

**Inaktivierung des ITGA2-Gens in der Maus:
Neue Erkenntnisse über die Funktion
des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors in vivo**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Olaf Holtkötter

aus Wesseling

2002

Berichterstatter:

Prof. Dr. Krieg

PD Dr. Waffenschmidt

Prof. Dr. Sterner

Tag der mündlichen Prüfung:

06.05.2002

Für Ulrike und Anna

1 EINLEITUNG	1
1.1 Zelladhäsion und Integrine.....	1
1.1.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle	1
1.1.2 Die Integrinfamilie.....	1
1.2 Das $\alpha 2\beta 1$-Integrin.....	5
1.2.1 Aufbau und Funktion des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins.....	5
1.2.2 In vivo-Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in Säugetieren.....	7
1.3 Prozesse der kutanen Wundheilung als Modelle $\alpha 2\beta 1$-vermittelter Zell-Matrix-Interaktionen	9
1.3.1 Aufbau der Haut	9
1.3.2 Wundheilung	9
1.3.3 Die Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors in der Hämostase.....	11
1.3.4 Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in der Reepithelialisierung	12
1.3.5 Die Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors in der Wundkontraktion	14
1.4 Geninaktivierung in der Maus	15
1.4.1 Konventionelle und gewebespezifische Geninaktivierung	15
1.4.2 Inaktivierung der Integrinuntereinheiten in der Maus	16
1.5 Zielstellung	18
1.6 Abkürzungen	20
2 ERGEBNISSE	21
2.1 Targeting-Strategien	21
2.1.1 Der ITGA2-Locus.....	21
2.1.2 Strategien der Geninaktivierung	21
2.2 Etablierung von ES-Zelllinien zur konventionellen Geninaktivierung	23
2.2.1 Der Vektor $p\alpha 2/lacZ$ -Neo.....	23
2.2.2 Analyse der mit $p\alpha 2/lacZ$ -Neo transfizierten ES-Zellen	24
2.2.3 Etablierung chimärer Tiere	25
2.3 Etablierung von ES-Zelllinien zur gewebespezifischen Geninaktivierung.....	26
2.3.1 Der Vektor $p\alpha 2flox$	26
2.3.2 Analyse der mit $p\alpha 2flox$ transfizierten ES-Zellen.....	27
2.3.3 Cre-vermittelte Deletion der Neo-Kassette in Klon 110	29
2.3.4 Etablierung chimärer Tiere	31
2.3.5 Klonierung des Vektors $p\alpha 2floxII$	32
2.3.5 Analyse der mit $p\alpha 2floxII$ transfizierten ES-Zellklone	35
2.3.6 Cre-vermittelte Deletion der Neo-Kassette in Klon 122	37
2.3.7 Erzeugung der ITGA2flox-Mauslinie.....	39
2.4 Die Mauslinien ITGA2flox und K14Cre.....	40
2.4.1 Charakterisierung der Mauslinie ITGA2flox	40
2.4.2 Erläuterungen zur Mauslinie K14Cre	41
2.5 Erzeugung und Analyse der Mauslinie ITGA2Δ.....	42
2.5.1 Erzeugung und erste Charakterisierung der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Mäuse	42
2.5.2 Analyse der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten	44
2.5.3 Analyse Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Fibroblasten.....	51

2.6 Erzeugung einer epidermisspezifischen Deletion des ITGA2-Gens	53
2.6.1 Erzeugung von Mäusen mit epidermisspezifischer Integrin- α 2-Defizienz	53
2.6.2 Analyse Integrin- α 2-defizienter Keratinozyten	56
2.7 Kreuzung der ITGA2flox-Linie mit Mäusen des Genotyps ITGA1^{-/-}	59
3 DISKUSSION	61
3.1 Zu den Targeting-Experimenten	61
3.1.1 Embryonale Stammzellen der Linien E14.1, E14.1.1 und IB-10.....	61
3.1.2 Rekombinationsereignisse in ES-Zellen	62
3.1.3 Cre-vermittelte Deletion der Neo-Kassette	63
3.2 Diskussion der Mauslinien	64
3.2.1 Die ITGA2flox-Mauslinie	64
3.2.2 Die ITGA2 Δ -Mauslinie	65
3.2.3 Die epidermisspezifische Deletion der Integrin- α 2-Untereinheit.....	67
3.2.4 Die Problematik der Mausmodelle	69
3.3 Die Bedeutung der Integrin-α2-Defizienz für Thrombozyten, Keratinozyten und Fibroblasten...	70
3.3.1 Der Verlust der Integrin- α 2-Untereinheit in Thrombozyten	70
3.3.2 Der Verlust des α 2 β 1-Integrins in Keratinozyten.....	72
3.3.3 Integrin- α 2-defiziente Fibroblasten in Kollagengelen.....	74
4 ZUSAMMENFASSUNG - ABSTRACT	76
4.1 Zusammenfassung	76
4.2 Abstract	77
5 MATERIAL UND METHODEN	78
5.1 Chemikalien, Materialien, Puffer	78
5.2 Molekularbiologische Methoden	79
5.2.1 Allgemeine Methoden	79
5.2.2 Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)	80
5.2.3 Northern Blot-Analyse.....	81
5.3 Protein-Analyse	83
5.3.1 Protein-Isolation	83
5.3.2 Western Blot-Analyse.....	83
5.3.3 Durchfluss-Zytometrie.....	84
5.4 Etablierung mutierter Mauslinien	85
5.4.1 ES-Zellkultur	85
5.4.2 Reinigung von DNA für die ES-Zelltransfektion	86
5.4.3 ES-Zelltransfektion.....	86
5.4.4 Isolation und Einfrieren von ES-Zellkolonien.....	86
5.4.5 Erzeugung chimärer Tiere	87
5.5 Zellisolation und -kultur	87
5.5.1 Kulturbedingungen	87
5.5.1 Maus-Fibroblasten	87
5.5.2 Maus-Keratinozyten	89
5.5.3 Maus-Thrombozyten.....	90
5.5.4 NMuMG, C2C12 und HaCaT.....	90

5.6 Funktionelle Analysen	90
5.6.1 Kontraktion von Kollagengelen.....	90
5.6.2 Adhäsion.....	91
5.6.3 Thrombozytenaggregation.....	92
5.7 Genotypisierung der Mäuse	92
5.7.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien.....	92
5.7.2 RFLP- und PCR-Analyse.....	92
6 LITERATUR	94

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion und Integrine

1.1.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle

Die Adhäsion von Zellen aneinander und an Bestandteile der extrazellulären Matrix bildet eine unbedingte Voraussetzung für die Existenz mehrzelliger Organismen. Vermittelt wird diese Adhäsion über Adhäsionsmoleküle, die das Zytoskelett der Zelle mit einem extrazellulären Liganden verbindet und der Zelle eine Kommunikation mit ihrer Umgebung ermöglicht.

Unter den Zelladhäsionsmolekülen finden sich vier große Gruppen, die Cadherine (Yap et al., 1997), die Immunglobuline (Walsh und Doherty, 1997), die Selektine (Kansas, 1996) und die Integrine (Hynes, 1992). Die Interaktion der Zelle mit den Proteinen der extrazellulären Matrix wird hauptsächlich durch die Integrine vermittelt (Hynes, 1999). Dabei beeinflussen sie - direkt oder indirekt - viele fundamentale Aspekte des Zellverhaltens, wie die Adhäsion, die Migration, das Zellwachstum und das Überleben der Zelle.

1.1.2 Die Integrinfamilie

Integrine sind nicht-kovalent assoziierte, heterodimere Zelloberflächenrezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen (van der Flier und Sonnenberg, 2001; Hynes, 1992). Zur Zeit sind in Vertebraten 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Rezeptoren bilden (Abb. 1-1). Der Variantenreichtum der Integrine wird durch das alternative Spleißen einiger Untereinheiten noch erhöht (Zur Übersicht: de Melker und Sonnenberg, 1999).

Die meisten Integrine sind vorwiegend oder ausschließlich Rezeptoren für Proteine der extrazellulären Matrix, vermitteln aber auch zum Teil die Bildung von Zell-Zellkontakten. Insbesondere für die Integrine der β 2-Familie, die auf Leukozyten exprimiert werden, ist die wichtigste Funktion die Bindung von Gegenrezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie zur Ausbildung heterotypischer Zell-Zellkontakte.

Einzelne Integrinrezeptoren zeigen eine Affinität zu mehreren Liganden, wobei verschiedene Integrinrezeptoren durchaus den gleichen Liganden binden können. Die Spezifität eines Integrins für verschiedene Liganden wird durch die Kombination der α - und β -Untereinheit festgelegt.

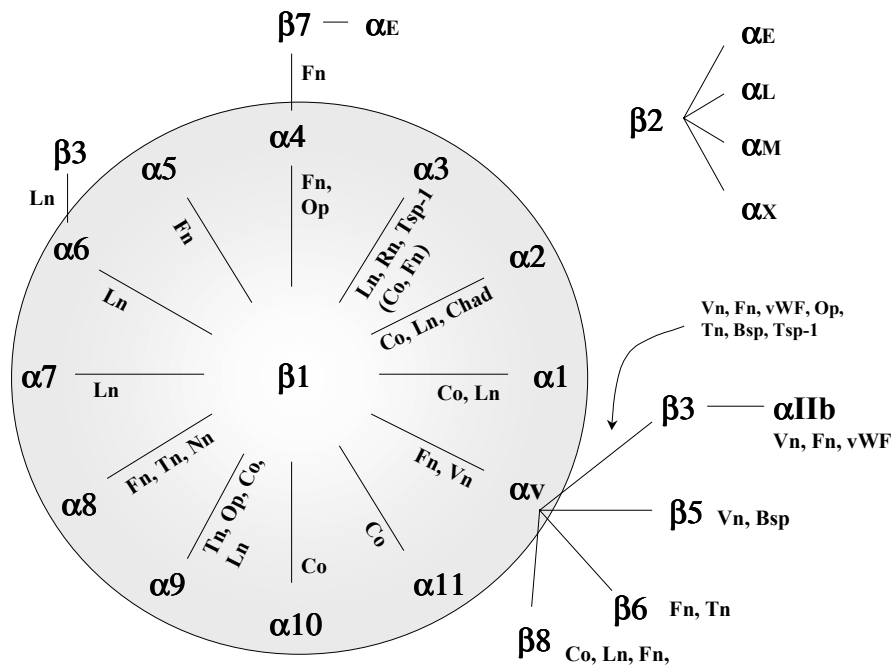


Abb. 1-1: Die Integrinfamilie. Gezeigt sind die bisher bekannten Assoziationen der α - und β -Untereinheiten. Die größte Unterfamilie ist die $\beta 1$ -Familie (im Kreis), zu der 12 Heterodimere gehören. Als Liganden der Integrine sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur Proteine der extrazellulären Matrix angegeben, lösliche Liganden und Gegenrezeptoren anderer Zellen sind nicht gezeigt. (Chad: Chondroadherin, Co: Kollagen, Fn: Fibronectin, Ln: Laminin, Nn: Nephronectin, Op: Osteopontin, Rn: Reelin, Tn: Tenascin, Tsp: Thrombospondin, Vn: Vitronectin, vWF: von Willebrand Faktor)

Struktur

Die Integrin- $\alpha\beta$ -Dimere besitzen einen extrazellulären globulären Kopf mit einem Durchmesser von etwa 70 Å, der aus den N-terminalen Regionen beider Untereinheiten gebildet wird (Erb et al., 1997). Dieser globuläre Kopf wird über einen etwa 100 Å langen stabförmigen Abschnitt mit einem Paar die Zellmembran durchspannenden Helices und den zytoplasmatischen C-Termini verbunden (Abb. 1-2). Die zytoplasmatischen Domänen der Integrine sind mit einer Länge von 30-50 AS vergleichsweise kurz und besitzen keine katalytische Aktivität. Eine Ausnahme in der Länge bildet die etwa 1000 AS lange zytoplasmatische Domäne der Integrin- $\beta 4$ -Untereinheit (Humphries, 1990).

Der distale extrazelluläre Teil der Integrin- α -Untereinheiten besteht aus sieben repetitiven Elementen, die sich zu einem β -Propeller aus sieben Blättern falten. Dieser bildet einen

Teil des globulären Kopfes, auf dem die Ligandenbindungsstelle zu finden ist (Springer, 1997). Auf der unteren Seite der Blätter 4 bis 7 befinden sich Bindungsstellen für zweiwertige Kationen (Humphries, 2000).

Die extrazelluläre Domäne einiger Integrin- α -Untereinheiten enthält darüber hinaus eine etwa 200 AS lange Insertion, die I- oder A-Domäne, die zwischen dem Flügel 2 und 3 des Propellers eingefügt ist. Diese Domäne enthält ein Mg^{2+} -abhängiges Bindungsmotiv (MIDAS – *metal ion dependent adhesion site motif*), das die Ligandenbindung beeinflusst (Plow et al., 2000). Für die Integrin- β -Untereinheit wird ebenfalls die Existenz einer I-Domäne diskutiert (Loftus und Liddington, 1997).

Posttranslational werden die Integrine durch die Glykosylierung der α - und β -Kette modifiziert. Außerdem werden nahezu alle Integrin- α -Untereinheiten, die keine I-Domäne besitzen, in eine große extrazelluläre Domäne und eine kleine Transmembrandomäne gespalten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben.

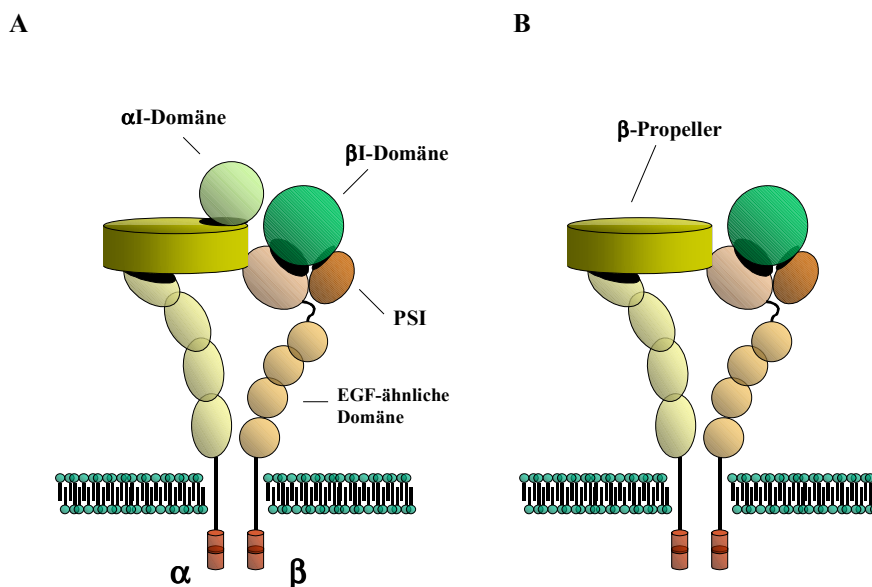


Abb. 1-2: Struktur der Integrine. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Heterodimere mit (A) oder ohne (B) I-Domäne der α -Kette. EGF: *Epidermal Growth Factor*, PSI: *plexins, semaphorins, integrins* (verändert übernommen aus Humphries, 2000)

Ligandenbindung und Inside-Out-Signaling

Integrine zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, ihr Adhäsionsvermögen schnell und reversibel zu modulieren (Sanchez-Mateos et al., 1996). Diese Fähigkeit wird allosterisch über Konformationsänderungen der Rezeptoruntereinheiten reguliert. Die Affinität der

Integrine zu ihren Liganden ist von den Zellen abhängig, von denen sie exprimiert werden (Kirchhofer et al., 1990), und wird außerdem durch zweiwertige Kationen reguliert, wobei Mg^{2+} und Mn^{2+} aktivierend und Ca^{2+} inhibierend wirkt (Masumoto und Hemler, 1993; Grzesiak et al., 1992; Staatz et al., 1989).

Darüber hinaus benötigen einige Integrine eine Aktivierung, um eine Affinität zu ihren Liganden zu entwickeln. Dieser Sachverhalt, der *inside-out-signaling* genannt wird, ist für das Integrin $\alpha IIb\beta 3$ detailliert untersucht. Dieses Integrin ist auf Thrombozyten zunächst inaktiv. Erst durch die Stimulierung der Thrombozyten über verschiedene Agonisten wird das $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin aktiviert und bindet Fibrinogen (Kieffer und Phillips, 1990).

Das zur Zeit diskutierte Modell des *inside-out-signaling* besagt, dass die zytoplasmatische Domäne der Integrin- α -Untereinheit direkt oder indirekt eine Interaktion der Integrin- β -Untereinheit mit Komponenten des Zytoskeletts stört. Durch die Bindung eines Liganden oder durch eine Signaltransduktion - über einen anderen Agonisten vermittelt - wird diese Inhibition aufgehoben und das Integrin ändert seine Konformation (Hughes et al., 1996; Vinogradova et al., 2000). Die Bindungsfähigkeit wird zusätzlich durch das *Clustern* der Integrine erhöht, das den Integrinen zu einer höheren Bindungsbereitschaft verhilft.

Intrazelluläre Interaktionen und Signaltransduktion

In adhärenenten Zellen bilden sich an den Stellen, wo die Zelle direkten Kontakt mit der extrazellulären Matrix hat, spezielle Strukturen aus, die sogenannten Fokalkontakte. An diesen Fokalkontakten kolokalisieren Integrine, Signalmoleküle und Moleküle des Zytoskeletts (Burrige und Fath, 1989).

Dementsprechend vergrößert sich die Zahl der identifizierten Proteine, die an die kurzen zytoplasmatischen Domänen der Integrine binden, stetig (Zur Übersicht: Hemler, 1998; Dedhar, 1999; Liu et al., 2000). Diese lassen sich aufgrund ihrer Funktion in drei Kategorien einteilen: (1) Zytoskelett-assoziierte Proteine (α -Actinin, Talin, Filamin u.a.), (2) Signalmoleküle (ILK, FAK u.a.) und (3) calciumbindende und akzessorische Proteine, die an der Aktivierung beziehungsweise der richtigen Faltung der Integrine beteiligt sein könnten.

Der Aufbau der Fokalkontakte verläuft nach einem hierarchischen Prinzip (Miyamoto et al., 1995). Das Adapterprotein Tensin und die Tyrosinkinase FAK (*Focal Adhesion Kinase*) sind die ersten Proteine, die an einen Integrincluster rekrutiert werden. Die Ligandenbindung des Integrinclusters führt zu einer weiteren Rekrutierung der Zytoskelettproteine Vinculin (Ungar et al., 1986), Talin (Horwitz et al., 1986) und α -

Actinin (Otey et al., 1990). Über diese Proteine werden die Fokalkontakte letztlich mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden.

Hemidesmosomen bilden die wesentliche Struktur der basalen Zelloberfläche epithelialer Zellen, die im Kontakt zu einer Basalmembran stehen. In Hemidesmosomen vermittelt das Integrin $\alpha6\beta4$ die Adhäsion an die Basalmembran. Im Gegensatz zu der für Integrine typischen Bindung an das Aktin-Zytoskelett, assoziieren die Hemidesmosomen über die Integrin- $\beta4$ -Untereinheit des $\alpha6\beta4$ -Integrinrezeptors mit den Intermediärfilamenten der Zelle (Sonnenberg et al., 1991; Green und Jones, 1996).

Neben den Proteinen, die an die zytoplasmatischen Domänen der Integrine binden, gibt es weitere Transmembran- oder membranassoziierte Proteine, die mit den Integrinen assoziieren und ihnen als Korezeptoren oder Stützproteine dienen (Porter und Hogg, 1998). Dazu zählen Mitglieder der Tetraspanine (Maecker et al., 1997), die an die extrazelluläre Domäne einiger Integrin- α -Untereinheiten binden, oder Rezeptorkinasen, wie der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und der *Platelet Derived Growth Factor Receptor* (PDGFR). Die Interaktion der Integrine mit den Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann zu einer effizienteren Vermittlung Adhäsions- und Wachstumsfaktor-induzierter Signale führen (Schneller et al., 1997).

Allerdings ist es auch eine fundamentale Eigenschaft der Integrine selbst, nach Bindung der extrazellulären Liganden Signale in das Zellinnere zu vermitteln (*outside-in-signaling*). Die Ligandenbindung und mechanischer Stress bewirken Phosphorylierungen von Proteinen der Fokalkontakte durch Mitglieder der Src-Proteinkinasefamilie. Es folgt eine Aktivierung stromabwärts liegender Signalmoleküle, wie z.B. Rho-ähnliche GTPasen, Phospholipase-C γ und die Mitglieder der *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK)-Kaskade (Schlaepfer und Hunter, 1998; Aplin et al., 1999), die auf die Integrität des Zytoskeletts und den Zellzyklus Einfluss nehmen und die integrinvermittelte Genregulation bewirken.

1.2 Das $\alpha2\beta1$ -Integrin

1.2.1 Aufbau und Funktion des $\alpha2\beta1$ -Integrins

Das humane $\alpha2\beta1$ -Integrin (CD49b, VLA-2, gp1aIIa) wurde erstmals als heterodimerer, glykosylierter Proteinkomplex einer unter reduzierenden Bedingungen 160 kDa schweren α -Untereinheit und einer 130 kDa schweren β -Untereinheit auf aktivierten T-Zellen

beschrieben (Hemler et al., 1983). Die Eigenschaften des Proteinkomplexes werden im wesentlichen durch die $\alpha 2$ -Untereinheit bestimmt.

Die Primärstruktur der humanen Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit wurde von Takada und Hemler (1989) aufgeklärt. Die cDNA enthält 5374 bp und codiert für 1181 AS. Einem 29 AS langen Signalpeptid folgt eine 1103 AS lange extrazelluläre Domäne, ein Transmembransegment und eine 22 AS lange zytoplasmatische Domäne. Wichtige funktionelle Einheiten sind drei metallbindende Domänen und die I-Domäne. Die entsprechende cDNA-Sequenz der Maus- $\alpha 2$ -Untereinheit wurde durch Edelman et al. (1994) aufgeklärt und zeigte für die daraus folgende Peptidsequenz eine 84 %ige Homologie zu der humanen AS-Sequenz. Die größte Divergenz fand sich in der I-Domäne und der zytoplasmatischen Domäne.

Die wesentlichen Elemente des Promotors des humanen Integrin- $\alpha 2$ -Gens (ITGA2-Gen) liegen in einem 1 kb großen Bereich vor dem Translationsstart (Zutter et al., 1994). Der Promotor ähnelt anderen Integrinpromotoren, indem er keine herkömmliche TATA- oder CAAT-Box besitzt (Prandini et al., 1988; Hickstein et al., 1992; Lopez-Cabrera et al., 1993). Stattdessen findet sich eine Konsensussequenz für die Transkriptionsinitiation, die sogenannte *initiator sequence* (Inr); diese Sequenz steuert die Transkriptionsinitiation in Verbindung mit naheliegenden SP1-Elementen (Spanopoulou et al., 1991). In dem Bereich des Transkriptionsstarts des ITGA2-Gens finden sich vier dieser SP1-Elemente. Die Identifizierung aktivierender und inhibierender Promotorbereiche gibt Hinweise auf eine differenzielle, zelltypspezifische Expressionsregulation des Integrin- $\alpha 2$ -Gens (Zutter et al., 1994).

Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin besitzt in Abhängigkeit von der exprimierenden Zelle eine Affinität zu verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix. Für Fibroblasten und Thrombozyten wurde Kollagen als Ligand identifiziert (Kunicki et al., 1988; Gullberg et al., 1989), auf Epithelzellen und Endothelzellen hingegen bindet das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vorzugsweise an Laminin-1 und Laminin-5 (Languino et al., 1989; Kirchhofer et al., 1990; Pfaff et al., 1994; Decline und Rousselle, 2001). Unter den Kollagenen zeigt das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin die größte Affinität zum Typ-I-Kollagen; daneben bindet es aber auch die Kollagene Typ II bis V (Kamata und Takada, 1994, Nykvist et al., 2000).

Als Bindungsmotiv für das Typ-I-Kollagen wird die Sequenz GFOGER diskutiert, die in der tripelhelikalen Quartärstruktur des Kollagens vorliegen muss (Knight et al., 2000; Emsley et al., 2000). Eine entsprechende Bindungssequenz findet sich in den N- und C-terminalen Bereichen sowie dem zentralen Abschnitt des Typ-I-Kollagens (Xu et al.,

2000). Die Bindungsstelle im heterotrimeren Laminin-5 wird hingegen auf dem kurzen Arm der $\gamma 2$ -Untereinheit des Laminins vermutet (Decline und Rousselle, 2001).

Die Bindung an Kollagen wird durch das auffälligste Strukturmerkmal der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit vermittelt, der I-Domäne. Neben der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit besitzen auch die übrigen Kollagenrezeptoren der Integrin- $\beta 1$ -Familie, das $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ und $\alpha 11\beta 1$, sowie die Integrine der $\beta 2$ -Familie ähnliche I-Domänen (Heino, 2000). *In vitro* konnte eine Bindung der I-Domäne an die Kollagene Typ I, II und XI gezeigt werden (Kamata et al., 1994; Tuckwell et al., 1994). Die Affinität wird durch Mn^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen erhöht und durch Ca^{2+} -Ionen gemindert. Antikörper, die die Bindung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors an Kollagen verhindern, besitzen in der Regel die I-Domäne als Epitop (Bank et al., 1989; Kamata et al., 1994).

1.2.2 *In vivo-Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in Säugetieren*

Da die Integrin- $\beta 1$ -Untereinheit konstitutiv und ubiquitär exprimiert wird (Brakebusch et al., 1997), ist die Bildung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors ausschließlich von der Expression der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit abhängig.

Die früheste Expression der Integrin- $\alpha 2$ -mRNA in der Mausentwicklung wurde etwa an Tag E7,5 in der späten Blastozyste, kurz vor der Implantation in den Uterus, detektiert (Sutherland et al., 1993). Eine umfassende Studie über die Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins nach der Implantation des Mausembryos wurde von Wu und Santoro (Wu und Santoro, 1994) durchgeführt. Das in dieser Arbeit beschriebene Expressionsmuster ist in Abbildung 1-3 wiedergegeben. Im Allgemeinen fand sich die Expression der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit spät in der Embryogenese und vorzugsweise auf Zellen, die sich in den späten Differenzierungsstadien befanden; beispielsweise exprimierten hypertrophe Chondrozyten und tubuläre Endothelzellen die $\alpha 2$ -Untereinheit. Zellen, die die Integrinuntereinheit exprimierten, waren aktiv an der Bildung oder Reorganisation der extrazellulären Matrix beteiligt.

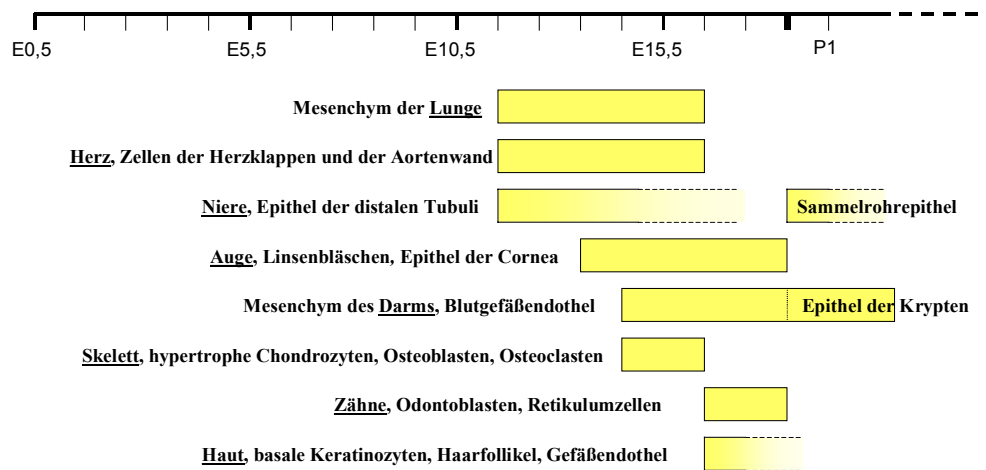


Abb. 1-3: Expression des $\alpha2\beta1$ -Integrins während der murinen Embryonalentwicklung. Darstellung der $\alpha2\beta1$ -Expressionsdaten von Wu und Santoro (1994). E0,5-E15,5: Tage der Embryonalentwicklung, P1: erster postnataler Tag.

Eine Analyse der $\alpha2\beta1$ -Expression in adultem humanen Gewebe wurde von Zutter und Santoro (Zutter und Santoro, 1990) mit Hilfe immunhistochemischer Methoden durchgeführt. Sie zeigte eine weitverteilte Expression des Rezeptors (Tab. 1-2). Der Rezeptor wurde auf Fibroblasten und Endothelzellen des ganzen Körpers exprimiert, wenn auch die Expression auf den Fibroblasten schwach war. Insbesondere konnte das Integrin auf epithelialen Zellen verschiedener humaner Gewebe nachgewiesen werden.

Tab. 1-2: Expression des $\alpha2\beta1$ -Integrin in adultem humanen Gewebe (Zutter und Santoro, 1990).

<i>Expression des $\alpha2\beta1$-Integrins auf</i>	<i>Keine Expression des $\alpha2\beta1$-Integrins auf</i>
Fibroblasten	Glatten Muskelzellen
Endothelzellen	Skelettmuskelzellen
Astrozyten	Peripheren Nerven
Schwann Zellen	Neuronen
Dendritische Zellen	Ganglion Zellen
(Follikulär, Thymisch)	Lymphozyten
Epithelzellen	(Lymphknoten, Tonsillen, Milz und Thymus)
(Haut, Intestinaltrakt, Lunge, Brust-, Schweißdrüse, Blase u.a.)	

1.3 Prozesse der kutanen Wundheilung als Modelle $\alpha 2\beta 1$ -vermittelter Zell-Matrix-Interaktionen

1.3.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ der Säugetiere. Sie bedeckt die äußere Körperoberfläche und übernimmt dabei vielfältige Funktionen, angefangen bei dem Schutz vor schädigenden äußeren Einflüssen, der Thermoregulation und Regulation des Wasserhaushalts bis hin zu metabolischen und immunologischen Funktionen. Die Haut besteht aus zwei hauptsächlichlichen Kompartimenten, der Epidermis (Oberhaut) und der Dermis (Corium, Lederhaut). Funktionell wird noch die Subcutis (Unterhaut), eine lockere Bindegewebsschicht, mit zur Haut gezählt. Epidermis und Dermis werden durch die Basalmembran voneinander getrennt.

Die Epidermis wird in erster Linie von Keratinozyten gebildet, die von der an der Basalmembran sitzenden Schicht, der Basalzellschicht, im Zuge einer fortschreitenden Differenzierung nach außen wandern, um schließlich als *Stratum Corneum* den protektiven Abschluss zur Umgebung zu formen.

Die Dermis ist im Vergleich zu anderen Geweben recht zellarm. Der hauptsächlichliche Zellanteil besteht in Fibroblasten; darüber hinaus finden sich mikrovaskuläre Endothelzellen, Mastzellen, glatte Muskelzellen, und Epithelzellen der Hautanhangsgebilde. Die Zellen sind eingebettet in eine extrazelluläre Matrix aus vornehmlich fibrillären Typ-I-Kollagen (~ 80 %) und Typ-III-Kollagen.

1.3.2 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein überlebenswichtiger Prozess zu Wiederherstellung der Integrität der Haut. Sie kann in drei zeitlich überlappende Phasen eingeteilt werden, die Entzündung, die Gewebeneubildung (Reepithelialisierung und Granulation), und die Phase der Matrixreorganisation (Zur Übersicht: Singer und Clark, 1999).

Entzündungsphase

Eine Verletzung geht in der Regel mit einer Zerstörung von Gefäßen einher. Die Hämostase führt zu einem Wundverschluss über die Bildung eines Pfropfes aus vernetztem Fibrin, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin (Gailit and Clark, 1994) und darin eingeschlossenen Thrombozyten. Das Gerinnsel ersetzt als provisorische Matrix das

zerstörte Gewebe, verhindert einen weiteren Flüssigkeitsverlust und bildet eine Leitstruktur für einwandernde Zellen. Die im Gerinnsel eingeschlossenen Thrombozyten setzen Wachstumsfaktoren frei (PDGF, TGF- β , TGF- α , IGF-I), die die folgenden Wundheilungsprozesse einleiten. Neutrophile Granulozyten und Monozyten wandern in das Wundareal, bekämpfen Infektionen und beteiligen sich am Debridement der Wunde. Monozyten verbleiben als Wundmakrophagen in der Wunde und organisieren die folgende Angiogenese und Fibroblastenproliferation zur Ausbildung des Granulationsgewebes.

Reepithelialisierung und Granulation

Nach der Verletzung beginnen Keratinozyten von den Wundrändern oder aus verbliebenen Überresten der Haarfollikel in das Wundbett einzuwandern. Die Einwanderung der Keratinozyten ist verbunden mit einer Änderung des Zellphänotyps und wird von der Expression von Proteasen begleitet.

Zeitgleich mit der beginnenden Reepithelialisierung findet die Ausbildung des Granulationsgewebes statt. Das Granulationsgewebe wird von Fibroblasten gebildet, die am Rande des Wundbettes proliferieren und in die provisorische Matrix einwandern. Dort beteiligen sie sich am Abbau nekrotischen Gewebes und produzieren eine neue Matrix aus Fibronectin und Kollagen; die Wunde wird kontrahiert.

Matrixreorganisation

Nach dem epithelialen Wundschluss finden in dem darunterliegenden Bindegewebe noch für einen längeren Zeitraum Umbauprozesse statt. Ein großer Teil der Zellen des Granulationsgewebes geht durch Apoptose unter, es bleibt eine zellarme und matrixreiche Narbe zurück.

Die verschiedenen Prozesse der Wundheilung, wie die Ausbildung des hämostatischen Verschlusses, Entzündung, Angiogenese, Bildung des Granulationsgewebes, Matrixumbau und Reepithelialisierung können auf wenige zelluläre Funktionen reduziert werden: Migration, Proliferation, Synthese, Ablagerung und Degradation extrazellulärer Matrix. Diese Funktionen basieren auf koordinierten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, gesteuert durch Zytokine und durch die extrazelluläre Matrix selbst. Entsprechend seiner Funktion als Bindeglied zwischen der extrazellulären Matrix und der Zelle wurde *in vitro* die Beteiligung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors an nahezu allen wundheilungsrelevanten Prozessen gezeigt. Die Rolle des Rezeptors in Zell-Matrix-Interaktionen während der

Hämostase, der Reepithelialisierung und der Wundkontraktion soll im folgenden näher erläutert werden.

1.3.3 Die Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors in der Hämostase

Als Hämostase wird der Vorgang der physiologischen Blutstillung bezeichnet. Die Hämostase verläuft in mehreren Schritten. Die **primäre Hämostase** beginnt nach der initialen Verletzung mit einer Vasokonstriktion. Thrombozyten adhären an die freiliegende, subendotheliale extrazelluläre Matrix und werden aktiviert. Die Aktivierung hat eine Änderung der Zellform und die Ausschüttung sekretorischer Granula zur Folge. Innerhalb weniger Minuten rekrutieren und aktivieren die sezernierten Faktoren (u.a. Thromboxan und ADP) weitere Thrombozyten, deren Aggregation in einem hämostatischen Pfropf resultiert.

In der **sekundären Hämostase** wird Thromboplastin (Gerinnungsfaktor III) auf der Membran von Endothelzellen nahe der vaskulären Läsion präsentiert und bewirkt im Zusammenspiel mit den von den Thrombozyten ausgeschütteten Komponenten die Aktivierung der Gerinnungskaskade, die zu der Aktivierung des Thrombins führt. Thrombin überführt zirkulierendes lösliches Fibrinogen durch enzymatische Spaltung in Fibrin, das lokal abgelagert wird und polymerisiert. Polymerisiertes Fibrin bildet mit den aggregierten Thrombozyten einen festen, permanenten Verschluss. Um den Verschluss auf den Ort der Gefäßläsion zu beschränken, werden die ersten antithrombotischen Mechanismen aktiviert.

Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin wurde bereits 1988 als Kollagenrezeptor der Thrombozyten beschrieben (Kunicki et al., 1988). Eine zentrale Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins wurde aufgrund der Beobachtung von Patienten postuliert, die an einer hämorrhagischen Diathese litten und eine reduzierte Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins zeigten (Nieuwenhuis et al., 1985, Kehrel et al., 1988).

Durch die Eigenschaft, Kollagen zu binden, ist das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin an der primären Hämostase beteiligt, indem es die Adhäsion an subendotheliales Kollagen vermittelt und dadurch an der Bildung des hämostatischen Verschlusses teilhat (Verkleij et al., 1998; Kamiguti et al., 1997; Saelman et al., 1994). Neben dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin existieren noch weitere Rezeptoren, die eine Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen vermitteln. Außer

GPIb-V-IX und dem Integrin α Ib β 3, die eine indirekte Bindung an das Kollagen über den von-Willebrand-Faktor (vWF) ermöglichen, ist insbesondere der Rezeptor GPVI von Bedeutung, der direkt mit Kollagen interagiert. GPVI ist ein Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (Clemetson et al., 1999) und findet sich nicht-kovalent assoziiert mit der Fc γ -Kette, die in Folge einer Kollagenbindung des GPVI-Rezeptors Signale in humanen und murinen Thrombozyten transduziert (Tsuji et al., 1997; Nieswandt et al., 2000).

Das lange akzeptierte Modell der Thrombozyten-Adhäsion an Kollagen besagt, dass die initiale Anheftung der Thrombozyten über die GPIb-vWF-Interaktion mit Kollagen stattfindet. Die anschließende stärkere Adhäsion, die eine weitere Bewegung der Thrombozyten verhindert, wird durch das α 2 β 1-Integrin vermittelt; dadurch wird der Kontakt des GPVI-Rezeptors zum Kollagen unterstützt, der zu einer Aktivierung der Thrombozyten führt.

Untersuchungen von Mausthrombozyten mit fehlender Integrin- β 1-Untereinheit scheinen dieses Modell jedoch zu widerlegen (Nieswandt et al., 2001a). Diese Thrombozyten, denen sämtliche Integrine der β 1-Familie fehlen, adhären weiterhin an fibrilläres Kollagen und werden dadurch aktiviert. Damit wäre GPVI der für die Adhäsion an Kollagen und die damit verbundene Aktivierung entscheidende Rezeptor.

1.3.4 Das α 2 β 1-Integrin in der Reepithelialisierung

Humane Keratinozyten exprimieren eine Reihe verschiedener Integrine, darunter das α 2 β 1, das α 3 β 1 und das α 6 β 4. Die Expression der Integrine ist auf die proliferative basale Keratinozytenschicht beschränkt (Hertle et al., 1991; Zambruno et al., 1991; Peltonen et al., 1989). Während das α 6 β 4-Integrin als Bestandteil der Hemidesmosomen ausschließlich basal zu finden ist, sind die Integrine α 2 β 1 und α 3 β 1 vorwiegend über die laterale Zelloberfläche verteilt (Marchisio et al., 1991; Adams und Watt, 1991). Die Ausbildung von Zell-Zellkontakten der Keratinozyten über eine homophile Bindung der α 3 β 1-Rezeptoren (Sriramarao et al., 1993) und eine heterophile Bindung der α 3 β 1 und α 2 β 1-Rezeptoren wird diskutiert (Carter et al., 1990; Symington et al., 1993). Andererseits ermöglichen diese Rezeptoren auch eine Bindung des im interzellulären Raum abgelagerten Laminins (Marchisio et al., 1991).

Die Verletzung der Haut führt zu einer Änderung des Integrinrepertoires und der Integrinverteilung auf der Oberfläche der am Wundrand ansässigen Keratinozyten (Larjava

et al., 1993; Cavani et al., 1993). Die Integrine $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$ sind jetzt in der mit der extrazellulären Matrix in Kontakt stehenden basalen Zellfläche der Keratinozyten zu finden. Die Expression der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 5$, Rezeptoren für Fibronektin und Vitronektin, wird induziert; Hemidesmosomen werden aufgelöst, wodurch die starke Verankerung der basalen Keratinozyten an der Basalmembran verloren geht, und das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin findet sich diffus auf der Keratinozytenmembran verteilt.

In vitro-Modelle für die Reepithelialisierung betrachten typischerweise die Migration von Keratinozyten über Bestandteile der provisorischen Matrix. In den migrierenden Keratinozyten heilender Wunden wurde eine verstärkte Expression von Laminin-5 beschrieben (Goldfinger et al., 1999; Lampe et al., 1998) und es konnte in *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden, dass endogen produziertes und nicht prozessiertes Laminin-5 eine Voraussetzung für eine effiziente Migration ist (Decline und Rousselle, 2001; Nguyen et al., 2000a; Nguyen et al., 2000b; Goldfinger et al., 1999). Die Migration wird durch eine transiente Bindung des $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptors an die $\gamma 2$ -Untereinheit des heterotrimeren Laminin-5 vermittelt (Decline und Rousselle, 2001) und geht außerdem mit einer Spaltung der $\gamma 2$ -Untereinheit des Laminins durch die Matrix-Metalloproteinase (MMP)-2 und die membrangebundene Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP einher (Koshikawa et al., 2000; Giannelli et al., 1997).

Die Migration von Keratinozyten über eine Matrix aus Typ-I-Kollagen verlangt die Expression und Aktivierung der MMP-1 (Sudbeck et al., 1997; Pilcher et al., 1997). Die Expression der MMP-1 wird durch die Bindung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins an das Kollagen induziert (Pilcher et al., 1997) und in den migrierenden Keratinozyten bildet sich ein Komplex aus der I-Domäne der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit, der proMMP-1 und fibrillärem Typ-I-Kollagen (Dumin et al., 2001). Vermutlich binden die Keratinozyten zunächst über das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin an das fibrilläre Kollagen und erst die Degradation des Kollagens durch die MMP-1 ermöglicht die weitere Migration der Keratinozyten.

Die dauerhafte Expression der MMP-1 während der Keratinozytenmigration über Typ-I-Kollagen wird über eine autokrine Aktivierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) bewirkt (Pilcher et al., 1999), der mit dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin assoziiert (Moro et al., 1998). Diese Interaktion könnte zu einer erhöhten Aktivität des EGF-Rezeptors führen und eine dauerhafte Signaltransduktion bewirken (Schneller et al., 1997).

1.3.5 Die Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors in der Wundkontraktion

Wenige Tage nach einer Verletzung der Haut beginnen dermale Fibroblasten zu proliferieren, wandern in die provisorische Matrix ein und synthetisieren eine neue kollagenreiche Matrix, das Granulationsgewebe. Durch die Interaktion der Fibroblasten mit den Bestandteilen des Granulationsgewebes beginnt die Kontraktion der Wunde (Grinnell, 1994).

Modellsysteme zur Untersuchung der Wundkontraktion verwenden Fibroblasten, die in einer dreidimensionalen Matrix aus Kollagen oder Fibrin kultiviert werden (Bell et al., 1979). In diesen *in vitro*-Modellen wird die Matrix zu einem Bruchteil der ursprünglichen Größe kontrahiert.

Die Kontraktion einer dreidimensionalen Matrix aus Typ-I-Kollagen und humanen Fibroblasten (Kollagengel) wird durch das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelt (Klein et al., 1991; Schiro et al., 1991). Die Kontraktion des Gels wird von einer Änderung des Expressionsprofils der Fibroblasten begleitet. Während das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin durch den Kontakt zu Kollagen Typ I-Fibrillen die Synthese des Typ-I-Kollagens reduziert, führt die Bindung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins an Kollagen Typ I zu einer Induktion der MMP-1, MMP-13 und MT1-MMP Expression (Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995; Ravanti et al., 1999; Zigrino et al., 2001). Außerdem wird auch die Expression der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit gesteigert, was zu einem größeren $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptorbesatz der Zelloberfläche führt (Klein et al., 1991).

Diese Änderungen in der Genexpression sind mit der Aktivierung verschiedener Signalwege verknüpft. Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin aktiviert die p38 α MAPK, die ihrerseits die Expression der MMP-13 und die Synthese des Typ-I-Kollagens induziert; die antagonistische Wirkung des $\alpha 1\beta 1$ -Integrins auf die Kollagensynthese führt allerdings letztlich zu der in den Gelsystemen gefundenen Repression der Kollagensynthese. Für die p38 α -Aktivierung ist die zytoplasmatische Domäne der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit essentiell (Ivaska et al., 1999). Die durch das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin induzierte Expressionssteigerung der MMP-1 wird hingegen über eine Aktivierung der *Protein Kinase C- ζ* (PKC- ζ) und *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) vermittelt (Xu et al., 1998). Die Regulation der MMP-1-Expression wird zusätzlich durch einen p38 α -abhängigen antagonistischen Signalweg beeinflusst (Xu et al., 2001).

Im Gegensatz zur Aktivierung des p38 MAPK Signalweges durch das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, wird durch das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin der Erk MAPK-Signalweg aktiviert (Wary et al., 1996; Pozzi et al., 1998), der an der Steuerung der Zellproliferation beteiligt ist (Pozzi et al., 1998).

1.4 Geninaktivierung in der Maus

1.4.1 Konventionelle und gewebespezifische Geninaktivierung

Die zielgerichtete Inaktivierung eines Gens im Mausmodell bietet die Möglichkeit, die Funktion des Gens *in vivo* zu charakterisieren. Solche Mauslinien können aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erzeugt werden, in denen das Gen durch *Gene Targeting*-Experimente modifiziert wurde (Soriano, 1995). Die Modifikation des Gens in den ES-Zellen erfolgt durch die Transfektion eines *Targeting*-Vektors, der durch homologe Rekombination in den gewünschten Locus integriert.

Targeting-Vektoren, die für eine konventionelle Geninaktivierung bestimmt sind, tragen einen zum Zielgen homologen Sequenzabschnitt, in den eine Mutation (häufig in Form eines Selektionsmarkers) eingeführt wurde. Die Mutation hat die Inaktivierung des Gens nach der homologen Rekombination in ES-Zellen zur Folge. Dieser Ansatz führt bei der Inaktivierung von Genen, die eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung haben, häufig zu einem früh lethalen Phänotyp, wodurch die Analyse der *in vivo*-Funktion des entsprechenden Genproduktes erschwert wird.

Dieses Problem kann durch die Verwendung des Cre/loxP-Systems umgangen werden, das eine gewebe- und zeitspezifische Geninaktivierung im Mausmodell ermöglicht (Gu et al., 1994). Die Cre-Rekombinase (Cre: *causes recombination*) stammt aus dem Bakteriophagen P1 und vermittelt die Rekombination zweier loxP-Sequenzen (*loxP: locus of crossover in P1*) *in vitro* und *in vivo* (Sternberg and Hamilton, 1981; Abremski and Hoess, 1984). Die loxP-Sequenzen bestehen aus zwei 13 bp langen invertierten Wiederholungen, die eine 8 bp lange *Spacer*-Region flankieren. Diese Region bestimmt die Orientierung der loxP-Sequenz. Die Cre-vermittelte Rekombination zweier aufeinanderfolgender loxP-Sequenzen gleicher Orientierung führt zur reversiblen Exzision und Zirkularisierung des loxP-flankierten Abschnitts. Auf jedem der beiden entstandenen Rekombinationsprodukte verbleibt eine loxP-Sequenz.

Wird durch ein *Gene Targeting* in ES-Zellen ein Zielgen mit loxP-Sequenzen so flankiert, dass die Sequenzen nicht in codierenden oder expressionsregulierenden Bereichen liegen,

lassen sich aus diesen Zellen Mauslinien erzeugen, die weiterhin die endogene Expression des Zielgens zeigen. Erst durch das Einkreuzen von transgenen Mauslinien, die die Cre-Rekombinase unter einem gewebespezifischen Promotor exprimieren, wird der *loxP*-flankierte Bereich in den Geweben, in denen der Promotor aktiv ist, deletiert und das Gen damit inaktiviert.

1.4.2 Inaktivierung der Integrinuntereinheiten in der Maus

Von den bekannten 8 β -Untereinheiten und 18 α -Untereinheiten wurden bereits 7 β -Untereinheiten und 12 α -Untereinheiten inaktiviert (Tab. 1-2). Für die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit wurde ein lethaler Phänotyp in verschiedenen Übersichtsartikeln erwähnt (De Arcangelis und Georges-Labouesse, 2000; Sheppard, 2000), die eigentliche Geninaktivierung wurde jedoch bisher nicht veröffentlicht.

Tab 1-2: Übersicht über die durch die Inaktivierung der Integrinuntereinheiten in der Maus erzeugten Phänotypen.

Integrinuntereinheit	Phänotyp
$\alpha 1$	Kein offensichtlicher Phänotyp; Erhöhte Kollagensynthese in Fibroblasten
$\alpha 3$	P.I.; gestörte Lungen-/Nierenentwicklung
$\alpha 4$	E.I.; Herzdefekte
$\alpha 5$	E.I.; mesodermale Abnormalitäten
$\alpha 6$	P.I.; Blasenbildung der Haut
$\alpha 7$	Muskeldystrophie
$\alpha 8$	P.I.; nicht oder schlecht ausgebildete Nieren
$\alpha 9$	Lethal innerhalb zwei Wochen p.n.; bilateraler Chylothorax
αV	E.I./P.I.; Fehlerhafte Gefäß- und ZNS-Entwicklung
αL	Gestörte Tumorabstoßung und Leukozytenrekutierung
αM	Gestörte Phagozytose/ Apoptose der Neutrophilen, Adipositas
αE	Reduzierte Zahl intestinaler und vaginaler Lymphozyten
$\beta 1$	Lethal zum Zeitpunkt der Implantation
$\beta 2$	Haut-Infektion, gestörte Leukozytenrekutierung
$\beta 3$	Gestörte Thrombozytenaggregation, Osteosklerose
$\beta 4$	P.I.; Blasenbildung der Haut
$\beta 5$	Kein offensichtlicher Phänotyp
$\beta 6$	Makrophageninfiltration der Haut und Lunge
$\beta 7$	Fehlende Lymphozyten im darmassoziierten Gewebe

P.I.: Perinatal lethal, E.I.: Embryonal lethal, p.n.: postnatal, ZNS: Zentrales Nervensystem, (De Arcangelis und Georges-Labouesse, 2000; Sheppard, 2000)

Die verschiedenen Mauslinien zeigen, trotz der überlappenden Verteilung und Ligandenspezifität der Integrine, unterschiedliche Phänotypen (Zur Übersicht: Sheppard, 2000). Das Verständnis der Funktion der Integrine und ihrer Fähigkeit, den Ausfall eines

einzelnen Integrinrezeptors zu kompensieren, wurde durch die Analyse von Mauslinien mit mehreren inaktivierten Integrinuntereinheiten noch erhöht (Yang et al., 1999; De Arcangelis et al., 1999; Zur Übersicht: De Arcangelis und Georges-Labouesse, 2000).

1.5 Zielstellung

Basierend auf *in vitro*-Untersuchungen wird dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin eine wichtige Beteiligung an Zell-Matrix-Interaktionen zugesprochen. Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin fungiert hauptsächlich als Rezeptor für Kollagen, auf einigen Zelltypen aber auch als Rezeptor für Laminin. Der Rezeptor vermittelt auf epithelialen und mesenchymalen Zellen die Adhäsion an und Migration auf kollagenen Substraten und die Kontraktion dreidimensionaler Kollagenmatrizes; dabei induziert der Rezeptor die Expression und Aktivierung verschiedener Matrix-Metalloproteinasen.

Diese Prozesse bilden die Grundlage für Gewebeumbauvorgänge, die zum Beispiel während der Embryogenese und bei der Reparatur von Gewebeerletzungen (Wundheilung) eine große Rolle spielen. Aus *in vitro*-Modellen erhaltene Daten entstammen allerdings einer vergleichsweise definierten experimentellen Umgebung, die die Komplexität des Organismus nur unzureichend wiedergibt.

Im Zuge dieser Arbeit sollte die Bedeutung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins *in vivo* durch die Etablierung von Mauslinien bestimmt werden, in denen das Gen für die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit (ITGA2-Gen) inaktiviert ist. Die Inaktivierung dieser Untereinheit führt zwangsläufig zu einem Verlust des funktionellen $\alpha 2\beta 1$ -Proteinkomplexes.

Die Inaktivierung des ITGA2-Gens sollte über zwei Ansätze erfolgen. In einem konventionellen Ansatz sollte das Gen durch die Insertion eines Reportergens unterbrochen werden, dessen Expression durch den endogenen Promotor des ITGA2-Gens gesteuert wird. Dieser Ansatz erlaubt bereits in heterozygoten Mutanten eine detaillierte Expressionsanalyse des ITGA2-Gens während physiologischer und pathologischer Vorgänge in der Maus.

Da die *in vitro*-Daten für den kompletten Verlust des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins *in vivo* einen lethalen Phänotyp nicht ausschließen, sollte in einem konditionalen Ansatz durch Verwendung des Cre/loxP-Systems eine gewebespezifische Inaktivierung des ITGA2-Gens ermöglicht werden.

Für beide Ansätze sollten zunächst ES-Zelllinien mit den gewünschten Mutationen etabliert und damit mutante Mauslinien erzeugt werden. Da für die komplette Inaktivierung des ITGA2-Gens ein lethaler Phänotyp erwartet wurde, sollte in der Mauslinie zur

gewebespezifischen Inaktivierung des ITGA2-Gens eine auf die Epidermis begrenzte Deletion erzeugt werden.

Die Analyse der kompletten Geninaktivierung wurde von dem auftretenden Phänotyp abhängig gemacht, sollte aber in jedem Fall eine Beschreibung des Entwicklungsverlaufes und eine anatomische Charakterisierung der Integrin- α 2-defizienten Tiere beinhalten. Soweit möglich, sollten außerdem verschiedene Zelltypen (Fibroblasten, Thrombozyten) funktionellen Untersuchungen zugänglich gemacht werden, um die Bedeutung des Verlustes des α 2 β 1-Integrins für diese Zellen herauszuarbeiten.

An den Tieren mit einer epidermisspezifischen Inaktivierung des ITGA2-Gens sollte zunächst eine histologische Analyse der Haut erfolgen. Die Keratinozyten dieser Tiere sollten ebenfalls funktionellen Assays zugeführt werden. Letztlich sollte in diesen Tieren der Ablauf der Reepithelialisierung im Zuge der Wundheilung untersucht werden.

1.6 Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
Bq	Becquerel
cDNA	komplementäre DNA
cM	Zentimorgan
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
HSV-tk	Herpes-Simplex-Virus Thymidin-Kinase
IGF	Insulinlike Growth Factor
ILK	Integrin Linked Kinase
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Neo	Neomycin-Resistenzgen
OAc	Acetat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelsträngig
TGF	Transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit (Enzymeinheit)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

2 Ergebnisse

2.1 Targeting-Strategien

2.1.1 Der ITGA2-Locus

Die Entwicklung von *Targeting*-Strategien zur Inaktivierung eines Gens verlangt eine hinreichende Kenntnis über den Locus des Zielgens. Auf der Grundlage dieser Kenntnis werden die Bereiche des Gens für die Klonierung des *Targeting*-Vektors ausgewählt, in denen die Einführung von Mutationen eine Geninaktivierung ermöglichen.

Der Locus des murinen ITGA2-Gens wurde auf dem Maus-Chromosom 13 bei 65 cM kartiert (*Mouse Genome Database (MGD)*; Blake et al., 2001) und in Teilen bereits näher charakterisiert (Holtkötter, Diplomarbeit 1997). Eine λ -Phagenbank, die Träger genomischer DNA der Mauslinie 129SvJ war, wurde mit einer cDNA-Sonde durchmustert. Die Sonde entsprach etwa den ersten drei Exons des ITGA2-Gens und führte zu den Phagenklonen 6, 8, 9 und 12, die eingehender charakterisiert wurden.

Durch die Restriktionsanalyse und teilweise Sequenzierung der Phagenklone 9 und 12 konnten detaillierte Informationen über den proximalen Promotorbereich, das erste Exon und das erste Intron des Gens gewonnen werden, während der Phagenklon 8 Auskunft über die Exon-Intron-Grenzen des zweiten Exons und Klon 6 Auskunft über die Exon-Intron-Grenzen und Lage des dritten und vierten Exons erteilte. Der gesamte analysierte Bereich überspannte eine Länge von etwa 43 kb, wobei es aber aufgrund fehlender Überlappung der genomischen Klone nicht möglich war, die kompletten Intronbereiche zwischen den codierenden Bereichen zu kartieren.

2.1.2 Strategien der Geninaktivierung

Die Grundlage für die Klonierung der *Targeting*-Vektoren bildeten Fragmente der Phagenklone 9 und 12, die in den Vektor pBluescript KS II subkloniert wurden. Diese Fragmente trugen den Promotorbereich, das erste Exon sowie einen Teil des ersten Introns des Integrings (Abb. 2-1).

Die Strategie der **konventionellen Geninaktivierung** bestand darin, in den Translationsstart des Integrings das *lacZ*-Gen als Reportergen einzufügen. Auf diese Weise wird die Expression des Reportergens durch den endogenen Promotor des ITGA2-

Gens gesteuert. Das Stop-Codon im Reporter-gen verhindert die Translation des restlichen Integringens. Diese Strategie erlaubt eine zusätzliche Expressionsstudie des ITGA2-Gens im Mausmodell.

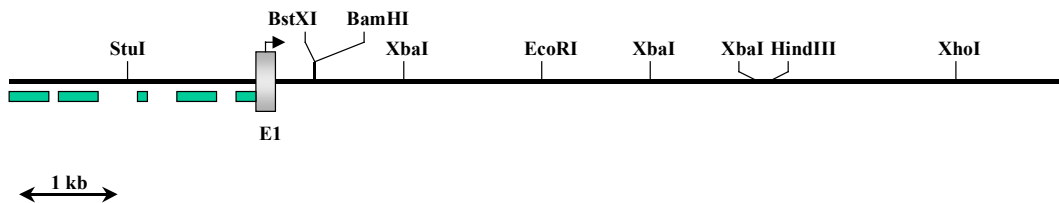


Abb. 2-1: Übersicht über den ITGA2-Locus im Bereich des ersten Exons. Der gezeigte Abschnitt, der komplett durch die λ -Phagenklone 9 und 12 abgedeckt wurde, bildete die Grundlage für die Klonierung der *Targeting*-Vektoren. Im ersten Exon (E1) befindet sich der Translationsstart (Pfeil). Gezeigt ist die Position einiger wesentlicher Restriktionsschnittstellen. Wichtige Regionen des Promotors sind durch darunter liegende Boxen hervorgehoben.

Für die **gewebespezifische Geninaktivierung** sollte das Cre/loxP-System (Gu et al., 1994) verwendet werden, das eine gewebe- und zeitspezifische Geninaktivierung ermöglicht. Auf diese Weise kann ein eventuell früh lethaler Phänotyp der Kompletteinaktivierung umgangen werden.

Die Flankierung des ersten Exons mit *loxP*-Erkennungsstellen erlaubt eine spätere Deletion des flankierten Bereiches durch das Enzym Cre-Rekombinase. Dadurch werden neben einem Teil des Promotors der ursprüngliche Translationsstart bei bp 113 und der codierende Bereich für die ersten 20 Aminosäuren des 26 Aminosäuren langen Signalpeptids deletiert (Abb. 2-2). Für den Fall, dass trotz einer Deletion der für die Expression des ITGA2-Gens wesentlichen Promotorbereiche die Transkription des restlichen Gens initiiert wird, liegt der nächste potentielle Translationsstart im zweiten Exon bei bp 195 (Nummerierung der cDNA). Die Sequenz ab diesem Start-Codon codiert allerdings aufgrund einer Leseraster-Verschiebung nicht mehr für die Integrin- α 2-Untereinheit.

```

1  gaattccaaa ctctccgta cagtttctgg aaagtctagc ctctgggagc cctggatcga
61  ggatactgtg tgcaccccca gagcacttta gattccccag cgcagaccca agatgggacc
                                     M G P
121  gggacaggca gggggcgcgc tcctgctgca gctgctaata ctagttcaag gtattttgaa
      G Q A G G A L L L Q L L M L V Q G I L N
181  ttgtctggcg tataatgttg gcctcccagg agcgaaaata ttttccgggc cttcaagtga
      C L A Y N V G L P G A K I F S G P S S E
                                     M L A S Q E R K Y F P G L Q V N
241  acagtttggg tattcagtac agcagcttac gaaccacaaa ggcaactggc tactggttgg
      Q F G Y S V Q Q L T N P Q G N W L L V G
      S L G I Q Y S S L R T H K A T G Y W L

```

Exon 1
Exon 2

Abb. 2-2: cDNA-Sequenz des ersten und zweiten Exons des murinen ITGA2-Gens. Der endogene Translationsstart bei nt 113 ist grün unterlegt, die aus dieser Sequenz resultierende Peptidkette unter der Sequenz wiedergegeben. Für den Ansatz der induzierbaren Genablation sollte das erste Exon des Gens mit *loxP*-Erkennungsstellen flankiert und in der Folge durch das Enzym Cre-Rekombinase deletiert werden. Durch den Verlust des ersten Exons entsteht im zweiten Exon ein neuer, hier rot unterlegter, Translationsstart. Die bei verbleibender Promotorrestaktivität ab diesem Translationsstart entstehende Peptidkette ist unter der Integrinpeptidsequenz wiedergegeben. Durch eine Leseraster-Verschiebung entspricht diese Peptidsequenz nicht mehr der $\alpha 2$ -Integrinsequenz (GenBank: Z29987).

2.2 Etablierung von ES-Zelllinien zur konventionellen Geninaktivierung

2.2.1 Der Vektor $p\alpha 2/lacZ$ -Neo

In Abbildung 2-3 ist der Aufbau des *Targeting*-Vektors $p\alpha 2/lacZ$ -Neo (Holtkötter, Diplomarbeit 1997) wiedergegeben. In den Translationsstart im ersten Exon des Integringens wurde eine *lacZ*/Neo-Kassette kloniert. Diese Kassette besitzt ein promotorloses *lacZ*-Gen, gefolgt von einem Stop-Codon. Daran schließt sich das Neo-Gen an, das von dem konstitutiven, synthetischen MC1-Promotor gesteuert wird (Thomas und Capecchi, 1987) und ebenfalls mit einem Stop-Codon abschließt. Die Expression des *lacZ*-Gens wird nach homologer Rekombination in den ITGA2-Locus durch den endogenen Integrinpromotor gesteuert und spiegelt dadurch die *in vivo*-Expression des $\alpha 2$ -Integrins wider. Eine weitere Translation des Integringens wird durch das Stop-Codon der *lacZ*-Kassette verhindert, so dass in homozygoten Mutanten eine komplette Geninaktivierung resultiert. Die Neo-Kassette dient der Positivselektion transfizierter ES-Zellen mit dem Neomycinanalogon G418.

Das modifizierte erste Exon wird auf der 5'-Seite von etwa 3 kb einer zum Integrieren homologen Sequenz, auf der 3'-Seite von etwa 5 kb homologer Sequenz flankiert. Als Klonierungsvektor wurde pBluescript KS II (+) verwendet.

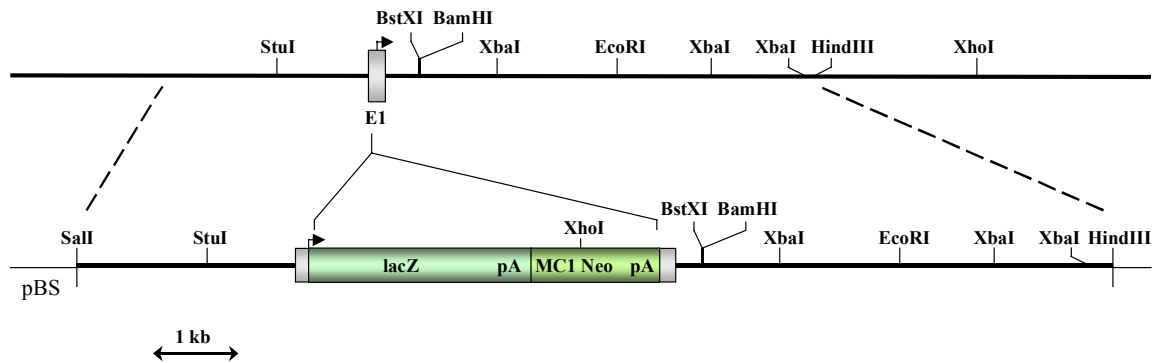


Abb. 2-3: Targeting-Vektor $p\alpha 2/lacZ$ -Neo. Der Vektor enthält das erste Exon (E1) des ITGA2-Gens, 3 kb Promotorsequenz und 5 kb Intronsequenz kloniert in pBluescript KS II (pBS). In den Translationsstart (Pfeil) im ersten Exon wurde eine *lacZ*/Neo-Kassette inseriert. Das *lacZ*-Gen wird nach der Integration in den Integrinlocus durch den endogenen Genpromotor gesteuert. Eine weitere Translation des Integrierens wird durch das folgende Stop-Codon (pA) verhindert. Die Neo-Kassette besitzt einen eigenen, konstitutiven Promotor (MC1) und schließt ebenfalls mit einem Stop-Codon (pA). Das Resistenzgen erlaubt die Selektion der transfizierten ES-Zellen, in die der Vektor integriert wurde.

2.2.2 Analyse der mit $p\alpha 2/lacZ$ -Neo transfizierten ES-Zellen

Der Vektor $p\alpha 2/lacZ$ -Neo wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* linearisiert. Mit dem linearisierten Vektor wurden anschließend ES-Zellen der Linie E14.1.1 transfiziert. Nach der Selektion G418-resistenter ES-Zellkolonien wurden insgesamt 196 Klone isoliert und über eine *Southern Blot*-Analyse auf ihren Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) untersucht. Die genomische DNA der Klone wurde mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Membranen wurde mit einem radioaktiv markierten *XhoI/HindIII*-Fragment (X/H, Abb. 2-4A) hybridisiert. Dieses Fragment diente als sogenannte externe Sonde, da es nicht Teil des transfizierten Vektors ist, und daher nur eine durch Integration des Vektors am Ziellocus bedingte Veränderung in der Länge der Restriktionsfragmente detektiert. Im Falle einer homologen Rekombination hybridisiert neben dem etwa 21 kb langen Wildtyp-Fragment des nicht mutierten Allels ein zusätzliches, 8 kb großes Fragment des mutierten Allels. Bei der Zufallsintegration des Vektors zeigt sich im Autoradiogramm lediglich das 21 kb große Wildtyp-Fragment.

In den insgesamt 120 Klonen, die sich analysieren ließen, fanden sich die Klone 18, 19, 36, 40, 131 und 175 mit einer homologen Rekombination des Vektors (Abb. 2-4B). Unter den verwendeten Bedingungen war mit dem Vektor demnach eine Rekombinationsfrequenz von 1/20 (5 %) zu erreichen. Durch eine Rehybridisierung der Membran mit der internen Neo-Sonde wurde die Anzahl integrierter Kopien des Vektors überprüft. Im Falle der Integration einer einzelnen Kopie (Einzelintegration) ist im Autoradiogramm eine einzelne Bande bei 8 kb zu erwarten, entsprechend dem mutierten *XhoI*-Fragment. Bei Mehrfachintegration des Vektors erscheinen zusätzlich zu der Bande bei 8 kb weitere Banden. Für alle sechs Klone konnte eine Einzelintegration des Vektors gezeigt werden.

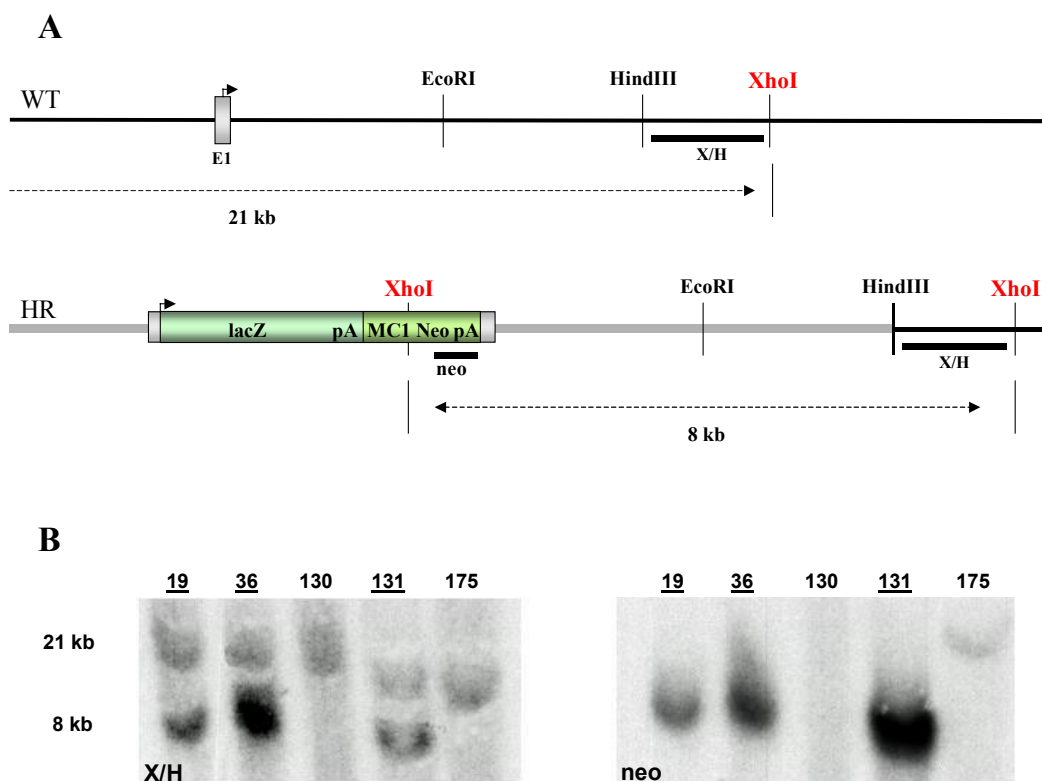


Abb. 2-4: Analyse der mit $\alpha 2$ /*lacZ*-Neo transfizierten ES-Zellen auf homologe Rekombination. (A) Darstellung des Wildtyp- und des mutierten Locus. Das *XhoI*/*HindIII*-Fragment (X/H) hybridisiert nach einem Schneideansatz mit dem Enzym *XhoI* mit einem 21 kb langen Wildtyp-Fragment und mit einem 8 kb langen mutierten Fragment. Die Länge des inserierten Vektors ist angedeutet. **(B)** *Southern Blot*-Analyse der transfizierten ES-Zellkolonien. Für die Klone Nr. 19, 36 und 131 (und die Klone 18, 40, 175; nicht gezeigt) findet sich nach der Hybridisierung des X/H-Fragmentes neben der 21 kb Wildtyp-Bande zusätzlich eine Bande bei 8 kb. Die Rehybridisierung mit der internen Neo-Sonde (neo) führte zu einzelnen Banden bei 8 kb und bestätigte die Einzelintegration in den Klonen.

2.2.3 Etablierung chimärer Tiere

ES-Zellen des Klons 40 (wie Klone 19, 36 und 131 in Abb. 2-4B) wurden expandiert und in geringer Dichte ausgesät. Von den unter G418-Selektion wachsenden Subklonen

wurden die Kolonien isoliert, die noch keine morphologischen Differenzierungsmerkmale aufwiesen. Die Zellen dieser Subklone sowie ES-Zellen des Klons 131 wurden in Maus-Blastozysten der Linie C57Bl/6 injiziert und anschließend in die Eileiter scheinchwangerer Mäuse transferiert. Aus den Injektionen gingen insgesamt 10 chimäre Tiere hervor. Durch die Verwendung von ES-Zellen der Mauslinie 129SvJ (weiße Fellfarbe) und Blastozysten der Mauslinie C57 (schwarze Fellfarbe) bilden die Hybride ein Fellfarbmosaik aus. Über die Ausprägung des Fellfarbmosaiks wird der Grad des Chimärismus bestimmt, der eine grobe Einschätzung über die Besiedelung der Keimbahn durch die injizierten ES-Zellen zulässt. Die aus dem Transfer der Blastozysten hervorgegangenen Mäuse waren durchgehend von einem geringen bis mittleren Chimärismus. Die chimären Tiere (Generation F0) wurden mit C57Bl/6-Mäusen verpaart und die resultierenden Würfe auf die Transmission der Mutation in die Keimbahn geprüft. Die Beteiligung der ES-Zellklone an der Keimbahn lässt sich in den resultierenden Mäusen der F1-Generation mit dem gemischten C57/SvJ-Hintergrund anhand der dominanten Agouti-Fellfarbe erkennen, die sie von den schwarzen C57-Mäusen unterscheidet. Unter insgesamt 351 analysierten Tieren fanden sich lediglich drei Tiere mit der gewünschten grau-braunen Fellfarbe. Die *Southern Blot*-Analyse der genomischen DNA aus Schwanzspitzenbiopsien dieser Tiere zeigte, dass in allen Fällen das Wildtyp-Allel und nicht das gewünschte mutierte Integrinallel weitergegeben wurde.

2.3 Etablierung von ES-Zelllinien zur gewebespezifischen Geninaktivierung

2.3.1 Der Vektor p α 2flox

Der *Targeting*-Vektor p α 2flox wurde von Michael Hesse (Diplomarbeit, 1998) kloniert (Abb. 2-5). Der zu Grunde liegende homologe Genbereich umfasst etwa 3 kb des Genpromotors, das erste Exon und etwa 2 kb des ersten Introns. Eine loxP-flankierte Neo-Kassette zur Positivselektion transfizierter ES-Zellen befindet sich ca. 1 kb stromabwärts vom ersten Exon, die singuläre dritte loxP-Erkennungsstelle und eine daran gekoppelte exogene *HindIII*-Schnittstelle wurden etwa 1 kb stromaufwärts des ersten Exons platziert. Durch Vergleiche des murinen Promotors mit dem näher charakterisierten humanen Promotor (Zutter et al., 1994) wurde für die Insertion der singulären loxP-Erkennungsstelle

ein Bereich gewählt, dessen Veränderung keine Auswirkungen auf die endogene Genexpression haben sollte. Die miteingeführte *HindIII*-Erkennungsstelle diente der späteren RFLP-Analyse. Auf der 5'-Seite der homologen Sequenz befindet sich eine HSV-tk-Kassette, die eine Negativselektion transfizierter ES-Zellklone mit Gancyclovir ermöglicht. Im resultierenden *Targeting*-Vektor wird die heterologe Neo-Kassette durch einen 4 kb langen homologen Arm auf der 5'-Seite und einen 0,9 kb langen homologen Arm auf der 3'-Seite umfasst.

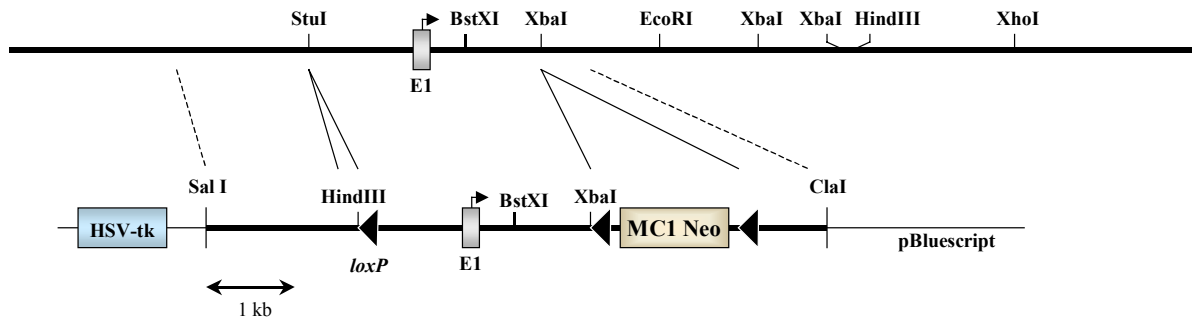
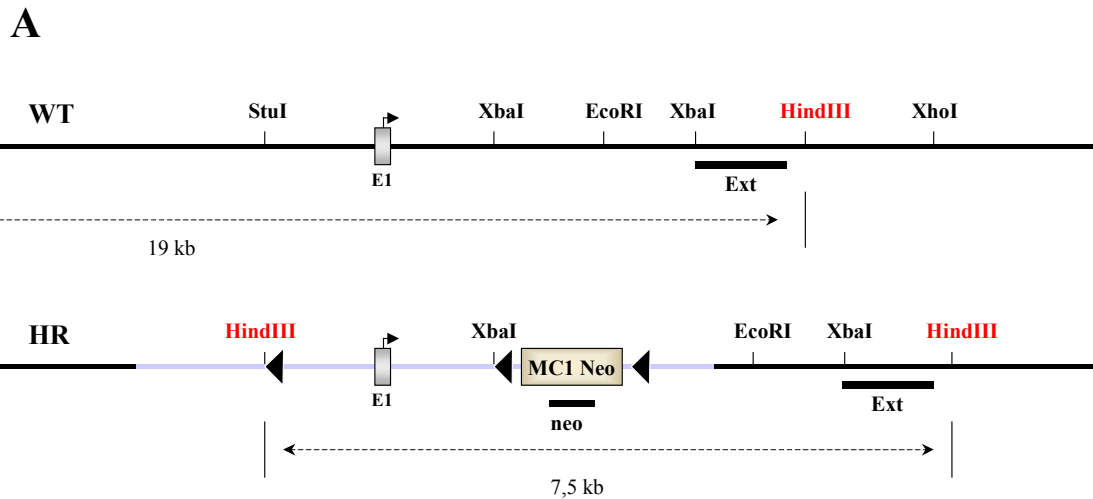


Abb. 2-5: Der Targeting Vektor p α 2flox. Eine *loxP*-flankierte Neo-Kassette (MC1 Neo) wird auf der 5'-Seite durch einen 4 kb langen Arm, bestehend aus etwa 2,5 kb des Genpromotors, dem ersten Exon und etwa 1 kb des ersten Introns, und auf der 3'-Seite durch einen 0,9 kb langen Arm, bestehend aus weiterer Intronsequenz, begrenzt. Etwa 1 kb stromaufwärts des Promotors befindet sich die dritte *loxP*-Erkennungsstelle und eine exogene *HindIII*-Erkennungsstelle. Auf der 5'-Seite des langen homologen Arms liegt eine HSV-tk-Kassette, die eine Negativselektion transfizierter Klone ermöglicht.

2.3.2 Analyse der mit p α 2flox transfizierten ES-Zellen

Mit dem durch *ClaI* linearisierten Vektor p α 2flox wurden ES-Zellen der Linie E14.1 transfiziert und mit G418 selektioniert. Von den aus der Transfektion hervorgehenden ES-Zellkolonien wurden 288 Klone isoliert und einer RFLP-Analyse unterzogen. Die genomische DNA der Klone wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Die Membranen wurden mit einem radioaktiv markierten, 0,7 kb langen *XbaI*-Fragment als externe Sonde (Ext) hybridisiert (Abb.2-6A).



B

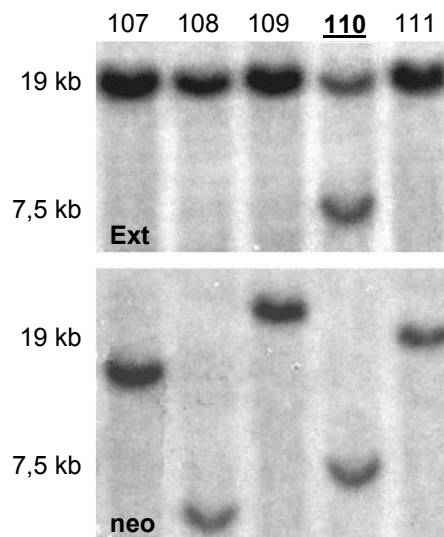


Abb. 2-6: Analyse der mit *pc2floxed* transfizierten ES-Zellen. (A) Darstellung des Wildtyp-Locus (WT) und des mutierten ITGA2-Locus (HR). Durch die homologe Rekombination des Vektors wird mit der singulären *loxP*-Sequenz eine exogene *HindIII*-Erkennungsstelle in den Promotor inseriert. Durch die Verwendung des Enzyms *HindIII* in der RFLP-Analyse lässt sich ein 7,5 kb langes mutiertes Fragment von dem 19 kb langen Wildtyp-Fragment unterscheiden. (E1: Exon 1, Pfeil: Translationsstart) (B) *Southern Blot*-Analyse der transfizierten ES-Zellklone. Bei einer Hybridisierung mit der externen Sonden „Ext“ erscheint im Autoradiogramm bei Klon 110 neben der Wildtyp-Bande bei 19 kb eine zusätzliche Bande des mutierten Fragmentes bei 7,5 kb. Die Rehybridisierung der Membran mit der internen Neo-Sonde führt zu einer einzelnen, 7,5 kb langen Bande, die die Einzelintegration des *Targeting*-Vektors in Klon 110 bestätigt. In den übrigen Klonen wurde der Vektor zufällig integriert. Bei diesen Klonen hybridisiert die Neo-Sonde mit Fragmenten unterschiedlicher Länge, mit der Sonde „Ext“ wird lediglich das Wildtyp-Fragment detektiert.

Im Falle einer Zufallsintegration des Vektors hybridisiert die Sonde mit dem 19 kb langen Wildtyp-Fragment der beiden nicht mutierten ITGA2-Allele. Bei einer homologen Rekombination des Vektors wird die exogene *HindIII*-Erkennungsstelle in ein Allel

eingeführt, die das 19 kb lange *HindIII*-Fragment auf etwa 7,5 kb reduziert. Entsprechend lassen sich in der *Southern Blot*-Analyse im Falle der Integration des *Targeting*-Vektors am Ziellocus zwei Banden erkennen, die des 19 kb langen Wildtyp-Fragmentes und die des 7,5 kb langen mutierten Fragmentes.

Von den 288 isolierten Klonen konnten 144 Kone analysiert werden. Aus den analysierten Klonen ging der Klon 110 hervor, in dem eine homologe Rekombination des Vektors stattgefunden hat (Abb.2-6B). Das entspricht einer Rekombinationsfrequenz von etwa 0,7 %. Die Einzelintegration des Vektors in Klon 110 wurde durch die Rehybridisierung der Membran mit einer Neo-Sonde bestätigt. Im Autoradiogramm ist lediglich das 7,5 kb-Fragment zu erkennen, das bei einer Einzelintegration zu erwarten ist. Die Mehrfachintegration wäre durch das Erscheinen weiterer Bande gekennzeichnet.

2.3.3 *Cre*-vermittelte Deletion der Neo-Kassette in Klon 110

Der konstitutive Promotor des Selektionsmarkers und die damit verbundene ständige Expression des Resistenzgens kann im ungünstigen Fall Einfluss auf die endogene Expression des Integrings nehmen (Xu et al., 1996; Pham et al., 1996). Um diesen Einfluss zu verhindern, wurde die Neo-Kassette in Klon 110 durch eine transiente Transfektion des Expressionsvektors pCrePac (5 µg; Taniguchi et al., 1998) entfernt. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression der Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des MC1-Promotors. Nach der Transfektion wurden insgesamt 240 Klone isoliert und jeweils in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit G418 selektioniert und so auf den Verlust der Neo-Kassette getestet. Von den 240 Klonen waren 16 Klone sensitiv gegenüber der G418-Behandlung. Die entsprechenden Klone der zweiten Hälfte wurden durch eine RFLP-Analyse näher charakterisiert. Die genomische DNA wurde erneut mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Membran wurden mit der externen Sonde „Ext“ hybridisiert.

Durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase in den ES-Zellen des Klons 110 können prinzipiell vier Ereignisse erzeugt werden, die sich in der Analyse an der Veränderung des mutierten Fragmentes erkennen lassen (Abb. 2-7A):

(1) **Komplette Exzision des *loxP*-flankierten Genabschnittes.** In diesem Falle wird sowohl die Neo-Kassette als auch das erste Exon deletiert (Abb. 2-7A: Δ). Es bleibt die

*Hind*III gekoppelte, singuläre *loxP*-Erkennungsstelle zurück, die in der RFLP-Analyse ein etwa 3,5 kb langes Fragment hinterlässt. Aufgrund der deletierten Neo-Kassette lässt sich dieses Fragment nur durch die externe Sonde erkennen, aber nicht durch die interne Neo-Sonde.

(2) **Partielle Deletion des ersten Exons.** Durch die partielle Deletion des ersten Exons verbleibt die *loxP*-flankierte Neo-Kassette auf dem ITGA2-Locus (Abb. 2-7A: Δ ex). In der Analyse führt dieses Ereignis zu einem 5 kb langen Fragment, das sowohl mit der externen Sonde als auch mit der internen Neo-Sonde detektierbar ist. In den Klonen, die zuvor eine Sensitivität gegen G418 gezeigt haben, sollte dieses Ereignis im Zuge der Analyse nicht zu finden sein.

(3) **Partielle Deletion der Neo-Kassette.** Die Deletion der Neo-Kassette hinterlässt das mit *loxP*-Erkennungsstellen flankierte erste Exon (Abb. 2-7A: Flox). ES-Zellklone, in denen dieses Ereignis stattgefunden hat, können zur Erzeugung der Mauslinie für eine konditionale Geninaktivierung herangezogen werden. In der RFLP-Analyse zeichnen sich diese Klone durch ein etwa 6 kb langes Fragment aus, das durch die externe Sonde, aber nicht durch die Neo-Sonde detektierbar ist.

(4) **Keine Deletion.** Ist kein Expressionsvektor in die ES-Zelle gelangt, oder zu wenig, um eine genügende Aktivität der Cre-Rekombinase zu gewährleisten, ist keine Deletion zu erwarten (Abb. 2-7A: HR). Diese Klone entsprechen dem Ausgangsklon, d.h. in der RFLP-Analyse ist sowohl mit der externen Sonde als auch mit der Neo-Sonde ein 7,5 kb-Fragment zu detektieren. Auch dieses Ereignis sollte durch die damit verbundene fehlende Sensitivität gegen G418 nicht in der Analyse erscheinen.

Da die ES-Zellklone heterozygot mutiert vorliegen, erscheint auf dem Autoradiogramm neben der Bande des mutierten Fragmentes auch die Bande des Wildtyp-Fragmentes (19 kb).

Von den 16 G418-sensitiven Klonen ließen sich 10 Klone charakterisieren. Die Hybridisierung mit der externen Sonde ergab für 9 Klone (90 % der analysierten / 3,8 % der isolierten Klone vor der Selektion) eine komplette Deletion des *loxP*-flankierten Genabschnittes. Der Klon 110-2 zeigte neben der Wildtyp-Bande eine Bande bei 6 kb und besaß demnach das *loxP*-flankierte erste Exon (10 % / 0,4 %) (Abb.2-7B). Eine Rehybridisierung der Membran mit der Neo-Sonde zeigte keine Banden und bestätigte die Exzision der Neo-Kassette in allen Klonen (nicht gezeigt). Klone, in denen lediglich das

erste Exon deletiert wurde, und Klone, in denen keine Deletion stattgefunden hatte, wurden erwartungsgemäß nicht gefunden.

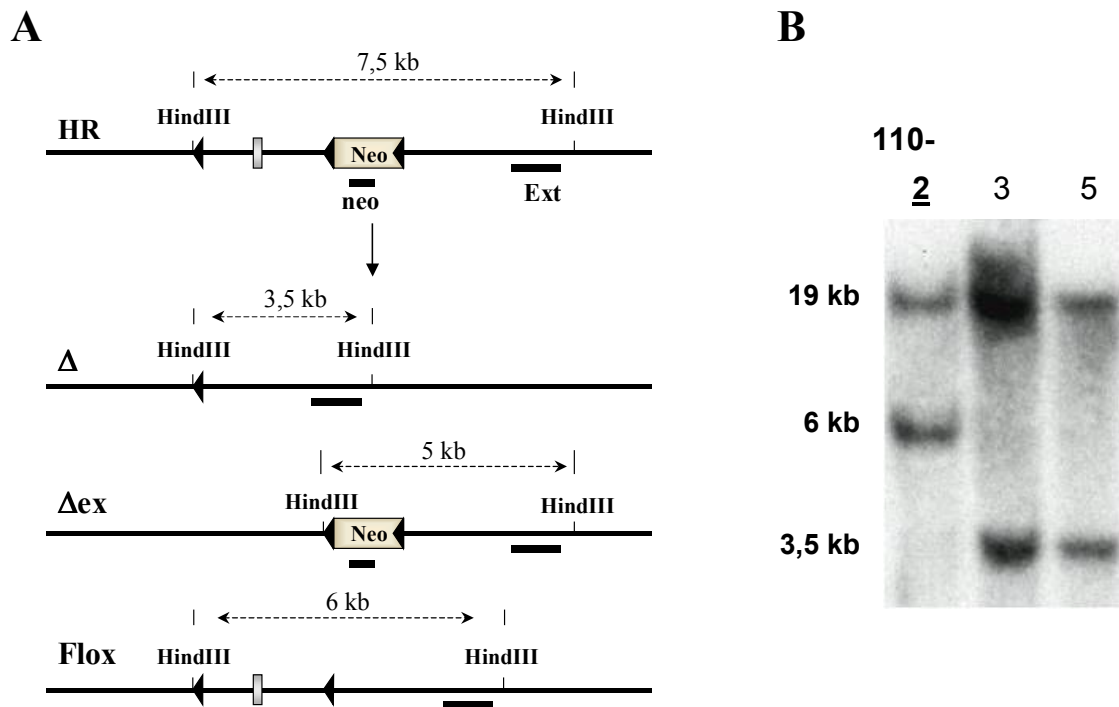


Abb. 2-7: Analyse der transienten Cre-Rekombinase-Expression in ES-Zellen des Klons 110. (A) Darstellung der möglichen Resultate einer transienten Cre-Rekombinase-Expression in Klon 110. Prinzipiell sind vier verschiedene Ereignisse möglich, 1. die komplette Deletion der loxP-flankierten Bereiche (Δ), 2. die partielle Deletion des ersten Exons (Δ ex), 3. die partielle Deletion der Neo-Kassette (Flox) und 4. keine Deletion (HR). Die verschiedenen Ereignisse lassen sich in der RFLP-Analyse mit *HindIII* aufgrund unterschiedlicher Längen der mutierten Fragmente unterscheiden (Ext/neo: externe und interne Sonden; Neo: Neo-Kassette). (B) *Southern Blot*-Analyse des transfizierten Klons 110. In 90 % der analysierbaren Klone führte die Expression der Cre-Rekombinase zu einer kompletten Deletion der loxP-flankierten Bereiche (Δ). Dieses Ereignis äußert sich in dem etwa 3,5 kb langen mutierten Fragment, das zusätzlich zur Wildtyp-Bande zu erkennen ist (hier gezeigt: Klone 110-3 und 110-5). In Klon 110-2 zeigte sich zusätzlich zur Wildtyp-Bande eine weitere Bande bei 6 kb, die einem Fragment mit deletierter Neo-Kassette entspricht (Flox).

2.3.4 Etablierung chimärer Tiere

Der ES-Zellsubklon 110-2 wurde expandiert und in Mausblastozysten der Linie C57Bl/6 injiziert. Die Blastozysten wurden zur Erzeugung chimärer Tiere in scheinchwangere Mäuse transferiert und die resultierenden Würfe auf ihr Fellfarbmosaik analysiert. Aus den Injektionen des Klons 110-2 gingen keine chimären Mäuse hervor.

Da die ES-Zellen von Subklon 110-2 nicht in der Lage waren, an der Entwicklung selbst weit differenzierter Gewebe teilzunehmen, wurden ES-Zellen des Klons 110 expandiert und in geringer Dichte kultiviert. Von den resultierenden Kolonien wurden

undifferenzierte und durchschnittlich schnell wachsende Klone isoliert und ebenfalls injiziert. Aus diesen Injektionen gingen Mäuse mit sehr geringem Chimärismus hervor, die nicht weiter auf eine Keimbahngängigkeit der erzeugten Mutation getestet wurden.

Aufgrund der geringen Erfolge mit den ES-Zelllinien E14.1 und E14.1.1 in der Erzeugung von keimbahnchimären Tieren wurde angenommen, dass der größte Teil der Zellen aus diesen Linien nicht mehr pluripotent war. In der Tat zeigte eine Karyotypisierung dieser Zelllinien häufige Genaberrationen (N. Smyth, persönliche Mitteilung). Für die folgenden Experimente wurde daher auf die Zelllinie IB-10 zurückgegriffen, einem weiteren Subklon der Linie E14.

2.3.5 Klonierung des Vektors $p\alpha 2floxII$

Vor der Transfektion der ES-Zelllinie IB-10 wurde der *Targeting*-Vektor $p\alpha 2flox$ modifiziert, um eine höhere Integrationsfrequenz am Ziellocus zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde der Gesamtanteil homologer Sequenz im Vergleich zum ursprünglichen Vektor (Abb. 2-5) verlängert sowie der Abstand der singulären *loxP*-Erkennungssequenz zur *loxP*-flankierten Neo-Kassette verringert (Abb. 2-8 und 2-9).

Zunächst wurde der Vektor pBluescript KS II (+) mit dem Enzym *SacII* linearisiert. In diese Schnittstelle wurde ein Hybrid der Oligonukleotide „*SmaI* upper“ und „*SmaI* lower“ ligiert, das die ursprüngliche *SacII*-Schnittstelle des Polylinkers zerstörte und eine neue *SmaI*-Schnittstelle einführte (Abb. 2-8A). Der so modifizierte Vektor wurde mit den Enzymen *SalI* und *XbaI* geschnitten. Aus einer Vorstufe zum *Targeting*-Vektor $p\alpha 2flox$, dem Plasmid $p\lambda 9SX4,0loxP$ (M. Hesse, Diplomarbeit 1998; Abb. 2-8B), wurde die 4 kb große Insertion durch Schnitte mit den Enzymen *SalI* und *XbaI* isoliert. Diese Insertion enthält 3 kb der Promotorsequenz des Integrings, das erste Exon und 1 kb des ersten Introns. Darüber hinaus besitzt die Insertion 1 kb vom Exon entfernt in der Promotorregion die exogene *HindIII*-Schnittstelle und die *loxP*-Erkennungsstelle (s. 2.3.1). Die Insertion wurde in den mit den Enzymen *SalI* und *XbaI* geschnittenen, modifizierten Vektor ligiert und es resultierte das Plasmid $p\lambda 9SX4,0loxP II$ (Abb. 2-8C).

Dieses Plasmid wurde mit dem Enzym *XbaI* linearisiert und das 2,9 kb große *XbaI*-Fragment aus $p\lambda 12X2,9$, einem Subklon des λ -Phagenklons Nr.12, in die Schnittstelle ligiert (Abb. 2-8D). Dadurch entstand das Plasmid $p\alpha 2floxII\Delta neo$. Die richtige

Orientierung des *Xba*I-Fragmentes wurde durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Sac*I bestätigt.

Gleichzeitig wurde in den durch das Enzym *Sac*I linearisierten Vektor pBluescript KS II ein weiteres Oligonukleotid-Hybrid ligiert, das eine *Sac*II-Schnittstelle, gefolgt von einer *Cla*I-Schnittstelle, einer *Sal*I-Schnittstelle und einer weiteren *Sac*II-Schnittstelle, in den Polylinker des Vektors einführte. Dieser Vektor wurde anschließend mit den Enzymen *Sal*I und *Cla*I geschnitten. Aus dem Plasmid pTV-O neoflox-8 (M. Hesse, Diplomarbeit 1998) wurde die mit *loxP*-Erkennungsstellen flankierte Neo-Kassette mit Hilfe der Enzyme *Sal*I und *Cla*I isoliert und in den Vektor ligiert, wodurch das Plasmid pBS neoflox [*Sac*II] entstand (Abb. 2-8E).

Aus diesem Plasmid wurde mit dem Enzym *Sac*II die Neo-Kassette erneut isoliert. Das Plasmid p α 2floxII Δ neo wurde ebenfalls mit dem Enzym *Sac*II geschnitten und die Neo-Kassette in diese Schnittstelle ligiert. Die richtige Orientierung der Kassette wurde durch die Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Xba*I, *Sac*I und *Sal*I überprüft. Die *loxP*-Erkennungsstellen und das Exon wurden mit Hilfe der Oligonukleotid-*Primer* MH11, MM09, MH12 und B2,6T7 sequenziert, um Mutationen in diesen Bereichen auszuschließen.

Durch die Modifizierung des Vektors hat sich der Anteil homologer Gensequenzen wesentlich erhöht (Abb. 2-9). Insbesondere der ursprünglich sehr kurze homologe Arm auf der 3'-Seite der Neo-Kassette hat deutlich an Länge gewonnen, die eine erhöhte Frequenz der homologen Rekombination erwarten ließ. Der verringerte Abstand zwischen der singulären *loxP*-Erkennungsstelle und der *loxP*-flankierten Neo-Kassette kann das Verhältnis der partiellen Deletionen der Neo-Kassette zur Komplett-Deletion im Zuge der transienten Cre-Expression verschlechtern. Im Gegenzug ist der geringe Abstand der Erkennungsstellen in der Regel mit einer besseren Kointegration der singulären *loxP*-Sequenzen verbunden, die eine limitierende Größe in der Effizienz der homologen Rekombination des Vektors darstellt.

Die Funktionalität der äußeren *loxP*-Erkennungsstellen wurde durch eine Transformation der Cre-exprimierenden Bakterien 294-Cre (Buchholz et al, 1996) mit dem *Targeting*-Vektor getestet. In dem nach der Transformation isolierten Plasmid konnte die komplette Deletion des *loxP*-flankierten Abschnittes durch Restriktionsanalyse bestätigt werden.

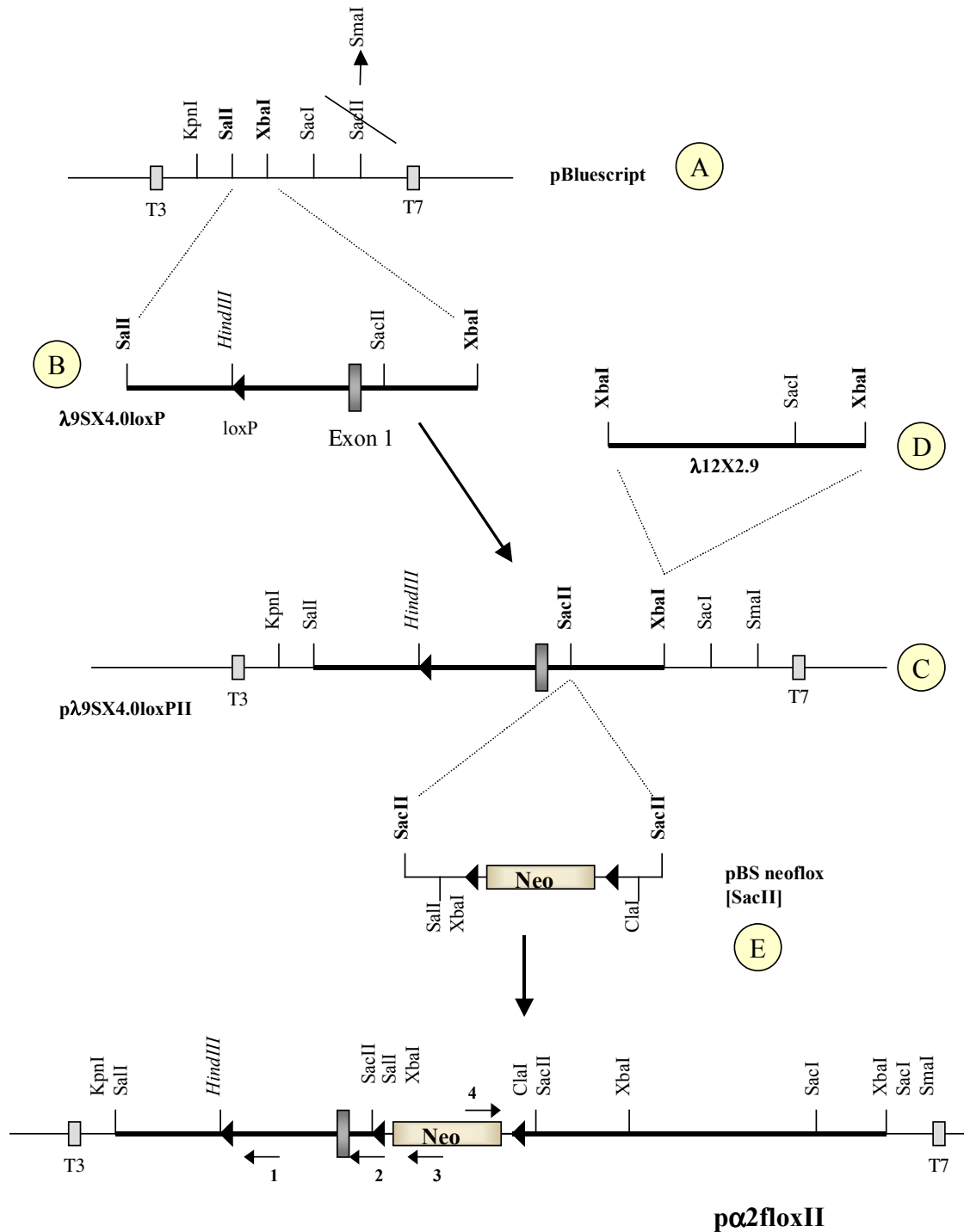


Abb. 2-8: Klonierung des Vektors $p\alpha 2floxII$. Basis des Vektors bildete ein Subklon, der einen Teil der Promotorregion des Integrings, das erste Exon und ein kurzes Stück des ersten Introns enthielt. Im Promotor befand sich eine exogene *HindIII*-Schnittstelle (kursiv) und eine *loxP*-Erkennungsstelle. Dieses Fragment wurde zunächst an der 3'-Seite um ein 2,9 kb langes Segment des ersten Introns erweitert. In eine etwa 400 bp 3' vom ersten Exon gelegenen *SacII*-Schnittstelle wurde eine mit *loxP*-Erkennungsstellen flankierte Neo-Kassette kloniert. Der Vektor wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit den Oligonukleotid-Primern B2,6T7 (1), MH11 (2), MM09 (3) und MH11 (4) überprüft. Die Gesamtgröße des Vektors beträgt etwa 11,5 kb, der zum Integring homologe Anteil beträgt 7 kb.

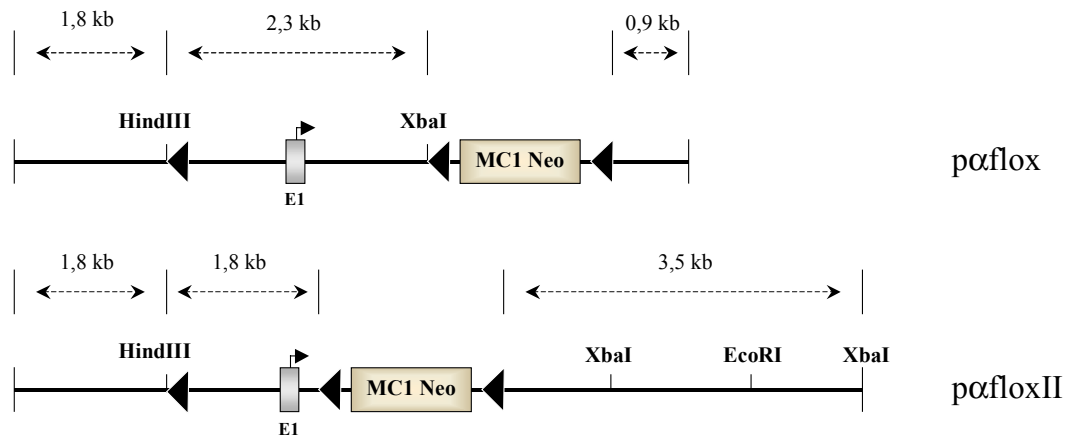


Abb. 2-9: Vergleich der Targeting Vektoren $p\alpha 2flox$ und $p\alpha 2floxII$. Die Gesamtmenge homologer ITGA2-Gensequenzen wurde im Vektor $p\alpha 2flox$ deutlich erhöht. Als Konsequenz ist der Abstand der *loxP*-flankierten Neo-Kassette zur dritten *loxP*-Erkennungsstelle verringert worden.

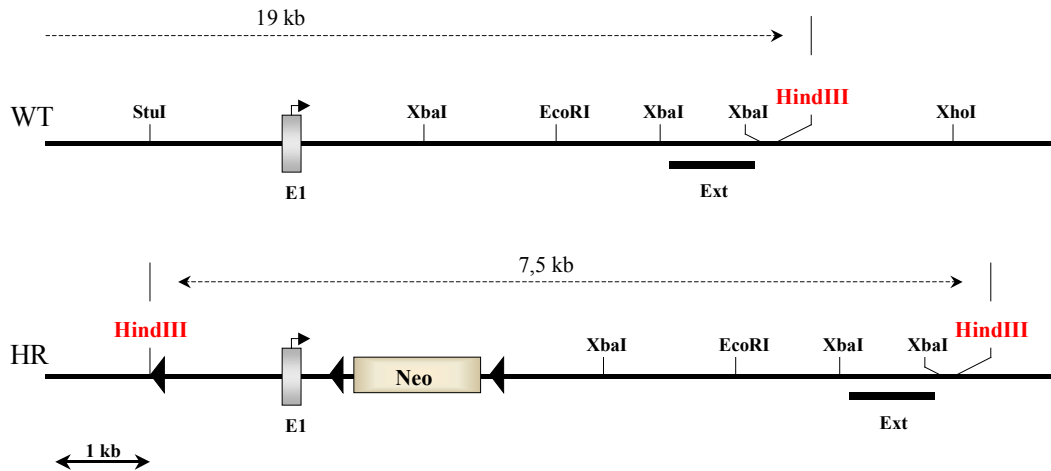
2.3.5 Analyse der mit $p\alpha 2floxII$ transfizierten ES-Zellklone

Der Vektor $p\alpha 2floxII$ wurde mit dem Enzym *SmaI* linearisiert und in ES-Zellen der Linie IB-10 transfiziert. Insgesamt wurden 240 Klone isoliert und auf ihren Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus analysiert. Dazu wurde die genomische DNA der Klone mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert.

Die Hybridisierung der Membranen mit der radioaktiv markierten Sonde „Ext“ führte im Falle der homologen Rekombination am ITGA2-Locus zu einer etwa 19 kb großen Bande für das nicht mutierte Allel und einer 7,5 kb großen Bande für das mutierte Allel. Bei einer Zufallsintegration des Vektors findet sich im Autoradiogramm lediglich die 19 kb Bande der beiden Wildtyp-Allele.

Die Analyse von 189 analysierbaren Klonen zeigte bei den fünf ES-Zellklonen 38, 92, 94, 122 und 175 zusätzlich zur Wildtyp-Bande eine Bande von etwa 7,5 kb (Abb. 2-10). Das entspricht einer Rekombinationsfrequenz von 1/38 (2,6 %). Die genomische DNA dieser ES-Zellklone wurde erneut mit *HindIII* geschnitten, aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert, um eine Hybridisierung mit einer internen Neo-Sonde zu ermöglichen. Diese Hybridisierung sollte Aufschluss über eine mögliche Mehrfachintegration des Vektors geben, da ausschließlich bei einer Einzelintegration eine einzelne Bande bei 7,5 kb im Autoradiogramm zu erwarten ist.

A



B

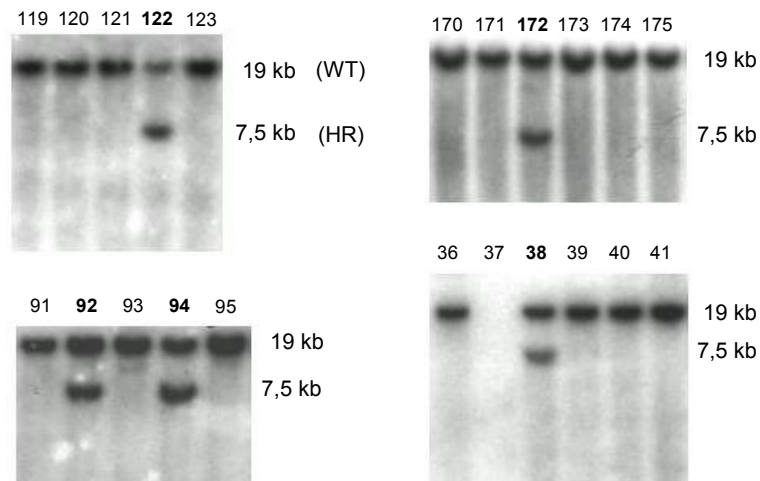
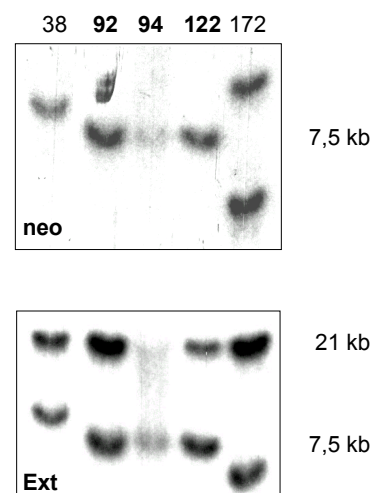


Abb. 2-10: Analyse der mit $\alpha 2$ floxII transfizierten ES-Zellklone auf homologe Rekombination. (A) Schematische Karte des Wildtyp-Locus (WT) und des durch homologe Rekombination mutierten Locus (HR) des ITGA2-Gens. Die durch Schnitte des Enzyms *HindIII* zu erwartenden Fragmente, sowie die Lage der externen Sonde (Ext) sind dargestellt. **(B)** *Southern Blot*-Analyse der mit $\alpha 2$ floxII transfizierten ES-Zellklone. Nach einer Hybridisierung mit der externen Sonde „Ext“ war für den Fall der homologen Rekombination eine zur Wildtyp-Bande bei etwa 19 kb zusätzliche Bande bei 7,5 kb zu erwarten, im Falle einer Zufallsintegration zeigte sich nur die 19 kb Wildtyp-Bande. Es konnten fünf Klone isoliert werden, die eine zweite Bande bei etwa 7,5 kb aufwiesen.

Für die Klone 38, 92, 94 und 122 konnte gezeigt werden, dass die homologe Rekombination des Vektors eine Einzelintegration darstellte (Abb. 2-11), während das Auftreten einer zweiten Bande bei Klon 175 auf eine Mehrfachintegration schließen lässt. Ein Vergleich der Bandenlage bei den Klonen 38, 92, 94 und 122 zeigte darüber hinaus einen deutlichen Unterschied in der Höhe der mutierten Bande des Klons 38 zu den

übrigen Klonen. Durch eine erneute Hybridisierung mit der Sonde Ext konnte ein unterschiedliches Laufverhalten der Proben ausgeschlossen werden, da die Wildtyp-Banden aller Klone auf gleicher Höhe liefen. Die größere Fragmentlänge für das mutierte Allel in Klon 38 kann auf die zusätzliche Integration nicht homologer Vektorsequenzen zurückzuführen sein.

Abb. 2-11: Vergleichende *Southern Blot*-Analyse der ES-Zellklone 38, 92, 94, 122 und 175. Die Membran wurde zunächst mit einer internen Neo-Sonde (neo) hybridisiert, anschließend mit der externen Sonde „Ext“ rehybridisiert. Die Hybridisierung mit der internen Sonde zeigte für den Klon 175 im Autoradiogramm zwei Banden. Da im Zuge einer Einzelintegration nur eine Bande zu erwarten ist, wie bei den Klonen 38, 92, 94 und 122 zu sehen, besitzt der Klon 175 offensichtlich noch eine zusätzliche Insertion des Vektors. Auffälligerweise liegt die Bande des Klons 38 etwas höher als die Banden der Klone 92, 94 und 122. Die Hybridisierung mit der Sonde „Ext“ zeigte, dass das Laufverhalten der Wildtyp-Banden identisch ist, und somit das aus dem mutierten Allel entstandene Fragment des Klons 38 tatsächlich größer ist. Eine Erklärung für das größere Fragment ist die Kointegration nicht homologer Vektorsequenzen in den ITGA2-Locus.



2.3.6 Cre-vermittelte Deletion der Neo-Kassette in Klon 122

Der ES-Zellklon 122 wurde in zwei unabhängigen Experimenten mit dem Expressionsvektor pIC-Cre (15 µg) transfiziert. Das Plasmid pIC-Cre ermöglicht die Expression der Cre-Rekombinase unter dem Einfluss des MC1-Promotors. Insgesamt wurden 192 Klone isoliert und zur Hälfte in zwei identische Kulturen aufgeteilt. Die Klone einer Kultur wurden auf die mit dem Verlust der Neo-Kassette verbundenen Sensitivität gegen das Antibiotikum G418 getestet. In diesem Test zeigten sich insgesamt 36 sensitive Klone, deren Duplikate der zweiten Kultur durch *Southern Blot*-Analyse näher untersucht wurden. Die genomische DNA wurde mit dem Enzym *Hind*III geschnitten, auf Agarosegelen aufgetrennt und auf Membranen transferiert. Durch eine Hybridisierung mit der Sonde „Ext“ ließen sich in 30 Klonen drei von vier möglichen Ereignissen unterscheiden (Abb 2-12, vgl. 2.3.3). Für alle Klone zeigte sich in der Hybridisierung die 19 kb-Bande, die dem Wildtyp-Allel entspricht. Darüber hinaus ergab sich bei 19 Klonen eine zusätzliche, 4 kb große Bande (63 % der analysierten Klone / 9,9 % der isolierten

Klone vor der Selektion). Das entsprechende Fragment entstand durch die Deletion des gesamten *loxP*-flankierten Bereiches, spiegelt also den Verlust des ersten Exons und der Neo-Kassette wider. Vier Klone zeigten eine zusätzliche 7,5 kb-Bande (13 % / 2,1 %). Diese Klone besaßen keine deletierten Bereiche, was durch eine Rehybridisierung der Membran mit einer Neo-Sonde bestätigt werden konnte (Abb. 2-12). Schließlich fand sich bei den Klonen 122-2, -4, -16, -20, -23, -50 und -72 eine zweite Bande bei 6 kb (24 % / 3,6 %). Dieses Fragment entstand durch die ausschließliche Deletion der Neo-Kassette unter Erhalt eines *loxP*-flankierten Exons. Der Verlust der Neo-Kassette wurde ebenfalls durch die Hybridisierung mit einer Neo-Sonde bestätigt.

Die letztgenannten Klone eigneten sich zur Erzeugung der Mauslinie ITGA2^{flox}, die eine gewebespezifische Geninaktivierung zulässt.

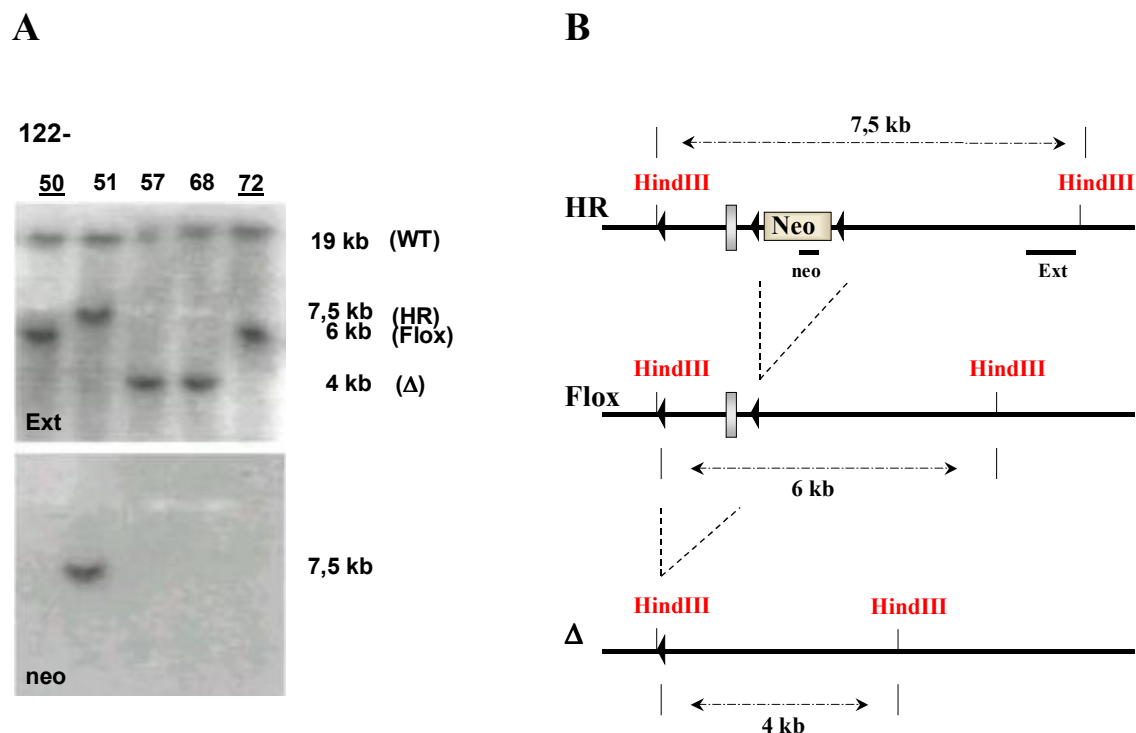


Abb. 2-12: Transiente Transfektion des ES-Zellklons 122 mit dem Plasmids pIC-Cre. Der ES-Zellklon 122 wurde transient mit dem Plasmid pIC-Cre transfiziert, das das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des MC1-Promotors exprimiert. Die resultierenden Klone wurden durch eine RFLP-Analyse mit dem Enzym *HindIII* untersucht. (A) Die externe Sonde „Ext“ hybridisierte bei sieben Klonen mit einem 6 kb großen Fragment, das durch die Deletion der Neo-Kassette entstand (Hier Nr. 50 und 72). Aufgrund der fehlenden Neo-Kassette hybridisierten diese Fragmente nicht mit der Neo-Sonde. In (B) sind die verschiedenen Deletionsvarianten aufgeführt, die in der *Southern Blot*-Analyse zu finden waren. Die Lage der Sonden, sowie die durch das Enzym *HindIII* produzierten Fragmente sind angegeben.

2.3.7 Erzeugung der *ITGA2*^{flox}-Mauslinie

Die ES-Zellklone 122-16, 122-20 und 122-72 wurden expandiert und in Mausblastozysten der Linie C57Bl/6 injiziert. Die Blastozysten wurden in scheinchwangere Mäuse transferiert. Die aus dem Transfer hervorgehenden Tiere zeigten ausgeprägte Fellfarbmosaiken und somit einen hohen Chimärismus.

Die chimären Tiere wurden im folgenden mit C57Bl/6-Mäusen gekreuzt. In den Würfen dieser Verpaarungen fanden sich Tiere, deren Agouti-Fellfarbe die Beteiligung der injizierten ES-Zellen an der Keimbahnausbildung anzeigte (vgl. 2.3.3). Diese Tiere wurden durch *Southern Blot*-Analyse auf die Keimbahntransmission der *ITGA2*-Mutation untersucht (Abb. 2-13A). Alle für Injektionen verwendeten ES-Zellklone führten zu keimbahnchimären Tieren. Die auf den Klonen 122-72 und 122-20 basierenden Linien wurden in der Zucht weitergeführt.

Die für die Mutation heterozygoten Tiere (*ITGA2*^{fl/+}) wurden untereinander verpaart, um die für die Mutation homozygote Mauslinie (*ITGA2*^{fl/fl}) zu erhalten (Abb. 2-13B und C)

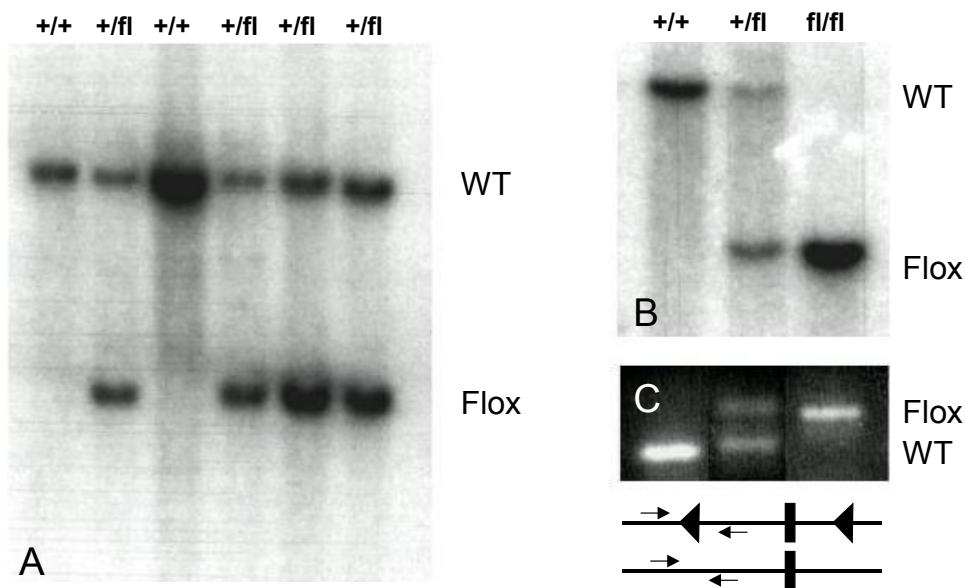


Abb. 2-13: Keimbahntransmission und Kreuzung zur Homozygoten. (A) Mutierte ES-Zellen wurden in Mausblastozysten injiziert, in scheinchwangere Mäuse transferiert und die resultierenden Chimären mit C57Bl/6-Mäusen gekreuzt. Die aus den Verpaarungen stammenden Tiere wurden über eine *Southern Blot*-Analyse auf die Mutation des Integrins untersucht. Gezeigt ist die Analyse eines kompletten Wurfs. Unter den Tieren befanden sich vier, die die Mutation geerbt hatten (fl/+). (B) Für die Mutation heterozygote Tiere wurden untereinander verpaart, um eine homozygote Linie zu etablieren. Homozygote Tiere (fl/fl) besitzen auf beiden Allelen des Integrins die mit der singulären loxP-Erkennungsstelle eingeführte, exogene *HindIII*-Schnittstelle. Die etwa 19 kb große Wildtyp-Bande (WT) geht daher in der RFLP-Analyse verloren und es zeigt sich nur die 7 kb große Bande (Flox) für die Mutationen. (C) PCR-Analyse der Tiere mit einem *Primer*-Paar, das den Promotorbereich mit der loxP-Erkennungsstelle amplifiziert (α 2flox-PCR). Während DNA von Tieren des Genotyps *ITGA2*^{+/+} zu einer Bande von etwa 100 bp führt, verlängert sich das PCR-Produkt um 39 bp, wenn eine loxP-Erkennungsstelle in den Promotor integriert ist.

2.4 Die Mauslinien *ITGA2^{flox}* und *K14Cre*

2.4.1 Charakterisierung der Mauslinie *ITGA2^{flox}*

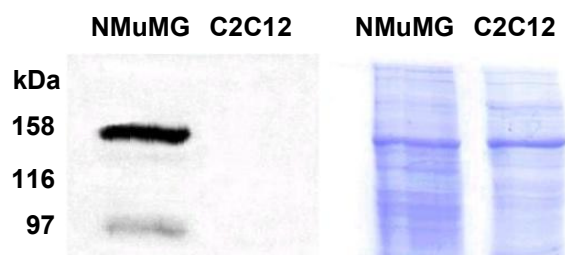
Die Tiere des Genotyps *ITGA2^{f/+}* und *ITGA2^{f/fl}* zeigten keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Nichtsdestotrotz können die eingeführten *loxP*-Erkennungsstellen aufgrund ihrer Platzierung einen Einfluss auf die Integrin- $\alpha 2$ -Expression haben, der sich im Phänotyp der Mäuse nicht unbedingt bemerkbar macht. Daher wurde die Expression der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit in Mausorganen mit Hilfe einer *Western Blot*-Analyse untersucht.

Die *Western Blot*-Analyse wurde zunächst mit Proteinlysaten der Zelllinien NMuMG und C2C12 etabliert (Abb. 2-14). Das Proteinlysat der Zelllinie NMuMG, einer murinen Zelllinie des Milchdrüsenepithels, für die eine starke Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit nachgewiesen wurde (Wu und Santoro, 1993), diente als Positivkontrolle. Das Lysat der Zelllinie C2C12, einer Myoblastenlinie, die keine $\alpha 2$ -Untereinheit exprimiert, diente als Negativkontrolle. Für die Analyse wurden verschiedene Antikörper gegen die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit getestet, von denen lediglich ein freundlicherweise von Dr. U. Mayer (Manchester, UK) zur Verfügung gestellter, affinitätsgereinigter Kaninchen-anti-Maus- $\alpha 2$ -Integrin Antikörper zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führte.

Im *Western Blot* ließ sich für das NMuMG-Lysat ein intensives Signal bei einer Größe von etwa 160 kDa detektieren, was der Größe der murinen Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit entspricht (165 kDa; Wu und Santoro, 1993). Darüber hinaus fand sich eine Kreuzreaktion mit einem etwa 100 kDa großen Protein, die bei ausschließlicher Verwendung des sekundären Antikörpers nicht erschien. Das C2C12-Lysat zeigte keine Reaktion mit dem primären Antikörper.

Abb. 2-14: *Western Blot*-Analyse von Proteinlysaten der Zelllinien NMuMG und C2C12. Die Zelllinie NMuMG exprimiert das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin in hohem Maße, während die Zelllinie C2C12 den Proteinkomplex nicht besitzt. Bei Verwendung eines gegen den zytoplasmatischen Teil der $\alpha 2$ -Untereinheit gerichteten Antikörpers lässt sich ein Signal bei etwa 160 kDa detektieren, das der Größenordnung der $\alpha 2$ -Untereinheit entspricht. Im Lysat der Linie C2C12 lässt sich ein entsprechendes Signal nicht finden. Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt eine vergleichbare Protein-Beladung beider Spuren.



Aus homozygot mutierten ITGA2^{flox}-Mäusen und Kontrolltieren wurden schließlich verschiedene Organe präpariert, lysiert und der *Western Blot*-Analyse unterzogen (Abb.2-15). In den Lysaten der Milz und der Lunge aus Mäusen beider Genotypen zeigte sich nach kurzer Exposition des Röntgenfilms eine starkes Signal für die Integrin- α 2-Untereinheit. Die Organe Herz, Muskel und Niere zeigten eine wesentlich schwächere Expression. Vermutlich entstammt die detektierte Integrin- α 2-Untereinheit in diesen Organen aus den darin verbliebenen hämatopoietischen Zellen. Dennoch war auch für diese Organe die Expression von vergleichbarer Stärke. Die Integrin- α 2-Untereinheit ließ sich in keinem der beiden Hirn-Lysate finden. Somit konnte in den so analysierten Geweben kein Unterschied in der Integrin- α 2-Expression zwischen ITGA2^{+/+} und ITGA2^{fl/fl}-Tieren festgestellt werden.



Abb. 2-15: *Western Blot*-Analyse der ITGA2(fl/fl)-Organe. Tieren des Genotyps ITGA2^{+/+} und ITGA2^{fl/fl} wurden die Organe Milz, Lunge, Herz, Muskel, Niere und Hirn entnommen und lysiert. Die Proteinlysate wurden durch eine *Western Blot*-Analyse miteinander verglichen. Als primärer Antikörper wurde ein gegen die zytosomatische Domäne der Integrin- α 2-Untereinheit gerichteter Kaninchen-Antikörper verwendet. Die stärkste Expression der α 2-Untereinheit (etwa 160 kDa) fand sich in der Milz und der Lunge, während die Expression in Niere, Herz und Muskel deutlich geringer war. Für das Hirn konnte keine Expression des Integrins gezeigt werden. Die Expressionsstärke war in den jeweiligen Organen der Tiere beider Genotypen vergleichbar.

2.4.2 Erläuterungen zur Mauslinie K14Cre

Die Erzeugung einer epidermisspezifischen oder kompletten Genablation in den Tieren der ITGA2^{flox}-Linie sollte durch das Einkreuzen der transgenen Mauslinie K14Cre erreicht werden, die freundlicherweise von Dr. Martin Hafner zur Verfügung gestellt wurde. In dieser Linie wird das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Keratin-14(K14)-Promotors exprimiert. K14Cre-Mäuse exprimieren Cre-Rekombinase in basalen Keratinozyten der Haut, im Epithel der Zunge und in Oocyten (M. Hafner, I. Haase, pers. Mitteilung). Die Expression des Transgens in Oocyten der K14Cre-Weibchen bewirkt in

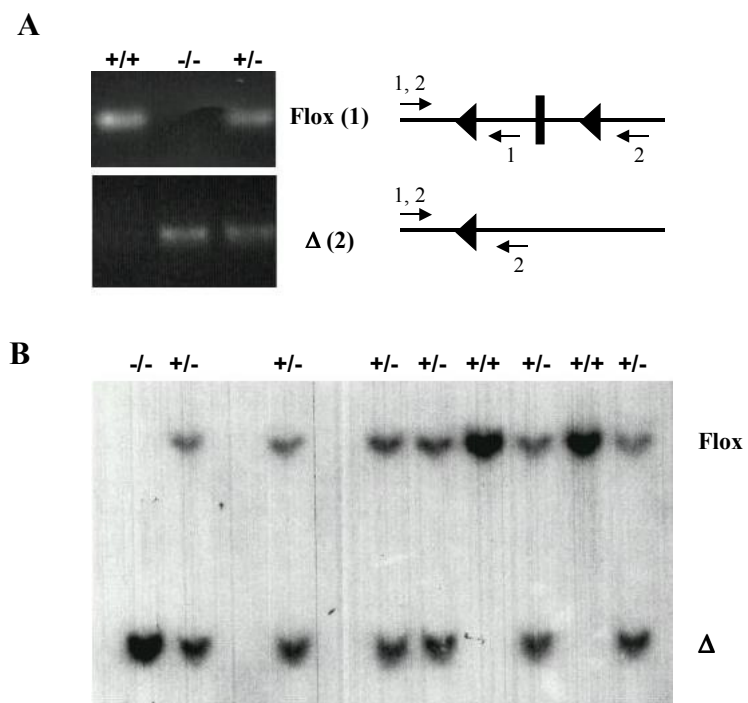
einer Verpaarung mit Böcken, die einen *loxP*-flankierten Genabschnitt besitzen, eine Deletion dieses Abschnittes bereits in der fertilisierten Oocyte. Daher eignen sich die Weibchen dieser Linie nicht zur epidermisspezifischen Deletion, können aber zur Erzeugung einer Komplettdelation verwendet werden.

2.5 Erzeugung und Analyse der Mauslinie *ITGA2Δ*

2.5.1 Erzeugung und erste Charakterisierung der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Mäuse

Die Erzeugung einer kompletten Genablation wurde durch die Verpaarung von Böcken des Genotyps *ITGA2^{fl/fl}* mit Weibchen der K14Cre-Linie erreicht. Die daraus hervorgehenden Tiere wurden zunächst mittels PCR auf die Deletion des ersten Exons analysiert. Das Ergebnis der Typisierung wurde anschließend durch eine *Southern Blot*-Analyse bestätigt (Abb. 2-16). Die Tiere des Genotyps *ITGA2^{+/-}* wurden untereinander verpaart, um Tiere des Genotyps *ITGA2^{-/-}* zu erzeugen.

Abb. 2-16: Genotypisierung von Mäusen der Linie *ITGA2Δ*. (A) PCR-Analyse genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien der Linie *ITGA2Δ*. Durch die $\alpha 2$ flox-PCR (Primer-Paar 1) wird der ursprüngliche Promotorbereich mit inserierter *loxP*-Erkennungsstelle identifiziert. Die $\alpha 2$ Deletions-PCR (Primer-Paar 2) bestätigt durch die Verwendung eines Primers im ersten Intron stromabwärts der 3'-liegenden *loxP*-Erkennungsstelle den Verlust des *loxP*-flankierten Genabschnittes. (B) *Southern Blot*-Analyse der genomischen Mausschwanz-DNA. In der RFLP-Analyse mit der Sonde „Ext“ zeigt sich eine Reduktion des 6 kb großen Fragmentes der Flox-Mutation auf das 4 kb große Fragment mit einer Deletion des ersten Exons (Δ). In den lebenden typisierten Würfen fanden sich Tiere des Genotyps *ITGA2^{-/-}*.



Die aus den Verpaarungen der Heterozygoten hervorgehenden Würfe waren in ihrer Größe vergleichbar mit der Wurfgröße von Wildtyp-Verpaarungen. In den Würfen konnten lebende Tiere des Genotyps $ITGA2^{-/-}$ identifiziert werden, die keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zu ihren Geschwistern zeigten. Von Tieren des Genotyps $ITGA2^{+/+}$ und $ITGA2^{-/-}$ wurden verschiedenen Organe entnommen und durch eine *Western Blot*-Analyse auf die Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit untersucht (Abb. 2-17). Während in Lunge, Milz, Herz, Muskel und Niere der $ITGA2^{+/+}$ -Tiere die $\alpha 2$ -Untereinheit zu detektieren war, konnte ein entsprechendes Signal in den Organlysaten der $ITGA2^{-/-}$ -Tieren nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis bestätigte den Verlust der $\alpha 2$ -Expression in Tieren des Genotyps $ITGA2^{-/-}$.

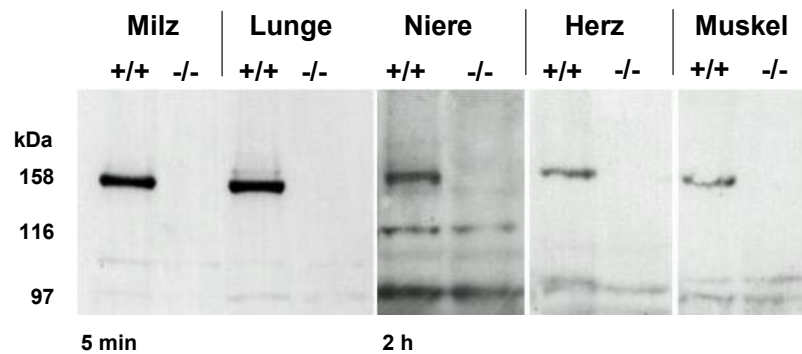


Abb. 2-17: Western Blot-Analyse $\alpha 2$ -defizienter Mausorgane. Aus Organen von $\alpha 2$ -defizienten Tieren und Kontroll-Tieren wurden Proteinlysate hergestellt und in einer *Western Blot*-Analyse untersucht. In den Organen der $\alpha 2$ -defizienten Mäuse ließ sich keine Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit (etwa 160 kDa) nachweisen.

Tab. 2-1: Genotypisierung lebender Mäuse der Linie $ITGA2\Delta$. In die Tabelle aufgenommen wurden ausschließlich Tiere, die $ITGA2^{+/+} \times ITGA2^{+/+}$ -Verpaarungen entstammten. In der Spalte eines Genotyps ist die Gesamtzahl der entsprechend typisierten Tiere und ihr Anteil an der Gesamtzahl in Prozent (gerundet) angegeben. Jeder Genotyp gliedert sich schließlich in die Anzahl männlicher und weiblicher Tiere, soweit sie bestimmt wurden (n.b.: Geschlecht nicht bestimmt).

Analysiert			(+/+)			(+/-)			(-/-)		
59			16	27 %		25	43 %		18	30 %	
♂	♀	n.b.	♂	♀	n.b.	♂	♀	n.b.	♂	♀	n.b.
21	23	15	7	7	2	9	9	8	5	8	5

Die Typisierung der weiteren Tiere ergab in ihrer bisherigen Tendenz eine Mendelsche Verteilung mit einem zu hohen Anteil an Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Tieren. Aufgrund dieser Beobachtung ist es nicht wahrscheinlich, dass Störungen in der Embryonalentwicklung zu einem pränatalen Verlust eines Teiles der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Tiere führen (Tab. 2-1).

Die $\alpha 2$ -defizienten Tiere sind fertil, und die Verpaarungen untereinander führten ebenfalls zu Würfen durchschnittlicher Größe und ohne augenscheinliche Veränderungen. Die Mäuse des Genotyps ITGA2^{-/-} haben ein den ITGA2^{+/-}- und ITGA2^{+/+}-Tieren vergleichbares Geburtsgewicht. Eine Aufzeichnung der Gewichtsentwicklung ab der dritten postnatalen Woche über einen Zeitraum von 5 Wochen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren unterschiedlichen Genotyps (Abb.2-18A). Kleine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zeigten sich allerdings im Vergleich von Tieren der F1-Generation mit unterschiedlicher Ausprägung der beiden genetischen Hintergründe. Tiere, die aufgrund ihrer weißen Fellfarbe einen deutlichen 129SvJ-Hintergrund hatten, zeigten eine etwas schnellere Gewichtszunahme als Tiere mit einer braunen bis schwarzen Fellfarbe, die mehr den C57Bl/6-Hintergrund ausprägten. Insgesamt waren alle Tiere der F1-Generation etwas schwerer, als es von Tieren eines reinen C57Bl/6-Hintergrundes zu erwarten gewesen wäre.

2.5.2 Analyse der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten

Blutungszeit der ITGA2^{-/-}-Mäuse und Expressionsprofil der Thrombozyten

Aufgrund der Beschreibung von Patienten, deren verringerte Expression des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins auf Thrombozyten von einer hämorrhagischen Diathese begleitet wird (Nieuwenhaus et al., 1985, Kehrel et al., 1988), wäre für die ITGA2^{-/-}-Mäuse eine verlängerte Blutungszeit zu erwarten gewesen. Im Gegensatz dazu wurde an Mäusen, deren Thrombozyten keine Rezeptoren der $\beta 1$ -Integrinfamilie mehr besaßen, eine solche verlängerte Blutungszeit nicht beobachtet (Nieswandt et al., 2001a). In der weiteren Analyse dieses Mausmodelles konnte zwar die Bedeutung eines anderen Kollagenrezeptors, GPVI, herausgearbeitet werden, der spezifische Phänotyp der Thrombozyten ließ sich aber nicht eindeutig dem Verlust eines $\beta 1$ -Integrins zuordnen.

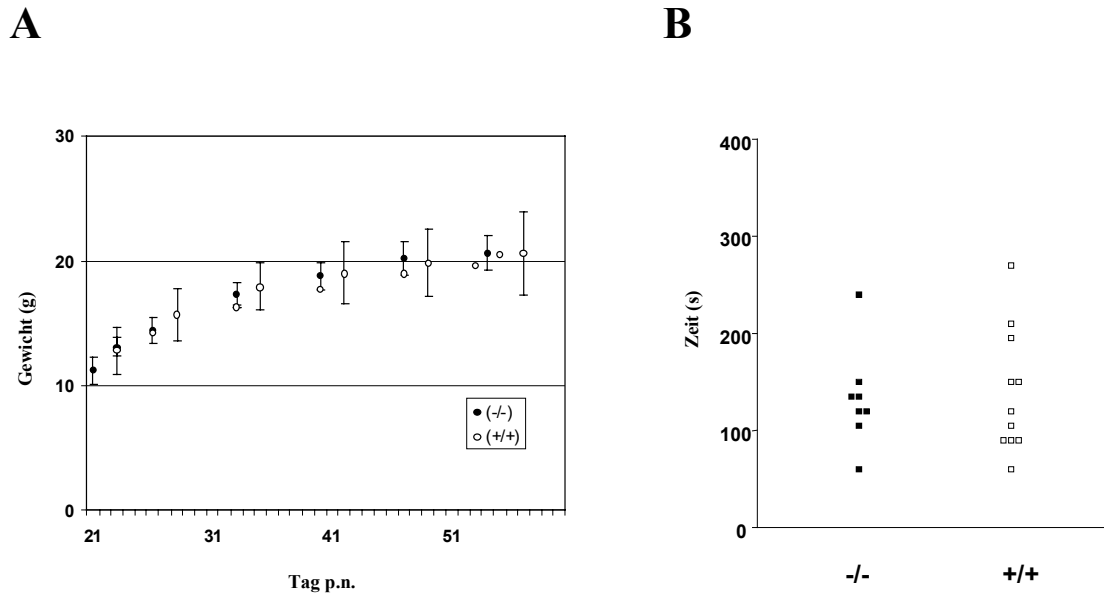


Abb.2-18: Gewichtsentwicklung und Blutungszeit $\alpha 2$ -defizienter Mäuse. (A) Gewichtsentwicklung der $\alpha 2$ -defizienten Mäuse. Verglichen wurde die Gewichtsentwicklung von Tieren des Genotyps ITGA2^{-/-} (6 Weibchen, schwarze Kreise) mit Tieren des Genotyps ITGA2^{+/+} (8 Weibchen, weiße Kreise) von der dritten postnatalen Woche an über einen Zeitraum von sechs Wochen (Mittelwert \pm SD bei mehr als drei Tieren zu einem Zeitpunkt). Die $\alpha 2$ -defizienten Tiere zeigen eine den Wildtyp-Tieren vergleichbare Gewichtszunahme. (B) Bestimmung der Blutungszeit von $\alpha 2$ -defizienten und Kontroll-Mäusen. Den Tieren wurde im Alter von drei Wochen eine Schwanzbiopsie entnommen und die Dauer der anschließenden Blutung verfolgt. Die entstehende Blutperle wurde mit einem Filterpapier in 15 s-Intervallen abgenommen. Als Ende der Blutung wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem das Filterpapier nicht mehr angefärbt wurde. Jeder Punkt des Diagramms entspricht der Blutungszeit eines Individuums. Zwischen den $\alpha 2$ -defizienten Tieren (schwarze Kästchen) und den Kontrolltieren (weiße Kästchen) lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

Aus diesem Grund wurde die Auswirkung der Integrin- $\alpha 2$ -Defizienz auf die Hämostase und den Thrombozytenphänotyp näher untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. B. Nieswandt, Universität Witten/Herdecke, durchgeführt.

Zunächst wurde bei $\alpha 2$ -defizienten Tieren und Kontrolltieren die Dauer der Blutung bestimmt, die nach Entnahme einer Schwanzspitzenbiopsie eintritt (Abb. 2-18B). In den Blutungszeiten konnte kein Unterschied zwischen den defizienten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt werden. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Gesamtblut von Tieren des Genotyps ITGA2^{-/-}, ITGA2^{+/-} und ITGA2^{+/+} führte für alle Genotypen zu einem vergleichbaren Wert.

Die Analyse der Thrombozyten mittels Durchfluss-Zytometrie bestätigte den Verlust der $\alpha 2$ -Untereinheit auf den Thrombozyten der $\alpha 2$ -defizienten Mäuse und zeigte eine im Vergleich zu Kontroll-Thrombozyten auf etwa 50 % reduzierte Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit in den heterozygoten Thrombozyten (Tab.2-2). Darüber hinaus fand sich auf

den Thrombozyten des Genotyps ITGA2^{-/-} eine um etwa 30 % verringerte Expression der Integrin- β 1-Untereinheit, auf den Thrombozyten des Genotyps ITGA2^{+/-} eine Reduktion um etwa 15 %. Abgesehen von einer leichten Expressionssteigerung der Integrin- α 6-Untereinheit in den mutierten Thrombozyten blieb die Expression weiterer Membranproteine der Thrombozytenoberfläche unverändert.

Tab.2-2: Analyse der Proteinexpression auf der Thrombozytenmembran mittels Durchfluss-Zytometrie. Die Expression verschiedener membranständiger Glykoproteine auf der Zelloberfläche von α 2-defizienten, heterozygoten und Kontroll-Thrombozyten wurde mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert aus den Logarithmen der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten und die Standardabweichung für Gruppen von jeweils sieben Tieren.

	α 2(+/+)	α 2(+/-)	α 2(-/-)
Integrin α 2	69,7 \pm 8,3	34,6 \pm 7,9	5,1 \pm 1,3
Integrin α 5	22,3 \pm 6,1	28,7 \pm 9,5	29,5 \pm 9,8
Integrin α 6	63,5 \pm 4,7	82,3 \pm 12,4	89,5 \pm 6,2
Integrin β 1	200,3 \pm 13,4	169,1 \pm 9,7	142,2 \pm 8,9
Integrin β 3	251,4 \pm 16,9	247,8 \pm 21,3	255,4 \pm 18,6
GPVI	63,1 \pm 8,4	60,9 \pm 5,9	61,7 \pm 8,5
GPIb	411,7 \pm 26,3	432,2 \pm 34,1	412,8 \pm 20,3
GPV	190,7 \pm 13,9	198,8 \pm 11,6	194,1 \pm 6,5
CD9	743,3 \pm 45,5	748,9 \pm 43,1	737,8 \pm 38,4

Aggregationsverhalten α 2-defizienter und normaler Thrombozyten

Ein wichtiger Schritt in der Hämostase ist die Aktivierung und anschließende Aggregation von Thrombozyten durch an beschädigten Gefäßwänden exponiertes subendotheliales Kollagen. Für diese kollagenvermittelte Aktivierung wurde eine zentrale Rolle des α 2 β 1-Rezeptors diskutiert (Nieuwenhuis et al., 1985, Kehrel et al., 1988, Collier et al., 1989). Die Analyse der β 1-defizienten Thrombozyten ließ jedoch eine eher unterstützende als zentrale Rolle vermuten (Nieswandt et al., 2001).

Um die Bedeutung des α 2 β 1-Rezeptors für die Thrombozytenaggregation eindeutig zu bestimmen, wurde die Aggregation von α 2-defizienten, heterozygoten und Wildtyp-Thrombozyten *in vitro* durch verschiedene Konzentrationen von fibrillärem Typ-I-Kollagen induziert. Der Verlauf der Aggregation wurde in einem Aggregometer verfolgt, das die Änderung der Lichttransmission einer Thrombozytensuspension nach einer

Stimulation der Thrombozytenaggregation misst. Für normale Thrombozyten wird zunächst nach einer Periode gleichbleibender Transmission ein Abnahme der Lichtdurchlässigkeit beobachtet. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Aggregationsbeginn, an dem die Thrombozyten durch Aktivierung ihre diskoide Form verlieren und eine kugelförmige Gestalt annehmen. Im weiteren Verlauf nimmt die Transmission dann stetig zu, bis ein Maximalwert erreicht wird. Diese Veränderung beschreibt die zunehmende Verklumpung und Entfernung der Thrombozytenaggregate aus dem Strahlengang.

Für die Thrombozyten aller drei Genotypen zeigten sich keine Unterschiede in der Dosis-Abhängigkeit oder der maximalen Aggregation. Allerdings ließ sich eine signifikante Verzögerung im Aggregationsbeginn der $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten feststellen, und zwar um so deutlicher, je geringer die Konzentration des Kollagens war (Abb. 2.19). Eine entsprechend schwächere Verzögerung ließ sich in heterozygoten Thrombozyten nicht beobachten.

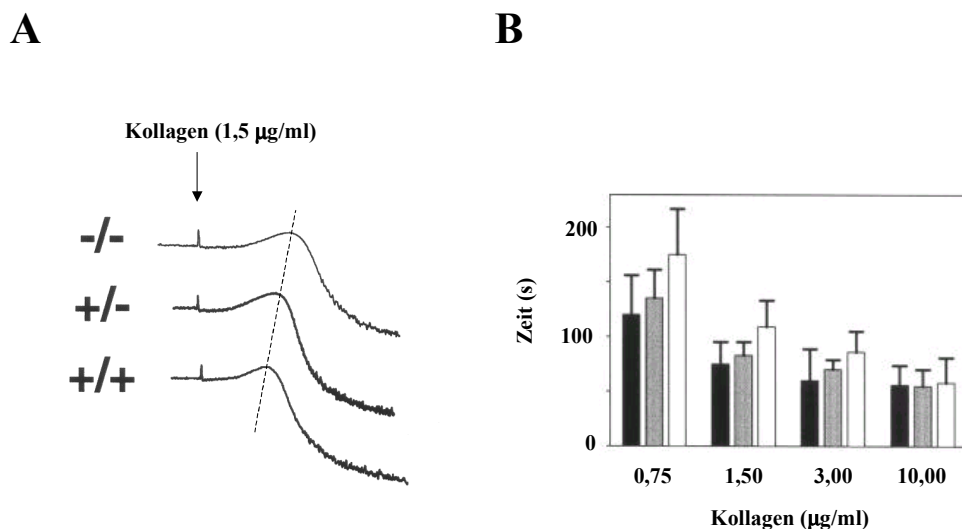


Abb. 2-19: Aggregationsverhalten $\alpha 2$ -defizienter Thrombozyten nach Kollagenstimulation. (A) Gezeigt sind die im Aggregometer gemessenen Absorptionskurven der $\alpha 2$ -defizienten (-/-), heterozygoten (+/-) und Wildtyp-Thrombozyten nach Induktion der Aggregation mit fibrillärem Typ-I-Kollagen der Konzentration 1,5 µg/ml. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Kollagen-Zugabe. Die Zeitspanne von der Zugabe des Kollagens bis zur Ausbildung des Absorptionsmaximums (Aktivierung und Aggregationsbeginn) ist bei den $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten deutlich verlängert. (B) Abhängigkeit der Verzögerung bis zum Aggregationsbeginn von der eingesetzten Kollagenkonzentration. Die verzögerte Aktivierung der $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten wird bei zunehmend geringeren Kollagenkonzentrationen deutlicher (schwarze Säulen: +/+, graue Säulen: +/-, weiße Säulen: -/-; Mittelwert \pm SD von je sechs Tieren).

Die Stimulation von Thrombozyten mit dem Agonisten CRP (collagen-related peptide) führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die im wesentlichen über GPVI vermittelt wird (Asselin et al., 1997). Entsprechend wurden bei der Verwendung von CRP zur Stimulation der unterschiedlichen Thrombozyten keine Unterschiede im Beginn und in der Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation zwischen mutierten und Wildtyp-Thrombozyten festgestellt. Ferner zeigte auch eine Induktion über ADP und Thrombin kein unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Thrombozyten. Die verzögerte Aktivierung der $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten lässt sich also direkt auf den Verlust des Rezeptors zurückführen und spiegelt keinen unspezifischen Defekt der Zellen wider.

Aktivierung $\alpha 2$ -defizienter Thrombozyten mit löslichem Kollagen

Vollständig assemblierte, unlösliche Kollagenfibrillen lassen sich u.a. durch eine Behandlung mit Pepsin in eine lösliche Form überführen, die ebenfalls in der Lage ist, Thrombozyten zu aktivieren (Morton et al., 1994; Siljander et al., 1999). Diese Aktivierung lässt sich in $\beta 1$ -defizienten Thrombozyten nicht beobachten, was darauf hindeutet, dass mindestens einer der auf diesen Thrombozyten fehlenden $\beta 1$ -Integrinrezeptoren für die Aktivierung über das „lösliche“ Kollagen eine entscheidende Rolle spielt.

Um zu klären, ob der $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor diese Rolle spielt, wurde die Aggregation von $\alpha 2$ -defizienten, heterozygoten und Wildtyp-Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen löslichen Kollagens induziert. Bei $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten konnte durch die Kollagenpräparation bis zu einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ keine Aggregation herbeigeführt werden, während die Wildtyp-Thrombozyten bereits bei Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ eine starke Aggregation zeigten (Abb. 2-20). Für die heterozygoten Thrombozyten zeigte sich eine Verschiebung der konzentrationsabhängigen Aggregation zu höheren Konzentrationen hin.

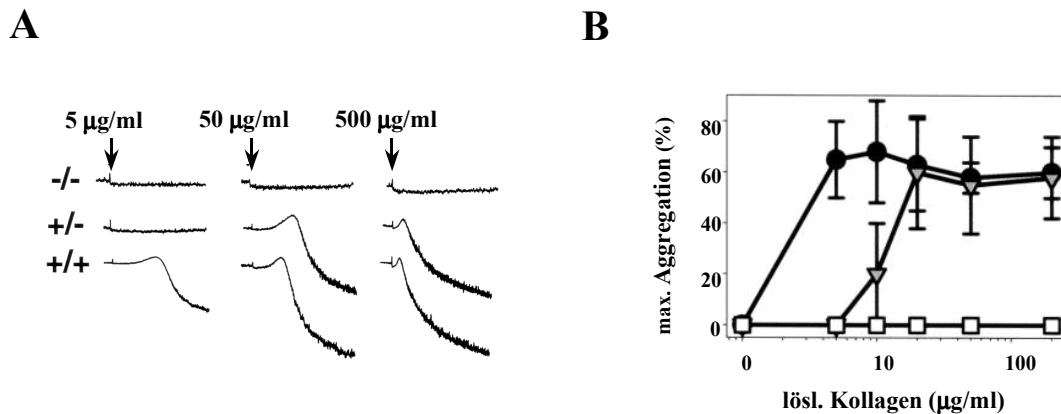


Abb.2-20: Induktion der Thrombozyten-Aggregation durch Pepsin-behandeltes „lösliches“ Kollagen. (A) Absorptionskurven der Aggregometrie. Eine Aggregation der $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten ($-/-$) lässt sich nicht durch lösliches Kollagen induzieren. Heterozygote Thrombozyten ($+/-$) aggregieren erst bei höheren Konzentrationen des löslichen Kollagens als Wildtyp-Thrombozyten ($+/+$). (B) Abhängigkeit der maximalen Aggregation von der eingesetzten Konzentration des löslichen Kollagens. Heterozygote Thrombozyten (graue Dreiecke) erreichen erst bei höheren Konzentrationen des löslichen Kollagens eine den Wildtyp-Thrombozyten (schwarze Kreise) vergleichbare maximale Aggregation. (Weiße Kästchen: $\alpha 2$ -defiziente Thrombozyten, Mittelwert \pm SD von je sechs Tieren)

Adhäsionsverhalten mutierter Thrombozyten

Die Aktivierung von Thrombozyten durch exponiertes Kollagen erfolgt erst nach Adhäsion der Thrombozyten an Kollagenfibrillen. Diese Adhäsion ist ein komplexer Prozess, an dem mehrere Rezeptoren und Signalwege beteiligt sind (Watson et al., 2000). Thrombozyten, die den Rezeptor GPVI nicht besitzen, sind nicht fähig, an fibrilläres Kollagen zu adhären (Nieswandt et al., 2000). Für $\beta 1$ -defiziente Thrombozyten wurden hingegen nur leichte Adhäsionsdefekte beschrieben, die vermutlich auf den Verlust des $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptors zurückzuführen sind (Nieswandt et al., 2001a).

Um die vermutliche Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins zu konkretisieren, wurde die Adhäsion mutierter und normaler Thrombozyten an fibrilläres und lösliches Kollagen unter statischen Bedingungen getestet. Sowohl die $\alpha 2$ -defizienten als auch die heterozygoten Thrombozyten zeigten in der zeitabhängigen Adhäsion an fibrilläres Kollagen des Typ I zu den späteren Zeitpunkten eine den Wildtyp-Thrombozyten vergleichbare Adhäsion (Abb. 2-21A). In der frühen Adhäsionsphase (15 min) fällt allerdings eine geringere Adhäsion der mutierten Thrombozyten auf. In den so durchgeführten Adhäsionsassays ließ sich die Adhäsion über GPVI nicht von der Adhäsion über das Integrin abgrenzen. Um eine Adhäsion der Thrombozyten über den GPVI-Rezeptor zu verhindern, wurde die

Kollagenbindungsstelle des Rezeptors durch die Verwendung von F(ab)-Fragmenten des Antikörpers JAQ1 (20 µg/ml; Schulte et al., 2001) blockiert. In diesem Falle war eine Adhäsion $\alpha 2$ -defizienter Thrombozyten nicht mehr zu beobachten. Die heterozygoten Thrombozyten adhärten im Vergleich zu den Wildtyp-Thrombozyten schlechter an das fibrilläre Kollagen. Allerdings war auch die Adhäsion der Wildtyp-Thrombozyten durch die Verwendung des Antikörperfragmentes beeinträchtigt, was sich in einer erheblichen Verzögerung der Adhäsion äußerte (Abb. 2-21B).

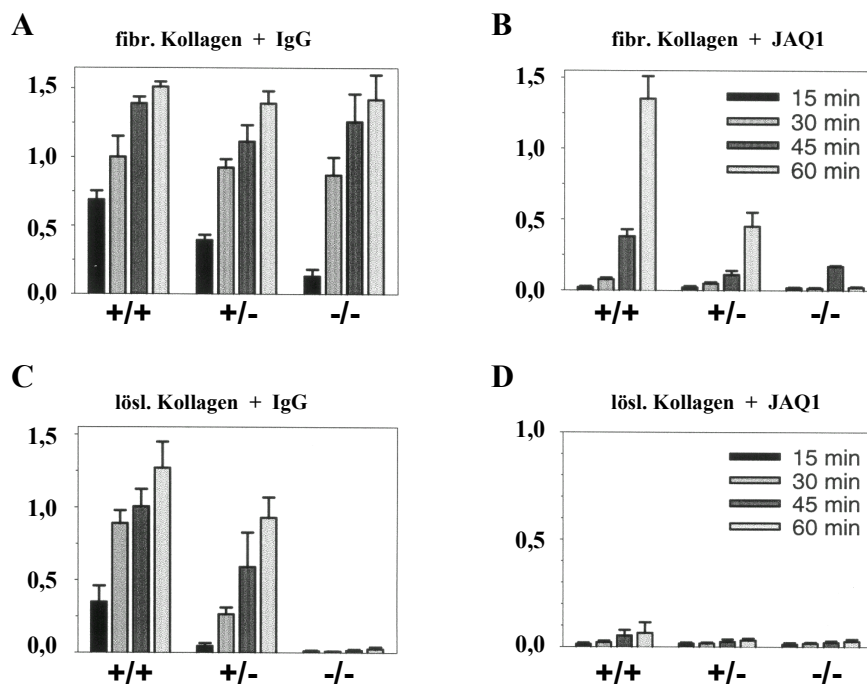


Abb. 2-21: Adhäsion mutierter Thrombozyten an fibrilläres und lösliches Kollagen unter statischen Bedingungen. (A) In der zeitabhängigen Adhäsion an fibrilläres Kollagen zeigten die mutierten Thrombozyten in Gegenwart von Kontroll-IgG keinen Unterschied zu den Wildtyp-Thrombozyten. (B) Durch Inhibition der Kollagenbindung über den Rezeptor GPVI durch den Antikörper JAQ1 zeigte sich für die $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten ein Verlust der Adhäsionsfähigkeit, während die Wildtyp-Thrombozyten noch zur Adhäsion fähig waren. (C) Bei der Verwendung von löslichem Kollagen als Adhäsionssubstrat zeigen die $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten keine Adhäsion, die heterozygoten Thrombozyten adhärten schlechter als die Wildtyp-Thrombozyten. (D) Durch die Inhibition der GPVI-vermittelten Kollagenbindung mit dem Antikörper JAQ1 wird die Adhäsion aller Thrombozyten an das lösliche Kollagen verhindert (Mittelwert \pm SD von Triplets).

In nächsten Schritt wurde den Thrombozyten lösliches Kollagen (s.o.) als Adhäsionssubstrat angeboten. Für die $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten konnte keine Adhäsion an das lösliche Kollagen beobachtet werden. Heterozygot mutierte Thrombozyten adhärten insgesamt schlechter an das lösliche Kollagen als Wildtyp-Thrombozyten (Abb. 2-21C). Der Verlust des Integrinrezeptors konnte in der Adhäsion

der mutierten Thrombozyten an das lösliche Kollagen offensichtlich nicht durch den GPVI-Rezeptor kompensiert werden. Um den Einfluss des GPVI-Rezeptors für die Adhäsion an das lösliche Kollagen herauszuarbeiten, wurde der Adhäsionsassay erneut unter Zusatz der JAQ1 F(ab)-Fragmente durchgeführt, die die Bindung von GPVI an Kollagen blockieren. In diesem Fall wurde die Adhäsion der Thrombozyten aller Genotypen an das Substrat verhindert, unabhängig davon, ob sie den $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor besaßen oder nicht (Abb. 2-21D).

2.5.3 Analyse Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Fibroblasten

Kollagengelkontraktion durch Fibroblasten des Genotyps ITGA2^{fl/fl} und ITGA2^{+/+}

Die Biologie des Bindegewebes ist hauptsächlich durch die Wechselwirkung der im Bindegewebe ansässigen Fibroblasten mit dem Kollagen der sie umgebenden Matrix bestimmt. Diese Wechselwirkung wird wesentlich über die Kollagenrezeptoren $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ vermittelt. Die Bedeutung dieser Rezeptoren ließ sich in *in vitro*-Modellen demonstrieren, in denen Fibroblasten in einer dreidimensionalen kollagenen Matrix kultiviert werden (Klein et al., 1991; Schiro et al., 1991; Langholz et al., 1995; Xu et al., 1997). So führt der Kontakt des Integrins $\alpha 1\beta 1$ an Typ-I-Kollagen u.a. zu einer reduzierten Synthese des Kollagens, während das Integrin $\alpha 2\beta 1$ die Kontraktion der Kollagenmatrix vermittelt und die Expression und Aktivierung verschiedener MMPs induziert (Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995; Zigrino et al., 2000).

Um zu bestätigen, dass die in den Promotor des ITGA2-Gens eingeführte *loxP*-Erkennungsstelle keine Auswirkung auf das $\alpha 2\beta 1$ -vermittelte Zellverhalten hat, wurden zunächst embryonale Mausfibroblasten, die das mit *loxP*-Sequenzen flankierte erste Exon des ITGA2-Gens besaßen, mit Wildtyp-Zellen in ihrem Vermögen verglichen, eine kollagene Matrix zu kontrahieren.

Embryonale Fibroblasten der Genotypen ITGA2^{fl/fl} und ITGA2^{+/+} wurden jeweils in frei kontrahierbare Kollagengele eingesät. Der Durchmesser der Gele wurde als Parameter für die Kontraktion der kollagenen Matrix stündlich über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen (Abb. 2-22A). Über den gemittelten Durchmesser der Gele wurde die Größe der Gelfläche bestimmt und als prozentualer Anteil der Ausgangsfläche gegen die Zeit

aufgetragen. Der Kontraktionsverlauf beider Zelltypen ist nahezu identisch und bestätigt, dass sich die Zellen mit der *loxP*-Mutation in ihrem Vermögen, Gele zu kontrahieren, nicht von Wildtyp-Zellen unterscheiden.

Zeitgleich mit dem Ansatz der Kollagengele wurden subkonfluente *Monolayer*-Kulturen der mutierten Fibroblasten ausgesät. Nach 48 Stunden wurde die Gesamt-RNA der mutierten Fibroblasten aus Gel- und *Monolayer*-Kulturen isoliert und in einer *Northern Blot*-Analyse auf die Expression der murinen MMP-13 (interstitielle Kollagenase der Maus, das Analogon zu der humanen MMP-1 [Balbin et al., 2001]), sowie die Expression der $\alpha 1$ -Kette des Typ-I-Kollagens untersucht (Abb. 2-22B). Während die Expression der MMP-13 im Zuge der Kontraktion im Vergleich zur *Monolayer*-Kultur stark anstieg, wurde die Expression der Kollagen- $\alpha 1$ -Kette massiv herunterreguliert. Das Expressionsmuster entspricht dem für humane (Langholz et al., 1995) und murine Wildtyp-Fibroblasten (Merckling, Diplomarbeit 1996) beschriebenen Muster. Fibroblasten, die das *loxP*-flankierte Exon des ITGA2-Gens besitzen, unterscheiden sich somit bezüglich der analysierten Parameter nicht von Wildtyp-Fibroblasten.

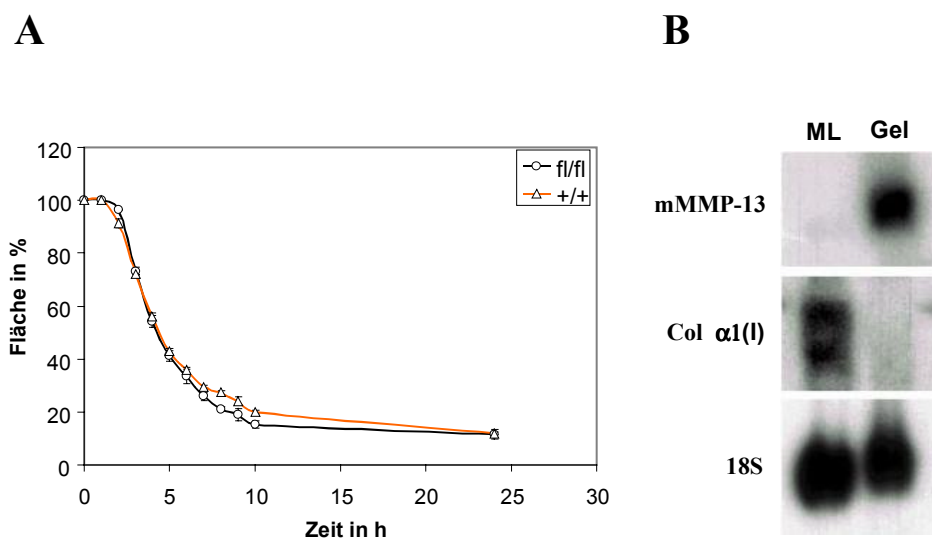


Abb. 2-22: Zeitlicher Verlauf der Kontraktion von Kollagengelen und mRNA-Expression embryonaler Mausfibroblasten des Genotyps ITGA2 (fl/fl). (A) Vergleich der Flächenänderung eines Kollagengels durch eingesäte embryonale Fibroblasten des Genotyps ITGA2^{fl/fl} (Kreise) oder ITGA2^{+/+} (Dreiecke) (Mittelwerte von Dreifachansätzen \pm SD; nicht sichtbare Fehlerbalken werden durch die Symbole verdeckt). (B) Aus mutierten Fibroblasten, die 48 h in einem Kollagengel (Gel) oder als *Monolayer* (ML) kultiviert wurden, wurde die Gesamt-RNA isoliert und durch eine *Northern Blot*-Analyse die Expression der murinen MMP-13 (mMMP-13) und der $\alpha 1$ -Kette des Typ-I-Kollagens (Col $\alpha 1(I)$) bestimmt. Durch eine Rehybridisierung mit einer 18S-Sonde wurde die vergleichbare Beladung der Gelspuren bestätigt.

Kollagenkontraktion durch Fibroblasten des Genotyps $ITGA2^{-/-}$ und $ITGA2^{+/+}$

Neonatale dermale Fibroblasten des Genotyps $ITGA2^{-/-}$ und $ITGA2^{+/+}$ wurden jeweils in frei kontrahierbare Kollagengele eingesät und die Änderung der Gelfläche (s.o.) über einen Zeitraum von 29 Stunden verfolgt (Abb. 2-23).

Überraschenderweise kontrahierten die mutierten Fibroblasten die Kollagengele im gleichen Ausmaß wie Kontrollzellen, wobei die Kontraktion allerdings etwas langsamer verlief als bei den Kontrollzellen. Während die Kontrollzellen bereits nach etwa 10 Stunden fast eine maximale Reduktion der Gelfläche erreicht hatten, benötigten die defizienten Fibroblasten dafür mehr als 30 Stunden.

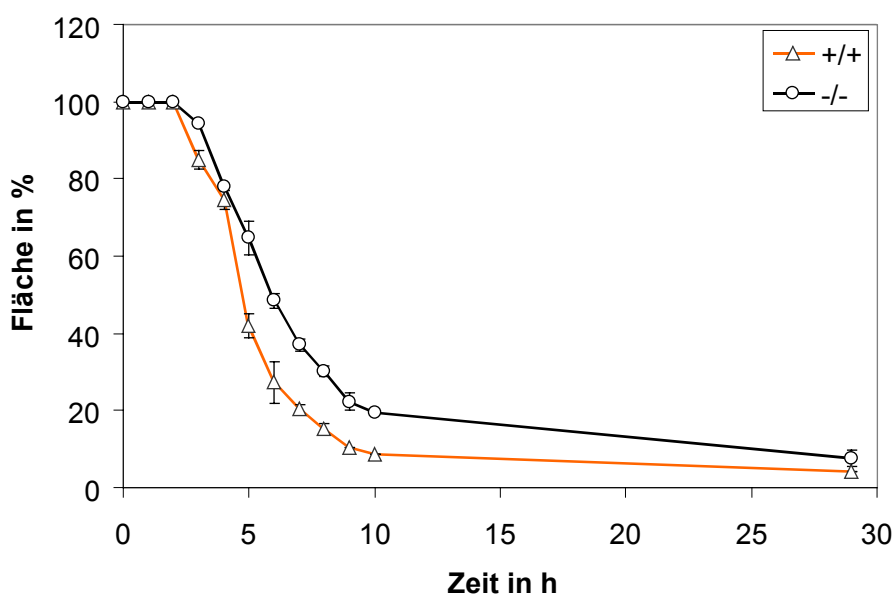


Abb. 2-23: Zeitlicher Verlauf der Kontraktion von Kollagengelen mit Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Fibroblasten. Vergleich der Flächenänderung eines Kollagengels durch eingesäte embryonale Fibroblasten des Genotyps $ITGA2^{-/-}$ (Kreise) oder $ITGA2^{+/+}$ (Dreiecke) (Mittelwerte von Dreifachansätzen \pm SD; nicht sichtbare Fehlerbalken werden durch die Symbole verdeckt).

2.6 Erzeugung einer epidermisspezifischen Deletion des $ITGA2$ -Gens

2.6.1 Erzeugung von Mäusen mit epidermisspezifischer Integrin- $\alpha 2$ -Defizienz

Zur Erzeugung einer epidermisspezifischen Deletion des $ITGA2$ -Gens wurden Weibchen des Genotyps $ITGA2^{fl/fl}$ mit Böcken der Linie K14Cre verpaart. Erfolgreiches Einkreuzen des Cre-Transgens in die $ITGA2$ flox-Linie wurde über PCR-Analysen bestimmt.

Erwartungsgemäß hatten alle Tiere dieser Verpaarungen den Genotyp $ITGA2^{fl/+}$. Böcke, die darüber hinaus das Cre-Transgen besaßen, wurden mit Weibchen des Genotyps $ITGA2^{fl/fl}$ verpaart. In den resultierenden Würfen besaßen etwa 25 % der Tiere den Genotyp $ITGA2^{fl/fl} Cre^+$, deren Keratinozyten keine Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit mehr zeigen sollten (Abb. 2-24).

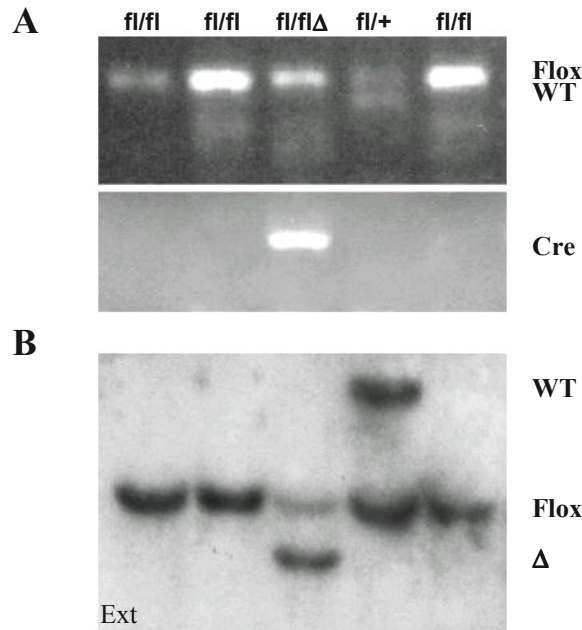


Abb. 2-24: Genotypisierung des Wurfes einer Verpaarung zur Erzeugung einer epidermisspezifischen ITGA2-Inaktivierung. (A) Nachkommen aus der Verpaarung von $ITGA2^{fl/fl}$ -Weibchen mit Böcken des Genotyps $ITGA2^{fl/fl} Cre^+$ wurden durch eine PCR-Analyse auf den Besitz des K14Cre-Transgens (Cre-PCR) und der loxP-Mutation des ITGA2-Gens untersucht ($\alpha 2$ flox-PCR, Flox: loxP-Erkennungsstelle im Promotor, WT: Wildtyp-Promotor). Tiere, die das Transgen besitzen und die darüber hinaus den Genotyp $ITGA2^{fl/fl}$ haben ($fl/fl\Delta$), sollten eine auf die Epidermis begrenzte Deletion der $\alpha 2$ -Untereinheit aufweisen. (B) Southern Blot-Analyse der identischen DNA wie in (A). Für die DNA-Probe von Tieren mit Cre-Transgen ($fl/fl\Delta$) wird eine 4 kb lange, der Deletion entsprechende Bande detektiert (Δ). Dieses Bande entstand aus der Fragmentierung der aus den Keratinozyten stammenden DNA. In den übrigen Zelltypen der Biopsie (Fibroblasten, Chondroblasten u.a.) wird keine Cre-Rekombinase exprimiert und es findet keine Deletion statt. Die Fragmentierung der DNA dieser Zellen führte zu der zusätzlich erscheinenden Bande bei etwa 6 kb (Flox).

Die Beschränkung der Deletion auf die Keratinozyten der Mausepidermis wurde durch eine Southern Blot-Analyse verschiedener Mausorgane aus Tieren des Genotyps $ITGA2^{fl/fl} Cre^+$ bestätigt. Die aus den Organen isolierte genomische DNA wurde, wie unter 5.2.2 beschrieben, einer RFLP-Analyse unterzogen (Abb.2-25). Für fast alle Organe führte die Hybridisierung der DNA mit der Sonde „Ext“ zu einer Bande von etwa 6 kb. In den Zellen dieser Organe wurde die Cre-Rekombinase nicht exprimiert und das erste Exon des Gens nicht deletiert. Für die aus der Haut und der Zunge isolierten DNA findet sich zusätzlich zu der Bande bei 6 kb eine Bande bei 4 kb. Diese Bande resultiert aus der Cre-

vermittelten Deletion des ersten Exons in den epithelialen Zellen dieser Organe. In den restlichen Zellen der Organe wird das Cre-Transgen nicht exprimiert und führt zu keiner Deletion. Die Geninaktivierung des ITGA2-Gens beschränkt sich in den Tieren des Genotyps ITGA2^{fl/fl}Cre⁺ demnach auf Keratinozyten der Haut und der Zunge. In epithelialen Geweben anderer Organe wurde keine Deletion gefunden.

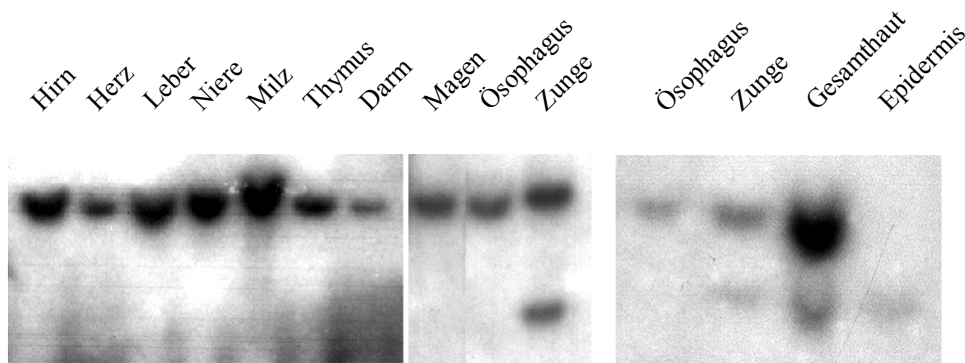


Abb. 2-25: Bestätigung einer epidermisspezifischen Deletion des ITGA2-Gens durch Southern Blot-Analyse. Aus verschiedenen Mausorganen des Genotyps ITGA2^{fl/fl} Cre⁺ wurde die genomische DNA isoliert und einer RFLP-Analyse mit dem Enzym *HindIII* und der Sonde „Ext“ unterzogen (vgl. 2.3.6). Eine zusätzliche, der keratinozytenspezifischen Deletion entsprechende Bande lässt sich nur für die Haut und die Zunge finden. Für die von der Gesamthaut abgetrennte Epidermis lässt sich ausschließlich die der Deletion entsprechende Bande detektieren.

Von ITGA2^{fl/fl}-Tieren, die das Cre-Transgen besaßen, und Tieren ohne Transgen wurden Biopsien der dorsalen Haut entnommen und Paraffin-Schnitte angefertigt. Ein Vergleich der HE-gefärbten Schnitte zeigte keine offensichtlichen Unterschiede zwischen der Epidermis mit $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten und der Epidermis der Kontrollhaut (Abb. 2-26). Für beide Genotypen fand sich eine Epidermis gleicher Dicke, die ohne erkennbare Ablösung auf der Dermis aufliegt; die basalen Keratinozyten zeigten eine ähnliche Morphologie. Entsprechend zeigte sich auch kein Unterschied in der Struktur und Zellmorphologie der Haarfollikel.

Da die zellspezifische Deletion von *loxP*-flankierten Abschnitten nicht immer vollständig ist (Brakebusch et al., 2000), sollte eine eventuelle Integrin- $\alpha 2$ -Expression einzelner Keratinozyten überprüft werden. Immunfluoreszenzfärbungen von Hautschnitten $\alpha 2$ -defizienter Tiere mit anti-Integrin- $\alpha 2$ -Antikörpern zeigten aber durch unspezifische Färbung einen starken Hintergrund und ergaben daher keine eindeutige Antwort. Die Analyse der Deletionseffizienz wurde deshalb an isolierten Mauskeratinozyten durchgeführt.

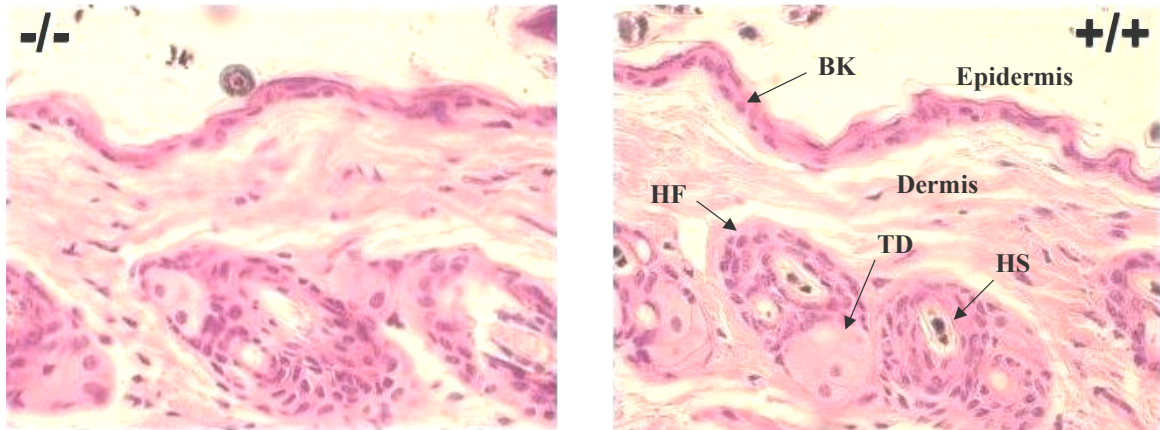


Abb. 2-26: Histologie der Haut aus Tieren mit einer epidermisspezifischen ITGA2-Inaktivierung. Gezeigt sind HE-Färbungen von Paraffinschnitten der Haut aus Tieren des Genotyps $ITGA2^{fl/fl}Cre^+$ (-/-) und $ITGA2^{fl/fl}$ (+/+). Der Verlust der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit in den Keratinozyten führt zu keiner Veränderungen der Hauthistologie (BK: Basale Keratinozyten, HF: Haarfollikel, TD: Talgdrüse, HS: Haarschaft). 400fache Vergrößerung.

2.6.2 Analyse Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Keratinozyten

Auf Keratinozyten stellt das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin den wesentlichen Kollagenrezeptor dar (Sheppard, 1996). Der mit der Inaktivierung des ITGA2-Gens verbundene Verlust des funktionalen Rezeptors lässt eine Änderung des Adhäsionsverhalten der Keratinozyten erwarten. Da nicht vorauszusehen war, ob Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Keratinozyten auch in ihrer Adhäsion an andere Substrate beeinträchtigt sind, wurde für die Kultivierung der Zellen ein Substrat gewählt, das in seiner Zusammensetzung dem *in vivo*-Substrat basaler Keratinozyten, einer Basalmembran, weitgehend ähnelt. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturschalen mit Keratinozyten der humanen HaCaT-Linie (Boukamp et al., 1988) beschichtet und für 16 h kultiviert. Anschließend wurden die HaCaT-Zellen durch Inkubation mit Ca^{2+} -Chelatoren abgelöst (s. Methoden) und die isolierten Mauskeratinozyten auf die zurückbleibende Matrix, die hauptsächlich aus Laminin-5 und Kollagen Typ IV besteht (Boukamp et al., 1994), ausgesät.

Mauskeratinozyten wurden aus Tieren des Genotyps $ITGA2^{+/fl}$, $ITGA2^{fl/fl}$, $ITGA2^{-/-}$ und $ITGA2^{fl/fl}Cre^+$ isoliert. Unabhängig von ihrem Genotyp zeigten die konfluenten Keratinozyten auf der HaCaT-Matrix keine morphologischen Unterschiede. Aus Keratinozyten der ersten Passage wurden Proteinlysate mittels einer *Western Blot*-Analyse untersucht. Während für die Keratinozyten des Genotyps $ITGA2^{+/fl}$ und $ITGA2^{fl/fl}$ die

Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit detektiert wurde, konnte sie erwartungsgemäß in Keratinozyten des Genotyps $ITGA2^{-/-}$ und $ITGA2^{fl/fl}Cre^+$ nicht nachgewiesen werden (Abb. 2-27).

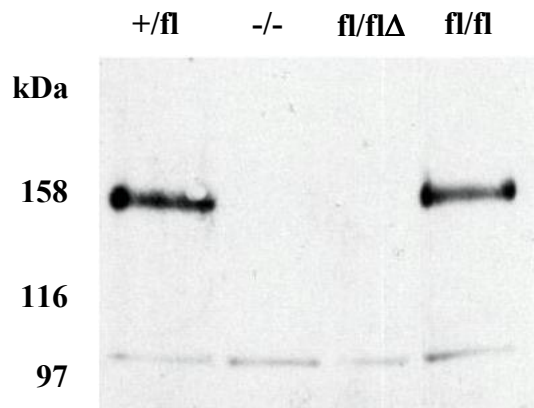


Abb. 2-27: Western Blot-Analyse $\alpha 2$ -defizienter Keratinozyten. Keratinozyten wurden aus Mäusen des Genotyps $ITGA2^{+/fl}$ ($+/fl$), $ITGA2^{fl/fl}$ (fl/fl), $ITGA2^{-/-}$ ($-/-$) und $ITGA2^{fl/fl}Cre^+$ ($fl/fl\Delta$) isoliert und lysiert. Die Proteinlysate wurden in einer *Western Blot*-Analyse auf die Expression der $\alpha 2$ -Untereinheit (etwa 160 kDa) untersucht. Die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit wurde nur in Keratinozyten der Genotypen $ITGA2^{+/fl}$ und $ITGA2^{fl/fl}$ identifiziert.

Es ist eine wesentliche Eigenschaft des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins, die Zelladhäsion an Kollagene und Laminine zu vermitteln (Gullberg et al., 1989; Languino et al., 1989). Daher wurde die Adhäsion der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten an verschiedene Substrate untersucht. Als Substrate dienten die HaCaT-Matrix als Kontrollsubstrat, fibrilläres Typ-I-Kollagen, Gelatine, Fibronectin, BSA und Plastik. Die Zellen wurden nach einstündiger Kultivierung auf den verschiedenen Substraten fotografiert (Abb. 2-28A). Anschließend wurden nicht adhärenente Zellen durch Waschen entfernt und die Anzahl adhärenenter Zellen nach der Färbung photometrisch bestimmt (Abb. 2-28B). Die Adhäsion der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten und der Kontrollzellen auf der HaCaT-Matrix war vergleichbar gut. In der numerischen Auswertung wurde die Adhäsion auf der HaCaT-Matrix als interner Standard gewählt und auf 100 % festgesetzt. Auf Typ-I-Kollagen hafteten die Kontroll-Zellen im Vergleich zu der HaCaT-Matrix sehr viel besser an. Die $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten konnten hingegen nicht an Typ-I-Kollagen adhäreren. Selbst nach einer Stunde waren auf fibrillärem Kollagen keine gespreiteten Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten zu erkennen.

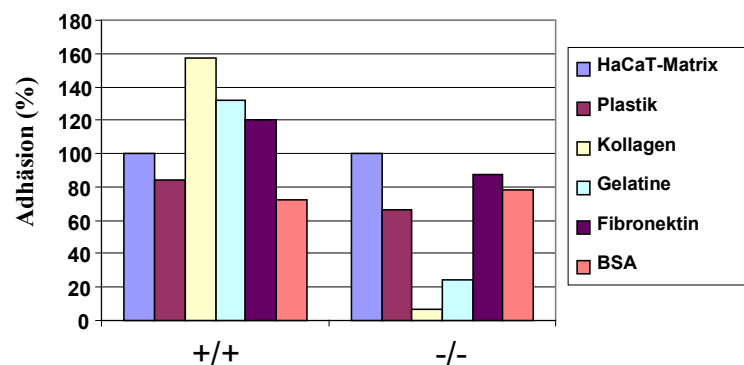
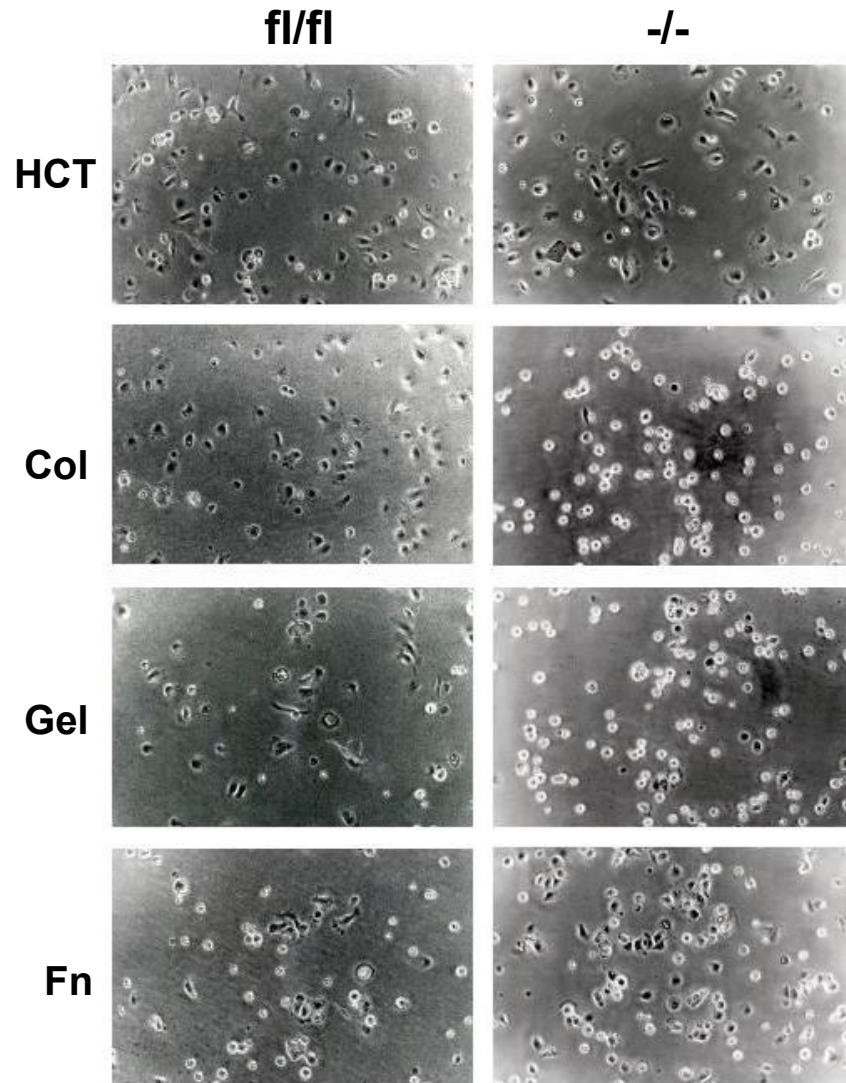


Abb. 2-28: Adhäsion Integrin- α 2-defizienter Keratinozyten an verschiedene Substrate. (A) α 2-defizienten Keratinozyten (-/-) und Kontrollzellen (fl/fl) wurden für die Dauer von einer Stunde auf verschiedenen Substraten ausgesät. Nach einer Stunde wurden die Zellen fotografiert (HCT: HaCaT-Matrix, Col: Typ-I-Kollagen, Gel: Gelatine, Fn: Fibronectin). 100fache Vergrößerung. (B) Photometrische Auswertung des Adhäsionsassays. Die Adhäsion auf der HaCaT-Matrix wurde als interner Standard verwendet und auf 100 % gesetzt, die Adhäsion an die übrigen Substrate gegen diese Adhäsion verglichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus Doppelansätzen.

Die immer noch kugelförmigen Zellen wurden mit dem anschließenden Waschschrift komplett entfernt. An Gelatine adhärennten Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Keratinozyten ebenfalls signifikant schlechter als Kontroll-Keratinozyten. Überraschend war die verminderte Adhäsion von Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten an Fibronectin, während die Adhäsion an Plastik und BSA für mutierte und Kontroll-Zellen vergleichbar war.

2.7 Kreuzung der ITGA2flox-Linie mit Mäusen des Genotyps ITGA1^{-/-}

Gardner et al. (1996) erzeugten eine Mauslinie mit einer homozygoten Inaktivierung des ITGA1-Gens. Die Tiere, die keinen $\alpha 1\beta 1$ -Integrinrezeptor besitzen, sind lebensfähig, fertil, und ohne offensichtlichen Phänotyp. Für die dermalen Fibroblasten dieser Tiere wurde jedoch eine höhere Kollagensynthese-Rate nachgewiesen (Gardner et al., 1999). In Tieren, die eine gegen den Abbau durch MMPs resistente Form des Typ-I-Kollagen produzieren (Liu et al., 1996), führte der Verlust der Integrin- $\alpha 1$ -Untereinheit zu einer verdickten Dermis.

Für ein weiterreichendes Verständnis der zum Teil antagonistischen Einflüsse der $\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrine in der Dermis ist die Inaktivierung beider Gene in der Maus von großem Interesse. Eine Analyse zur Lage der Gen-Loci für das ITGA1- und das ITGA2-Gen ergab, dass sich beide Gene in der Maus auf Chromosom 13 in einem Abstand von 1 cM befinden (*Mouse Genome Database* (MGD); Blake et al., 2001). Die Lage auf dem gleichen Chromosom bedeutet eine Kopplung des Genpaares. Um ein Chromatid zu erhalten, das eine Mutation in beiden Genen trägt, muss ein *crossing-over* in dem Bereich zwischen beiden Genen auftreten. Aufgrund des Abstandes von 1 cM zwischen den Genen ist ein solches *crossing-over* nur für eine von hundert meiotischen Teilungen der Keimzellen zu erwarten. Entsprechend ist nur ein geringer Anteil an Tieren zu erwarten, die die Mutation beider Gene auf demselben Chromatid tragen.

Daher wurden Mäuse der ITGA2flox-Linie mit Integrin- $\alpha 1$ -defizienten Tieren gekreuzt, um eine Linie des Genotyps ITGA1^{-/-}ITGA2^{fl/fl} zu generieren. Diese Vorgehensweise hat gegenüber dem direkten Einkreuzen der ITGA2^{-/-}-Linie den Vorteil, dass der vergleichsweise große Aufwand in der Erzeugung dieser Linie mit Sicherheit nicht in einem embryonal lethalen Phänotyp resultiert. In Tieren dieser Linie lässt sich die

Doppelnul-Mutationen anschließend einfach und schnell durch das Einkreuzen von Cre-Linien induzieren.

Im ersten Schritt der Kreuzung wurden Tiere des Genotyps $ITGA1^{-/-}$ mit Tieren des Genotyps $ITGA2^{fl/fl}$ gekreuzt. Diese Verpaarung führte zu Tieren des Genotyps $ITGA1^{+/-}ITGA2^{fl/+}$, in denen die Mutationen der Gene auf dem jeweils anderen Chromatid des Chromosoms lagen. Die Mäuse dieses Genotyps wurden untereinander verpaart, um Tiere zu erhalten, die durch das *crossing-over* zwischen den Genen eine heterozygote Mutation des einen Gens und eine homozygote Mutation des anderen Gens tragen. Tabelle 2-3 zeigt das Ergebnis der bisher analysierten Tiere. Interessanterweise wurden bereits Tiere geboren, bei denen ein *crossing over* zwischen dem Genpaar stattgefunden hat. Diese Ereignisse führten aber zu dem Verlust einer Genmutation und ist für die weiter Kreuzung ohne Bedeutung.

Tab 2-3: Erzeugung einer Doppelmutation der $ITGA1$ - und $ITGA2$ -Gene. Um Tiere des Genotyps $ITGA1^{-/-}ITGA2^{fl/fl}$ zu erhalten, wurden zunächst Kreuzungen der Form $ITGA1^{+/-}ITGA2^{fl/+}$ x $ITGA1^{+/-}ITGA2^{fl/+}$ und $ITGA1^{+/-}ITGA2^{fl/+}$ x $ITGA1^{-/-}ITGA2^{+/+}$ angesetzt. In der Tabelle angegeben ist die Zahl der für einen bestimmten Genotyp typisierten Tiere (schattiert) und deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl typisierter Tiere (Prozentangaben gerundet).

<i>ITGA1(+/-) // ITGA2(fl/+) x ITGA1(+/-) // ITGA2(fl/+)</i>						
	$\alpha 2(+/+)$		$\alpha 2(+/fl)$		$\alpha 2(fl/fl)$	
$\alpha 1(+/+)$	0	0 %	3	5 %	12	22 %
$\alpha 1(+/-)$	2	4 %	20	36 %	0	0 %
$\alpha 1(-/-)$	18	33 %	0	0 %	0	0 %

<i>ITGA1(+/-) // ITGA2(fl/+) x ITGA1(-/-) // ITGA2(+/+)</i>						
	$\alpha 2(+/+)$		$\alpha 2(+/fl)$		$\alpha 2(fl/fl)$	
$\alpha 1(+/+)$	0	0 %	2	23 %	0	0 %
$\alpha 1(+/-)$	0	0 %	3	33 %	0	0 %
$\alpha 1(-/-)$	4	44 %	0	0 %	0	0 %

3 Diskussion

3.1 Zu den Targeting-Experimenten

3.1.1 Embryonale Stammzellen der Linien E14.1, E14.1.1 und IB-10

Die Zelllinien E14.1 und E14.1.1 wurden bereits vielfach erfolgreich für die Inaktivierung verschiedener Gene in Mäusen verwendet (Torres und Kühn, 1997). Da diese Linien bereits seit einiger Zeit verwendet werden, lagen sie in einer vergleichsweise hohen Passage vor und wurden vor dem Gebrauch recht lange gelagert. Lange Lagerung und Kultivierung hat aber eine ungünstige Auswirkung auf die Qualität der ES-Zellen. So lässt es sich beispielsweise nicht verhindern, dass mit der Zeit aberrante Zellvarianten entstehen, die sich oftmals durch einen veränderten Karyotyp erkennen lassen (Wurst und Joyner, 1993). Ein entsprechend veränderter Karyotyp wurde in Zellen der Linie E14.1 häufig beobachtet (N. Smyth, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus sind diese Linien bekanntermaßen mit Mycoplasmen kontaminiert und müssen deshalb unter ständiger Verwendung von Antibiotika kultiviert werden. Mycoplasmenkontaminationen reduzieren die Effizienz in der Erzeugung chimärer Tiere aus ES-Zellklonen (Wurst und Joyner, 1993). Darüber hinaus erzeugt die ständige Verwendung von Antibiotika einen zusätzlichen Selektionsstress, der die Qualität der Zellen weiter mindert. Entsprechend konnten mit den ES-Zellen dieser Linien die gewünschten Mauslinien nicht erzeugt werden.

Die Zellen der Linie IB-10 wurden dahingegen in einer geringen Passage verwendet. Da diese Zellen nicht mit Mycoplasmen kontaminiert waren, konnte die Kultur ohne ständigen Antibiotikazusatz geführt werden. Diese besseren experimentellen Voraussetzungen äußerten sich darin, dass mit allen auf dieser Linie basierenden ES-Zellklonen keimbahnchimäre Mäuse generiert wurden.

3.1.2 Rekombinationsereignisse in ES-Zellen

Die Frequenz der homologen Rekombination eines *Targeting*-Vektors am Ziellocus ist von mehreren Faktoren abhängig. Auf der Seite des Integrationsortes ist die vorherrschende Chromatinstruktur und die damit verbundene Empfänglichkeit des Gens für eine homologe Rekombination von entscheidender Bedeutung (Wilder und Rizzino, 1993).

Auf der Seite des Vektordesigns ist ein möglichst hoher Anteil an zum Genlocus homologen und isogenen Sequenzen entscheidend. In der Literatur liegt der empfohlene Anteil zwischen 8-15 kb (Deng und Cappecchi, 1992; Hasty und Bradley, 1993; Hasty et al., 1991). Weder die Größe des heterologen Bereiches noch die asymmetrische Verteilung der homologen Sequenzbereiche um die heterologe Sequenz hat einen nennenswerten Einfluss auf die Rekombinationsfrequenz, solange der kürzere homologe Arm nicht kleiner als 1 kb ist (Deng und Cappecchi, 1994).

Für den *Targeting*-Vektor $\rho\alpha 2/lacZ$ -Neo wurde ein homologer Sequenzanteil von insgesamt 8 kb verwendet, der einen 5 kb großen heterologen Bereich flankiert. Entsprechend wurde die gute Rekombinationsfrequenz von 5 % erreicht, d.h. in 20 analysierten Klonen ließ sich ein Klon mit einer homologen Rekombination identifizieren.

Für den *Targeting*-Vektor $\rho\alpha 2$ flox wurden insgesamt lediglich 5 kb homologe Sequenz verwendet. Der kurze Arm der Homologie besaß nur eine Länge von 0,9 kb. Durch diesen kurzen homologen Arm sollte ursprünglich eine Analyse transfizierter ES-Zellklone mittels PCR ermöglicht werden. Homologe Rekombinationen wurden zwar auch für Vektoren vergleichbaren Designs beschrieben (Hasty et al., 1991; Zou et al., 1993), doch wird der Vorteil der dadurch möglichen PCR-Analyse transfizierter ES-Zellen von dem Nachteil einer reduzierten Rekombinationsfrequenz begleitet. Bei Zou et al. (1993) führte die Transfektion eines *Targeting*-Vektors mit einem 0,5 kb kurzen Arm der Homologie und einem 4 kb langen Arm zu einer Rekombinationsfrequenz von 1/500 (0,2 %). Damit verglichen ist die in dem hier beschriebenen Experiment erreichte Frequenz von 0,6 % erstaunlich gut, insbesondere, da die Kointegration der einzelnen, im Promotor liegenden *loxP*-Erkennungsstelle stattfand. Die Frequenz der homologen Rekombination ohne die Kointegration dürfte noch höher sein; da dieses Rekombinationsereignis aber ohne Nutzen für die Erzeugung der Mauslinien ist, wurde eine Analysestrategie gewählt, in der die Rekombination ohne Kointegration nicht erfasst wurde.

Um eine höhere Rekombinationsfrequenz zu erreichen und damit bei einem weiteren Transfektionsexperiment mehrere individuelle Klone mit der gewünschten Mutation zu

isolieren, wurde der Vektor $\rho\alpha 2\text{flox}$ modifiziert. Zunächst wurde der Anteil homologer Bereiche durch eine Verlängerung des kurzen Armes auf insgesamt etwa 8 kb ausgeweitet. Eine zusätzliche Verkürzung des Abstandes der *loxP*-flankierten Neo-Kassette zur singulären *loxP*-Erkennungsstelle ließ eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer Kointegration der *loxP*-Erkennungsstellen erwarten. Dieser Einfluss des Abstandes zweier *loxP*-Sequenzen auf die Kointegrations-Rate wurde am Beispiel der Geninaktivierung des TNF-Locus beschrieben (Torres und Kühn, 1997).

Der resultierende Vektor $\rho\alpha 2\text{floxII}$ führte dann auch zu einer Rekombinationsfrequenz von etwa 2,8 %, fast dem Fünffachen der Frequenz des Vektors $\rho\alpha 2\text{flox}$. Durch die Analysestrategien lässt sich keine Aussage über die Effizienz der homologen Rekombinationen ohne Kointegration der einzelnen *loxP*-Sequenz treffen. Ein Vergleich der beiden Vektoren in Hinsicht auf die Rekombination ohne Kointegration und die Kointegrations-Rate ist deshalb nicht möglich.

3.1.3 Cre-vermittelte Deletion der Neo-Kassette

Die experimentellen Rahmenbedingungen für eine effiziente Exzision der *loxP*-flankierten Neo-Kassette sind in der Literatur nur dürftig beschreiben und nicht systematisch untersucht. Persönlichen Mitteilungen zufolge (N. Smyth, W. Müller, R. Fässler) ist die erfolgreiche Deletion wesentlich von der Art und Menge des Cre-Rekombinase-Expressionsvektors abhängig, wobei die konkreten Angaben insbesondere über die einzusetzende Menge des Vektors kontrovers sind. Darin spiegelt sich die besondere Problematik der Neo-Deletion wider. Eine genügende Anzahl von ES-Zellen muss mit einer gerade ausreichenden Menge des Expressionsvektors transfiziert werden, um eine Cre-Rekombinase-Expression zu gewährleisten, die gerade für eine partielle Deletion ausreicht. Eine große Menge des Expressionsvektors und ein sehr starker Promotor favorisieren sicherlich eine komplette Deletion, während eine geringe Menge des Expressionsvektors und ein schwacher Promotor zu wenigen Zellen führen, in denen ein Deletionsereignis überhaupt stattfindet. Darüber hinaus beeinflusst die Zugänglichkeit des Genlocus und vermutlich auch die Platzierung der *loxP*-Sequenzen ebenfalls das Verhältnis von partieller zu kompletter Deletion.

Die transiente Transfektion des E14.1-Klons 110 mit 5 μg des Vektors pCrePac (Taniguchi et al., 1998) führte in 0,4 % der isolierten Klone zu einer Deletion der Neo-Kassette und in

3,8 % zu einer kompletten Exzision des *loxP*-flankierten Bereiches. In der Originalarbeit von Taniguchi et al. führte die Verwendung des Expressionsvektors zu einer partiellen Deletion in 8,3 % der Klone und in weiteren 8,3 % der Klone zu einer kompletten Deletion. Die in der hier beschriebenen Arbeit erreichte Effizienz in der gesamten Deletion wie der partiellen Deletion ist also vergleichsweise niedrig. Sie führte letztlich zu einem einzigen Klon, der für eine Erzeugung einer Mauslinie verwendet werden konnte, aus dem allerdings keine chimären Tiere hervorgingen.

Für die transiente Transfektion des IB-10 Klons 122 wurde der Expressionsvektor pIC-Cre (Gu et al., 1994) verwendet, in dem die Expression der Cre-Rekombinase wie im Vektor pCrePac durch den schwachen MC1-Promotor gesteuert wird. In der Arbeit von Gu et al. wurden durch 1 bzw. 3 µg dieses Expressionsvektors in insgesamt 15 % der isolierten Klone eine Deletion der Neo-Kassette erzeugt, in weiteren 6 % eine komplette Deletion. Im Zuge der hier beschriebenen Arbeit wurde der ES-Zellklon 122 in zwei Transfektionsexperimenten mit jeweils 20 µg des Vektors transfiziert. Insgesamt führten diese Experimente in 3,6 % der isolierten Klone zu einer Deletion der Neo-Kassette und in 9,9 % zu einer kompletten Deletion. Die Effizienz in Hinsicht auf die insgesamt erzeugten Deletionen und das Verhältnis von partieller zu kompletter Deletion ist zwar erneut nicht so gut wie in der Literatur beschrieben, aber deutlich besser als die Effizienz der transienten Transfektion des Vektors pCrePac.

3.2 Diskussion der Mauslinien

3.2.1 Die ITGA2flox-Mauslinie

Die Tiere der Linie ITGA2flox, die das mit *loxP*-Erkennungsstellen flankierte erste Exon des ITGA2-Gens tragen, zeigen keine besonderen Auffälligkeiten. Diese Beobachtung ist im Hinblick darauf, dass auch Integrin- α 2-defiziente Tiere keinen auffälligen Phänotyp zeigen, ohne weitere Bedeutung, denn sie gibt keine Auskunft über eine eventuelle Störung der endogenen Integrin- α 2-Expression. Eine normale Expression des Zielgens in den Linien, in denen schließlich eine gewebespezifische Inaktivierung induziert werden soll, ist aber eine Voraussetzung, um die Folgen der gewebespezifischen Geninaktivierung vernünftig diskutieren zu können.

Der Genexpression in Tieren der Linie ITGA2flox muss insbesondere deswegen Aufmerksamkeit geschenkt werden, weil eine *HindIII* gekoppelte *loxP*-Erkennungstelle in

den Promotor des Gens inseriert wurde, die die Funktion regulatorischer Promotorelemente beeinflussen kann.

In der Entwicklung der *Targeting*-Strategie wurde dem Rechnung getragen, indem für die 39 bp lange Insertion ein Bereich des Promotors gewählt wurde, in dem sich bei einem Vergleich des murinen Promotors mit dem humanen Promotor keine wichtigen bekannten regulatorischen Elemente fanden (Hesse, Diplomarbeit 1997; Zutter et al., 1994).

Die Expression der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit in den Tieren der Linie ITGA2flox wurde mittels *Western Blot*-Analyse verschiedener Mausorgane untersucht. In dieser Analyse konnte kein Unterschied zu der Expression in Wildtyp-Tieren gefunden werden. Diese Form der Analyse ist allerdings sehr grob und unvollständig, da sie sich auf ausgewählte Organe beschränkt und in diesen nur die Expression des Zellkollektivs erfasst. Da die Analyse des Integrin- $\alpha 2$ -Verlustes an Tieren mit einer kompletten Inaktivierung des ITGA2-Gens möglich ist, ist eine detailliertere Untersuchung des Expressionsmusters der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit in den Tieren der ITGA2flox-Linie zunächst nicht notwendig. Die spätere Erzeugung von Doppelmutanten mit Tieren der Linie ITGA2flox kann aber eine gewebespezifische Geninaktivierung erfordern, um einen lethalen Phänotyp zu vermeiden. An dieser Stelle muss die Integrin- $\alpha 2$ -Expression der ITGA2flox-Tiere in dem interessierenden Gewebe näher charakterisiert werden, möglichst über immunhistochemische Methoden, um die Expression in einzelnen Zellen zu identifizieren (s. 3.2.3).

3.2.2 Die ITGA2 Δ -Mauslinie

Die Tatsache, dass Mäuse des Genotyps ITGA2^{-/-} lebensfähig sind, ist insbesondere deshalb überraschend, da *in vitro*-Studien eine für Entwicklungsprozesse wichtige Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins nahe legten. So wurde gezeigt, dass das Integrin die Wanderung von epithelialen Zellen und Fibroblasten über eine kollagene Matrix vermittelt (Scharffetter-Kochanek et al., 1992; Grzesiak et al., 1992). Die Kontraktion und Organisation kollagener Matrices durch verschiedene Zelltypen, u.a. Fibroblasten, wird ebenfalls durch das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelt (Klein et al., 1991; Schiro et al., 1991; Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995). Diese Prozesse sind in der Embryo- und Organogenese von zentraler Bedeutung.

Acht der elf bekannten Integrin- α -Untereinheiten der $\beta 1$ -Familie wurden bislang in der Maus inaktiviert (Sheppard, 2000). In sechs Fällen zeigten sich schwerwiegende Phänotypen, die zum Tod der Tiere, z.T. bereits in frühen Embryonalstadien, führten. Die Deletion der Integrin- $\alpha 7$ -Untereinheit (Mayer et al., 1997) führte zu lebensfähigen Mäusen, die Merkmale einer progressiven Muskeldystrophie aufwiesen. Lediglich die Deletion der Integrin- $\alpha 1$ -Untereinheit führte zu Tieren, die keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten (Gardner et al., 1996). Mit der Deletion der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit existiert nun die zweite Inaktivierung eines Integrin-Kollagenrezeptors in der Maus, die mit einem unscheinbaren Phänotyp verbunden ist.

Zwei weitere Kollagenrezeptoren gehören zur $\beta 1$ -Familie der Integrine, das $\alpha 10\beta 1$ (Camper et al., 2001; Bengtsson et al., 2001) und das $\alpha 11\beta 1$ (Velling et al., 1999; Tiger et al. 2001), für deren α -Untereinheit noch keine Geninaktivierung publiziert wurde. Die Existenz von vier verwandten Kollagenrezeptoren eröffnet ein weites Feld für Spekulationen über die mögliche Kompensation des Verlustes eines dieser Rezeptoren durch die anderen und die Überprüfung, inwieweit sich eine solche Kompensation in der Expressionsinduktion der anderen Kollagenrezeptoren äußert, ist Aufgabe zukünftiger Arbeiten. Die Kompensation eines Integrinverlustes durch ein anderes Integrin wurde durch den Vergleich der Doppelinaktivierungen der Integrinuntereinheiten $\alpha 5/\alpha v$ und $\alpha 3/\alpha 6$ mit den jeweiligen Einzelinaktivierungen belegt (Yang et al., 1999; De Arcangelis et al., 1999).

Bei der Diskussion der Rezeptoren, die den Ausfall des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins kompensieren könnten, müssen letztlich auch Kollagenrezeptoren berücksichtigt werden, die nicht zu der Integrinfamilie gerechnet werden. Erwähnenswert sind zumindest für den Ersatz der integrinvermittelten Signaltransduktion die Rezeptortyrosinkinasen *Discoidin Domain Receptor* (DDR)-1 und -2 (Vogel, 1999), die durch die Bindung an Kollagen aktiviert werden. Die Aktivierung von DDR-2 in humanen Fibrosarcoma-Zellen führt, ähnlich wie die Kollagenbindung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins, zu einer gesteigerten Expression der MMP-1 (Vogel et al., 1997).

Außerdem werden über die nähere Analyse des humanen Genoms sicherlich noch eine Reihe weiterer möglicher Rezeptoren identifiziert werden, deren Existenz *in vivo* noch nicht belegt ist. Beispielsweise zeigt eine erste Übersicht über das humane Genom die potentielle Existenz einer weiteren Integrin- β -Untereinheit und sechs weiterer Integrin- α -Untereinheiten, deren Expression noch nicht nachgewiesen wurde (Venter et al., 2000).

3.2.3 Die epidermisspezifische Deletion der Integrin- α 2-Untereinheit

Die epidermisspezifische Deletion der Integrin- α 2-Untereinheit zeigte - wie erwartet - keinen Unterschied zu den Tieren mit einer kompletten Inaktivierung des Gens. Sie erlaubte aber die Funktionsprüfung des Modells einer gewebespezifischen Geninaktivierung des ITGA2-Gens. Diese wird zur Vermeidung eines lethalen Phänotyps bei der Erzeugung von Mäusen mit gleichzeitiger Inaktivierung mehrerer Gene von Bedeutung sein.

Das größte Problem in der Durchführung einer gewebespezifischen Geninaktivierung ist zum einen die nicht immer genügende Spezifität der durch den gewebespezifischen Promotor gesteuerten Cre-Expression, zum anderen die nicht immer komplette Inaktivierung des Gens in allen gewünschten Zellen. Dieses Problem ist sehr deutlich in den Beschreibungen der epidermisspezifischen Inaktivierung der Integrin- β 1-Untereinheit der Maus zu erkennen. Diese Mutation wurde durch das Kreuzen von Mäusen, die die gewebespezifisch inaktivierbare Integrin- β 1-Untereinheit besitzen, mit den epidermisspezifisch Cre-exprimierenden Mauslinien K14Cre (Raghavan et al., 2000) und K5Cre (Brakebusch et al., 2000) erzeugt.

In den Tieren, die das K14Cre-Transgen trugen, konnte zum Zeitpunkt der Geburt durch Immunfluoreszenzfärbungen keine Expression der Integrin- β 1-Untereinheit auf den Keratinozyten mehr nachgewiesen werden. Tiere, die das K5Cre-Transgen besaßen, zeigten hingegen zum Zeitpunkt der Geburt eine noch vorhandene Expression der Untereinheit auf einzelnen Keratinozyten. Der Unterschied in der Güte der Deletion äußert sich in unterschiedlichen Phänotypen. Bei einem kompletten Verlust der Integrin- β 1-Untereinheit zum Zeitpunkt der Geburt zeigten sich schwerwiegende Blasenbildungen, verbunden mit einer fehlerhaften Organisation der Basalmembran. Haarfollikel invaginierten nicht die Dermis und die Epidermis war hypoplastisch. Diese Tiere starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt (Raghavan et al., 2000). Die Mäuse mit einer Restexpression der Integrin- β 1-Untereinheit besaßen hingegen eine hyperplastische Epidermis und überlebten je nach Grad der Deletion bis über die sechste postnatale Woche hinaus. Haarfollikel bildeten sich aus, gingen aber im Zuge fortschreitender Deletion der Integrin- β 1-Untereinheit unter, begleitet von an den Follikeln auftretenden entzündlichen Prozessen und einer sich zunehmend manifestierenden dermalen Fibrose (Brakebusch et al., 2000).

Die gewebespezifische Inaktivierung des ITGA2-Gens wurde durch die *Southern Blot*-Analyse der Genmutation in verschiedenen Organen der Mäuse nach Einkreuzen der K14Cre-Linie und durch die *Western Blot*-Analyse der Integrin- α 2-Expression in aus der Haut isolierten, kultivierten Mauskeratinozyten überprüft und zeigte die spezifische Deletion der Untereinheit in den Keratinozyten. Die zusätzliche Überprüfung der Deletionseffizienz der Integrin- α 2-Untereinheit in den Keratinozyten der Maushaut mit Hilfe von immunhistochemischen Techniken oder Immunfluoreszenz-Färbungen ist sicherlich Aufgabe zukünftiger Arbeiten. Die weitere Analyse wird außerdem einige Standardfärbungen beinhalten, wie zum Beispiel Färbung verschiedener Keratine, die einen Überblick über den Grad der Keratinozytendifferenzierung in den verschiedenen Schichten der Epidermis geben (Smack et al., 1994), sowie Färbungen gegen Ki67, ein Antigen, dessen Expression mit dem Proliferationsstatus der Zelle korreliert (Van Erp et al., 1989).

Da die Epidermis der Tiere mit Integrin- α 2-defizienten Keratinozyten keine augenscheinlichen Defekte zeigt, ist der Rezeptor nicht für die normale Entwicklung der Epidermis notwendig. Ein ausgeprägter Defekt in der Ausbildung der Epidermis war auch nicht erwartet, da selbst Tiere mit einem epidermalen Verlust aller Integrine der β 1-Familie eine Epidermis ausbilden (Brakebusch et al., 2000; Raghavan et al., 2000). Auf Keratinozyten werden noch mindestens zwei weitere Integrine der β 1-Familie exprimiert, das α 3 β 1-Integrin und das α 5 β 1-Integrin, dessen Expression erst durch geeignete Stimuli erzeugt werden muss (BurrIDGE und Fath, 1989). Der Verlust der Integrin- α 3-Untereinheit führte zu einem milden Hautphänotyp (Kreidberg et al., 1996; DiPersio et al., 1997). Die Epidermis der Integrin- α 3-defizienten Tiere erschien weitestgehend normal, es bildeten sich lediglich an mechanisch beanspruchten Stellen Hautblasen. Mikroskopisch äußerte sich der Verlust der Integrin- α 3-Untereinheit in einer Disorganisation der Basalmembran und einer damit einhergehenden verringerten Anzahl Hemidesmosomen. Die Tiere starben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt an schwerwiegenden Defekten in der Niere und der Lunge.

Die Inaktivierung der Integrin- α 5-Untereinheit führt zu einem frühen embryonalen Phänotyp (Yang et al., 1993); die Auswirkung der Defizienz des α 5 β 1-Integrins für die Epidermis ließ sich daher an diesem Modell nicht klären. Eine gewebespezifische Inaktivierung der Integrin- α 5-Untereinheit wurde bislang nicht publiziert.

Mit der Geninaktivierung der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten wurden die beiden prominentesten Integrine der $\beta 1$ -Familie auf den Keratinozyten deletiert. Trotzdem zeigten die einzelnen Deletionen erstaunlicherweise deutlich mildere Phänotypen als die epidermisspezifische Deletion der $\beta 1$ -Untereinheit. Es bleibt zu untersuchen, ob durch die gleichzeitige Geninaktivierung der beiden Integrin- α -Untereinheiten in den Keratinozyten Phänotypen erzeugt werden können, die dem epidermalen Verlust der $\beta 1$ -Untereinheit entsprechen, oder ob der Verlust der $\beta 1$ -Untereinheit eine Konsequenz hat, die über den reinen Funktionsverlust der Integrinrezeptoren der $\beta 1$ -Familie hinausgeht.

3.2.4 Die Problematik der Mausmodelle

Mausmodelle einer Geninaktivierung bieten die Möglichkeit, den Verlust eines Proteins in einem komplexeren Zusammenhang zu untersuchen, als es in *in vitro*-Modellen möglich ist. Die größere Komplexität erschwert aber auch eine Evaluierung der aus den *in vitro*-Modellen erhaltenen Daten, da biologische Prozesse *in vivo* oftmals auf mehreren redundanten Mechanismen basieren.

Außerdem beschränkt sich die Phänotypisierung der Geninaktivierung auf die Mausentwicklung in einem weitestgehend definierten genetischen Hintergrund und einer gleichbleibenden Umgebung. Der genetische Hintergrund der Mäuse hat einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Ausprägung von Phänotypen nach einer Geninaktivierung. So führte die Geninaktivierung des EGF-Rezeptors in Mäusen der Linie CF-1 zu einem embryonal lethalen Phänotyp zum Zeitpunkt der Implantation, während die Inaktivierung in Mäusen der Linie CD-1 zu Tieren führt, die bis in die dritte postnatale Woche überleben (Threadgill et al., 1995). Die Inaktivierung des Keratin 8 in Mäusen mit einem C57Bl/6-Hintergrund hat einen lethalen Phänotyp aufgrund innerer Blutungen zur Folge, während die Inaktivierung in einem FVB/N-Hintergrund zu lebensfähigen Tieren mit kolorektaler Hyperplasie führt (Baribault et al., 1994). Um den Phänotyp einer Geninaktivierung in der Maus umfassend zu diskutieren, ist es daher notwendig, die Konsequenz der Inaktivierung in verschiedenen genetischen Hintergründen zu charakterisieren.

Weiterhin stehen die Tiere nicht unter einer natürlichen, umweltbedingten Selektion, da die Haltung in den Tierställen unter gleichbleibend optimierten und weitgehend keimfreien Bedingungen erfolgt. Der Verlust des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins kann sich aber möglicherweise erst

aufgrund eines umweltbedingten Stimulus äußern und zu einem Selektionsnachteil (oder –vorteil) der Tiere führen, die diesen Rezeptor nicht mehr besitzen. Für Mäuse, deren Gene für p53 und TCR β inaktiviert waren, wurde eine Ausbildung intestinaler Tumoren nur beobachtet, wenn die Tiere in einer „verschmutzten“ Umgebung gehalten wurden; in einer keimfreien Umgebung zeigte sich dieser Phänotyp bei den Tieren nicht (Kado et al., 2001). Da die Auswirkung der Geninaktivierung in der Maus bereits von vielen Randbedingungen beeinflusst wird, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf eine andere Spezies, z.B. den Menschen, nur unter Vorbehalt möglich.

3.3 Die Bedeutung der Integrin- α 2-Defizienz für Thrombozyten, Keratinozyten und Fibroblasten

3.3.1 Der Verlust der Integrin- α 2-Untereinheit in Thrombozyten

Der zweifellos wichtigste Schritt in der Hämostase besteht in der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten nach einer Gefäßverletzung (Ruggeri, 1997). Dieser Schritt ist von der Interaktion der Thrombozyten mit subendothelialen Matrixmolekülen bestimmt. Für die Bindung der Thrombozyten an Kollagen wurden verschiedene Rezeptoren identifiziert (Sixma et al., 1995; Sixma et al., 1997), darunter das α 2 β 1-Integrin (Santoro und Zutter, 1995) und der Rezeptor GPVI (Moroi et al., 1989). Lange Zeit wurde das α 2 β 1-Integrin als der für die Adhäsion wesentliche Kollagenrezeptor der Thrombozyten diskutiert, während der Rezeptor GPVI über die Bindung an Kollagen eine Aktivierung der Thrombozyten bewirke (Kehrel et al., 1998; Gibbins et al., 1997; Nieswandt et al., 2000).

Diese Vorstellung wurde aber durch die Analyse von Mausthrombozyten angezweifelt, deren Integrin- β 1-Untereinheit inaktiviert war. Diese Thrombozyten, die keine Integrine der β 1-Familie mehr exprimierten, adhärten weiter an fibrilläres Typ-I-Kollagen und wurden aktiviert. Für diese Prozesse schien der Rezeptor GPVI eine entscheidende Rolle zu spielen (Nieswandt et al., 2001a).

Diese Interpretation konnte durch die Analyse der Integrin- α 2-defizienten Thrombozyten der ITGA2^{-/-}-Maus weiter spezifiziert und eingeeengt werden. Die Thrombozyten waren trotz des Verlustes des α 2 β 1-Integrins in der Lage, an fibrilläres Typ-I-Kollagen zu adhären, und wurden aktiviert. Diese Adhäsion an Typ-I-Kollagen und die daran

anschließende Aktivierung wurde primär über den Rezeptor GPVI vermittelt, während für das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin eine die Adhäsion unterstützende Rolle gefunden wurde.

Aus der Analyse der Integrin- $\beta 1$ -defizienten Thrombozyten wurde ein Modell postuliert, nach dem Thrombozyten an einer Gefäßläsion zunächst durch die Interaktionen von GPIIb-V-IX, vWF und Kollagen anheften. Im zweiten Schritt binden die Thrombozyten über GPVI an das Kollagen und werden darüber aktiviert, was zu einer Aktivierung der Integrinrezeptoren, u.a. $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha \text{IIb}\beta 3$, führt. Die anschließende Bindung des Kollagens durch das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin führt zu einer verstärkten Adhäsion der Thrombozyten, die aber nicht essentiell ist (Nieswandt et al., 2001a).

Dieses Modell steht im Einklang mit der hier beschriebenen Interaktion Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Thrombozyten mit Typ-I-Kollagen. Allerdings beschränkt sich das Modell zunächst auch auf die Interaktion mit fibrillärem Typ-I-Kollagen und lässt sich nicht ohne weiteres auf andere Kollagentypen übertragen.

Für die Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten konnte in dieser Arbeit ein ausgeprägter Adhäsionsdefekt an „lösliches“ Kollagen gezeigt werden, der offensichtlich nicht durch den GPVI-Rezeptor kompensiert wird. Trotzdem spielt der GPVI-Rezeptor bei der Adhäsion der Thrombozyten an das „lösliche“ Kollagen auch eine entscheidende Rolle, da durch die Blockierung der Kollagenbindungsstelle des Rezeptors eine Adhäsion trotz des exprimierten $\alpha 2\beta 1$ -Integrins nicht stattfindet. Für die Adhäsion an „lösliches“ Kollagen sind Thrombozyten demzufolge auf beide Rezeptoren, das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und GPVI, angewiesen. „Lösliches“ Kollagen ist allerdings ohne physiologische Relevanz, da Kollagen in den Gefäßen normalerweise in unlöslicher fibrillärer Form vorliegt und kollagene Fragmente schnell abgebaut werden.

Die konsequente Weiterführung der Beobachtung bedeutet aber, dass die Adhäsion an verschiedene Kollagentypen durchaus in einem unterschiedlichem Maße vom $\alpha 2\beta 1$ -Integrin abhängen kann. Unterstützt wird dieser Gedanke durch die Beobachtung, dass die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen des Typs IV von Mg^{2+} -Ionen abhängig ist (Sixma et al., 1995). Eine Abhängigkeit der Rezeptorfunktion von zweiwertigen Kationen ist für das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin demonstriert worden (Onley et al., 2000), wohingegen die Bindung des GPVI-Rezeptors an Kollagen unabhängig von der Verfügbarkeit zweiwertiger Kationen ist (Morton et al., 1995). Entspricht die Bindung der Thrombozyten an andere Kollagene der Bindung an „lösliches“ Kollagen, wird eine Aktivierung zwar immer noch durch GPVI vermittelt, für eine ausreichend starke Adhäsion wird aber darüber hinaus das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin benötigt. Diese Vorstellung hat zur Folge, dass die Bedeutung des $\alpha 2\beta 1$ -

Integrins für die Thrombozytenadhäsion von dem Ausmaß der Gefäßläsion und der Zusammensetzung der dadurch exponierten subendothelialen Matrix abhängt. Beispielsweise wird durch den Untergang endothelialer Zellen zunächst die darunterliegende Basalmembran freigelegt, deren wesentlicher Kollagenbestandteil das Kollagen Typ IV ist. In zukünftigen Arbeiten wird daher die Adhäsion der Thrombozyten auf weiteren Kollagentypen sowohl unter statischen als auch unter fließenden Bedingungen charakterisiert werden.

Die Diskussion der Bedeutung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in Prozessen, die nach einer primären Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten stattfinden, ist nur bedingt möglich, da durch Degranulation weitere Aktivatoren, proaggregatorische und Matrix-Proteine ausgeschüttet werden, die die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten unabhängig von der $\alpha 2\beta 1$ -Kollagen-Interaktion entscheidend beeinflussen. Diese Ereignisse stehen nicht mehr in einem direkten Zusammenhang mit dem Verlust der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit. Auffälligerweise lässt sich aber in der zeitabhängigen Adhäsion an fibrilläres Kollagen des Typs I in den ersten 15 min eine schlechtere Haftung der $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen finden. Dieser Unterschied verliert sich erst zu den späteren Zeitpunkten. Eine anfänglich verminderte Adhäsionsfähigkeit der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten scheint durch die im Zuge der Aktivierung der Thrombozyten freigesetzte Granulabestandteile kompensiert zu werden.

3.3.2 Der Verlust des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in Keratinozyten

Entsprechend der Bedeutung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins als Kollagenrezeptor konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Keratinozyten ohne diesen Rezeptor keine Adhäsion an Typ-I-Kollagen mehr zeigen. Die Interaktion der Keratinozyten mit Kollagen des Typs I wird demnach ausschließlich über das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelt, der Verlust kann von den Zellen nicht kompensiert werden.

Auch die Adhäsion Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Keratinozyten an Gelatine ist stark reduziert. Für die Zelladhäsion an denaturiertes Kollagen wurden mehrere Integrinrezeptoren diskutiert, wobei dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bisher keine herausragende Bedeutung zukam (Davis, 1992; Pfaff et al., 1993; Tuckwell et al., 1994). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Adhäsion der Keratinozyten an Gelatine das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin eine wesentliche Rolle spielt. Das ist insofern erstaunlich, als für die Kollagenbindung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins

die Notwendigkeit der intakten Quartärstruktur des Kollagens diskutiert wird (Knight et al., 2000; Emsley et al., 2000).

In der Adhäsion an Fibronectin zeichnet sich für die Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten ein im Vergleich zu den Kontrollzellen geringfügig reduziertes Adhäsionsvermögen ab. Die eigentlichen Rezeptoren für Fibronectin auf Keratinozyten sind das $\alpha v\beta 5$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, deren Expression auf Keratinozyten *in vivo* stimuliert werden muss (Sheppard et al., 1992; Burridge und Fath, 1989). In der *in vitro*-Kultur werden diese Integrine von Keratinozyten exprimiert. Das reduzierte Adhäsionsvermögen der Keratinozyten an Fibronectin zeugt von einer Auswirkung des $\alpha 2\beta 1$ -Verlustes auf die Aktivität oder Affinität der fibronectinbindenden Rezeptoren. Solche transdominanten Effekte wurden bereits für andere Integrine beschrieben (Hodivala-Dilke et al., 1998; Lichtner et al., 1998). Hodivala-Dilke et al. beobachteten in Keratinozyten ohne $\alpha 3\beta 1$ -Integrin eine im Vergleich zu den Kontrollzellen verbesserte Adhäsion an Fibronectin und Kollagen Typ IV; die Aktivität oder Affinität der an diese Proteine bindenden Integrine wurde also erhöht. Außerdem bildeten die Keratinozyten mehr Stressfasern als Kontrollkeratinozyten, und in den Fokalkontakten fanden sich mehr Aktin-assoziierte Proteine. Zellmorphologische Studien sowie eine Analyse des Zytoskeletts und der Fokalkontakte in Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Keratinozyten auf verschiedenen Substraten sind wesentliche Ziele zukünftiger Arbeiten; diese Analysen bleiben nicht auf Keratinozyten beschränkt, sondern betreffen auch die Charakterisierung anderer Zelltypen, beispielsweise Thombozyten und Fibroblasten.

Neben dem Adhäsionsverhalten wird zukünftig insbesondere das Migrationsverhalten der $\alpha 2\beta 1$ -defizienten Keratinozyten von großem Interesse sein, da das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin als Kollagenrezeptor auf basalen Keratinozyten primär unter dem Aspekt der Reepithelialisierung bei der Wundheilung diskutiert wird. Für die Migration über sowohl Typ-I-Kollagen als auch Laminin-5 wird aufgrund mehrerer *in vitro*-Untersuchungen eine bedeutende Beteiligung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins postuliert (Pilcher et al., 1997; Dumin et al., 2001; Decline und Rousselle, 2001; Nguyen et al., 2000). Der Verlust der Adhäsionsfähigkeit Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Keratinozyten an Typ-I-Kollagen lässt ein deutlich verändertes Migrationsverhalten der Keratinozyten über dieses Substrat vermuten. Ein erster Wundheilungsversuch an einem Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Tier zeigte allerdings keinen offensichtlich veränderten zeitlichen Verlauf der Wundheilung im Vergleich zu einem Kontrolltier. Die gleiche Beobachtung wurde kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe vorgestellt (Grenache et al., 2001). Interessanterweise zeigen Integrin- $\beta 1$ -

defiziente Keratinozyten in Wundheilungsstudien ebenfalls Migrationspotential (Cord Brakebusch, persönliche Mitteilung). Ein nur geringfügiger Einfluss auf die Wundheilung wurde noch für eine Reihe weiterer Proteine dokumentiert, für die eine essentielle Rolle in diesem Prozess vermutet wurde (Scheid et al., 2000). Diese Beobachtungen zeugen davon, dass die Wundheilung offensichtlich ein durch vielfältige Mechanismen abgesicherter Prozess ist, der sich robust gegen den Verlust wichtiger Proteine zeigt. Die Rolle einzelner Gene in diesem Prozess wird wohl erst durch die Inaktivierung mehrerer Gene verdeutlicht werden können. Über die Beteiligung des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins an der Wundheilung werden immunhistochemische Analysen von Wunden Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Tiere und die Charakterisierung des Migrationsverhaltens Integrin- $\alpha 2$ -defizienter Keratinozyten Auskunft geben.

3.3.3 Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Fibroblasten in Kollagengelen

Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Fibroblasten zeigen eine deutlich verzögerte Kontraktion von Kollagengelen. Der $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptor ist demnach an der Kontraktion der Kollagengele beteiligt und für eine effektive, d.h. zeitlich schnell verlaufende Kontraktion notwendig. Trotz des Verlustes des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors findet allerdings eine Kontraktion der Gele statt. Diese Beobachtung stimmt mit den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Kollagengelkontraktion durch Fibroblasten überein. In diesen Untersuchungen wurde eine verzögerte Kontraktion der Gele durch blockierende Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop der Integrin- $\beta 1$ -Untereinheit erreicht (Klein et al., 1991; Langholz et al., 1995). Durch die zusätzliche Verwendung eines Antikörpers gegen die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit wurde die Kontraktion nicht nur verzögert, sondern auch deutlich reduziert. Die Verwendung des Antikörpers gegen die Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit alleine zeigte nur einen geringen Effekt auf die Gelkontraktion.

Die noch stattfindende Kontraktion der Kollagengele macht die Beteiligung mindestens eines weiteren kollagenbindenden Integrinrezeptors der $\beta 1$ -Familie in der Gelkontraktion wahrscheinlich. So wird beispielsweise die Kontraktion von Kollagengelen durch Leberfibroblasten im wesentlichen durch das $\alpha 1\beta 1$ -Integrin vermittelt (Racine-Samson et al., 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die stabile Transfektion von Zellen der Linie C2C12, die keine kollagenbindenden Integrinrezeptoren exprimiert, mit der cDNA der Integrin- $\alpha 11$ -Untereinheit die Kontraktion einer kollagenen Matrix durch diese Zellen

ermöglicht (Tiger et al., 2001). Inwieweit das $\alpha 1\beta 1$ - oder das $\alpha 11\beta 1$ -Integrin, oder noch ein weiterer Kollagenrezeptor, die Kontraktion durch Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Fibroblasten vermittelt, wird in zukünftigen Experimenten durch die Bestimmung des Integrin-Expressionsprofils dieser Fibroblasten untersucht werden. Zum Teil wird sich diese Frage sicherlich durch die Analyse der Fibroblasten aus Mäusen mit einer Deletion der Integrin- $\alpha 1$ - und - $\alpha 2$ -Untereinheiten beantworten lassen.

4 Zusammenfassung - Abstract

4.1 Zusammenfassung

Integrine bilden eine Familie von Zelloberflächenrezeptoren, die Proteine der extrazellulären Matrix binden und Zell-Zellkontakte vermitteln. Das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin dient hauptsächlich als Rezeptor für Kollagen, bindet aber in Abhängigkeit vom exprimierenden Zelltyp auch Laminin. Basierend auf *in vitro*-Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Rezeptor auf epithelialen und mesenchymalen Zellen die Adhäsion an und Migration auf kollagenen Substraten sowie die Kontraktion dreidimensionaler Kollagenmatrizes vermittelt. Ferner wurde für das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin eine zentrale Rolle in der Hämostase diskutiert. Um die Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins *in vivo* zu untersuchen, wurden murine ES-Zelllinien etabliert, in denen das erste Exon des ITGA2-Gens mit *loxP*-Sequenzen flankiert ist. Mit diesen Zellen wurde die Mauslinie ITGA2^{flox} erzeugt, in denen eine gewebespezifische Deletion der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit durch das Einkreuzen entsprechender Cre-exprimierender Mauslinien erzeugt werden kann. Der Verlust der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit führt zum Funktionsverlust des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors. Die komplette Deletion der Integrin- $\alpha 2$ -Untereinheit führte überraschenderweise zu lebensfähigen Tieren, die fertil waren und, wie die Tiere mit einer epidermisspezifischen Deletion, keinen offensichtlichen Phänotypen zeigten. Die Blutungszeit der Tiere entsprach der von Kontrolltieren. Entsprechend war die Aggregation der Integrin- $\alpha 2$ -defizienten Thrombozyten nach einer Stimulierung mit fibrillärem Typ-I-Kollagen lediglich verzögert, aber nicht reduziert. Mit „löslichem“ Kollagen ließ sich hingegen keine Aggregation induzieren. Die Adhäsion der Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Thrombozyten an fibrilläres Typ-I-Kollagen entsprach der von Kontrollzellen, jedoch ließ sich die Adhäsion der defizienten Thrombozyten durch Verwendung eines Antikörpers gegen GPIV, einem aktivierenden Kollagenrezeptor der Thrombozyten, vollständig verhindert. Bei der Interaktion der Thrombozyten mit fibrillärem Typ-I-Kollagen kommt dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin demnach eine eher unterstützende als zentrale Rolle zu. Integrin- $\alpha 2$ -defiziente Keratinozyten adhären im Gegensatz zu Kontrollzellen nicht an fibrilläres Typ-I-Kollagen und deutlich schlechter an Gelatine. Auf Keratinozyten ist das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin demnach der einzige Rezeptor, der eine Adhäsion an Typ-I-Kollagen vermittelt. Fibroblasten, in denen das $\alpha 2\beta 1$ -Integrin deletiert wurde, kontrahieren erstaunlicherweise

Kollagengele im gleichen Maße wie Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust des $\alpha 2\beta 1$ -Integrinrezeptors *in vivo* vermutlich kompensiert wird und dass die zum Teil subtilen Phänotypen durch funktionelle *in vitro*-Untersuchungen erschlossen werden müssen.

4.2 Abstract

Integrins are a family of cell surface-receptors that bind to proteins of the extracellular matrix and mediate cell-cell contacts. The $\alpha 2\beta 1$ integrin predominantly binds to collagen but also, depending on the cell type it is expressed on, to laminin. Based on *in vitro* studies it has been shown that on epithelial and mesenchymal cells the receptor mediates adhesion to and migration on collagen and, in addition, the contraction of three-dimensional collagen lattices. On platelets, a central role for $\alpha 2\beta 1$ integrin in hemostasis has been discussed. To define the role of the $\alpha 2\beta 1$ integrin *in vivo*, ES-cell lines were established containing the *loxP*-flanked first exon of the *ITGA2* gene. These cells were used to generate mice in which a tissue-specific deletion of the integrin $\alpha 2$ -subunit is enabled by crossing to cre-expressing mice. Deletion of the integrin $\alpha 2$ -subunit leads to loss of function of the $\alpha 2\beta 1$ integrin. As a surprise, the complete deletion of the integrin $\alpha 2$ -subunit resulted in viable and fertile mice that showed no obvious phenotype, as the epidermis-restricted $\alpha 2$ -deletion did. Bleeding times of the integrin $\alpha 2$ -deficient animals did not differ from normal mice. In accordance, aggregation of integrin $\alpha 2$ -deficient platelets to fibrillar collagen type I was delayed, but not reduced, whereas aggregation to enzymatically digested soluble collagen was abolished. Furthermore, integrin $\alpha 2$ -deficient platelets normally adhere to fibrillar collagen. In the presence of an antibody against GPVI, an activating platelet collagen receptor, adhesion of integrin $\alpha 2$ -deficient, but not wild-type platelets is abrogated. Thus, $\alpha 2\beta 1$ integrin plays a supportive rather than an essential role in interactions of platelets with collagen type I. Integrin $\alpha 2$ -deficient keratinocytes did not adhere to collagen type I and barely to gelatin, showing that $\alpha 2\beta 1$ integrin is the only receptor on keratinocytes enabling adhesion to collagen type I. Surprisingly, fibroblasts deficient in the integrin $\alpha 2$ -subunit were still capable of contracting three-dimensional collagen lattices to the same extent as wild-type cells. These results show that *in vivo* loss of $\alpha 2\beta 1$ integrin is probably compensated, and that the mechanisms leading to the observed subtle phenotypes have to be revealed using functional *in vitro* assays.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Materialien, Puffer

Chemikalien, Materialien und Enzyme stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim), Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Mannheim), und Sigma (Taufkirchen).

Häufig verwendete Puffer:

Alle verwendeten Puffer wurden mit bidestilierten Wasser angesetzt und, wenn möglich, autoklaviert.

PBS	162 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Trypsin	0,1 % Trypsin, 0,02% EDTA

Vektoren:

pBluescript KSII (+)	Klonierungsvektor; Stratagene
pIC-Cre	Cre-Expressionsvektor; freundlicherweise von W. Müller, Institut für Genetik, Köln, zur Verfügung gestellt.
pCre-Pac	Cre-Expressionsvektor; freundlicherweise von N. Smyth, Institut für Biochemie II, Köln, zur Verfügung gestellt.
pGEM3Hf677	1,4 kb cDNA-Fragment des humanen α 1(I) Prokollagens kloniert in pGEM-4.
MauskollI	730 bp cDNA-Fragment der murinen MMP-13 kloniert in pBluescript KSII; freundlicherweise von P. Angel, DKFZ, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.
p λ 9S6.5	6,7 kb langes genomisches Fragment des murinen ITGA2-Locus kloniert in pBluescript KSII. Aus diesem Plasmid wurden die Sonden X/H und Ext isoliert (O. Holtkötter, Diplomarbeit 1997).

Oligonukleotide:

SmaI upper	5'-CTC CCG GGT AGG GCC CAC CAT GGG C-3'
SmaI lower	5'-CCA TGG TGG GCC CTA CCC GGG AGG C-3'
MM09	5'-GTG CTT TAC GGT ATC GCC GCT CC-3'
MH11	5'-GTC ACC TTA ATA TGC GAA GT-3'
MH12	5'-AGA GCA GAC ATC GCC AGC TCC-3'
B2,6T7	5'-TGC CTT GCC ATT TCC CAA-3'
OH1	5'-AAG TTG CTC GCT TGC TCT A-3'
OH2	5'-GCT TGT CTA ATG GCT ATT GC-3'
OH3	5'-TGG CTT TTC TTC CTC CTA TGG-3'
SC 1(+)	5'-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA-3'
SC 3(-)	5'-CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC-3'
WT	5'-GTT GTT CTA TTT TTG TAG TTA AC-3'
KOA1	5'-GGG GAA CTT CCT GAC TAG-3'
DST	5'-AAT CCT CCA TTC GGG TTG GTG-3'

5.2 Molekularbiologische Methoden

Vorbemerkung: Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.1 Allgemeine Methoden

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „Qiaprep® Spin Miniprep Kit“ und des „Qiagen® Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmid-Präparationen beruhen auf dem Alkali-Lyse-Verfahren von Birnboim et al. (1979).

Die **DNA-Extraktion** aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „Qiagen® Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Für die **Bakterien-Transformation** wurden 50 µl kompetenter *E. coli* DH5α (Life Technologies, Karlsruhe) oder 294-Cre (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N.Smyth, Biochemie II, Köln) auf Eis aufgetaut und mit 10 ng des Plasmids versetzt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung 30 s auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Bakterien weitere 2 min auf Eis inkubiert und schließlich durch Zugabe von

500 µl LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) und Inkubation bei 37 °C für 1 h im Schüttler regeneriert. Es wurden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf LB(AMP)-Platten (LB-Medium mit 15 g/l Agar und 50 mg/l Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zur **radioaktiven Markierung von doppelsträngiger DNA** wurde das „Ladderman™ Labeling Kit“ von Takara benutzt, das auf dem von Feinberg und Vogelstein (1983) vorgestellten Prinzip des *Random Priming* basiert. In der Regel wurden 20 ng dsDNA eingesetzt und durch die Zugabe von 1.87 Mbq [α -³²P]dCTP (spezifische Aktivität > 111 TBq/mmol; ICN, Eschwege) nach der Vorschrift des Herstellers markiert.

Zur Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide wurde die markierte DNA über eine Sephadex-G50-Säule („Probe Quant™ G-50 Micro Columns“, Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Ein Aliquot des Eluats wurde im β -Zerfallszähler (Beckman) gemessen.

5.2.2 Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen

Auf 48 Lochplatten kultivierte ES-Zellen wurden einmal mit 500 µl PBS pro Loch gewaschen, mit 500 µl Lysispuffer (100 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, 100 µg/ml Proteinase K) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Lysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8, aufgenommen. Die DNA wurde durch mehrstündige Inkubation bei 55 °C vollständig resuspendiert.

Restriktionsspaltung und Gelelektrophorese genomischer DNA

Etwa 25 µl der DNA-Lösung wurden in einem 30 µl Gesamtvolumen mit 100–150 U des entsprechenden Restriktionsenzym über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die geschnittene DNA wurde mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer (30 % [w/v] Glycerin, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol FF) versetzt und in horizontalen 0,7 %igen Agarosegelen (Gibco/BRL) mit TAE (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA [pH 8]) als Elektrophoresepuffer aufgetrennt.

Die DNA wurde durch Zugabe einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung auf eine Endkonzentration von etwa 0,5 µg/ml zur verflüssigten Agarose angefärbt. Als Größenstandard diente die 1 kb DNA-Leiter von Life Technologies (Karlsruhe).

Transfer von DNA auf Nitrocellulose (Southern Blot)

Nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des *Southern Blots* (Southern, 1975) auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Das Gel wurde zunächst 20 min in 250 mM HCl-Lösung geschwenkt, einige Male mit Wasser gespült und dann weitere 30 min in Alkali-Transfer-Lösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht durch die Kapillarwirkung von Whatmanpapier und Papiertüchern mit Alkali-Transfer-Lösung. Die Membran wurde anschließend zur Fixierung der DNA im „UV-Crosslinker“ (Stratagene, Heidelberg) bestrahlt und dann hybridisiert.

Hybridisierung mit DNA-Sonden

Die zu hybridisierenden Membranen wurden zunächst in Prähybridisierungs-Lösung (4xSSC, 0,4 % [w/v] Milchpulver, 4 % [w/v] SDS, 0,3 mg/ml ssDNA) bei 65 °C für mindestens 1 h vorhybridisiert. Im Anschluss wurde die Prähybridisierungs-Lösung gegen Hybridisierungs-Lösung (4xSSC, 0,4 % [w/v] Milchpulver, 4 % [w/v] SDS, 20 % [w/v] Dextransulfat, 0,3 mg/ml ssDNA) ausgetauscht und über Nacht bei 65 °C mit der denaturierten markierten Sonde hybridisiert. Am folgenden Tag wurde zunächst 20 min bei 65 °C mit 2 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen, dann bei gleicher Temperatur 30 min mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS. Auf die Membranen wurden Filme bei -80 °C in Röntgenkassetten exponiert.

Sollten die Filter mit einer weiteren Probe hybridisiert werden, wurden sie zum Entfernen der alten Sonde zweimal je 30 min bei 80 °C mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen.

5.2.3 Northern Blot-Analyse

Isolation von RNA aus Kollagengelen und Monolayer-Kulturen

Kollagengele (Ø 6 cm) wurden vor der Isolation der RNA über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Dann wurden die Gele dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Skalpell zerkleinert. Es wurden 4 ml RNazol B (WAK-Chemie, Bad Homburg) zugesetzt und das Gel darin weiter zerkleinert. Das Homogenisat wurde schließlich mehrere Male erst durch eine 10 ml Plastikpipette und dann durch eine 5 ml Plastikpipette gezogen, bis es letztlich

durch eine 22G-Kanüle aufgezogen und in ein 15 ml Röhrchen überführt werden konnte. Die weitere Präparation (Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Präzipitat wurde je nach Menge in 20-100 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Monolayer-Kulturen (6 cm) wurden dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 4 ml RNAzol B (WAK-Chemie, Bad Homburg) versetzt. Die weitere Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

Transfer von RNA auf Nitrocellulose (Northern Blot)

10-20 µg Gesamt-RNA wurde in 20 mM MOPS, 0,66 M Formaldehyd, 50 % Formamid, 5 % Glycerin, 0,1 mM EDTA, 0,04 % Bromphenolblau und 0,04 % Xylencyanol bei 65 °C für 10 min denaturiert und in 1 % Agarosegelen aufgetrennt, die mit FA Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,0) und 0,66 M Formaldehyd hergestellt wurden. Als Laufpuffer diente FA Puffer. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in 20 x SSC inkubiert, dann wurde die RNA durch die Kapillar-Transfer-Methode mit 20 x SSC über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond NTM, Amersham Pharmacia, Freiburg) transferiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zur Fixierung der DNA im „UV-Crosslinker“ (Stratagene, Heidelberg) bestrahlt und zur Kontrolle des Transfers mit Methylblau-Lösung (0,04 % Methylblau, 0,5 M NaOAc) gefärbt.

Hybridisierung mit DNA-Sonden

Northern Blot Membranen wurden für eine Stunde bei 42 °C in „ULTRAhyb“ (Ambion) prähybridisiert. Im Anschluss wurde eine radioaktiv markierte cDNA-Sonde (10⁶ cpm/ml) zur Hybridisierungslösung gegeben und die Membran über Nacht bei 42 °C hybridisiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde in der Regel zweimal 10 min mit 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 50 °C – 55 °C gewaschen und ein Röntgenfilm exponiert.

5.3 Protein-Analyse

5.3.1 Protein-Isolation

Isolation aus Zellkulturen

In Zellkulturschalen (\varnothing 9 cm) kultivierte Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und schließlich 15 min mit 2 ml Lysispuffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 0,5 % NP-40, CompleteTM Protease Inhibitor Tablets [Boehringer Mannheim]) auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Schale mit 2 ml Lysispuffer nachgewaschen. Der Lyse-Ansatz wurde für weitere 1-2 Stunden im Überkopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert und schließlich bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für kurze Zeit bei 4 °C aufbewahrt oder bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde durch die BCA-Methode mit Reagenzien von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

Isolation aus Organen

Aus Mäusen präparierte Organe wurden gewogen und etwa 100-150 mg eines Organs in 1 ml Lysispuffer (50 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 % NP-40, CompleteTM Protease Inhibitor Tablets [Boehringer Mannheim]) unter Verwendung eines Ultra-Turrax (Janke & Kunkel) homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1-2 Stunden im über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für kurze Zeit bei 4 °C aufbewahrt oder bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde durch die BCA-Methode mit Reagenzien von Pierce (Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

5.3.2 Western Blot-Analyse

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Transfer auf Nitrocellulosemembrane

Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit 6 %igen Trenngelen nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Als Größenstandard diente der „Broad Range“-Marker von New England Biolabs (Schwalbach).

Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem *Semi Dry*-Verfahren in einer „Fastblot B34“-Kammer (Biometra) auf Nitrocellulosemembrane (Hybond-C SuperTM, Amersham Pharmacia, Freiburg) transferiert. Der Transfer wurde mit 1 mA/cm² Membranfläche für etwa 120 min

durchgeführt (Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS [w/v], 20% Methanol [v/v]). Die Güte des Transfers wurde durch eine Färbung der Membran mit „Ponceau redTM“ (Sigma, Taufkirchen) überprüft.

Alternativ wurden SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Färbelösung (10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Serva Blau R, filtriert) 30 min gefärbt und anschließend zur Differenzierung der Proteinbanden durch mehrmalige Inkubation mit 5 % Ethanol / 10 % Essigsäure entfärbt.

Immundetektion der Integrin- α 2-Untereinheit

Die aus dem Proteintransfer erhaltene Membran wurde über Nacht bei 4 °C in TBST (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,2 % Tween 20, pH 7,6) mit 1 % Pferdeserum (Boehringer Mannheim) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 5 min mit TBST gewaschen und mit einer 1:4000 Verdünnung des Antikörpers U+34E (Kaninchen anti-Maus α 2-Integrin, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von U. Mayer, Manchester, UK) in TBST für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST für 5 min entfernt, dann wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Schwein anti-Kaninchen IgG Antikörper (DAKO, 1:3000 in TBST) für 45 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit TBST für 5 min gewaschen, gefolgt von drei weiteren Waschschritten in TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) für 5 min. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des „ECLTM“ -Systems (Amersham Pharmacia, Freiburg) auf Röntgenfilmen nach Angaben des Herstellers.

5.3.3 Durchfluss-Zytometrie

Die Analyse mittels Durchfluss-Zytometrie erfolgte in der Arbeitsgruppe von B. Nieswandt wie zuvor beschrieben (Nieswandt et al., 2001b).

Heparinisiertes Gesamtblut (s. 5.5.4) wurde 1:30 mit modifiziertem Tyrode's Puffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,3 mM Na₂PO₄, 5,5 mM Glukose, 5 mM Hepes, pH 7,3) und 0,35 % BSA verdünnt. 50 μ l-Proben wurden 10 min bei 37 °C mit einem Fluorophorgekoppeltem monoklonalen Antikörpern (s.u.) inkubiert und schließlich direkt mit Hilfe des FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert oder 10 min bei 37 °C mit einem primären monoklonalen Antikörper inkubiert, zweimal mit modifiziertem Tyrode's Puffer gewaschen, weitere 10 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert und im FACSCalibur analysiert. Von den Messergebnissen wurde der Teil ausgewertet (*Gating*), der den Engwinkelstreulicht

(*forward scatter*)- und 90°-Streulicht (*sideward scatter*)-Charakteristiken von Thrombozytenpopulationen entsprach.

Verwendete primäre Antikörper:

FITC konjugierter (kj.) Hamster anti-Ratte $\beta 1$ Integrin (Ha2/5, BD PharMingen, Heidelberg), FITC kj. Hamster anti-Ratte $\alpha 2$ Integrin (Ha1/129, BD PharMingen), Ratte anti-Maus $\alpha 5$ Integrin (5H10-27, BD PharMingen), FITC kj. Ratte anti-Maus $\alpha 6$ Integrin (GoH3, BD PharMingen), Ratte anti-Maus $\beta 3$ Integrin (EDL4, B. Nieswandt), Ratte anti-Maus GPIb-IX (p0p1, B. Nieswandt), Ratte anti-Maus GPV (DOM1, B. Nieswandt), Ratte anti-Maus CD9 (ULF1, B. Nieswandt), Ratte anti-Maus GPVI (JAQ1, B. Nieswandt).

Verwendeter sekundärer Antikörper:

FITC kj. Kaninchen anti-Ratte IgG (DAKO, Hamburg).

5.4 Etablierung mutierter Mauslinien

5.4.1 ES-Zellkultur

Die ES-Zelllinien E14.1, E14.1.1 und IB-10 wurden freundlicherweise von Dr. W. Müller, Institut für Genetik, Köln, zur Verfügung gestellt. Die ES-Zellkultur wurde nach Protokollen von Torres und Kühn (1997) und Talts et al. (1999) durchgeführt. Die ES-Zellen wurden auf einer konfluenten Schicht mitoseinaktivierter (s. 5.5.1) und G418-resistenter embryonaler Fibroblasten (isoliert aus freundlicherweise von N. Smyth, Institut für Biochemie, Köln, zur Verfügung gestellten CD1neo-Mäusen) bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 10 % CO₂ kultiviert. Als ES Medium diente DMEM (4500 g/l Glukose, ohne Natriumpyruvat), supplementiert mit 15 % FCS (PAA, Linz, Österreich), 1 mM Natriumpyruvat (Life Technologies, Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin, 1 x Nicht-essentielle Aminosäuren (Life Technologies), 2000 U/ml LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*, Chemicon, Hofheim), 0,1 mM 2-Mercaptoethanol. ES-Zellen der Linie IB-10 wurden ohne Antibiotika, die Zellen der Linie E14.1 und E14.1.1 wurden unter Verwendung von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die ES-Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf 9 cm Gewebekulturschalen (Greiner) in einer Dichte von 10⁶ Zellen ausgesät und nach spätestens zwei Tagen erneut passagiert. Die Passagezahl wurde möglichst gering gehalten.

5.4.2 Reinigung von DNA für die ES-Zelltransfektion

Etwa 80–100 µg der zur Transfektion bestimmten Plasmid-DNA wurden über Nacht mit 50 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease linearisiert. Anschließend wurde der Ansatz einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen, die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris, pH 8, resuspendiert, die vollständige Linearisierung auf einem Agarosegel überprüft und die Konzentration der Lösung durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260/280 nm bestimmt.

5.4.3 ES-Zelltransfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die ES-Zellen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen auf eine 9 cm Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurde zwei bis drei Stunden vor der Transfektion das Medium gewechselt. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, zweimal mit PBS gewaschen und gezählt. Für eine Transfektion wurden 10^7 ES-Zellen in 1 ml PBS, das 20-40 µg des linearisierten Vektors enthielt, resuspendiert und in eine 1 ml-Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, BTX inc., San Diego, USA) überführt. Die Zellen wurden schließlich in einem „GenePulser II“ Elektroporator (Bio-Rad, München) bei 800 V und 3 µF elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in ES Medium überführt und auf 6-8 Zellkulturschalen ausgesät. Zur Kontrolle der Selektion wurden 5×10^5 nicht elektroporierte ES-Zellen ausgesät.

Nach 48 Stunden wurde das Medium erstmals gewechselt und die Selektion mit 300 µg G418/ml Medium begonnen. Ein Mediumwechsel mit G418-haltigem Medium erfolgte täglich. Ab dem vierten Tag wurde bei entsprechender *Targeting* Strategie durch den täglichen Zusatz von Gancyclovir auf eine Endkonzentration von etwa 2 µM negativ selektioniert. ES-Zellkolonien konnten etwa 8 bis 10 Tage nach der Elektroporation isoliert werden.

5.4.4 Isolation und Einfrieren von ES-Zellkolonien

Die ES-Zellkolonien wurden unter einem Mikroskop mit Hilfe gelber Pipettenspitzen isoliert. Undifferenzierte Kolonien wurden vorsichtig von den umliegenden Fibroblasten abgelöst, schließlich mit etwa 5 µl Medium in die Pipettenspitze gesogen und in 100 µl Trypsin überführt. Nach etwa 20 minütiger Inkubation bei RT wurden die vereinzelt Kolonien auf Fibroblasten-beschichtete 48 Loch-Mikrotiterplatten überführt und die Löcher mit ES

Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden bis zur Subkonfluenz bei täglichem Mediumwechsel kultiviert.

Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 150 µl Trypsin bei 37 °C für etwa 3 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 350 µl ES-Medium beendet. Nachdem die abgelösten Zellen vorsichtig resuspendiert worden waren, wurden 250 µl der Suspension mit 250 µl Einfriermedium (20 % DMSO, 80 % FCS) vermischt und auf Trockeneis eingefroren. Die eingefrorenen Zellen wurden bis zum Ergebnis der Analyse bei –80 °C gelagert. Die restlichen Zellen auf der 48 Lochplatte wurden mit weiteren 500 µl Medium versehen und bis zur Konfluenz kultiviert. Aus diesen Zellen wurde DNA präpariert und analysiert.

5.4.5 Erzeugung chimärer Tiere

Injektionen genetisch modifizierter ES-Zellen in Blastozysten und die Reimplantationen der Blastozysten in scheinchwangere Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Neil Smyth (Institut für Biochemie II, Universität zu Köln) wie zuvor beschrieben (Smyth et al., 1999) durchgeführt.

5.5 Zellisolation und -kultur

5.5.1 Kulturbedingungen

Die im folgenden beschriebenen Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 10 % CO₂ kultiviert. Als Standardmedium diente DMEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, die Gewebekulturschalen stammten von Greiner.

5.5.1 Maus-Fibroblasten

Isolation embryonaler und neonataler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten wurden aus 13 bis 14 Tage alten Mausembryonen isoliert. Schwangere Mäuse wurden zum entsprechenden Zeitpunkt getötet, der Uterus präpariert und in PBS überführt. Der Uterus wurde mehrmals in PBS gewaschen, schließlich wurde die Uteruswand eröffnet und die Embryonen in frisches PBS überführt. Die bluthaltigen Organe

(Leber, Herz) werden aus dem Bauchraum entfernt, der Kopf abgetrennt. Die übriggebliebenen Torsi wurden in wenig PBS gesammelt und zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 10 ml Trypsin bei Raumtemperatur für 10 min im Rotationsschüttler inkubiert. 5 ml des Überstandes wurden abgenommen, der Rest mit weiteren 5 ml Trypsin für weitere 10 min inkubiert. Der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt, dann wurden die gesammelten Überstände zentrifugiert und das Zentrifugat in Standardmedium resuspendiert. Die Zellpräparation wurde auf eine 9 cm Zellkulturschale/Embryo ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Neonatale Fibroblasten wurden aus 1-3 Tage alten, neugeborenen Mäusen isoliert. Die Tiere wurden getötet und für jeweils 2-3 min in Betaisodona-Lösung, PBS, 70 % Ethanol und PBS gewaschen. Die Extremitäten wurden abgetrennt und die Haut isoliert. Die Haut wurde unter PBS mit Hilfe eines Skalpell in etwa 1 mm² große Stücke geschnitten und die Stücke auf einer Zellkulturschale ausgebreitet. Zum Anheften wurden die Hautstücke für etwa 15 min im Zellkultur-Inkubator getrocknet, dann wurden sie mit 10 ml Standardmedium überschichtet. Nach etwa 10-14 Tagen waren genügend Fibroblasten aus den Hautstücken ausgewandert. Sie wurden trypsiniert und erneut auf eine Zellkulturschale ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:2 oder 1:3 passagiert.

Mitoseinaktivierung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten, die als *Feeder*-Zellen für die ES-Zellen dienen, wurden vor der Verwendung mitoseinaktiviert. Dazu wurden sie entweder mit γ -Strahlung bestrahlt oder mit Mitomycin C (MMC) behandelt.

Zur Bestrahlung wurden frisch präparierte Zellen einmalig im Verhältnis 1:3 passagiert, bis zur Konfluenz kultiviert und schließlich trypsiniert. Die trypsinierten Zellen wurden in Medium gesammelt und mit 2000 g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 20 ml Medium resuspendiert und die Suspension mit 35 Gy bestrahlt (γ -Strahlung aus einer Kobaltquelle). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen gezählt und 4×10^6 Zellen/ Röhrchen in Einfriermedium eingefroren. Ein Röhrchen wurde zur Beschichtung einer 9 cm Schale verwendet.

Alternativ konnten die Fibroblasten am Tag vor deren Verwendung als *Feeder*-Zellen mit MMC behandelt werden. Dazu wurden die embryonalen Fibroblasten mit 10 μ g/ml MMC für mindestens 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert und auf die benötigte Fläche verteilt.

5.5.2 Maus-Keratinocyten

Herstellung einer HaCaT-Matrix-Beschichtung

Zellkulturschalen wurden mit Zellen der HaCaT-Linie beschichtet und 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PBS / 20 mM EDTA und Protease-Inhibitoren (Complete™ Protease Inhibitor Tablets [Boehringer Mannheim]) für weitere 16 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Durch mehrfaches kräftiges Pipettieren wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst, die Schalen weitere zwei Mal mit PBS gewaschen. Die mit der HaCaT-Matrix beschichteten Zellkulturschalen konnten mehrere Tage mit PBS überschichtet bei 4 °C aufbewahrt werden (nach Delwel et al., 1993).

Isolation und Kultur von Mauskeratinocyten

Mauskeratinocyten wurden aus 1-3 Tage alten, neugeborenen Mäusen isoliert. Die Tiere wurden getötet, für 1 Stunde auf Eis gelagert und schließlich hintereinander in Betaisodona-Lösung, PBS, 70 % Ethanol und PBS gewaschen. Schließlich wurden die Extremitäten abgetrennt und die Haut isoliert. Diese wurde mit der dermalen Seite zum Boden hin auf eine Zellkulturschale ausgebreitet, mit Trypsin-Lösung so versetzt, dass die Haut auf der Flüssigkeit aufschwamm, und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Epidermis von der Dermis getrennt und zerkleinert. Das Homogenisat wurde 1 h bei RT in etwa 3 ml FAD (DMEM[Ca²⁺-frei]:F12 3:1, 10 % FCS, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 5 µg/ml Insulin, 10⁻¹⁰ M Cholera Toxin, 10 ng/ml EGF, 1,8x10⁻⁴ M Adenin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; F12 und FCS wurden zuvor über Nacht mit 40 mg/ml des Ca²⁺-Chelators Chelex inkubiert und sterilfiltriert) pro Maushaut gerührt, gefiltert und in FAD auf mit HaCaT-Matrix beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Die Keratinocyten wurden bei 33 °C kultiviert, ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

5.5.3 Maus-Thrombozyten

Mäusen wurde unter Etheranästhesie Blut durch Venen-Punktion des Retroorbital-Plexus entnommen. In den Sammelgefäßen wurde 7,5 U/ml Heparin vorgelegt, so dass die Endkonzentration nach Blutentnahme 10 % (v/v) betrug (Heparinisiertes Gesamtblut).

Thrombozyten-angereichertes Plasma (PRP) wurde als Überstand nach 10 minütiger Zentrifugation bei 300 g und RT erhalten. Die Thrombozyten des Überstandes wurden zur Regeneration 30 min mit 0,02 U/ml des Enzyms Adenosin-5-triphosphatdiphosphohydrolase inkubiert.

Während der Experimente wurden die Thrombozyten durchgängig auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Die Thrombozytenzahl wurde aus dem Gesamtblut nach einer 1:100 Verdünnung („Unopette™ Platelet/White Blood Count Hematology Test Kit“, Becton Dickinson, Heidelberg) und 20 minütiger Sedimentation auf einem Neubauer Hämocytometer (Superior) bestimmt. Thrombozyten wurden im Phasenkontrast bei einer 400 fachen Vergrößerung gezählt.

5.5.4 NMuMG, C2C12 und HaCaT

Die Zelllinie NMuMG (ECACC Nr. 94081121) wurde in Standardmedium, supplementiert mit 10 µg/ml Insulin, kultiviert. Die Zelllinien C2C12 (ECACC Nr. 91031101) und HaCaT (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Fusenig, DKFZ, Heidelberg) wurden in Standardmedium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1:4 oder 1:5 passagiert.

5.6 Funktionelle Analysen

5.6.1 Kontraktion von Kollagengelen

Eine Typ-I-Kollagen-Präparation aus fötaler Kalbshaut (IBMF GmbH, Leipzig) wurde in 0,1 % Essigsäure auf eine Endkonzentration von 3 mg/ml gelöst. Für einen Ansatz in bakteriologischen Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm wurden 2,3 ml 1,76 x DMEM mit 0,25 ml 0,1 N Natronlauge versetzt, 1,5 ml der Kollagenlösung zugegeben und anschließend mit 0,45 ml FCS und 0,5 ml Zellsuspension ($5-10 \times 10^5$ Zellen) vermischt. Die

Mischung wurde unverzüglich auf die Kulturschale gegeben und ohne weiteren Mediumwechsel inkubiert (nach Langholz et al., 1995).

5.6.2 Adhäsion

Keratinocytenadhäsion

Die benötigte Anzahl Löcher einer 96 Loch-Mikrotiterplatte für die Zellkultur (Falcon) wurde zunächst mit einer HaCaT-Matrix beschichtet (5.5.2). Anschließend wurden die restlichen Löcher der Platte über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Loch der folgenden in PBS gelösten oder verdünnten Substrate beschichtet: 20 µg/ml fibrilläres Kälberkollagen Typ I (IBFB GmbH, Leipzig), 100 µg/ml denaturiertes Kälberkollagen Typ I (denaturiert durch 20 min Inkubation bei 56 °C), 10 µg/ml Fibronectin (Roche, Mannheim) und 1 % BSA. Nach der Beschichtung wurden die Platten mit PBS gewaschen und bis zum Gebrauch mit PBS überschichtet.

Keratinocyten wurden trypsinisiert und gezählt, die Zelldichte auf etwa 20 000 Zellen / 100 µl Medium eingestellt. Als Adhäsionsmedium diente FAD (5.5.2). Je 100 µl der Zellsuspension wurden auf die Löcher der Mikrotiterplatte ausgesät und 1 h bei 33 °C inkubiert. Die Platte wurde zweimal mit PBS gewaschen und die adhärenen Zellen durch 15 minütige Inkubation mit 1 % Glutaraldehyd bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden einmal mit Wasser gewaschen und schließlich mit 0,1 % Kristall Violett gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen ausgiebig mit Wasser gewaschen. Der zurückgebliebene Farbstoff wurde mit 0,1 % Triton X-100 ausgezogen und die Absorption bei 495 nm bestimmt.

Thrombozytenadhäsion

Fibrilläres Typ-I-Kollagen (Horm, Nycomed) oder nicht fibrilläres „lösliches“ Kollagen (Sigma, Taufkirchen) wurde auf 96-Loch Mikrotiterplatten (F96-MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden) bei 4 °C über Nacht immobilisiert. Anschließend wurden die Platten mit 1 mg/ml BSA in PBS für 3 h bei 37 °C inkubiert und mit PBS gewaschen. 10^7 Thrombozyten/Loch wurden im modifizierten Tyrode's Puffer, supplementiert mit 1 mM CaCl_2 und 1 mM MgCl_2 , resuspendiert und für bis zu 60 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die adhärenen Thrombozyten fluorimetrisch quantifiziert. F(ab)-Fragmente des Antikörpers JAQ1 wurden von B. Nieswandt zur Verfügung gestellt (Nieswandt et al., 2001b).

5.6.3 Thrombozytenaggregation

Der Aggregationsverlauf der Thrombozyten wurde über die Bestimmung der Lichttransmission in Thrombozyten-angereichertem Plasma, dessen Zahl mit modifiziertem Tyrode's Puffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0,3 mM Na₂PO₄, 5,5 mM Glukose, 5 mM HEPES, pH 7,3; 0,35 % BSA) auf 3 x 10⁵ Thrombozyten/μl eingestellt wurde, bestimmt. Die Transmission wurden mit Hilfe des „Fibrinometer“ 4-Kanal Aggregometer (APACT Laborgeräte und Analysesysteme, Hamburg) über 10 min relativ zur Transmission des Blutplasmas (100 %) gemessen.

5.7 Genotypisierung der Mäuse

5.7.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsien

Mausschwanz-Biopsien (etwa 0,5 cm) wurden über Nacht bei 55 °C mit 500 μl Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,5 mM Spermidin, 2 % [w/v] SDS, 200 μg Proteinase K/ml) unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Reste wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand mit der gleichen Menge Chloroform extrahiert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit dem doppelten Volumen Ethanol präzipitiert, in 70 % Ethanol gewaschen und in 50 μl 10 mM Tris, pH 8, resuspendiert. Zum vollständigen Lösen der DNA wurde mehrere Stunden bei 55 °C unter Schütteln inkubiert.

5.7.2 RFLP- und PCR-Analyse

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte entweder durch eine RFLP- oder eine PCR-Analyse. Die **RFLP-Analyse** erfolgte wie unter 5.2.2 beschrieben. Für die **PCR-Analyse** wurden je nach Genotyp unterschiedliche Ansätze etabliert, die im folgenden aufgeführt sind. Alle PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 50 μl mit 100 pmol der entsprechenden Primer und 0,2 mM dNTPs durchgeführt. Als *Template* wurden 1-2 μl der DNA-Präparation eingesetzt. Die Programme starteten mit einem 4 minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C, auf den die angegebenen Programmzyklen folgten. Nach den Zyklen wurden die Ansätze bis zur Analyse auf 4 °C gekühlt.

PCR	Primerpaar	MgCl ₂	Programmzyklus
ITGA2 flox	OH1/OH2	2 mM	(35 x) 94 °C, 30s 48 °C, 30s 72 °C, 15s
ITGA2 Δ	OH1/OH3	1 mM	(8 x) 94 °C, 60s 54 °C - 47 °C, 30s (TD) 72 °C, 60s (27 x) 94 °C, 60s 47 °C, 60s 72 °C, 60s
Cre-PCR	SC 1(+)/SC 3(-)	1,5 mM	(35 x) 94 °C, 45s 58 °C, 60s 72 °C, 90s
ITGA1 WT/KO	WT/KoA1/Dst (0,5:0,5:1)	1,25 mM	(30 x) 95 °C, 30s 52 °C, 60s 72 °C, 120s

TD: *Touch Down-PCR*

6 Literatur

- Abremski, K., und R. Hoess.** 1984. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem.* 259:1509-14.
- Adams, J.C., und F.M. Watt.** 1991. Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human epidermal keratinocytes and non-differentiating keratinocytes. *J Cell Biol.* 115:829-41.
- Aplin, A.E., A.K. Howe, und R.L. Juliano.** 1999. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 11:737-44.
- Asselin, J., J.M. Gibbins, M. Achison, Y.H. Lee, L.F. Morton, R.W. Farndale, M.J. Barnes, und S.P. Watson.** 1997. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood.* 89:1235-42.
- Balbin, M., A. Fueyo, V. Knauper, J.M. Lopez, J. Alvarez, L.M. Sanchez, V. Quesada, J. Bordallo, G. Murphy, und C. Lopez-Otin.** 2001. Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem.* 276:10253-62.
- Bank, I., M. Hemler, M.B. Brenner, D. Cohen, V. Levy, J. Belko, C. Crouse, und L. Chess.** 1989. A novel monoclonal antibody, 1B3.1, binds to a new epitope of the VLA-1 molecule. *Cell Immunol.* 122:416-23.
- Baribault, H., J. Penner, R.V. Iozzo, und M. Wilson-Heiner.** 1994. Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev.* 8:2964-73.
- Bell, E., B. Ivarsson, und C. Merrill.** 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1274-8.
- Bengtsson, T., L. Camper, M. Schneller, und E. Lundgren-Akerlund.** 2001. Characterization of the mouse integrin subunit alpha10 gene and comparison with its human homologue. Genomic structure, chromosomal localization and identification of splice variants. *Matrix Biol.* 20:565-76.
- Birnboim, H.C., und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Blake, J.A., J.T. Eppig, J.E. Richardson, C.J. Bult, und J.A. Kadin.** 2001. The Mouse Genome Database (MGD): integration nexus for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res.* 29:91-4.

- Boukamp, P., D. Breitkreuz, A. Hülsen, P. Tomakidi, and N.E. Fusenig in I.M. Leigh, B. Lane, F.M. Watt.** 1994. *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-71.
- Brakebusch, C., R. Grose, F. Quondamatteo, A. Ramirez, J.L. Jorcano, A. Pirro, M. Svensson, R. Herken, T. Sasaki, R. Timpl, S. Werner, and R. Fassler.** 2000. Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *Embo J.* 19:3990-4003.
- Brakebusch, C., E. Hirsch, A. Potocnik, and R. Fassler.** 1997. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci.* 110:2895-904.
- Buchholz, F., P.O. Angrand, and A.F. Stewart.** 1996. A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res* 24: 3118-9.
- Burridge, K., and K. Fath.** 1989. Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Bioessays.* 10:104-8.
- Camper, L., K. Holmvall, C. Wangnerud, A. Aszodi, and E. Lundgren-Akerlund.** 2001. Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development. *Cell Tissue Res.* 306:107-16.
- Carter, W.G., A.E. Wayner, T.S. Bouchard, P. Kaur.** 1990. The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* 110: 1387-404.
- Cavani, A., G. Zambruno, A. Marconi, V. Manca, M. Marchetti, and A. Giannetti.** 1993. Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *J Invest Dermatol.* 101:600-4.
- Clemetson, J.M., J. Polgar, E. Magnenat, T.N. Wells, and K.J. Clemetson.** 1999. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem.* 274:29019-24.
- Coller, B.S., J.H. Beer, L.E. Scudder, and M.H. Steinberg.** 1989. Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. *Blood.* 74:182-92.

- Davis, G.E.** 1992. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 182:1025-31.
- De Arcangelis, A., und E. Georges-Labouesse.** 2000. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.* 16:389-95.
- De Arcangelis, A., M. Mark, J. Kreidberg, L. Sorokin, und E. Georges-Labouesse.** 1999. Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development.* 126:3957-68.
- de Melker, A.A., und A. Sonnenberg.** 1999. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays.* 21:499-509.
- Decline, F., und P. Rousselle.** 2001. Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *J Cell Sci.* 114:811-23.
- Dedhar, S.** 1999. Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol.* 6:37-43.
- Delwel, G.O., F. Hogervorst, I. Kuikman, M. Paulsson, R. Timpl, und A. Sonnenberg.** 1993. Expression and function of the cytoplasmic variants of the integrin alpha 6 subunit in transfected K562 cells. Activation-dependent adhesion and interaction with isoforms of laminin. *J Biol Chem.* 268: 25865-75.
- Deng, C., und M.R. Capecchi.** 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol.* 12:3365-71.
- DiPersio, C.M., K.M. Hodivala-Dilke, R. Jaenisch, J.A. Kreidberg, und R.O. Hynes.** 1997. alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 137:729-42.
- Dumin, J.A., S.K. Dickeson, T.P. Stricker, M. Bhattacharyya-Pakrasi, J.D. Roby, S.A. Santoro, und W.C. Parks.** 2001. Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. *J Biol Chem.* 276:29368-74.
- Edelman, J.M., B.M. Chan, S. Uniyal, H. Onodera, D.Z. Wang, N.F. St John, L. Damjanovich, D.B. Latzer, R.W. Finberg, und J.M. Bergelson.** 1994. The mouse VLA-2 homologue supports collagen and laminin adhesion but not virus binding. *Cell Adhes Commun.* 2:131-43.
- Emsley, J., C.G. Knight, R.W. Farndale, M.J. Barnes, und R.C. Liddington.** 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101:47-56.

- Erb, E.M., K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller, and J. Engel.** 1997. Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*. 36:7395-402.
- Feinberg, A.P., and B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 132:6-13.
- Gailit, J., and R.A. Clark.** 1994. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 6:717-25.
- Gardner, H., A. Broberg, A. Pozzi, M. Laato, and J. Heino.** 1999. Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J Cell Sci*. 112:263-72.
- Gardner, H., J. Kreidberg, V. Koteliansky, and R. Jaenisch.** 1996. Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol*. 175:301-13.
- Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W.G. Stetler-Stevenson, and V. Quaranta.** 1997. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*. 277:225-8.
- Gibbins, J., J. Asselin, R. Farndale, M. Barnes, C.L. Law, and S.P. Watson.** 1996. Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem*. 271:18095-9.
- Goldfinger, L.E., S.B. Hopkinson, G.W. deHart, S. Collawn, J.R. Couchman, and J.C. Jones.** 1999. The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J Cell Sci*. 112:2615-29.
- Green, K.J., and J.C. Jones.** 1996. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *Faseb J*. 10:871-81.
- Grenache, D.G., J. Chen, S.A. Santoro and M.M. Zutter.** 2001. Normal wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse. *Abstract, 41st Annual Meeting ASCB, Washington*.
- Grinnell, F.** 1994. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol*. 124:401-4.
- Grzesiak, J.J., G.E. Davis, D. Kirchhofer, and M.D. Pierschbacher.** 1992. Regulation of alpha 2 beta 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Cell Biol*. 117:1109-17.

- Gu, H., J.D. Marth, P.C. Orban, H. Mossmann, und K. Rajewsky.** 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*. 265:103-6.
- Gullberg, D., L. Terracio, T.K. Borg, und K. Rubin.** 1989. Identification of integrin-like matrix receptors with affinity for interstitial collagens. *J Biol Chem*. 264:12686-94.
- Hasty, P., und A. Bradley in A.L. Joyner (ed.).** 1993. Gene Targeting. A Practical Approach. The Practical Approach Series. IRL Press.
- Hasty, P., J. Rivera-Perez, C. Chang, und A. Bradley.** 1991. Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 11:4509-17.
- Hasty1, P., R. Ramirez-Solis, R. Krumlauf, A. Bradley.** 1991. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* 350:243-6
- Heino, J.** 2000. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol*. 19:319-23.
- Hemler, M.E.** 1998. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 10:578-85.
- Hemler, M.E., C.F. Ware, und J.L. Strominger.** 1983. Characterization of a novel differentiation antigen complex recognize by a monoclonal antibody (A-1A5): unique activation-specific molecular forms on stimulated T cells. *J Immunol*. 131:334-40.
- Hertle, M.D., J.C. Adams, und F.M. Watt.** 1991. Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro. *Development*. 112:193-206.
- Hesse, M.** Konstruktion eines „Targeting-Vektors“ zur konditionalen Inaktivierung des Integrin- α 2-Gens in der Maus. Diplomarbeit 1998.
- Hickstein, D.D., D.M. Baker, K.A. Gollahon, und A.L. Back.** 1992. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:2105-9.
- Hodivala-Dilke, K.M., C.M. DiPersio, J.A. Kreidberg, und R.O. Hynes.** 1998. Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *J Cell Biol*. 142:1357-69.
- Holtkötter, O.** Konstruktion eines „Targeting-Vektors“ zur gezielten Inaktivierung des Integrin- α 2-Gens in der Maus. Diplomarbeit 1997.
- Horwitz, A., K. Duggan, C. Buck, M.C. Beckerle, und K. Burridge.** 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*. 320:531-3.

- Hughes, P.E., F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J.A. McDonald, S.J. Shattil, und M.H. Ginsberg.** 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem.* 271:6571-4.
- Humphries, M.J.** 1990. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci.* 97:585-92.
- Humphries, M.J.** 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 28:311-39.
- Hynes, R.O.** 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O.** 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 9:M33-7.
- Ivaska, J., H. Reunanen, J. Westermarck, L. Koivisto, V.M. Kahari, und J. Heino.** 1999. Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2
- Kado, S., K. Uchida, H. Funabashi, S. Iwata, Y. Nagata, M. Ando, M. Onoue, Y. Matsuoka, M. Ohwaki, und M. Morotomi.** 2001. Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice. *Cancer Res.* 61:2395-8.
- Kamata, T., W. Puzon, und Y. Takada.** 1994. Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29). *J Biol Chem.* 269:9659-63.
- Kamata, T., und Y. Takada.** 1994. Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J Biol Chem.* 269:26006-10.
- Kamiguti, A.S., F.S. Markland, Q. Zhou, G.D. Laing, R.D. Theakston, und M. Zuzel.** 1997. Proteolytic cleavage of the beta1 subunit of platelet alpha2beta1 integrin by the metalloproteinase jararhagin compromises collagen- stimulated phosphorylation of pp72. *J Biol Chem.* 272:32599-605.
- Kansas, G.S.** 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 88:3259-87.
- Kehrel, B., L. Balleisen, R. Kokott, R. Mesters, W. Stenzinger, K.J. Clemetson, und J. van de Loo.** 1988. Deficiency of intact thrombospondin and membrane glycoprotein Ia in platelets with defective collagen-induced aggregation and spontaneous loss of disorder. *Blood.* 71:1074-8.
- Kehrel, B., S. Wierwille, K.J. Clemetson, O. Anders, M. Steiner, C.G. Knight, R.W. Farndale, M. Okuma, und M.J. Barnes.** 1998. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure

of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*. 91:491-9.

Kieffer, N., und D.R. Phillips. 1990. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol.* 6:329-57.

Kirchhofer, D., L.R. Languino, E. Ruoslahti, und M.D. Pierschbacher. 1990. Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. *J Biol Chem.* 265:615-8.

Klein, C.E., D. Dressel, T. Steinmayer, C. Mauch, B. Eckes, T. Krieg, R.B. Bankert, und L. Weber. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol.* 115:1427-36.

Knight, C.G., L.F. Morton, A.R. Peachey, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, und M.J. Barnes. 2000. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem.* 275:35-40.

Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki, und V. Quaranta. 2000. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol.* 148:615-24.

Kramer, R.H., und N. Marks. 1989. Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem.* 264:4684-8.

Kreidberg, J.A., M.J. Donovan, S.L. Goldstein, H. Rennke, K. Shepherd, R.C. Jones, und R. Jaenisch. 1996. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development.* 122:3537-47.

Kunicki, T.J., D.J. Nugent, S.J. Staats, R.P. Orchekowski, E.A. Wayner, und W.G. Carter. 1988. The human fibroblast class II extracellular matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein Ia-IIa complex. *J Biol Chem.* 263:4516-9.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

Lampe, P.D., B.P. Nguyen, S. Gil, M. Usui, J. Olerud, Y. Takada, und W.G. Carter. 1998. Cellular interaction of integrin alpha3beta1 with laminin 5 promotes gap junctional communication. *J Cell Biol.* 143:1735-47.

Langholz, O., D. Rockel, C. Mauch, E. Kozłowska, I. Bank, T. Krieg, und B. Eckes. 1995. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices

- are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol.* 131:1903-15.
- Languino, L.R., K.R. Gehlsen, E. Wayner, W.G. Carter, E. Engvall, und E. Ruoslahti.** 1989. Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol.* 109:2455-62.
- Larjava, H., T. Salo, K. Haapasalmi, R.H. Kramer, und J. Heino.** 1993. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. *J Clin Invest.* 92:1425-35.
- Lichtner, R.B., A.R. Howlett, M. Lerch, J.A. Xuan, J. Brink, B. Langton-Webster, und M.R. Schneider.** 1998. Negative cooperativity between alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells. *Exp Cell Res.* 240:368-76.
- Liu, S., D.A. Calderwood, und M.H. Ginsberg.** 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci.* 113:3563-71.
- Loftus, J.C., und R.C. Liddington.** 1997. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 100:S77-81.
- Lopez-Cabrera, M., A. Nueda, A. Vara, J. Garcia-Aguilar, A. Tugores, und A.L. Corbi.** 1993. Characterization of the p150,95 leukocyte integrin alpha subunit (CD11c) gene promoter. Identification of cis-acting elements. *J Biol Chem.* 268:1187-93.
- Maecker, H.T., S.C. Todd, und S. Levy.** 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *Faseb J.* 11:428-42.
- Marchisio, P.C., S. Bondanza, O. Cremona, R. Cancedda, und M. De Luca.** 1991. Polarized expression of integrin receptors (alpha 6 beta 4, alpha 2 beta 1, alpha 3 beta 1, and alpha v beta 5) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. *J Cell Biol.* 112:761-73.
- Masumoto, A., und M.E. Hemler.** 1993. Mutation of putative divalent cation sites in the alpha 4 subunit of the integrin VLA-4: distinct effects on adhesion to CS1/fibronectin, VCAM-1, and invasin. *J Cell Biol.* 123:245-53.
- Mayer, U., G. Saher, R. Fassler, A. Bornemann, F. Echtermeyer, H. von der Mark, N. Miosge, E. Poschl, und K. von der Mark.** 1997. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* 17:318-23.
- Merckling, A.** Charakterisierung von Fibroblasten aus Vimentin-defizienten Mäusen. Diplomarbeit 1996.

- Miyamoto, S., H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Burbelo, S.K. Akiyama, and K.M. Yamada.** 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 131:791-805.
- Moro, L., M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, and P. Defilippi.** 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *Embo J.* 17:6622-32.
- Moroi, M., S.M. Jung, M. Okuma, and K. Shinmyozu.** 1989. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest.* 84:1440-5.
- Morton, L.F., P.G. Hargreaves, R.W. Farndale, R.D. Young, and M.J. Barnes.** 1995. Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J.* 306:337-44.
- Morton, L.F., A.R. Peachey, L.S. Zijenah, A.H. Goodall, M.J. Humphries, and M.J. Barnes.** 1994. Conformation-dependent platelet adhesion to collagen involving integrin alpha 2 beta 1-mediated and other mechanisms: multiple alpha 2 beta 1- recognition sites in collagen type I. *Biochem J.* 299:791-7.
- Nguyen, B.P., S.G. Gil, and W.G. Carter.** 2000. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275:31896-907.
- Nguyen, B.P., M.C. Ryan, S.G. Gil, and W.G. Carter.** 2000. Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 12:554-62.
- Nieswandt, B., W. Bergmeier, V. Schulte, K. Rackebrandt, J.E. Gessner, and H. Zirngibl.** 2000. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem.* 275:23998-4002.
- Nieswandt, B., C. Brakebusch, W. Bergmeier, V. Schulte, D. Bouvard, R. Mokhtari-Nejad, T. Lindhout, J.W. Heemskerk, H. Zirngibl, and R. Fassler.** 2001. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J.* 20:2120-30.
- Nieswandt, B., V. Schulte, W. Bergmeier, R. Mokhtari-Nejad, K. Rackebrandt, J.P. Cazenave, P. Ohlmann, C. Gachet, and H. Zirngibl.** 2001. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *J Exp Med.* 193:459-69.

- Nieuwenhuis, H.K., J.W. Akkerman, W.P. Houdijk, and J.J. Sixma.** 1985. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*. 318:470-2.
- Nykvist, P., H. Tu, J. Ivaska, J. Kapyla, T. Pihlajaniemi, and J. Heino.** 2000. Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. *J Biol Chem*. 275:8255-61.
- Onley, D.J., C.G. Knight, D.S. Tuckwell, M.J. Barnes, and R.W. Farndale.** 2000. Micromolar Ca²⁺ concentrations are essential for Mg²⁺-dependent binding of collagen by the integrin alpha 2beta 1 in human platelets. *J Biol Chem*. 275:24560-4.
- Otey, C.A., F.M. Pavalko, and K. Burridge.** 1990. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol*. 111:721-9.
- Peltonen, J., H. Larjava, S. Jaakkola, H. Gralnick, S.K. Akiyama, S.S. Yamada, K.M. Yamada, and J. Uitto.** 1989. Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *J Clin Invest*. 84:1916-23.
- Pfaff, M., M. Aumailley, U. Specks, J. Knolle, H.G. Zerwes, and R. Timpl.** 1993. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp Cell Res*. 206:167-76.
- Pfaff, M., W. Gohring, J.C. Brown, and R. Timpl.** 1994. Binding of purified collagen receptors (alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments. *Eur J Biochem*. 225:975-84.
- Pham, C.T., D.M. MacIvor, B.A. Hug, J.W. Heusel, and T.J. Ley.** 1996. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13090-5.
- Pilcher, B.K., J. Dumin, M.J. Schwartz, B.A. Mast, G.S. Schultz, W.C. Parks, and H.G. Welgus.** 1999. Keratinocyte collagenase-1 expression requires an epidermal growth factor receptor autocrine mechanism. *J Biol Chem*. 274:10372-81.
- Pilcher, B.K., J.A. Dumin, B.D. Sudbeck, S.M. Krane, H.G. Welgus, and W.C. Parks.** 1997. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*. 137:1445-57.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith.** 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*. 275:21785-8.
- Porter, J.C., and N. Hogg.** 1998. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol*. 8:390-6.

- Pozzi, A., K.K. Wary, F.G. Giancotti, and H.A. Gardner.** 1998. Integrin alpha1beta1 mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol.* 142:587-94.
- Prandini, M.H., E. Denarier, P. Frachet, G. Uzan, and G. Marguerie.** 1988. Isolation of the human platelet glycoprotein IIb gene and characterization of the 5' flanking region. *Biochem Biophys Res Commun.* 156:595-601.
- Racine-Samson, L., D.C. Rockey and D.M. Bissell.** 1997. The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J Biol Chem.* 272: 30911-7.
- Raghavan, S., C. Bauer, G. Mundschau, Q. Li, and E. Fuchs.** 2000. Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination. *J Cell Biol.* 150:1149-60.
- Ravanti, L., J. Heino, C. Lopez-Otin, and V.M. Kahari.** 1999. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen- activated protein kinase. *J Biol Chem.* 274:2446-55.
- Riikonen, T., J. Westermarck, L. Koivisto, A. Broberg, V.M. Kahari, and J. Heino.** 1995. Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *J Biol Chem.* 270:13548-52.
- Ruggeri, Z.M.** 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost.* 78:611-6.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saelman, E.U., H.K. Nieuwenhuis, K.M. Hese, P.G. de Groot, H.F. Heijnen, E.H. Sage, S. Williams, L. McKeown, H.R. Gralnick, and J.J. Sixma.** 1994. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood.* 83:1244-50.
- Sanchez-Mateos, P., C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid.** 1996. Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol.* 7:99-109.
- Santoro, S.A., and M.M. Zutter.** 1995. The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost.* 74:813-21.
- Scharffetter-Kochanek, K., C.E. Klein, G. Heinen, C. Mauch, T. Schaefer, B.C. Adelmann-Grill, G. Goerz, N.E. Fusenig, T.M. Krieg, and G. Plewig.** 1992. Migration of a human keratinocyte cell line (HACAT) to interstitial collagen type I is mediated by the alpha 2 beta 1-integrin receptor. *J Invest Dermatol.* 98:3-11.

- Scheid, A., M. Meuli, M. Gassmann, und R.H. Wenger.** 2000. Genetically modified mouse models in studies on cutaneous wound healing. *Exp Physiol.* 85:687-704.
- Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, und P.O. Brown.** 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270:467-70.
- Schiro, J.A., B.M. Chan, W.T. Roswit, P.D. Kassner, A.P. Pentland, M.E. Hemler, A.Z. Eisen, und T.S. Kupper.** 1991. Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell.* 67:403-10.
- Schlaepfer, D.D., und T. Hunter.** 1998. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8:151-7.
- Schneller, M., K. Vuori, und E. Ruoslahti.** 1997. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *Embo J.* 16:5600-7.
- Schulte, V., D. Snell, W. Bergmeier, H. Zirngibl, S.P. Watson, und B. Nieswandt.** 2001. Evidence for two distinct epitopes within collagen for activation of murine platelets. *J Biol Chem.* 276:364-8.
- Sheppard, D.** 1996. Epithelial integrins. *Bioessays.* 18:655-60.
- Sheppard, D.** 2000. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol.* 19:203-9.
- Sheppard, D., D.S. Cohen, A. Wang, und M. Busk.** 1992. Transforming growth factor beta differentially regulates expression of integrin subunits in guinea pig airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 267:17409-14.
- Siljander, P., und R. Lassila.** 1999. Studies of adhesion-dependent platelet activation: distinct roles for different participating receptors can be dissociated by proteolysis of collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:3033-43.
- Singer, A.J., und R.A. Clark.** 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 341:738-46.
- Sixma, J.J., G.H. van Zanten, E.G. Huizinga, R.M. van der Plas, M. Verkley, Y.P. Wu, P. Gros, und P.G. de Groot.** 1997. Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost.* 78:434-8.
- Sixma, J.J., G.H. van Zanten, E.U. Saelman, M. Verkleij, H. Lankhof, H.K. Nieuwenhuis, und P.G. de Groot.** 1995. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost.* 74:454-9.
- Smack, D.P., B.P. Korge, und W.D. James.** 1994. Keratin and keratinization. *J Am Acad Dermatol.* 30:85-102.

- Smyth, N., H.S. Vatansever, P. Murray, M. Meyer, C. Frie, M. Paulsson, und D. Edgar.** 1999. Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol.* 144:151-60.
- Sonnenberg, A., J. Calafat, H. Janssen, H. Daams, L.M. van der Raaij-Helmer, R. Falcioni, S.J. Kennel, J.D. Aplin, J. Baker, M. Loizidou, et al.** 1991. Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol.* 113:907-17.
- Soriano, P.** 1995. Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci.* 18:1-18.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-17.
- Spanopoulou, E., V. Giguere, und F. Grosveld.** 1991. The functional domains of the murine Thy-1 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 11:2216-28.
- Springer, T.A.** 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:65-72.
- Sriramarao, P., P. Steffner, und K.R. Gehlsen.** 1993. Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 268:22036-41.
- Staatz, W.D., S.M. Rajpara, E.A. Wayner, W.G. Carter, und S.A. Santoro.** 1989. The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg⁺⁺- dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol.* 108:1917-24.
- Sternberg, N., und D. Hamilton.** 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 150:467-86.
- Sudbeck, B.D., B.K. Pilcher, H.G. Welgus, und W.C. Parks.** 1997. Induction and repression of collagenase-1 by keratinocytes is controlled by distinct components of different extracellular matrix compartments. *J Biol Chem.* 272:22103-10.
- Sutherland, A.E., P.G. Calarco, und C.H. Damsky.** 1993. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development.* 119:1175-86.
- Symington, B.E., Y. Takada, und W.G. Carter.** 1993. Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. *J Cell Biol.* 120:523-35.
- Takada, Y., und M.E. Hemler.** 1989. The primary structure of the VLA-2/collagen receptor alpha 2 subunit (platelet GPIa): homology to other integrins and the presence of a possible collagen-binding domain. *J Cell Biol.* 109:397-407.
- Talts, J.F., C. Brakebusch, und R. Fassler.** 1999. Integrin gene targeting. *Methods Mol Biol.* 129:153-87.

- Taniguchi, M., M. Sanbo, S. Watanabe, I. Naruse, M. Mishina, and T. Yagi.** 1998. Efficient production of Cre-mediated site-directed recombinants through the utilization of the puromycin resistance gene, *pac*: a transient gene- integration marker for ES cells. *Nucleic Acids Res.* 26:679-80.
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi.** 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 51:503-12.
- Threadgill, D.W., A.A. Dlugosz, L.A. Hansen, T. Tennenbaum, U. Lichti, D. Yee, C. LaMantia, T. Mourton, K. Herrup, R.C. Harris, et al.** 1995. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 269:230-4.
- Tiger, C.F., F. Fougerousse, G. Grundstrom, T. Velling, and D. Gullberg.** 2001. $\alpha 11\beta 1$ integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev Biol.* 237:116-29.
- Torres, R.M., and R. Kühn.** 1997. Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. Oxford University Press.
- Tsuji, M., Y. Ezumi, M. Arai, and H. Takayama.** 1997. A novel association of Fc receptor gamma-chain with glycoprotein VI and their co-expression as a collagen receptor in human platelets. *J Biol Chem.* 272:23528-31.
- Tuckwell, D.S., S. Ayad, M.E. Grant, M. Takigawa, and M.J. Humphries.** 1994. Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support $\alpha 2 \beta 1$ binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin bridge. *J Cell Sci.* 107:993-1005.
- Tuckwell, D.S., S. Ayad, M.E. Grant, M. Takigawa, and M.J. Humphries.** 1994. Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support $\alpha 2 \beta 1$ binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin bridge. *J Cell Sci.* 107:993-1005.
- Ungar, F., B. Geiger, and A. Ben-Ze'ev.** 1986. Cell contact- and shape-dependent regulation of vinculin synthesis in cultured fibroblasts. *Nature.* 319:787-91.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg.** 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- Van Erp, P.E., S. De Mare, J.J. Rijzewijk, P.C. Van de Kerkhof, and F.W. Bauer.** 1989. A sequential double immunoenzymic staining procedure to obtain cell kinetic information in normal and hyperproliferative epidermis. *Histochem J.* 21:343-7.
- Velling, T., M. Kusche-Gullberg, T. Sejersen, and D. Gullberg.** 1999. cDNA cloning and chromosomal localization of human $\alpha(11)$ integrin. A collagen-binding, I domain-

- containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem.* 274:25735-42.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, et al.** 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291:1304-51.
- Verkleij, M.W., L.F. Morton, C.G. Knight, P.G. de Groot, M.J. Barnes, und J.J. Sixma.** 1998. Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via alpha2 beta1 and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood.* 91:3808-16.
- Vinogradova, O., T. Haas, E.F. Plow, und J. Qin.** 2000. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1450-5.
- Vogel, W.** 1999. Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *Faseb J.* 13:S77-82.
- Vogel, W., G.D. Gish, F. Alves, und T. Pawson.** 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell.* 1:13-23.
- Walsh, F.S., und P. Doherty.** 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:425-56.
- Wary, K.K., F. Mainiero, S.J. Isakoff, E.E. Marcantonio, und F.G. Giancotti.** 1996. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* 87:733-43.
- Watson, S., O. Berlanga, D. Best, und J. Frampton.** 2000. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets.* 11:252-8.
- Wilder P.J., und A. Rizzino.** 1992. Mouse genetics in the 21st century: using gene targeting to create a cornucopia of mouse mutants possessing precise genetic modifications. *Cytotech* 11: 79-9.
- Wu, J.E., und S.A. Santoro.** 1994. Complex patterns of expression suggest extensive roles for the alpha 2 beta 1 integrin in murine development. *Dev Dyn.* 199:292-314.
- Wurst, W., und A.L. Joyner in A.L. Joyner (ed.).** 1993. Gene Targeting. A Practical Approach. The Practical Approach Series. IRL Press.
- Xu, J., R.A. Clark, und W.C. Parks.** 2001. p38 mitogen-activated kinase is a bidirectional regulator of human fibroblast collagenase-1 induction by three-dimensional collagen lattices. *Biochem J.* 355:437-47.
- Xu, J., M.M. Zutter, S.A. Santoro, und R.A. Clark.** 1998. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappaB in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. *J Cell Biol.* 140:709-19.

- Xu, Y., L. Davidson, F.W. Alt, und D. Baltimore.** 1996. Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity*. 4:377-85.
- Xu, Y., S. Gurusiddappa, R.L. Rich, R.T. Owens, D.R. Keene, R. Mayne, A. Hook, und M. Hook.** 2000. Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. *J Biol Chem*. 275:38981-9.
- Yang, J.T., B.L. Bader, J.A. Kreidberg, M. Ullman-Cullere, J.E. Trevithick, und R.O. Hynes.** 1999. Overlapping and independent functions of fibronectin receptor integrins in early mesodermal development. *Dev Biol*. 215:264-77.
- Yang, J.T., H. Rayburn, und R.O. Hynes.** 1993. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development*. 119:1093-105.
- Yap, A.S., W.M. Briehner, und B.M. Gumbiner.** 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:119-46.
- Zambruno, G., V. Manca, M.L. Santantonio, D. Soligo, und A. Giannetti.** 1991. VLA protein expression on epidermal cells (keratinocytes, Langerhans cells, melanocytes): a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 124:135-45.
- Zigrino, P., C. Drescher, und C. Mauch.** 2001. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. *Eur J Cell Biol*. 80:68-77.
- Zou, Y.R., H. Gu, K. Rajewsky.** 1993. Generation of a mouse strain that produces immunoglobulin kappa chains with human constant regions. *Science* 262: 1271-4.
- Zutter, M.M., und S.A. Santoro.** 1990. Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell- surface collagen receptor. *Am J Pathol*. 137:113-20.
- Zutter, M.M., S.A. Santoro, A.S. Painter, Y.L. Tsung, und A. Gafford.** 1994. The human alpha 2 integrin gene promoter. Identification of positive and negative regulatory elements important for cell-type and developmentally restricted gene expression. *J Biol Chem*. 269:463-9.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg und Frau Dr. Beate Eckes danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, für die Themenstellung sowie für ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und die kritische Diskussion dieser Arbeit.

Frau Priv.-Doz. Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Sterner danke ich herzlich für die sehr spontane Übernahme des Drittgutachtens.

I am deeply indebted to Dr. Neil Smyth who gave me very exciting but also very disappointing moments during the progress of the work and, finally, shaped me a lot. Probably, without his special way of support the project might not have reached this point.

Außerdem danke ich insbesondere Dr. Werner Müller für die ständige wertvolle Diskussion der Arbeit sowie den anderen „ES-Zellkämpfern“, speziell Christoph Leuker, Martin Hafner und Monzur Murshed für geteilte Freude und Leid.

Bernhard Nieswandt und Valerie Schulte danke ich für die überaus nette Einführung in die interessante Welt der Thrombozyten und ihrer Analyse.

Marion Reibetanz, Gabi Hüppe und insbesondere Kerstin Elias danke ich für hervorragende technische Unterstützung und ausgesprochen angenehme Zusammenarbeit. Für viele allgemein-wissenschaftliche und nicht wissenschaftliche Diskussionen danke ich Pierre Shephard, Paola Zigrino und Markus Bernhards. Außerdem war es mir ein großes Vergnügen, den Enthusiasmus und das schier unglaubliche Fachwissen eines Reinhard Fässler kennenzulernen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Laboratorien der Hautklinik, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzlichen Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Dank an Ulrike und Anna, die viele Entbehrungen ertragen und ihr persönliches Opfer an die Wissenschaft gebracht haben, lässt sich nicht in Worte fassen. Es ist unmöglich, ihr Verständnis und die ständige Unterstützung gebührend zu belohnen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg betreut worden.

Köln, den 27. Februar 2002

Olaf Holtkötter

Teilpublikationen:

O. Holtkötter, B. Nieswandt, N. Smyth, W. Müller, M. Hafner, V. Schulte, T. Krieg, B. Eckes., „Integrin $\alpha 2$ -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen”. J. Biol. Chem. (2002), 277:10789-10794.

Lebenslauf

Olaf Holtkötter

Geburtsdatum: 02.06.1971 in Wesseling,

Geburtsort: Wesseling

Schulbildung:

77-78 Grundschule Bad Dürkheim

78-90 Grundschule und Gymnasium Hürth, Abitur

Studium:

10/90 Beginn des Studiums der Chemie an der Universität zu Köln

05/91-07/92 Zivildienst im mobilen sozialen Hilfsdienst des Lazarus Hilfswerks in Hürth

08/96-05/97 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Krieg, Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln

05/97 Diplom-Hauptprüfung im Fach Chemie

seit 06/97 Promotion für das Fach Biochemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Krieg, Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln

Auslandsaufenthalt:

06/99-07/99 Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. Reinhard Fässler am Institut

09/99-10/99 für experimentelle Pathologie in Lund, Schweden