

**Intra- und extrazelluläre Mechanismen
bei der
Pathogenese von Chondrodysplasien**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Alexander Becker
aus Neuss

Köln 2006

Berichterstatter: **Prof. Dr. Mats Paulsson**
 Prof. Dr. Helmut W. Klein
Prüfungsvorsitzender: **Prof. Dr. Thomas Langer**

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 12. Januar 2007

Zusammenfassung

Die Pseudoachondroplasie (PSACH) und die Multiple Epiphysäre Dysplasie (MED) sind zwei konstitutionelle Skeletterkrankungen, die zu disproportioniertem Minderwuchs führen, wobei MED mildere Symptome aufweist als PSACH. Beide Formen werden u. a. durch Mutationen im Gen für das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) hervorgerufen, die häufig zur Retention des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen. Die physiologische Funktion von COMP und dessen Rolle bei der Pathogenese ist jedoch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen mehrerer Mutationen (D361Y, D469 Δ , D475N, H587R) zunächst im bovinen und murinen Zellkulturmodellen untersucht. Primäre Chondrocyten wurden mit *myc*-markierten Wildtyp bzw. mutierten COMP-Konstrukten sowohl transfiziert als auch transduziert und in *monolayer*- und Alginatekulturen analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Pathogenese vielfältiger ist als bisher angenommen, sodass PSACH und MED nicht nur als ER-Speicherkrankheit gelten können, sondern auch extrazelluläre Mechanismen eine Rolle spielen. Während es bei allen untersuchten Aspartat-Mutationen zu Sekretionsstörungen und einer Erweiterung des ER kommt, wird H587R COMP ungehindert sekretiert. Trotz der Verzögerung erreichen auch alle Aspartat-Mutanten letztendlich zu einem gewissen Teil die extrazelluläre Matrix. Chondrocyten, die PSACH-assoziierte COMP-Varianten (D469 Δ , D475N, H587R) exprimieren, fehlt eine Matrix mit organisierten Collagen-Fibrillen. Stattdessen entstehen amorphe Aggregate. Die MED-assoziierte Mutation (D361Y) bewirkt, wie auch in ihrem Sekretionsverhalten, weniger drastische Veränderungen. Dies impliziert einen Zusammenhang zwischen zellulärem Phänotyp und Ausprägung der Krankheit. Die Induktion der Apoptose ist ungeachtet des Sekretionsverhaltens und des Phänotyps der extrazellulären Matrix bei allen Mutanten erhöht. Die Zellen weisen charakteristische intrazelluläre Veränderungen der Apoptose auf. Subtile Strukturänderungen von rekombinant exprimierten COMP-Varianten manifestieren sich in Abhängigkeit der Calciumkonzentration bzw. nach Entzug von Calcium. Diese Veränderungen wirken eindeutig auf die Funktion von COMP als Chaperon der Collagen-Fibrillogenese, obwohl die apparente Affinität sich nur unwesentlich unterscheidet. Während bei Aspartat-Mutationen die Fibrillogenese von Collagen I und II/XI im Vergleich zum Wildtyp Protein verzögert ist, scheint sie mit H587R COMP beschleunigt. Allerdings sind die durch Inkubation mit H587R COMP entstehenden Fibrillen erheblich in ihrer Struktur gestört, was im Einklang mit den beobachteten Aggregaten im Zellkulturmodell steht. Dass extrazelluläres mutiertes COMP auch zurück auf die Zellen wirken kann, wurde in Zelladhäsionsversuchen nachgewiesen.

Entgegen der vorherrschenden Ansicht, wirken bei der Pathogenese von PSACH und MED sowohl intra- als auch extrazelluläre Mechanismen. Diese tragen zum erhöhten Zelltod und der Desintegration des Knorpelgewebes bei, die möglicherweise den Minderwuchs bedingen.

Abstract

Pseudoachondroplasia (PSACH) and multiple epiphyseal dysplasia (MED) are two constitutional skeletal diseases, which lead to disproportionate dwarfism. MED is the clinically milder disease. Both forms are mostly associated with mutations in the gene for the cartilage oligomeric matrix protein (COMP). These mutations often lead to intracellular retention of the protein in the endoplasmic reticulum (ER). The physiological function of COMP and its role in the pathogenesis of chondrodysplasias is largely unknown.

In the present study the effects of a panel of disease-causing mutations (D361Y, D469 Δ , D475N, H587R) were examined, initially in bovine and murine cell culture systems. Primary chondrocytes were transfected or transduced with myc-tagged wildtype or mutated COMP constructs and examined in monolayer or three dimensional alginate culture.

It was found that the pathogenesis is more diverse than previously thought. PSACH and MED are not exclusively storage diseases, but extracellular mechanisms also play a role in pathogenesis. While all analyzed aspartate mutations showed a disturbed secretion and caused an enlarged ER, the secretion of H587R COMP was unaffected. Despite the retention all aspartate mutant proteins reach eventually the extracellular matrix. Chondrocytes expressing PSACH-associated COMP variants (D469 Δ , D475N, H587R) lack well defined distinct collagen fibrils in the extracellular matrix. Instead amorphous aggregates are formed. The MED-associated mutation (D361Y) gave a mild retention and limited matrix alterations. This implies a connection between the cellular phenotype and disease characteristics. Apoptosis was elevated by all mutant proteins irrespective of the secretion behaviour and extracellular matrix phenotype. On ultrastructural level the chondrocytes showed intracellular characteristic changes of apoptosis.

For analysis on molecular level the COMP variants were expressed recombinantly. Subtle structural alterations were revealed in dependence of calcium concentration. These changes affect the function of COMP as a chaperone in collagen fibrillogenesis, although the apparent affinity is only moderately altered. While the fibrillogenesis of collagen I and II/XI is delayed due to aspartate mutations, it is accelerated by H587R COMP. However fibrils formed in the presence of H587R COMP display a disrupted structure. This is consistent with the matrix alterations observed in the cell culture model. In cell adhesion assay it was found that extracellular mutant COMP influence cell behaviour.

In contrast to the predominant opinion, the pathogenesis of PSACH and MED includes extracellular as well as intracellular mechanisms. Both pathways contribute to an increased cell death and a disintegration of the cartilage matrix which may cause the dwarfism.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	4
INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN	7
EINLEITUNG	8
Konstitutionelle Skeletterkrankungen	8
COMP – cartilage oligomeric matrix protein	14
Untersuchte Mutationen in COMP	20
Zielsetzung der Arbeit	23
MATERIAL UND METHODEN	24
Chemikalien	24
Verwendete Antikörper	24
Molekularbiologische Arbeiten	25
Bakterienkulturen	25
Herstellung kompetenter Bakterien	26
Transformation von Bakterien	26
Expressionsvektor und cDNA	27
Agarose-Gelelektrophorese	28
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
DNA-Sequenzierung	29
Adenovirale Konstrukte	29
Zellkultursysteme	31
Nährmedien und Kultivierung	31
Lagerung	31
Isolierung primärer boviner Chondrocyten	31
Isolierung primärer muriner Chondrocyten	32
Transfektion von Zellen	32
Ernte des Zellkulturüberstands und des Zellrasens	32
Immunfluoreszenzfärbung von Chondrocyten	33
Alginkulturen von Chondrocyten	33
Immunhistochemie von Alginkulturen	34
Elektronenmikroskopie	36
Ölrotfärbung	38
Bestimmung der Zellvitalität	38
Bestimmung des nekrotischen Zelltods	39
Zellanhaftungsexperimente	39
TUNEL assay	39

Proteinchemische Arbeiten	40
Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatografie	40
Gelfiltration	41
Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
Dialyse	42
Trichloressigsäurefällung	42
Ethanol-fällung	42
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
Coomassie-Färbung	44
Western Blot und Immunodetektion	44
Silberfärbung	45
Circular Dichroismus Spektroskopie	46
Proteinbindungsversuche nach dem ELISA-Prinzip	46
Collagen-Fibrillogenese	47
ERGEBNISSE	48
Etablierung eines Zellkulturmodells für die Pathogenese von PSACH und MED	48
Sekretionsverhalten von Wildtyp- und mutiertem COMP	48
Intrazelluläre Verteilung von rekombinantem COMP	50
Einfluss von COMP Mutationen auf die Zellvitalität	52
Etablierung eines Zellkulturmodells mit viral-transduzierten Chondrocyten	58
Proteinchemische Analyse mutierter COMP Varianten	67
Aufreinigung von rekombinantem COMP	67
Strukturanalyse mittels Circular-Dichroismus Spektroskopie	68
COMP als Chaperon für Collagen-Fibrillogenese	72
ELISA-artige Bindungsstudien mit Collagen IX und COMP-Varianten	75
Zellanhaftungsexperimente	77
Einfluss des Signalpeptids auf die Sekretion von mutiertem COMP	79
Sekretion von COMP in murinen Chondrocyten	80
DISKUSSION	82
Sekretion der COMP-Konstrukte	83
Intrazelluläre Effekte von mutiertem COMP	86
Extrazelluläre Effekte von mutiertem COMP	89
Proteinchemische Analyse mutierter COMP Varianten	91
LITERATURVERZEICHNIS	96
DANKSAGUNG	103
LEBENS LAUF	105
ERKLÄRUNG	106

Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol	MOI	<i>multiplicity of infections</i>
AK	Antikörper	myc	c-myc-Epitop
AS	Aminosäuren	nt	nicht-transfiziert
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>	NEM	N-Ethylmaleinimid
bp	Basenpaare	NGS	<i>normal goat serum</i>
BSA	Rinderserumalbumin	Ni-NTA	<i>nickel nitriloacetic acid</i>
CD	Circular Dichroismus	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>	OD	optische Dichte
DMEM	Dulbecco's MEM Nut Mix F-12 Medium	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	OMIM	<i>On-Line Mendelian Inheritance in Man</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	PSACH	Pseudoachondroplasie
EBNA	<i>Epstein Barr virus nuclear antigen</i>	rb	<i>rabbit</i>
ECM	extrazelluläre Matrix	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiami tetraessigsäure	SDS	Sodiumdodecylsulfat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	T3	Thrombospondin Typ 3 Domäne
ER	endoplasmatisches Retikulum	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
EM	Elektronenmikroskop	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
f.c.	Endkonzentration	TC	carboxyterminale Domäne von COMP
FCS	fötales Kälberserum	TCA	Trichloressigsäure
fX	Faktor X Proteaseschnittstelle	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
his ₆	Hexahistidinmotiv	TSP	Thrombospondin
HMW	<i>high molecular weight marker</i>	Ü	Überstand
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	ÜN	über Nacht
IF	Immunfluoreszenz	UV	ultraviolett
kDa	Kilodalton	WB	Western Blot
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium	wt	Wildtyp
LMW	<i>low molecular weight marker</i>	ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln
L	Lysat		
LDH	Lactat Dehydrogenase		
m	<i>mouse</i>		
MED	Multiple Epiphysäre Dysplasie		
MMP	Magermilchpulver		

Einleitung

Konstitutionelle Skeletterkrankungen

Konstitutionelle Skeletterkrankungen haben einen negativen Einfluss auf die Entwicklung, das Wachstum und die Homöostase. Die verschiedenen anlagebedingten Krankheitsbilder unterscheiden sich in Symptomatik, Ätiologie, Pathogenese sowie der Vererbung. Die „Internationale Arbeitsgruppe für die Klassifizierung konstitutioneller Störungen des Knochens“ stellte erstmals 1972 eine Einteilung der Skeletterkrankungen auf. Zuletzt wies diese Einteilung 33 verschiedene Gruppen mit über 200 Skeletterkrankungen auf, wovon die größte Gruppe die Dysplasien umfasst (Hall 2002). Dysplasien sind im Allgemeinen pathologische Fehlgestaltungen. Sie sind charakterisiert durch Wachstums- und Entwicklungsstörungen der Röhrenknochen und/oder der Wirbelsäule, durch anarchische Entwicklung von Knorpel- und Fasergewebe sowie durch Anomalien der Knochendichte von dia- und metaphysären Strukturen (Int. Working Group of Const. Diseases of Bone, 1998)

Zu den konstitutionellen Skeletterkrankungen zählen des Weiteren Dysostosen, idiopathische Osteolysen und Krankheiten, die auf Chromosomenaberrationen oder Stoffwechselstörungen beruhen. Dysostosen sind Entwicklungsstörungen einzelner Knochen oder Skelettelementen, die sich schon im Embryo manifestieren. Unter der idiopathischen Osteolysen versteht man den krankhaften Abbau von Knochensubstanz. Chromosomale Aberrationen wurden von der oben genannten Arbeitsgruppe in drei Gruppen unterteilt: numerische und strukturelle Aberrationen sowie solche, die Geschlechtschromosomen betreffen. Sie führen zu mannigfaltigen Phänotypen. Skeletterkrankungen auf Grund des primären Stoffwechsels beziehen sich unter anderem auf Defekte im Calcium- und Phosphatstoffwechsel oder metabolische Störungen. Oft spielen bei der Pathogenese der Skeletterkrankungen grundlegende Störungen in Proliferation, Differenzierung und Migration der beteiligten Zellsysteme sowie der programmierte Zelltod eine Rolle (Spranger, 1997).

Die Einteilung von Erkrankungen auf Grund von Symptomen wird erweitert durch die Einordnung nach genetischen und molekularen Kriterien. Man unterscheidet z.B. Defekte bei Molekülen des Metabolismus (Enzyme, Ionenkanäle, Transporter), Fehlfaltungen extrazellulärer Proteine, gestörten Signaltransduktionsprozessen, veränderten Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressorgene, sowie Störungen im Nukleinsäuremetabolismus (Superti-Furga *et al.*, 2001; OMIM). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Skelettdysplasien, die durch Mutationen in extrazellulären Matrixproteinen entstehen – der Pseudoachondroplasie und der Multiplen Epiphysären Dysplasie. Sie werden unter anderem durch Mutationen im Gen für das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) ausgelöst. Diese Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung von COMP bei der Pathogenese dieser Krankheiten.

Pseudoachondroplasie und Multiple Epiphysäre Dysplasie

In der Gruppe der Osteochondrodysplasien bilden die Pseudoachondroplasie (PSACH) und die Multiple Epiphysäre Dysplasie (MED) eine Krankheitsfamilie. Ihre Symptome und deren Ausprägung überlappen, sodass keine scharfe Abgrenzung der beiden Knorpelkrankheiten möglich ist. Grundsätzlich gilt PSACH als die schwerwiegendere Krankheitsform im Vergleich zu MED. Die Prävalenz liegt für PSACH bei 1:250.000, während sie für MED bei 1:25.000 liegt (Kohler und Hesse, 2004). Die Symptome manifestieren sich vielfach nicht direkt nach der Geburt, sondern entwickeln sich bei PSACH frühestens mit dem zweiten Lebensjahr. Bei MED erscheinen Symptome im Kleinkindalter (bis ca. 6 Jahre). Als Leitsymptom ist eine einsetzende Gangstörung erkennbar. Der Intellekt und die Lebenserwartung sind bei beiden Krankheiten normal (McKeand *et al.*, 1996). Der Erbgang von PSACH ist autosomal dominant, lediglich für MED ist auch eine rezessive Form beschrieben (Int. Working Group on Constitutional Diseases of Bone, 1998).

PSACH-Patienten erreichen eine Körpergröße zwischen 90 und 150 cm (McKeand *et al.*, 1996). Die Arme und Beine sind verkrümmt und neigen zur Überstreckbarkeit (vgl. Abb. 1 A). Es kommt zu einem disproportionierten Minderwuchs, d.h. normale Rumpf- und Schädelgröße bei kurzen verdickten Extremitäten. Bei der Entwicklung der Wirbelsäule flachen die Wirbelkörper zunächst ab, gehen in eine bikonvexe Form über, wobei die glatte Wirbelkörperoberfläche später aufraut. Daraufhin kommt es zu einer ventralen Zuspitzung des Wirbelkörpers. Bis zum Erwachsenenalter normalisiert sich die Entwicklung, sodass normal geformte Wirbelkörper entstehen (siehe Abb. 1 B). Das Längenwachstum und die Epiphysenentwicklung sind gehemmt und es entstehen verkürzte Röhrenknochen. Dadurch entsteht eine Brachydaktylie (Kurzfingerigkeit, siehe Abb. 1 C). Die Epi- und Metaphysen sind fragmentiert geformt. Die Ossifikation in den Röhrenknochen ist verlangsamt. Diese grundlegenden Störungen führen zu veränderter Motilität der Gelenke. Ein charakteristisches Symptom ist die Bandlaxität, ebenso wie die Fehlstellung der Beine (*Genua valga*). Letztere bewirkt eine Abflachung der Hüftgelenke. Eine damit einhergehende früh einsetzende Arthrose erfordert bei der Hälfte der Patienten eine Hüftprothese bis zum 30. Lebensjahr. (vgl. Abb. 1 D; Briggs *et al.*, 2002). Als Begleiterscheinung können Knick-Plattfüße auftreten. Der Femur weist fragmentierte Ossifikationskerne sowie eine *Coxa vara* – eine Verkleinerung des Schenkelhalswinkels – auf (siehe Abb. 1 E; Kohler, 2004; Lachmann *et al.*, 2005). Durch diese anatomische Fehlstellung entsteht die charakteristische Gangstörung.



Abbildung 1: PSACH-Patienten mit Röntgenaufnahmen von Lendenwirbelsäule, Hand, Hüfte, Knie und Arm. (A) Charakteristisches Erscheinungsbild von PSACH-Patienten (aus Hall *et al.*, 1987); (B) typische, bikonvexe bis zugespitzte Verformung der Wirbelkörper (Pfeil) im Lendenbereich (aus Unger und Hecht, 2001); (C) Hand eines 10-jährigen PSACH-Patienten mit verzögerter Ossifikation der Epiphysen, milder Brachydaktylie und unregelmäßigen Mittelhandknochen; (D) Hüfte eines 11-jährigen MED-Patienten mit flacher unregelmäßig geformter femoralen Epiphyse; (E) Hüfte eines 19-jährigen MED-Patienten (schwere Ausprägung) mit anomalen Epiphysenform und *Coxa vara*; (F) Knie eines 6,5 Jahre alten Kindes mit erweiterten Metaphysen; (G) Arm eines 2,5 Jahre alten Kindes mit verformten Metaphysen von Humerus, Radius und Ulna sowie Fehlentwicklungen im Ellbogen. (C-G aus Lachmann *et al.*, 2005)

MED-Patienten erreichen eine Größe von bis zu 170 cm (Nakashima *et al.*, 2005). Auch hier fallen als erste Leitsymptome die Gangstörung, Bewegungseinschränkungen und Hüftschmerzen auf. Besonders charakteristisch sind die flachen Epiphysen des Femurs mit frühzeitig arthrotischen Veränderungen (siehe Abb. 1 D). Der Femur weist zudem fragmentierte abgeflachte Ossifikationskerne auf. Ein charakteristischer Hinweis auf MED ist die unregelmäßige und verbreiterte Form der Metaphysen, wie in den Abbildungen 1 F und 1 G zu sehen ist. Bei schweren Krankheitsformen der MED, wie dem Typ Fairbank, entstehen wie bei PSACH plumpe, kurze Finger und Zehen. Die Mittelhandknochen können proximal abgerundet sein. Die Wirbelsäule ist ebenfalls nur bei den schweren Formen betroffen, hinzu kommt auch hier die früh einsetzende Arthrose.

Die genetische Kartierung ergab für PSACH und MED einen gemeinsamen Genlocus in der pericentromerischen Region des Chromosoms 19 (Briggs *et al.*, 1993; Hecht *et al.*, 1993; Oehlmann *et al.*, 1994). Später wurden die krankheitsauslösenden Mutationen mit dem Gen für das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP) in Verbindung gebracht, welches auf Chromosom 19p12-13.1 lokalisiert ist (Briggs *et al.*, 1995; Hecht *et al.*, 1995). Für MED sind darüber hinaus weitere krankheitsauslösende Mutationen in anderen Genen gefunden worden. Briggs *et al.* (1994) lokalisierten auf Chromosom 1 eine Region, welche für die $\alpha 2$ Kette von Collagen IX codiert und die mit MED assoziiert werden konnte. Später zeigte sich, dass Mutationen in allen drei Ketten von Collagen IX mit MED in Verbindung gebracht werden konnten (Czarny-Ratajczak *et al.*, 2001; Muragaki *et al.*, 1996; Paasilta *et al.* 1999). Ein weiteres mit MED assoziiertes Protein ist Matrilin-3, ebenfalls ein oligomeres Strukturprotein der extrazellulären Matrix des Knorpels. Die krankheitsauslösenden Mutationen sind, hier vor allem in der von-Willebrand-Faktor-A Domäne lokalisiert (Chapman *et al.*, 2001). Die molekularen Grundlagen von PSACH und MED sind heterogen und auch Nicht-Strukturproteine sind bei der Pathogenese beteiligt. Mutationen im *diastrophic dysplasia sulphate transporter* (DTDST) verursachen die seltene rezessive Form der MED (Superti-Furga *et al.*, 1999). Auch die von Ikegawa *et al.* (1998) gefundene Deletion auf Chromosom 11 verursacht PSACH. Allerdings sind diejenigen Gene, welche durch die Deletion betroffenen sind, (IL-1- β konvertierendes Enzym, ionotroper Glutamatrezeptor 4 und Acetoacetyl-CoA Thiolase) unwahrscheinliche Kandidaten für ein PSACH-auslösendes Gen, sodass weiterführende Untersuchungen notwendig sind. Weitere krankheitsauslösende Loci werden noch vermutet, da einer Studie zufolge bei nur ca. einem Drittel der MED-Patienten Veränderungen in den oben genannten Gen-Loci zugeschrieben werden konnten (Jakkula *et al.*, 2004).

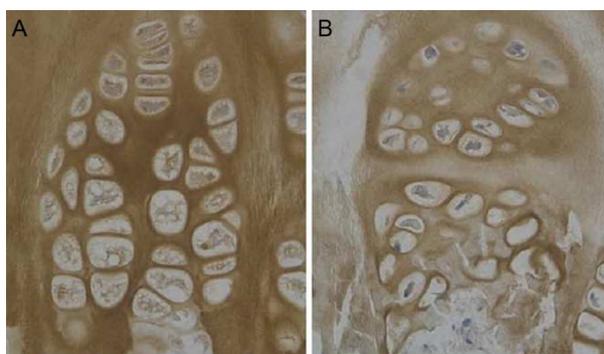


Abbildung 2: Lokalisierung von COMP in der Wachstumsfuge. (A) stellt gesunden Knorpel dar. Die Chondrocyten sind charakteristischerweise säulenartig angeordnet. COMP ist in der perizellulären und territorialen Matrix lokalisiert. In (B) ist der Knorpel eines PSACH-Patienten (D511Y) gezeigt. Die Chondrocyten weisen eine desorganisierte Verteilung auf. Hier ist COMP kaum in der territorialen Matrix zu finden (aus: Posey *et al.*, 2004).

In einer gesunden Wachstumsfuge eines Knochens ist eine säulenförmige Anordnung der Chondrocyten charakteristisch. Diese ist bei PSACH- und MED-Patienten nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 2). Es ist insgesamt eine geringere Zelldichte zu beobachten. Große Vakuolen sind im Cytoplasma der Zellen zu erkennen. Innerhalb erweiterter Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (ER) wurden lamelläre oder granuläre Strukturen beobachtet (Maynard *et al.*, 1972). Diese Strukturen können das *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), die Collagene IX, XI und XII, die Proteoglycane Decorin und Fibromodulin sowie das Glycoprotein SPARC enthalten (Maddox *et al.*, 1997; Vranka *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2006). Durch die Retention und Akkumulation von Proteinen wird das rER auf charakteristische Weise aufgebläht (Abb. 3).

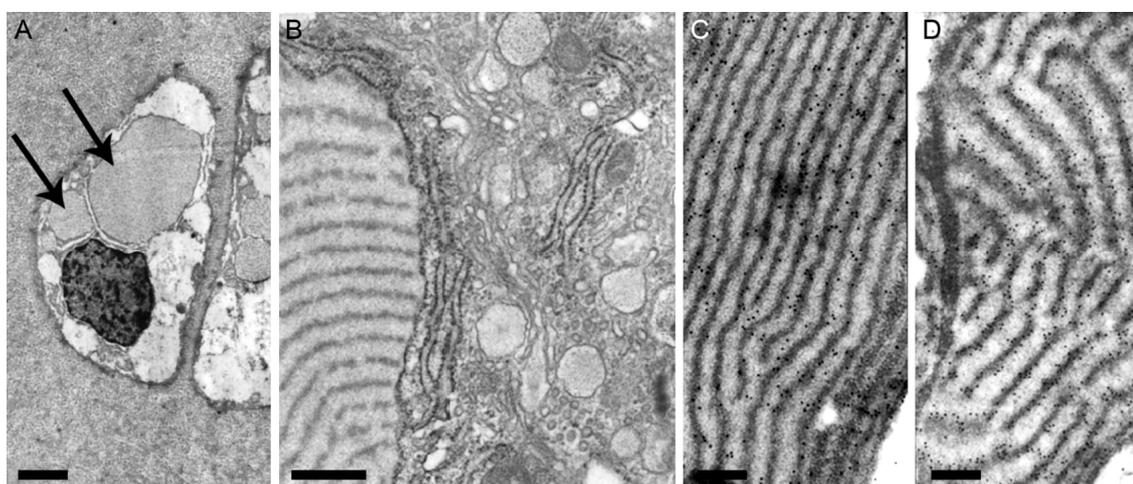


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chondrocyten aus dem Wachstumsfugenknorpel (A,C,D), bzw. dem Beckenkamm (B) von PSACH-Patienten.

(A) Das charakteristisch vergrößerte ER ist mit Pfeilen markiert. (B) zeigt in höherer Vergrößerung das aufgeblähte ER mit den lamellären Strukturen (links im Bild) sowie normales ER und Teile des Golgi Apparates. Mittels Immunogoldmarkierung konnte in den Strukturen Collagen IX (C) und COMP (D) nachgewiesen werden. Maßstäbe in (A) = 2 μm , (B) = 500 nm, (C, D) = 200 nm. (Quellen: (A, C und D) aus Maddox *et al.*, 1997; (B) aus Vranka *et al.*, 2001).

Die Sekretion von Collagen II, Collagen VI und Aggrecan ist nicht betroffen (Vranka *et al.*, 2001). Es finden sich auch in der extrazellulären Matrix des Knorpels von PSACH-Patienten Spuren von COMP, die Sekretion ist also nicht vollständig gehemmt (Délot *et al.*, 1998). Die intrazellulären Einschlüsse enthalten auch erhöhte Mengen der Chaperone Hsp47, Calnexin und der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), die an der so genannten *unfolded protein response* (UPR) beteiligt sind (Vranka *et al.*, 2001). Die UPR reguliert den Proteintransport des ER bei Zellstress, z.B. durch eine erhöhte Anzahl fehlgefalteter Proteine. Die Chaperone Calreticulin, Grp94 und ERp72 sowie BiP wurden im aufgeblähten ER gefunden. Ihnen werden faltungsunterstützende Eigenschaften auch von wildtyp COMP zugesprochen (Hecht *et al.*, 2001). Eine Mitwirkung der Chaperone bei der Retention von COMP kann also nicht

ausgeschlossen werden. Durch die Retention bindet COMP möglicherweise schon innerhalb des ER an seine Interaktionspartner (z.B. Col IX). Die entstehenden pathogenen Aggregate behindern den Proteintransport. Weitere Proteine könnten sich an den Komplex anlagern und immer größere Aggregate bilden und so das endoplasmatische Retikulum aufblähen (Vranka *et al.*, 2001).

Aus therapeutischer Sicht können bisher nur die Symptome und deren sekundäre Folgen von PSACH und MED gemildert werden. Die Epiphysenstörungen an der Hüfte werden als Präarthrosen aufgefasst und nach den Prinzipien der Arthrosebehandlung versorgt. Den Extremitätendeformierungen entsprechend werden weitere Behandlungen eingeleitet. Die Gabe von Wachstumshormonen zeigte bei PSACH-Patienten keinen positiven Effekt (Kanazawa *et al.*, 2003; Bjarnason *et al.*, 2004). Mittelfristig verbleibt den Patienten deshalb als Therapie nur der prothetische Gelenkersatz. Eine Vielzahl von Forschungsgruppen arbeitet an Methoden zur Rekonstruktion und Regeneration mittels in Zellkultur gewonnenem Gewebe oder strukturellen Gerüsten (*scaffolds*).

COMP – cartilage oligomeric matrix protein

COMP ist ein nicht-collagenes, homopentamerer Glycoprotein der extrazellulären Matrix und wird hauptsächlich im Knorpel sowie in Sehnen und Bändern exprimiert (Mörgelin *et al.*, 1992; Hedbom *et al.*, 1992; Oldberg *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1998). Außerdem konnte es in synovialen Flüssigkeiten, vaskulären glatten Muskelzellen und Osteoblasten nachgewiesen werden (Saxne *et al.*, 1992; Riessen *et al.*, 2001; DiCesare *et al.*, 2000). Sein Molekulargewicht beträgt 524 kDa. Es besitzt anionische Eigenschaften auf Grund seines hohen Gehalts an Aspartat- und Glutamatresten sowie an negativ geladenen Kohlenhydraten.

COMP ist modular aufgebaut. Die Domänen werden beim Menschen von 18 Exons codiert, welche 2471 Nukleotide umfassen (Briggs *et al.*, 1995). Ein Monomer besteht aus 757 Aminosäuren, wobei die ersten 30 das Signalpeptid darstellen. Nach Abspaltung dieses Signalpeptids setzt sich ein Monomer aus folgenden Domänen zusammen: einer Pentamerisierungsdomäne (PD), vier EGF-ähnliche Domänen (EGF), acht Thrombospondin Typ 3 Domänen (T3) und einer globulären Domäne (TC) (Abb. 4)

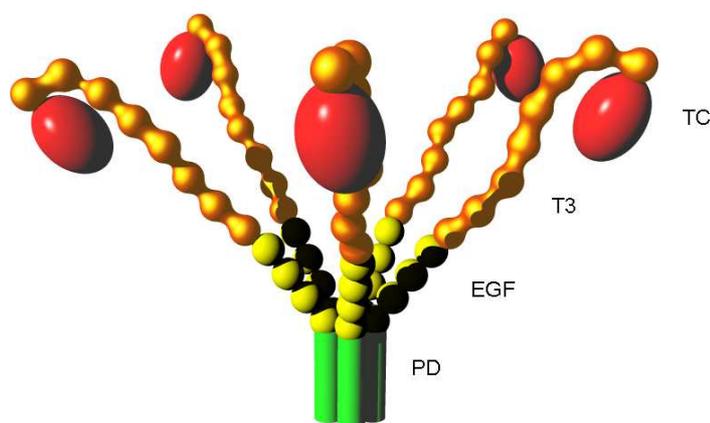


Abbildung 4: Modell der räumlichen Anordnung eines COMP-Pentamers. Die Monomere sind aus folgenden Domänen aufgebaut: einer Pentamerisierungsdomäne (PD), vier EGF-ähnlichen Domänen (EGF), acht Thrombospondin-Typ 3 Domänen (T3) und einer globulären C-terminalen Domäne (TC).

COMP gehört zur Familie der Thrombospondine (TSP). Bei den Säugetieren sind fünf Mitglieder bekannt. In niederen Lebewesen enthält das Genom dagegen entweder eine reduzierte Anzahl an TSPs (z.B. *Drosophila melanogaster*, Adams *et al.*, 2000) oder nur Proteine, die TSP-Domänen enthalten (*C. elegans*, Nicholson *et al.*, 2005). COMP wird auch als Thrombospondin-5 bezeichnet und ging wahrscheinlich durch Genduplikation aus Vorläufern von Thrombospondin-3 und -4 hervor (Newton *et al.*, 1994). Die drei Moleküle sind untereinander hoch konserviert, dies gilt auch speziesübergreifend (Oldberg *et al.*, 1992). Im elektronenmikroskopischen Bild erscheint COMP als ein Bouquet-artiges Molekül (Mörgelin *et al.*, 1992, s.a. Abb. 6). Das Oligomer entsteht intrazellulär durch die Zusammenlagerung

von fünf Pentamerisierungsdomänen. Die PD ist 46 Aminosäuren lang und es finden sich die charakteristischen *Heptad*-Wiederholungen (Oldberg *et al.*, 1992; Efimov *et al.*, 1994). Diese Folge aus polaren und hydrophoben Seitenketten bildet eine rechtsgängige α -Helix aus. Fünf dieser Helices lagern sich zu einer linksgängigen, superspiralisierten α -Helix zusammen. Sie wird durch hydrophobe und ionische Interaktionen unterstützt und mittels intermolekularer Disulfidbrücken (Cystein 68 und Cystein 71) stabilisiert. Es entsteht eine Ionenkanal-ähnliche Struktur, in der hydrophobe Substanzen, wie Vitamin A oder D, potenziell transportiert werden können (Guo *et al.*, 1998). Beide Substanzen sind wichtig für den Knochenbau. Es folgen nach einer kurzen *linker*-Sequenz vier EGF-ähnliche Domänen. Die Domänen weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit Domänen des *epidermal growth factor* auf. Diese kompakten globulären Domänen bestehen aus β -Faltblättern, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Ihre Ca^{2+} -Bindefähigkeit erfüllt strukturgebende Aufgaben (Stenflo *et al.*, 2000).

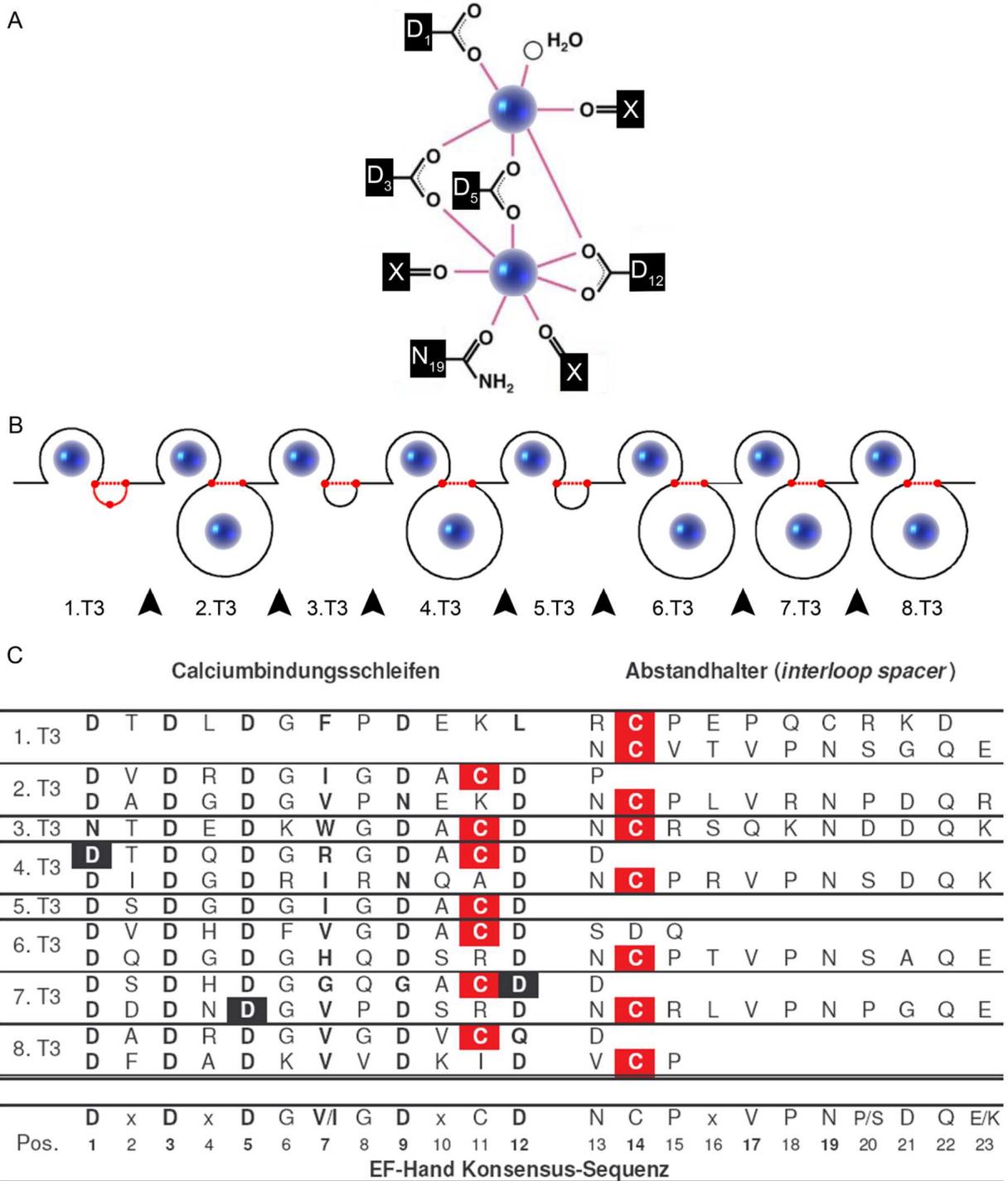


Abbildung 5: Calciumbindung in den T3 Domänen. (A) Schematische Darstellung der Koordinierung zweier Ca^{2+} -Ionen (blaue Kugeln). Die beteiligten AS sind bezüglich ihrer Position in der EF-Hand Konsensus-Sequenz (s.u.) nummeriert. (B) Schematische Darstellung der Ca^{2+} -bindenden Schleifen der acht T3 Domänen. Die stabilisierenden Disulfidbrücken sind in rot dargestellt. (C) Darstellung der AS-Sequenz der T3 Domänen. Die schwarz unterlegten AS markieren die Mutationen, die in dieser Arbeit untersucht werden (D361Y, D469Δ, D475N). Die Cysteine zur Disulfidbrückenbildung sind rot unterlegt. Ca^{2+} -Ionen koordinierende AS sind fett gedruckt. Unten ist die Konsensus-Sequenz von EF-Händen angegeben (modifiziert nach Thur, 2001; Kleerekoper *et al.*, 2002 und Kvensakul *et al.*, 2004).

Als nächstes folgen acht TSP Typ 3 Domänen (T3). Ein Monomer ist in der Lage, in den T3 Domänen bis zu 14 Ca^{2+} -Ionen zu binden. Die Ca^{2+} -Bindung ist für die Funktionsfähigkeit des Proteins essenziell und krankheitsverursachende Mutationen können die Zahl gebundener Ca^{2+} -Ionen reduzieren und die Funktion des Proteins einschränken (Chen *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001; Kleerekoper *et al.*, 2002). Mutationen in Calciumbindungsstellen einiger anderer Proteine führen zu Krankheiten (Dietz *et al.*, 1995; Maurer *et al.*, 1997). Bei den meisten PSACH- und MED auslösenden Mutationen sind die Calcium-koordinierenden Aspartate betroffen. Es handelt sich zumeist um Substitutionen. Es wurden auch Deletionen und Insertionen entdeckt, so führt z.B. eine Insertion eines bzw. zweier Aspartatreste in den T3 Domänen zu MED bzw. PSACH. Das hochkonservierte Bindungsmotiv für Ca^{2+} -Ionen scheint durch die Insertion weiterer Aspartate erheblich gestört zu sein. Die Aspartate die wichtigsten Koordinierungspartner für die Ionen (Abb. 5 A). Eine Veränderung der räumlichen Anordnung durch zusätzliche Aspartate ist daher besonders gravierend.

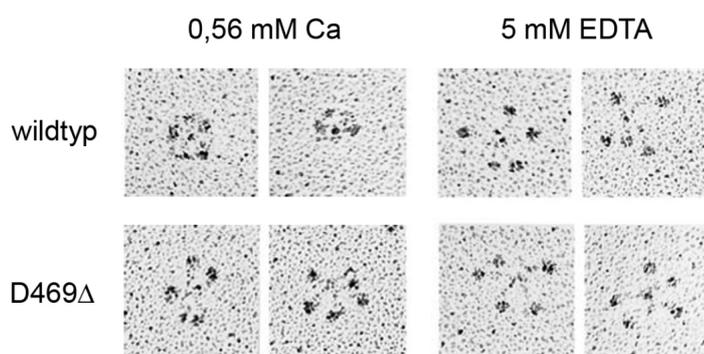


Abbildung 6: Einfluss von Ca^{2+} auf die Struktur von wildtyp und mutiertem COMP.

Rekombinantes COMP wurde in Anwesenheit von Calcium und nach EDTA-Zugabe mittels Rotationsbedampfung elektronenmikroskopisch analysiert. wildtyp COMP weist mit 0,56 mM Ca^{2+} eine kompakte Form auf, während es nach EDTA-Zugabe (5 mM) aufgefächert erscheint. D469Δ COMP hingegen verändert seine Konformation kaum (modifiziert nach Chen *et al.*, 2000).

Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen sowie Gleichgewichtsdialyse und CD-spektroskopischen Messungen an wildtyp (wt) und mutiertem COMP wurde gezeigt, dass die Ca^{2+} -Bindefähigkeit und die Sekundärstruktur in direktem Zusammenhang stehen (Chen *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001). Abbildung 6 zeigt elektronenmikroskopische Bilder von Rotationsbedampfungen von wildtyp und D469Δ (Δ D) COMP jeweils mit Ca^{2+} - oder EDTA-Zugabe. Wildtyp COMP nimmt in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} unterschiedliche Konformationen ein. Bei 0,56 mM Ca^{2+} weist es eine sehr kompakte Form auf, während es nach EDTA-Zugabe wie aufgefächert wirkt. Im Gegensatz dazu bleibt die Ausrichtung der Peptidketten von D469Δ COMP nahezu unverändert. Das Protein kann weder die kompakte noch die weit gefächerte Konformation einnehmen, sondern verbleibt stets zwischen beiden Zuständen. Dies impliziert eine regulatorische Funktion von Calcium auf COMP, die bei der mutierten Varianten möglicherweise gestört ist (s.u.).

Neben den Aspartatsubstitutionen bilden Cysteinsubstitutionen die zweitgrößte Gruppe MED- und PSACH-auslösender Mutationen. Die Cysteine bilden Disulfidbrücken aus, die die Schleifen stabilisieren und so erst die Ca^{2+} -Bindung ermöglichen.

Der Carboxyterminus wird von der TC Domäne gebildet und besteht zum größten Teil aus β -Faltblättern. Röntgenstrukturanalysen mit rekombinanten Fragmenten von TSP-1 und -2 zeigten, dass sich die TC auf die T3 Domänen zurückfaltet (Kvansakul *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2005). Dies impliziert eine strukturelle Abhängigkeit der TC und der T3 Domänen voneinander. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen sind im Hinblick auf die Untersuchung von strukturverändernden Mutationen besonders interessant. In der TC Domäne sind die Bindestellen zu einigen Proteinen lokalisiert. So bindet COMP dort an Fibronectin, die Matriline 1, -3 und -4 sowie die Collagene I, II und IX (DiCesare *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 1998; Thur *et al.*, 2001; Holden *et al.*, 2001).

Es konnte auch eine Bindung zu den Prokollagenen I und II nachgewiesen werden. Daher wird für COMP eine Rolle bei der Fibrillogenese und dem Erhalt der Matrix diskutiert. Durch seine pentamere Struktur sind multivalente Interaktionen u.a. mit tripelhelikalem Collagen möglich. Die Bindung zu den Collagenen ($k_D = 1,5$ nM bei Col I; $k_D = 1,7$ nM bei Col II) ist abhängig von divalenten Kationen, wie Zn^{2+} oder Ni^{2+} , nicht aber von Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Rosenberg, 1998). Die physiologische Konzentration von Zink variiert in den verschiedenen Knorpelschichten (0,16-1,85 mM). Das Verhältnis zwischen Zn^{2+} und Ca^{2+} variiert ebenfalls (1:5 bis 1:50). Über die genaue Funktion beider Ionen und deren Verhältnis wird noch spekuliert. Die physiologische Funktionsweise von COMP ist noch weitgehend unbekannt, daher wurden in der vorliegenden Arbeit unter anderem der Einfluss von Ca^{2+} auf wildtyp und mutiertes COMP sowie die Bindung von COMP an Collagene analysiert.

Bei COMP *knock-out* Mäusen konnte keine Veränderung in der skeletalen Entwicklung festgestellt werden (Svensson *et al.*, 2002). Die Expression von COMP beginnt bei der Maus mit der Chondrogenese (Tag 10 *post coitus*). Mehrere regulatorische Elemente (*enhancer*, *silencer* und Transkriptionsregulator) steuern die Expression des COMP-Gens (Issack *et al.*, 2000, 2004; Liu *et al.*, 2004, 2005). Während in mesenchymalem Gewebe COMP zunächst nur gering exprimiert wird, wird die Expression in Knorpelzellen im Laufe der Differenzierung hochreguliert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird COMP weitgehend in der Proliferationszone der Wachstumsfuge, im Perichondrium, Periosteum und im Oberflächenknorpel exprimiert (Fang *et al.*, 2000). Das menschliche Skelett entwickelt sich aus dem embryonalen Mesoderm und teilt sich in drei Zelllinien auf. Die Somiten formen das Axialskelett, aus dem Seitenplattenmesoderm gehen die Appendikularknochen hervor und Teile des Schädels entstehen aus Neuralleistenzellen. Der Schädel und der Torso von PSACH- und MED-Patienten sind normal entwickelt. Dies impliziert für COMP eine

unterschiedliche Regulation sowohl auf der Ebene der mesodermalen Zellerivate als auch bei der Verknöcherung (DiCesare *et al.*, 2000). Man unterscheidet zwei grundlegende Verknöcherungsmechanismen: Die endochondrale und die desmale Ossifikation. Aus der Letzteren gehen weitgehend die Schädelknochen hervor. Torso und Extremitäten entstehen durch endochondrale Ossifikation. Da bei PSACH- und MED-Patienten die Extremitäten betroffen sind, der Torso aber nicht, kann auch hier eine unterschiedliche Regulation der endochondralen Ossifikation angenommen werden.

Während der Entwicklung verändert sich, wie Untersuchungen mit COMP aus bovinem Knorpel zeigten, die N-Glycosylierung. Von den drei potenziellen Bindungsstellen sind lediglich zwei tatsächlich glycosyliert. In der ersten EGF-ähnlichen Domäne befindet sich der Asparaginrest 101, welcher im Laufe der Entwicklung mit unterschiedlichen Zuckerketten substituiert wird. Die variable Glycosylierung könnte regulatorische Eigenschaften haben, indem die Bindung zu Interaktionspartnern beeinflusst wird. Der Asparaginrest 721 liegt in der TC Domäne und trägt eine Zuckerkette, die hauptsächlich aus Glucosamin und N-Acetylneuraminsäure besteht. Trotz einer Erkennungssequenz für N-Glycosylierung ist der Asparaginrest 124 nicht substituiert. Bisher wurde keine O-Glycosylierung festgestellt (Oldberg *et al.*, 1992; Zaia *et al.*, 1997).

Die Expression von COMP wird vielen weiteren Faktoren wie, z.B. dem Alter, der mechanischen Beanspruchung oder Verletzung des Knorpel- und Sehngewebe beeinflusst (Smith *et al.*, 2000, 2002).

Untersuchte Mutationen in COMP

Alle PSACH- und viele MED-Varianten entstehen durch Mutationen im COMP-Gen. Die meisten der über 70 erfassten Veränderungen beruhen auf Substitution einzelner, meist saurer Aminosäuren, wobei nur einige Deletionen und Insertionen nachgewiesen wurden. Bisher wurde nur ein Kettenabbruch - bedingt durch ein verfrühtes Stop-Codon - entdeckt. Circa 80 % der Mutationen sind in den T3 Domänen lokalisiert, die verbleibenden liegen in der TC Domäne. Es wurden bisher keine krankheits-assoziierten Mutationen in den EGF Domänen oder der PD gefunden. Ob solche Mutationen keine Auswirkungen haben oder letal sind, bleibt spekulativ. Die meisten Mutationen betreffen die T3 Domänen und die TC Domäne: Sie vermitteln Ca^{2+} -Bindefähigkeit bzw. die Collagen-, Matrilin- und Fibronectinbindung. Folgende Abbildung illustriert die Lage der bekannten PSACH und MED verursachenden Mutationen. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen sind hervorgehoben:

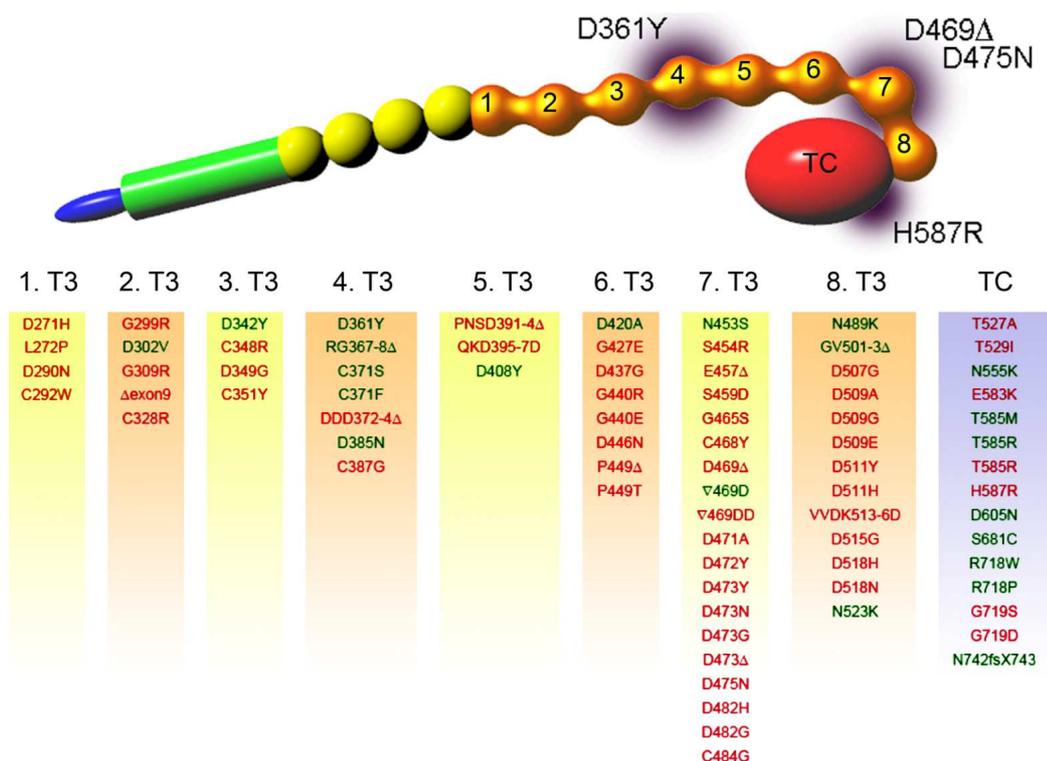


Abbildung 7: PSACH und MED assoziierte Mutationen. Die PSACH auslösenden Mutationen sind in rot dargestellt, die MED auslösenden in grün. Die Mutationen sind vertikal entsprechend ihrer Lokalisation in den unterschiedlichen T3 bzw. TC Domänen angeordnet. Es wird deutlich, dass der Großteil der krankheitsauslösenden Genveränderungen in den T3 Domänen liegt.

Die pathogenen Mechanismen, die zu PSACH und MED führen, sollten in dieser Arbeit eingehender untersucht werden. Aus diesem Grund wurden vier repräsentative COMP-Varianten ausgewählt.

Mutation	Nukleotid	Exon	Domäne	Diagnose	Referenz
D361Y (DY)	1081 G>T	10	4. T3	MED	Loughlin <i>et al.</i> , 1998
D469 Δ (Δ D)	1405-1407 Δ	13	7. T3	PSACH	Hecht <i>et al.</i> , 1995
D475N (DN)	1423 G>A	13	7. T3	PSACH	Deere <i>et al.</i> , 1998
H587R (HR)	1760 A>G	16	TC	PSACH	Deere <i>et al.</i> , 1998

Die kürzlich gelungene Kristallisierung der TC Domäne und einiger T3 Domänen von TSP 1 kann Einblicke in die Lage der Mutationen in der 3D Struktur geben, da TSP 1 und COMP in diesem Bereich extrem homolog sind.

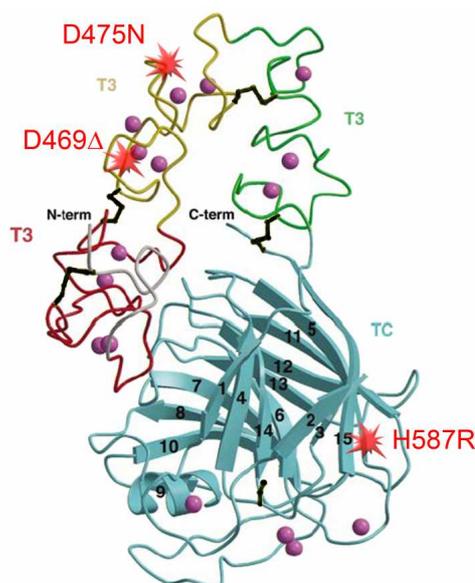


Abbildung 8: Lokalisierung der PSACH-auslösenden Mutationen. Das Modell aus drei T3 Domänen und der TC Domäne basiert auf Röntgenstrukturanalysen. Die PSACH-auslösenden Mutationen sind mit Sternen markiert. Die Domänen sind farblich hervorgehoben und die β -Faltblätter sind entsprechend ihrer Reihenfolge in der AS-Kette nummeriert. Ca^{2+} -Ionen sind durch violette Kugeln symbolisiert. Die Disulfidbrücken sind in schwarz dargestellt (modifiziert nach Kvensakul *et al.*, 2004).

Der Satz an untersuchten Mutationen umfasst drei PSACH-assoziierte Mutationen (Δ D, DN, HR) sowie eine Mutation, die MED (DY) verursacht. Δ D ist mit ca. 20 % die häufigste aller PSACH-Mutationen und daher am umfassendsten charakterisiert (Kleerekoper *et al.*, 2002). Wie in Abb. 6-C zu sehen, ist das betroffene Aspartat in einer Reihe von fünf weiteren Aspartaten in der 7. T3 Domäne lokalisiert. In dieser Folge wurden bereits mehrere Mutationen charakterisiert. So führt z.B. eine Insertion eines weiteren Aspartatrests zu den

oben beschriebenen Einschlüssen im ER und zu MED. Durch die Deletion des Aspartats kommt es im Molekül zu lokalen Konformationsänderungen, wie NMR-Studien mit Proteinfragmenten zeigten. Dadurch reduziert sich die Ca^{2+} -Bindekapazität von COMP (Kleerekoper *et al.*, 2002). Der Einfluss von Calcium auf die Struktur wird daher in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das vollständige Protein untersucht. Des Weiteren zeigten Dinser *et al.* (2002), dass durch ΔD COMP neben den Einschlüssen im ER auch extrazelluläre Veränderungen entstehen. So konnten sie bei isolierten, transduzierten Chondrocyten eine reduzierte Zellvitalität und die Ausbildung einer desorganisierten extrazellulären Matrix feststellen. Zur Analyse der extrazellulären Matrix benötigt man Langzeitkulturen. Hierzu müssen Chondrocyten in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert werden, da sie sonst ihr Expressionsmuster ändern (Zaucke *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde als Trägermaterial Alginate verwendet. Die genannten Effekte von ΔD COMP wurden in dieser Arbeit ebenfalls analysiert und mit anderen Mutationen verglichen. Mit DN wird eine PSACH-assoziierte Mutation untersucht, die wie DY direkt an der Ca^{2+} -Koordination beteiligt ist (Deere *et al.*, 1998). Sie ist noch wenig untersucht und daher erschien deren Charakterisierung besonders interessant.

Die MED-auslösende DY Mutation wurde ausgewählt, um mögliche Zusammenhänge zwischen dem Phänotyp der Krankheit und beobachteten Effekten durch DY COMP zu erkennen. Die DY-Substitution bewirkt einen schwächeren Phänotyp, obwohl sie ebenfalls die Calcium-Koordination betrifft. Daher ist ein Vergleich mit PSACH-assoziierten Mutationen und deren Auswirkungen von Interesse und bietet die Möglichkeit zur Erarbeitung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Diese könnte als Basis für ein Modell der pathogenen Mechanismen der Krankheiten dienen.

Die Gruppe der untersuchten Mutationen wird durch HR erweitert. Sie befindet sich im Gegensatz zu den anderen Substitutionen in der TC Domäne. Wie oben beschrieben, faltet sich die TC Domäne zurück auf die T3 Domänen. Dadurch werden Mutationen in dieser Domäne in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe dieser Mutationen umfasst Veränderungen in der Kontaktfläche zwischen TC und T3. Sie könnten also, ähnlich wie die Mutationen in den T3 Domänen selbst, die Struktur der Ca^{2+} -Bindungsstellen beeinflussen. Die H587R kann der zweiten Gruppe zugeordnet werden, da sich die Substitution auf der abgewandten Seite befindet, wodurch die Störung intermolekularer Vorgänge möglich ist (Kennedy *et al.*, 2005). Sie ist in der von Holden *et al.* (2001) vorhergesagten Collagen-Bindungsstelle lokalisiert. Der Einfluss der Mutation auf die Struktur und die Bindefähigkeit an Collagen I, II und IX ist jedoch nur geringfügig verändert (Spitznagel *et al.*, 2004). Ob HR COMP einen andersartigen Einfluss auf die Collagene hat, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, Auswirkungen verschiedener Mutationen in COMP auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen. Es sollte hierbei ein Satz verschiedener Mutationen analysiert werden. Dieser Satz umfasste sowohl Mutationen, die in unterschiedlichen funktionellen und strukturellen Domänen des Proteins liegen, als auch Mutationen, die einen unterschiedlich starken Phänotyp im Patienten bewirken. Es sollte erörtert werden, ob die einzelnen Mutationen über unterschiedliche pathogene Mechanismen wirken.

Die methodische Herangehensweise basierte auf zwei Ansätzen. Zum einen sollten die Effekte der COMP-Mutanten D361Y, D469Δ, D475N und H587R im Zellkulturmodell untersucht und verglichen werden. Zum anderen sollten die entsprechenden rekombinanten COMP-Varianten proteinchemisch untersucht werden.

Anhand von primären bovinen und murinen Chondrocyten sollten im Zellkulturmodell die Auswirkungen von rekombinant exprimiertem, mutiertem COMP analysiert werden. Die Chondrocyten wurden dazu je nach Fragestellung des Experiments mit den verschiedenen COMP-Konstrukten transfiziert oder viral infiziert. Zuerst sollte die Sekretion und die intrazelluläre Verteilung der COMP-Varianten untersucht werden. Intrazelluläre Effekte von mutiertem COMP sollten dann auf ultrastruktureller Ebene erfasst werden. In Langzeitkulturen sollte der Einfluss von mutiertem COMP auf die extrazelluläre Matrix charakterisiert werden. Zu diesem Zweck sollten die Chondrocyten in Alginate kultiviert, um das charakteristische Expressionsmuster von Chondrocyten aufrecht zu erhalten.

Für die proteinchemischen Analysen der COMP-Varianten sollten die Proteine rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Die strukturellen Eigenschaften der Proteine in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration wurden mittels CD-Spektroskopie analysiert. Die Funktionsweise von COMP sollte eingehender untersucht werden, indem seine Eigenschaften bezüglich der Protein- und Zellinteraktion charakterisiert wurden. Als wichtige Interaktionspartner von COMP hinsichtlich der Pathogenese werden die Collagene angesehen. Daher wurden Fibrillogenese-Experimente mit Collagen I und einem Gemisch aus Collagen II/XI und Bindungsstudien mit Collagen IX und COMP durchgeführt. Von besonderem Interesse war zudem die Zellanhaftung von Chondrocyten auf mutiertem COMP.

Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden Standardmethoden der Molekularbiologie, Proteinbiochemie und Zellkulturarbeiten nach Standardprotokollen (z.B. Mühlhardt 2000, Rehm 2000) oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten die Qualität *pro analysi*. Häufig verwendete Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit hochreinem, deionisiertem Wasser (MilliQ Plus PF von Millipore) angesetzt und gegebenenfalls für 40 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Der pH-Wert wurde mit HCl und NaOH bei Raumtemperatur eingestellt.

PBS (pH 7,4)

140 mM NaCl

10 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

TBS (pH 7,4)

150 mM NaCl

50 mM Tris

Verwendete Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper und ihre optimale Arbeitskonzentration.

Spezifität	Spezies	Referenz	WB	IF
COMP	rb (polykl.)	Hedbom <i>et al.</i> , 1992	1:1000	1:1000
<i>c-myc</i> (A-14) sc-789	rb (polykl.)	Santa Cruz Biotech	1:1000	1:1000
<i>c-myc</i> (9E10) sc-40	m (monokl.)	Santa Cruz Biotech	1:1000	1:1000
Giantin	rb (polykl.)	Covance Research	n.v.	1:1000
Golgi 58K	m (monokl.)	Sigma-Aldrich	n.v.	1:1000
his ₆	m (polykl.)	Qiagen	1:400	1:400
PDI	m (monokl.)	Stressgen Bioreagents	n.v.	1:1000

(WB: Western Blot; IF: Immunofluoreszenz; rb: *rabbit*; m: *mouse*; monokl.: monoklonal; polykl.: polyklonal; n.v.: nicht verwendet)

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper und ihre optimale Arbeitskonzentration.

Spezifität	Typ	Referenz	WB	IF
Kaninchen IgG	HRP-konjugiert	Dako	1:1000	n.v.
Maus IgG	HRP-konjugiert	Dako	1:1000	n.v.
Kaninchen IgG	Alexa 488-konjugiert	Molecular Probes	n.v.	1:1000
Maus IgG	Cy3-konjugiert	Jackson Laboratories	n.v.	1:500

Molekularbiologische Arbeiten

Bakterienkulturen

Für Klonierungsarbeiten und Transformationen wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm DH5 α eingesetzt (Invitrogen). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte je nach Bedarf in autoklaviertem Luria-Bertani (LB) Medium oder auf LB Agar (Gibco BRL). Zur Selektion wurde Ampicillin in einer Endkonzentration (f.c.) von 50 μ g/ml in Medien und Agar zugefügt. Flüssigkulturen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 Umdrehungen pro Minute gehalten. Auf LB-Agar-Kulturplatten ausgestrichene Bakterien wurden bei 37 °C im Brutschrank (Hereaus, Typ B5050 E) inkubiert. Mittelfristig konnten bewachsene Platten bei 4 °C gelagert werden. Bakterien aus Flüssigkulturen wurden zur Lagerung zentrifugiert (4000 \times g für 5 min) und das Pellet bei -20 °C eingefroren.

Die Bakterien wurden hauptsächlich zur Präparation von Plasmid DNA verwendet, die die Grundlage für die im folgenden beschriebenen Arbeiten bildet. Zur Herstellung geringer DNA-Mengen wurden 5 ml Kulturen transformierter Bakterien mit Hilfe des *Nucleo Spin Plasmid Kits* (Machery Nagel) verwendet. Größere Mengen DNA wurden aus 100 ml Kulturen gewonnen, die mit dem *Nucleobond AX 100 Kit* (Machery Nagel) präpariert wurden.

Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden 5 ml LB-Medium mit einem Abstrich tiefgefrorener DH5 α -Bakterien angeimpft und über Nacht (ÜN) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde durch fotometrische Messungen bei 600 nm überwacht und bei Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,4 durch 15-minütiges Kühlen auf Eis gestoppt. Nach Zentrifugation (1200 \times g, 15 min, 4 °C) wurde das Pellet in 33 ml steriler RF I-Lösung resuspendiert und für 30 min gekühlt. Es folgte eine weitere Zentrifugation und das Aufnehmen der Bakterien in 8 ml steriler RF II-Lösung. Nachdem die Bakterien weitere 15 min auf Eis inkubierten, wurden sie zu 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und schließlich bei -80 °C gelagert.

RF I (pH 5,8)

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂

30 mM Kaliumacetat

10 mM CaCl₂

RF II (pH 6,8)

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15 % Glycerin

Transformation von Bakterien

Es wurden 100 μ l kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 45 s bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzestress ausgesetzt, um für 2 min auf Eis zu ruhen. Eine Regeneration erfolgte für 1 h bei 37 °C in 1 ml LB-Medium. Dann wurden 30 bzw. 100 μ l dieses Ansatzes auf ampicillinhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Von den gewachsenen Kolonien wurden 5 ml Flüssigkulturen angesetzt, die für DNA-Präparationen benutzt wurden.

Expressionsvektor und cDNA

Ein Großteil, der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, lag entweder schon im Zentrum für Biochemie vor oder wurde im Verlauf der vorangehenden Diplomarbeit hergestellt. Die für Wildtyp COMP sowie die mutierten Varianten kodierende cDNA wurden in den episomalen Expressionsvektor pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.*, 1997), einem Derivat der pCEP3-Vektors (Invitrogen), kloniert. Die cDNA für Wildtyp COMP stammt aus der Ratte (Thur *et al.*, 2001). Basierend auf diesem Klon wurden mittels *site-directed mutagenesis* die mutierten Varianten erzeugt. Die cDNA beinhaltet das BM-40 Signalpeptid sowie einen *tag*, welcher aus einem Hexahistidinmotif, dem *myc*-Epitop und einer Faktor X Proteaseschnittstelle besteht. Schnittstellen für die Endonukleasen HindIII bzw. NheI und NotI (New England Biolabs) flankieren den rekombinanten DNA-Abschnitt. Zur Untersuchung des Einflusses des Signalpeptids wurde der pcDNA6/V5 Vektor verwendet.

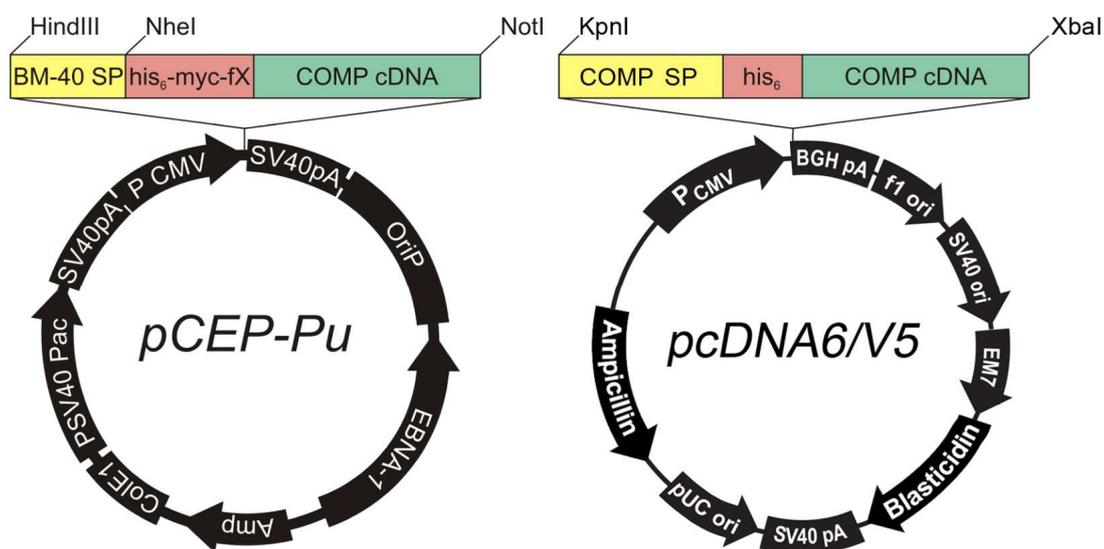


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pCEP-Pu und pcDNA6/V5. Der Balken stellt das hineinklonierte Insert dar. Die jeweiligen Signalpeptide sind gelb hinterlegt. Der *tag*, bestehend aus dem *his*₆-*myc*-*fX* bzw. nur einer *his*₆-Sequenz Motiv ist rötlich hinterlegt. Das grüne Kästchen symbolisiert die COMP cDNA, wobei die Boxen nicht die proportionalen Verhältnisse der einzelnen Sequenzen darstellen.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte eines Restriktionsverdau wurden per Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die hier verwendeten Gele hatten einen Agarose-Anteil (Seakam LE Agarose von BMA) zwischen 0,7 und 1 % und wurden mit TAE-Puffer angesetzt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurden 30 µg Ethidiumbromid pro 100 ml Gel hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde bei 70-100 V durchgeführt. Die Proben wurden in DNA Puffer gelöst.

10x DNA Puffer

10 mM Tris

50 mM EDTA

80 % Glycerin

0,1 % Bromphenolblau

0,1 % Xylencyanol

TAE (pH 7,4)

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäurelösungen wurde hauptsächlich fotometrisch durchgeführt, da zeitgleich auch deren Reinheit gemessen werden kann. Aus der Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ergab sich wie folgt die Konzentration:

$$\text{dsDNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{280}) \times 100 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das Verhältnis der optischen Dichten von 260 nm zu 280 nm ergibt die Reinheit der DNA und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Bei geringen DNA-Mengen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid zur Konzentrationsabschätzung herangezogen. Die Nachweisgrenze liegt hier bei ca. 5 ng pro Bande. Ein DNA-Größenmarker mit bekannten Konzentrationen diente hierbei als Referenz.

DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung der cDNA wurden nur die Reaktionsansätze mit der gewünschten DNA hergestellt. Die Analyse wurde vom Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) mit einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer Applied Biosystems) mit der *Taq FS BigDye-Terminator cycle sequencing* Methode durchgeführt.

Allg. Reaktionsansatz

100-500 ng DNA

3-10 pmol *primer*

ad 6 µl H₂O

Adenovirale Konstrukte

Die cDNA für Wildtyp-COMP und ihre Varianten wurden mit dem AdEasy-Vektor Kit (Qbiogene) in ein virales Expressionssystem gebracht. Die COMP-cDNA wurde mit KpnI und XhoI oder NheI und NotI in den Transfektor pShuttleCMV umklontiert, welcher anschließend mit PmeI linearisiert wurde. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung wurde mit der Phenol/Chloroform-Methode extrahiert. Der pAdEasy-1 Vektor wurde mittels Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation aufgereinigt und mit dem linearisierten pShuttleCMV in kompetente BJ1583 Bakterien (Qbiogene) cotransformiert, sodass die homologe Rekombination stattfinden konnte. Die so gewonnenen Klone wurden durch einen BamHI-Restriktionsverdau daraufhin geprüft. Die DNA positiver Klone wurde in ultrakompetenten XL Gold Bakterien (Stratagene) vervielfältigt. Kontrollverdaue mit verschiedenen Restriktionsenzymen belegten die Aufnahme und Stabilität der rekombinanten DNA. Diese wurde erneut mit PacI linearisiert und mit Phenol/Chloroform gereinigt, sodass QBI-293 Zellen (Qbiogene) mit FuGene6 (Roche) transfiziert werden konnten (hier: 5 µg DNA mit 15 µl FuGene6 pro $1,5 \times 10^9$ Zellen). Die nun virusproduzierenden Zellen wurden, nachdem sie begannen sich von ihren Zellkulturschalen zu lösen, wiederholt aufgeschlossen und zur Infektion neuer QBI-293 Zellen verwendet. So konnte eine Viruszahl von 10^{12} Partikeln erreicht werden. Diese wurden mit Hilfe der Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation aufgereinigt und bei -80 °C gelagert. Durch den Plaque-Test und die *tissue culture infectious dose 50* Methode (TCID₅₀) wurde der Virustiter ermittelt. Ein Southern Blot (nach Kreppel *et al.*, 2002) bestätigte mit guter Übereinstimmung die Titerangabe.

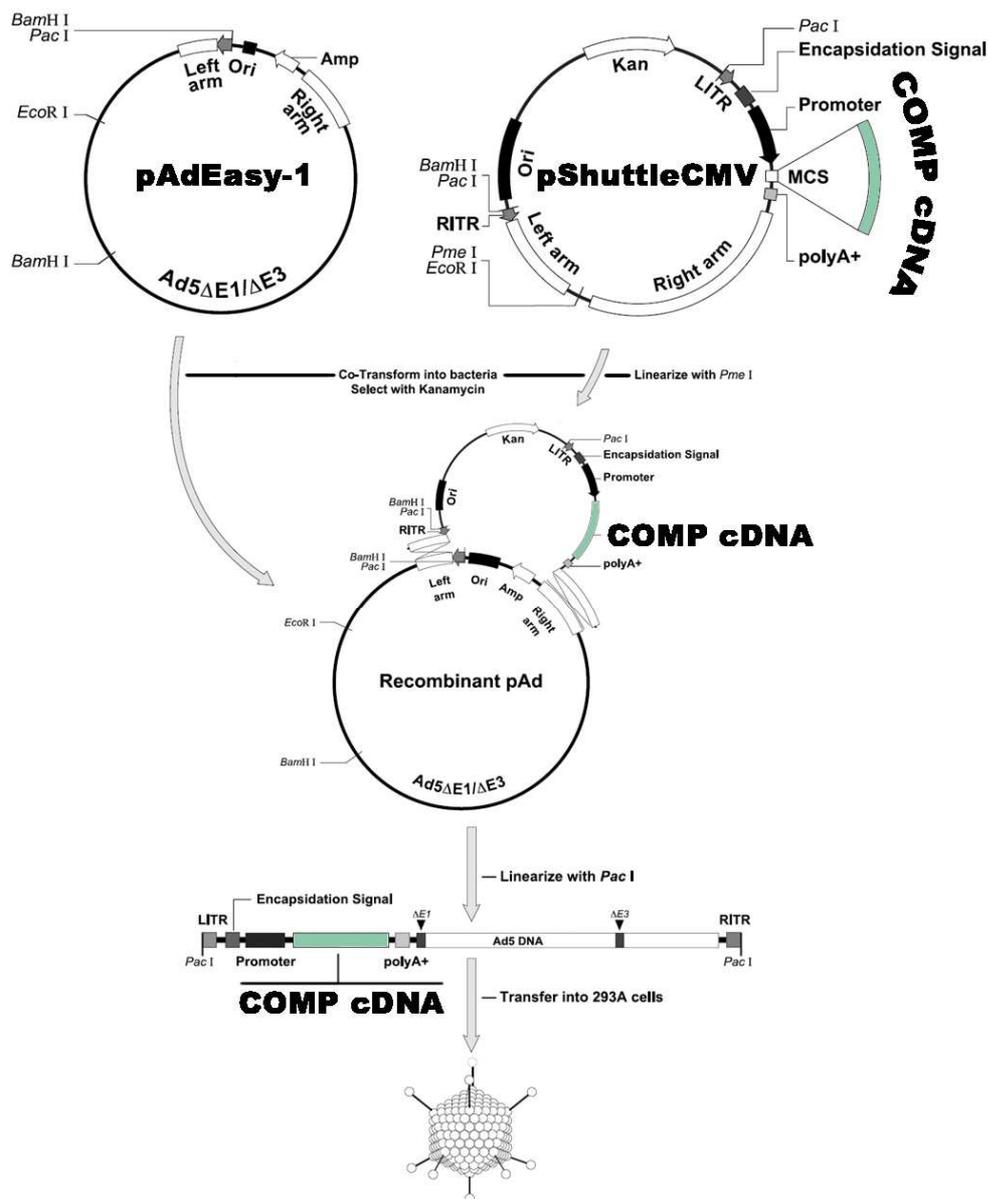


Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Integration der COMP cDNA in den Adenovirus
 Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise findet sich in obigem Text (modifiziert nach AdEasy Vector Systems, Application Manual, QBiogene).

Zur Transduktion von Chondrocyten wurden $\sim 8 \times 10^9$ frisch isolierte Zellen in 500 μl serumfreiem Medium aufgenommen und mit der gewählten Virusdosis von 5, 20 oder 100 MOI (*multiplicity of infections*) für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und, falls nicht anders angegeben, für die Herstellung von Alginatkulturen verwendet (s.u.).

Zellkultursysteme

Nährmedien und Kultivierung

Sowohl QBI-293 als auch EBNA-293 Zellen wurden in Dulbecco's MEM Nut Mix F-12 Medium (DMEM, GibcoBRL) ohne Glutamin kultiviert. Es wurde jeweils frisch mit 1 % Glutamin, 1 % Penicillin-Streptomycin (beides GibcoBRL) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom KG) angereichert. Das Nährmedium für Chondrocyten wurde zusätzlich mit 60 μ M Ascorbat und 112 μ M Ascorbat-2-Phosphat versetzt. Die phosphorylierte Form gewährt eine kontinuierliche Versorgung über drei Tage hinweg. Das nicht-phosphorylierte Ascorbat ist in wässriger Lösung nicht lang genug stabil. Standardmäßig erfolgte alle drei Tage eine Erneuerung des Nährmediums. Die Zellen wurden bei 37 °C in wassergesättigter, 5 % CO₂-enthaltender Atmosphäre in 10 cm Zellkulturschalen (Becton-Dickinson) gehalten. Zur Passagierung wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA in PBS (Gibco-BRL) vom Plattenboden gelöst und in gewünschter Zelldichte ausplattiert.

Lagerung

EBNA-293 Zellen wurden in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert. Dafür wurden sie mit Trypsin-EDTA von den Kulturschalen gelöst, abzentrifugiert (5 min bei 180 × g) und das Pellet in Einfriermedium, welches 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, resuspendiert und in Einfriergefäße (Cryo.S, Greiner) überführt. Zunächst kühlte man die Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Cryo Container, Nalgene) langsam auf -80 °C herunter, um sie anschließend in den flüssigen Stickstoff zu überführen. Erneutes Auftauen erfolgte rasch im Wasserbad (37 °C). Durch Zugabe frischen Nährmediums, Zentrifugation mit anschließender Resuspendierung im Nährmedium wurde das DMSO herausverdünnt und die Zellen konnten ausplattiert werden.

Isolierung primärer boviner Chondrocyten

Frische Rindervorderbeine wurden am Tag der Isolierung von der Fleischversorgung Köln GmbH (Boecker-Schauff KG) bezogen. Die humeroscapulare Knorpeloberfläche wurde freigelegt und mit 70 %igem Ethanol gespült. Mit einem Skalpell wurde der Knorpel vom Knochen geschabt und für 90 min in einer 0,4 %igen Pronase-Lösung (Calbiochem) in einem autoklavierten Gefäß (Celstir, Wheaton Science Products) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre) inkubiert. Pro Gramm isolierten Knorpels wurden 12 ml Verdau-Lösung (DMEM, 5 % FCS, Penicillin-Streptomycin und Glutamin s.o.) hergestellt. Die Lösung wurde nach dreimaligem Waschen mit gekühltem Medium durch eine 0,025 %ige Collagenase P Lösung

(Roche) ersetzt und für 15 h inkubiert, diese enthielt zusätzlich das Antibiotikum Gentamicin (f.c.: 0,5 µg/ml). Die resultierende Knorpelsuspension wurde durch Zentrifugation (5 min bei 180 × g, RT) und anschließendem Sieben durch 100 µm bzw. 40 µm Zellsiebe (Falcon) von unverdaulichem Material befreit. Zwischenzeitlich wurde die Zellsuspension mehrmals zentrifugiert und in frischem Nährmedium resuspendiert, um die Collagenase zu entfernen. Die gewonnene Chondrocytenzahl wurde durch eine Neubauer-Kammer oder einen Z2 Coulter Counter (Beckman) ermittelt. Anschließend konnten die Zellen in Kultur genommen werden.

Isolierung primärer muriner Chondrocyten

Hier dienten Sterni und Rippenbögen neugeborener Mäuse (C57Bl/6 Stamm) als Quelle. Die Rippen wurden auf halben Weg zur Wirbelsäule durchtrennt und mit dem Sternum entnommen, von Geweberesten befreit und in sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in eine 10 ml Collagenase P Lösung (1 mg/ml) überführt. Nach einer 16-stündigen Inkubation im Brutschrank konnte die Zellsuspension zentrifugiert werden und nach den Sieb- und Waschrufen sowie der Zellzahlbestimmung ausplattiert werden.

Transfektion von Zellen

Die Transfektion von EBNA-283 Zellen und Chondrocyten erfolgte unter Verwendung von FuGene6 (Roche). Die Zellkulturschalen waren zum Zeitpunkt der Transfektion optimalerweise zu 70 % konfluent bewachsen. 3 µl FuGene6 wurden mit 97 µl serumfreien DMEM-Mediums verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden pro Transfektionsansatz 1 µg Plasmid DNA in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben, um sie später für 15 min (RT) mit der verdünnten FuGene6 Lösung zu inkubieren. Anschließend konnte die DNA-FuGene6 Lösung zu den Zellen gegeben werden. Nach 24 h wurden die transfizierten Zellen mit Hilfe von Puromycin (1 µg/ml) selektioniert, was nur bei EBNA-293 Zellen angewendet wurde, da nur sie mittelfristig in Kultur gehalten wurden. Für die Transfektion in *Lab Tek chamber slides* (Nalge Nunc Int.) wurde der gleiche Ansatz hergestellt, die ~100 µl aber auf acht Kammern verteilt.

Ernte des Zellkulturüberstands und des Zellrasens

Für die Untersuchung des Sekretionsverhaltens der unterschiedlichen COMP-Varianten wurden transfizierte Chondrocyten in 6-Loch-Schalen kultiviert. Nach drei bzw. sechs Tagen wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C tiefgefroren. Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und mit 200 µl 2x SDS-PAGE Probenpuffer überschichtet, mit

einem *cell scraper* (Greiner) geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Behandlung mit Ultraschall wurde das Zelllysat direkt analysiert oder bei -20 °C weggefroren.

Die Analyse beider Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE (s.u.). Durch die unterschiedlichen Ausgangsvolumina von Zellüberstand (2 ml) und Zelllysat (0,2 ml) war es nötig geworden äquivalente Mengen für die SDS-PAGE einzusetzen. Um trotzdem eine größtmögliche Menge zu untersuchen, wurde der Überstand mittels Trichloressigsäure-Fällung auf ein Zehntel des Ausgangsvolumen eingeeengt.

Immunfluoreszenzfärbung von Chondrocyten

Die intrazelluläre Verteilung der unterschiedlichen COMP-Varianten wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert. Frisch isolierte Zellen wurden dazu auf *Lab Tek chamber slides* ausplattiert, wahlweise aus Glas oder *Permanox*-Kunststoff. Nach drei- bis siebentägiger Anhaftungsphase hatten die Zellen eine Konfluenz von 50-70 % erreicht. Sie wurden dann, wie oben beschrieben, transfiziert und drei weitere Tage später mit 1 % Paraformaldehyd in PBS mit 0,2 % Triton X100 fixiert und permeabilisiert. Dem dreimaligen Waschen mit PBS folgte die Blockierung der freien Objektträgeroberfläche mit 1 % Ziegenserum (NGS) in PBS für mindestens eine Stunde. Dann folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in optimaler Konzentration für mindestens eine Stunde. Nach Waschen mit PBS wurde für eine Stunde mit den sekundären fluoreszierenden Antikörpern inkubiert. Es folgte eine Kernfärbung mit Bisbenzimid (1 µg/ml) für zwei Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser wurden die Chondrocyten mit Eindeckmedium (*Mounting Medium*, Dako) eingedeckelt und unter dem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) analysiert. Aufnahmen dieser Zellen wurden mit der digitalen Kamera *Spot RT Slider* (Diagnostic Instruments) unter Zuhilfenahme der Steuerungssoftware *Metamorph* (Universal Imaging Corp.) gemacht. Die Bilder wurden mit Adobe Photoshop nachkoloriert.

Alginatkulturen von Chondrocyten

Die 3D Struktur einer Alginatkultur hindert Chondrocyten an der Dedifferenzierung. Über Nacht wurden 1,2 g Alginat (Keltone LV, NutraSweet Kelco Co.) in einer 150 mM NaCl gelöst und sterilfiltriert. Transfizierte Chondrocyten (4×10^6 Zellen pro ml Alginat) wurden von ihren Platten trypsiniert und in steriler Alginatlösung aufgenommen. Diese wurde luftblasenfrei in eine Spritze mit Kanüle (0,8 mm) gefüllt und tropfenweise in eine autoklavierte CaCl₂-Lösung (100 mM) gegeben und dabei leicht geschwenkt. Die entstandenen Kugeln sollten nicht länger als 10 min polymerisieren. Die CaCl₂-Lösung wird dann durch 150 mM NaCl ersetzt, wonach die Kugeln mit serumfreien Medium gewaschen werden. Schlußendlich wird dieses durch Standardkulturmedium ersetzt. Eine Kugel enthielt dann etwa 6×10^4 Zellen.

Immunhistochemie von Alginatkulturen

Um die Verteilung des rekombinanten COMP in Alginatkulturen lichtmikroskopisch zu untersuchen wurden das exprimierte Protein immunhistochemisch nachgewiesen. Die Alginatkulturen wurden zu Anfang für 15-30 min in 100 mM BaCl₂ inkubiert, um die Stabilität der Alginatkugeln zu erhöhen (Mok *et al.*, 1994). Alle TBS haltigen Lösung enthielten ebenfalls 5 mM CaCl₂ (TBS-Ca). Folgende Tabelle beschreibt die hier durchgeführte Prozedur, wobei die AEC-Färbung (3-Amino-9-ethylcarbazol) für Peroxidaseaktivität nach Herstellerangaben (Sigma) durchgeführt wurde.

Tabelle 3: Herstellung von Proben aus Alginatkulturen für immunhistochemische Analysen.

Fixierung	
1 mM BaCl ₂	30 min
4 %iges Paraformaldehyd in TBS-Ca, pH 7,4	2 h
TBS-Ca	3x 1 h
Entwässerung	
50 % Ethanol in TBS-Ca	1 h
75 % Ethanol in TBS-Ca	1 h
96 % Ethanol in TBS-Ca	1h
100 % Ethanol	2x 1 h
Xylol / Ethanol (1:2)	1 h
Xylol	über Nacht
Xylol	1 h
Einbettung	
Paraplast plus (Sherwood Medical)	2x 1 h bei 60 °C
Paraplast plus	über Nacht bei 60 °C
Überführung in Einbettungsgefäßen und Kühlen	mehere Stunden bei 4 °C
Schneiden	
10 µm Schnitte mittels Rotationsmikrotom (Mikrom 355S)	

Entparaffinierung und Wässerung	
Xylol	2x 5 min
Isopropanol	2x 5 min
96 % Ethanol	2 min
90 % Ethanol in TBS-Ca	2 min
75 % Ethanol in TBS-Ca	2 min
50 % Ethanol in TBS-Ca	2 min
30 % Ethanol in TBS-Ca	2 min
TBS-Ca	3x 5 min
Färbung	
1 % H ₂ O ₂ in Methanol (inhibiert endogene Peroxidasen)	20 min
2 % H ₂ O ₂ in Methanol	20 min
TBS-Ca	2x 5 min
40 mU Chondroitinase ABC (Fluka), 1 % testikuläre Hyaluronidase (Sigma), 0,01 % BSA in TBS-Ca	1 h
TBS-Ca	3x 5 min
1 % BSA in TBS-Ca (Blockieren unspez. Bindestellen)	1 h
Primärantikörper in TBS-Ca mit 1 % BSA	1 h
TBS-Ca	3x 5 min
HRP-konjugierter Sekundärantikörper in TBS-Ca mit 1 % BSA	1 h
TBS-Ca	3x 5 min
AEC-Färbung (unter ständiger visueller Kontrolle)	15-30 min
TBS-Ca (Abstoppen der Reaktion)	3x 5 min

Schlussendlich wurden die Schnitte mit Wasser gespült, mit Kaisers Glycingelatine eingedeckelt und analysiert.

Elektronenmikroskopie

Um ultrastrukturelle Veränderungen beobachten zu können, wurden Chondrocyten aus Alginatkulturen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Alginatkulturen wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen (3-12 Wochen) fixiert. Folgende Tabelle fasst die Prozedur zur Einbettung in Araldit zusammen:

Tabelle 4: Herstellung von Araldit-eingebetteten Proben.

Fixierung	
3 % Paraformaldehyd, 0,1 % Glutaraldehyd, 3 mM CaCl ₂ , 0,1 M Natriumcacodylat (Caco), pH 7,4	über Nacht
0,1 M Caco	10 min
1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Caco	1,5 h bei 4 °C
Einbettung	
30 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
50 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
70 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
1,5 % Uranylacetat (Merck) in 70 % Ethanol	über Nacht bei 4 °C
70 % Ethanol	2x 15-30 min bei 4 °C
90 % Ethanol	15-30 min bei 4 °C
100 % Ethanol	3x 15-30 min bei 4 °C
Propylenoxid (Merck) / Ethanol (1:2)	15-30 min bei 4 °C
Propylenoxid	15-30 min bei 4 °C
Araldit CY212 (Serva) / Propylenoxid (1:2)	2-12 h bei 4 °C
Propylenoxid / Araldit CY212 (1:4)	4-24 h bei 4 °C
Araldit CY212, Härtungsmittel HY964, Beschleuniger (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol))	2 h bei 40 °C
Überführung in BEEM-Kapseln (Roth)	
vorläufige Polymerisierung	12 h bei 45 °C
vollständige Polymerisierung	48 h bei 60 °C

Mit einem Leica Ultracut UCT Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte (70 nm) angefertigt und auf Formvar-beschichtete Kupfer-Netze übertragen. Die Präparate wurden mit wässrigem 1,5 %igen Uranylacetat (20 min) und 0,1 % Bleicitrat (2 min, Dunkelheit) kontrastiert (Reynolds, 1963) und im Transmissionsmikroskop Leo 902 (Zeiss) bei einer Spannung von 80 kV analysiert. Die Präparate wurden mit dem digitalen *Megaview Kamera* System von Soft Imaging System fotografiert.

Für den immunologischen Nachweis von COMP wurde eine andere Einbettungsmethode verwendet. Es eignet sich hierfür die LR-Gold Einbettung (Fluka):

Tabelle 5: Herstellung von LR-Gold-eingebetteten Proben.

Fixierung	
2 % Glutaraldehyd, 0,5 % Paraformaldehyd, 3 mM CaCl ₂ , 0,1 M Natriumcacodylat (Caco), pH 7,4	über Nacht
0,1 M Caco	10 min
10 mM NH ₄ Cl in 0,1 M Caco	45 min
30 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
50 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
70 % Ethanol in 0,1 M Caco	15-30 min bei 4 °C
Einbettung	
LR-Gold / Ethanol (1:3)	30 min bei 4 °C
LR-Gold / Ethanol (1:2)	1 h bei 4 °C
Ethanol / LR-Gold (1:3)	1 h bei 4 °C
LR-Gold	1 h bei 4 °C
LR-Gold, 0,8 % Benzil	über Nacht bei -20 °C
Überführung in BEEM-Kapseln	
LR-Gold, 0,8 % Benzil (Fluka), luftblasenfrei!	24 h bei -25 °C unter UV-Licht

Die Schnitte erfolgten wie oben beschrieben. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Gold-gekoppelten *myc*-Antikörper. Die Kopplung erfolgte wie folgt. Eine 0,01 %ige Tetrachlorgoldsäure wurde in einer wassergekühlten Destillationsanlage gekocht. 1,2 ml einer 1 %igen Natriumcitratlösung wurden zügig hinzugegeben, sodass sich die Lösung kirschrot verfärbte. War dies nicht der Fall, so musste die Lösung verworfen werden. Die Lösung wurde für weitere 5 min gekocht und dann zügig unter fließendem Wasser gekühlt. 25 µl des zu koppelnden Antikörpers wurden 1:10 mit destilliertem Wasser (pH 9) verdünnt. Parallel wurde die Tetrachlorgoldlösung durch schrittweise Zugabe von 0,2 M K₂CO₃ auf pH 9 gebracht. Um das optimale Verhältnis zwischen Antikörperlösung und Tetrachlorgoldsäurelösung zu ermitteln wurde auf eine Mikrotiterplatte eine Verdünnungsreihe aufgetragen. Dazu wurden zu 100 µl Tetrachlorgoldsäurelösung jeweils 1 bis 12 µl verdünnter Antikörper gegeben und für 2 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 10 %igen NaCl-Lösung zugegeben und der farbliche Umschlag fotometrisch bei 405 nm bemessen. Die optimale Verdünnung war erreicht, wenn das Fotometer (Dynatech MR 500) das untere Detektionslimit erreichte. Für die eigentliche Immunreaktion auf dem Präparat wurde der Antikörper weiter in TBS verdünnt.

Die finale Verdünnung bei dieser Arbeit betrug 1:100. Die Präparate inkubierten für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tropfen Antikörperlösung und wurden dann mit Wasser gespült. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und die Schnitte im Leo 902 betrachtet.

Ölrotfärbung

Ölrot O ist ein Farbstoff zur Darstellung von Lipiden. Sie wurde in dieser Arbeit angewendet, um intrazelluläre Strukturen, die im Licht- und Elektronenmikroskop in transfizierten Chondrocyten zu beobachten waren, als Lipidtropfen zu identifizieren. Es wurden transfizierte Chondrocyten unter üblichen Bedingungen in 6-Loch-Schalen kultiviert und nach drei Tagen gefärbt. Dazu wurde eine 0,2 %ige Ölrot O Certistain (Merck) Lösung in 60 % Isopropanol kurz aufgekocht und filtriert. Die Zellen wurden für 20 min in die Färbelösung getaucht und dann kurz in Isopropanol überführt. Anschließend wird mit Wasser die restliche Farbe weggespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung (Merck) für 5 min. Nach erneutem Spülen wird unter fließendem Wasser gebläut und die Zellen unter Kaisers Glyceringelantine (Merck) eingedeckelt.

Bestimmung der Zellvitalität

Die Vitalität der Zellen wurde gemessen, indem dem Zellmedium ein Tetrazoliumsalz (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid (XTT)) zugesetzt. Dieses Salz wird von den Zellen zu einem Formazanprodukt umgesetzt, welches wasserlöslich ist und fotometrisch nachgewiesen werden kann. Die Farbintensität ist proportional zu metabolisch aktiven Zellen setzen. Die Reduktion des XTT verbesserte sich durch die Zugabe von Phenazinmethosulphat (PMS). Für den Versuch stellte man zwei Stammlösungen her:

- a) 1 mg/ml XTT in vorgewärmten DMEM-F12 Medium (37 °C).
- b) 5 mM PMS in PBS.

Zu 5 ml der XTT-Lösung wurden dann 25 µl der PMS-Lösung gegeben. Die Vitalität der Zellen wurde drei und sechs Tage nach Transfektion in 6-Loch-Titerplatten bestimmt. Das Kulturmedium wurde durch die PMS-XTT-Lösung ersetzt und nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurde die Extinktion des Zellkulturüberstands bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe eines Fotometers gemessen.

Bestimmung des nekrotischen Zelltods

Bei der Nekrose wird die Integrität der Plasmamembran der Zellen zerstört, wodurch die Lactatdehydrogenase (LDH) ins umgebende Medium gelangt. Das Enzymmenge kann durch gekoppelte enzymatisches Tests bestimmt werden. Hier wurde zur Bestimmung des nekrotischen Zelltods wurde der *CytoTox-ONE assay* (Promega) verwendet. Er beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Resazurin zu Resorufin, welches fluorimetrisch nachgewiesen werden kann. Der Test wurde hier auf Zellkulturmedien transfizierter Chondrocyten nach Herstellerangaben angewandt.

Zellanhaftungsexperimente

Um das Adhäsions-Verhalten von Chondrocyten auf COMP-Varianten zu untersuchen, wurden Mikrotiterplatten mit Proteinlösungen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente Fibronectin (Chemicon) und als Negativkontrolle BSA. Jeweils 100 µl COMP-Lösung wurden in einer seriellen 1:2-Verdünnung beginnend mit 10 µg/ml in die Mikrotiterplatten pipettiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA für drei Stunden bei 4 °C blockiert. Anschließend wurden Chondrocyten, die zuvor drei Tage in Kultur gehalten wurden, mittels Trypsin-EDTA von ihrer Schale gelöst, abzentrifugiert und in serumfreiem Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie mit dem *Coulter Counter* gezählt und es wurden jeweils 5×10^4 Zellen pro Mikrotitervertiefung ausplattiert. Die Inkubationszeit betrug bis zu 20 h (Di Cesare *et al.*, 1994). Dann wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt und die Platte vorsichtig mit PBS gewaschen. Die anhaftenden Zellen wurden mit 1 % Glutaraldehyd fixiert und mit 0,1 % Cristal Violet für mindestens 30 min gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit Wasser gewaschen. Nach Zugabe von 50 µl 0,2 %igem Triton X100 wurde die Mikrotiterplatte in einem ELISA-Fotometer (Labssystem Multiskan MS) bei 562 nm ausgelesen.

TUNEL assay

Zur Bestimmung der Apoptose wurde das *TUNEL Label Kit* (Roche) benutzt. Er beruht auf der Markierung von DNA-Strangbrüchen mittels Fluorescein-dUTP. Die zu untersuchenden Chondrocyten wurden auf *Lab Tek chamber slides* ausplattiert. Der Test wurde hier sechs Tage nach der Transduktion der Chondrocyten nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll für adhärenente Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen über Nacht mit 2 mM Natriumnitroprussid inkubiert. Der TUNEL assay wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgewertet.

Proteinchemische Arbeiten

Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatografie

Die Aufreinigung des rekombinanten COMP erfolgte über eine Nickel-NTA Superflow Matrix (Qiagen), an die der his₆-myc-Tag bindet. Dazu wurden transfizierte EBNA-293 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und mittels Puromycin-haltigem Standardmedium selektioniert. Sobald die Platten konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen auf *Tripleflasks* (Nalge Nunc) verteilt und bis zu 50-70 %iger Konfluenz kultiviert. Danach ersetzte man das Medium durch serumfreies, da vor allem Serumalbumin die spätere Aufreinigung behindert. Alle drei Tage wurde das Kulturmedium durch neues ersetzt. Über eine Dauer von bis zu zwei Wochen der Überstand geerntet werden bis die Zellen auf Grund des Serum-Entzugs abstarben. Der Überstand wurde zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen und mit den Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, f.c.: 500 µM) und N'-Ethylmaleinimid (NEM, f.c.: 500 µM) versetzt. Anschließendes Filtern entfernte ausgefallenes PMSF. Bis zur Aufreinigungsprozedur wurden die Überstände eingefroren. Nach Angaben des Herstellers wurde der Überstand mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min durch eine XK16 Säule (Pharmacia) gepumpt, die ca. 10 ml der Nickel-NTA Matrix enthielt. Zur Equilibrierung und als Laufpuffer wurde ein Nidrigsalzpuffer gewählt. Die Puffer wurden vor der Benutzung sterilfiltriert und entgast. Die Elution erfolgte graduell mit Hilfe des Pharmacia-*Highload*-Systems der LKB-Serie. Er wurden Fraktionen zu je 5 ml gesammelt und per SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Laufpuffer (pH 8,0)

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

500 µM PMSF

500 µM NEM

Elutionspuffer (pH 8,0)

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

500 µM PMSF

500 µM NEM

250 mM Imidazol

Gelfiltration

Die Pseudo-Oligomere, die durch proteolytische Aktivität in der Zellkultur entstehen, müssen aus den aufgereinigten Fraktionen entfernt werden, um eine möglichst homogene Proteinlösung zu erhalten. Die Gelfiltration sollte dies erfüllen und degradierte Produkte heraussieben. Vereinigte Fraktionen der Affinitätschromatografie wurden mittels Stickstoffüberdruck in Amicon Ultra-15 Zellen (Millipore) oder Zentrifugationskonzentratoren (Vivaspin, Sartorius) auf ein Volumen eingeeengt, welches maximal 10 % des Säulenvolumens der Gelfiltrationssäule entsprach. Die eingeeengten Fraktionen wurden auf die Gelmatrix (Superose 6) geladen und anschließend Laufpuffer mit 0,5 ml/min über das Material gepumpt. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt und mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western Blot analysiert.

Laufpuffer (pH 8,6)

50 mM Tris

50 mM NaCl

500 µM PMSF

500 µM NEM

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen das *BCA* (Bicinchoninsäure) *protein assay kit* von Perbio, das zum Einsatz kam, wenn genügend Proteinlösung zur Verfügung stand, weil dieser Test pro Ansatz 25 µl Probenlösung erfordert. Wenn nur geringe Volumina (< 100 µl) zur Verfügung standen, wurde auf die Methode nach Bradford zurückgegriffen. Da diese Methode (> 100 µg/ml) nicht so sensitiv ist wie der *BCA* Test, diente sie nur der Kontrolle von Proben mit zuvor bereits gemessener Konzentration. Dazu verdünnte man die Bradford-Stammlösung 1 : 5 in Wasser und gab im Verhältnis 50 : 1 Proteinlösung hinzu (hier: 200 µl Bradford-Lösung + 4 µl Proteinlösung). Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz fotometrisch bei 595 nm gemessen und mit einer BSA-Standardreihe verglichen.

Bradford-Stammlösung (50 ml)

2,5 ml Ethanol

25 mg Coomassie Brilliant Blue G250

25 ml H₃PO₄ (konz.)

Dialyse

Für bestimmte Experimente ist es unablässig die Proteine in geeigneten Puffern vorliegen zu haben. Die Dialyse wurde über Nacht bei 4 °C in der *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette* (MWCO: 10 kDa) von Pierce.

Trichloressigsäurefällung

1 ml Proteinlösung wurde mit 10 µl Triton X100 (10 %) und mit 250 µl einer wässrigen 50 %igen Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 15 min bei 15.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen, um Lipide und restliche TCA zu entfernen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen, das Aceton verdampfte und das Proteinpellet konnte in 100 µl 2x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen werden.

Ethanolfällung

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit dem zehnfachen ihres Volumen mit 96 %igem Ethanol gemischt und über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat für 20 min bei 15.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das Aceton abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in 2x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinlösungen wurden gelelektrophoretisch durch Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurde der entsprechende Polyacrylamidgehalt der Gele gewählt. Die Gele hatten entweder einen konstanten Gehalt von Polyacrylamid oder wiesen einen Gradienten auf, der von einem niedrigen bis zu einem hohen Polyacrylamidgehalt verlief. Dadurch wird ein größerer Trennbereich erreicht. Eine 30 %ige Stammlösung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid (National Diagnostics) wurde entsprechend mit PBS und Wasser verdünnt und durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (f.c.: 0,001 %) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, f.c.: 0,001 %) zur Polymerisation gebracht. Unter reduzierenden Bedingungen wurden die Proben für 5 min bei 95 °C inkubiert und mit 0,5 % β-Mercaptoethanol versetzt und in einem konstanten Gel mit 7,5 % Acrylamidanteil aufgetrennt.

Gradientengele wurden bei nicht-reduzierenden Bedingungen genutzt. Durch eine langsame Durchmischung einer 3 %igen und einer 12 %igen Lösung wurde ein solcher Gradient aufgebaut. Die Zusammensetzung der Gellösungen ist unten angegeben.

Die Elektrophorese wurde im *Mighty Small II SE 250 System* (Amersham Pharmacia Biotech) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt.

Zur Kalibrierung wurde unter reduzierenden Bedingungen der *high molecular weight marker* (Roche) und unter nicht-reduzierenden Bedingungen der *low molecular weight marker* (Amersham Pharmacia Biotech) nach Zugabe von Fibronectin verwendet. Die darin enthaltenen Proteine sind unten angegeben.

Sammelgel (pH 6,8)

3 % Polyacrylamid

120 mM Tris

0,1 % SDS

Trenngele (pH 8,8)

3; 7,5 oder 12 % Polyacrylamid

375 mM Tris

0,1 % SDS

2x SDS-PAGE Probenpuffer (pH 6,8)

160 mM Tris

4 % SDS

22,8 % Glycerin

0,08 % Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer (pH 8,3)

25 mM TrisHCl

200 mM Glycin

0,1 % SDS

high molecular weight marker (HMW)

Myosin 200 kDa

β -Galaktosidase 116 kDa

Phosphorylase B 97 kDa

Rinderserumalbumin 66 kDa

Aldolase 39 kDa

low molecular weight marker (LMW)

Fibronectin 500 kDa

Phosphorylase B 97 kDa

Rinderserumalbumin 66 kDa

Ovalalbumin 43 kDa

Carboanhydrase 30 kDa

Trypsininhibitor 20 kDa

α -Lactalbumin 14 kDa

Coomassie-Färbung

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt und im gleichen Schritt fixiert. Gele werden dazu zunächst für 20 bis 30 min in einer Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel solange in der Entfärbelösung inkubiert bis die Proteinbanden deutlich hervortreten. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 500 ng Protein pro Bande. Die Gele wurden in 7 %iger Essigsäure gelagert werden. Falls nach der Färbung Western Blot durchgeführt werden sollte, wurde das Gel für einige Stunden in 2 %iger SDS-Lösung geschwenkt.

Coomassie Färbelösung

50 % Methanol

10 % Essigsäure

0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung

40 % Methanol

10 % Essigsäure

Western Blot und Immunodetektion

Für die immunologische Detektion von Proteinen nach einer SDS-PAGE wurden diese mittels Tankblotverfahren bei konstanter Stromstärke (100 mA ÜN oder 400 mA für 1-2 h) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA45, Schleicher und Schuell) transferiert. Mit einer Ponceau S Lösung (Serva) wurde die Membran anschließend für 5 min bei RT gefärbt und gleichzeitig fixiert. Durch das Abspülen mit Wasser konnten die Proteinbanden sichtbar gemacht werden, wobei die Nachweisgrenze bei ca. 1 µg liegt. Die Positionen des Größenstandards wurden markiert und die Membran fotokopiert, wonach die Ponceaufärbung mit TBS entfernt wurde. Die unspezifische Bindungsstellen wurden für 1 h bei RT mit 5 % Magermilchpulver in TBS (MMP-TBS) abgesättigt. Es folgte für mindestens eine Stunde die Inkubation mit spezifischen Primärantikörpern (s.o.) in MMP-TBS. Durch dreimaliges Waschen für 5 min mit TBS-T 0,1 % wurden nicht gebundene Antikörper entfernt. Dann setzte man den Sekundärantikörper für höchstens eine Stunde ein, gefolgt von dreimaligem Waschen. Der sekundäre Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert, sodass eine Detektion mittels Chemolumineszenz durchführbar war. Die benötigte Substratlösung wurde für 1-2 min auf die Membran gegeben, welche anschließend zwischen zwei Folien in einer Entwicklungskassette fixiert wurde. Ein Röntgenfilm (RX Super, Fujifilm) konnte durch die freigesetzte Strahlung belichtet werden. Die Filme wurden standardmäßig für 10 s und 1 min belichtet und entwickelt (RG II Fujifilm *X-Ray Film Processor*). Je nach Schwärzung der Filme wurden weitere Belichtungen bis zu 45 min durchgeführt.

Blotpuffer (pH 8.5)

50 mM Borsäure

10 % Methanol

MMP-TBS

5 % Magermilchpulver (MMP)

in TBS

TBS-T 0,1 %

TBS mit Zugabe von Tween-20,

hier 0,1 %

Substratlösung

10 ml 100 mM Tris (pH 8,5)

225 µM Coumarinsäure

1 mM Luminol

3 µl H₂O₂**Silberfärbung**

Die Silberfärbung ist eine empfindlichere Methode, deren Nachweisgrenze bei etwa 10 ng pro Bande liegt. Nach Fixierung in Ethanol-Essigsäure Lösung wurde das Gel für 15 min bei RT in Lösung I inkubiert. Der Fixierungsschritt entfiel, wenn das Gel zuvor bereits mit Coomassie gefärbt wurde. Anschließend wässerte man das Gel. Es folgte eine Inkubation mit Lösung II für 15 min bei RT. Die darin enthaltenen Silberionen gehen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten ein. Das Ersetzen der zweiten Lösung durch die Lösung III bewirkt, dass alkalisches Formaldehyd die Silberionen zu elementarem Silber reduziert, was zu einer charakteristischen Braunfärbung führt. Sobald diese einsetzte, wurde Lösung III durch frische ersetzt und bei befriedigender Farbintensität konnte die Reaktion mit Zugabe von 5 %iger Essigsäure gestoppt werden.

Fixierlösung

30 % Ethanol

10 % Essigsäure

Lösung I

30 % Ethanol

4 M Natriumacetat

0,3 % Essigsäure

0,5 % Glutaraldehyd

0,4 mM Na₂S₂O₃ × 5 H₂OLösung II

0,6 mM Silbernitrat

2,5 % Formalinlösung

Lösung III24 mM Na₂CO₃

4 % Formalinlösung

Circular Dichroismus Spektroskopie

Die präzise Analyse von Sekundärstrukturen der Proteine setzt verwertbare Messungen bei niedrigen Wellenlängen voraus. Dazu ist es nötig die Proteine in Puffern vorliegen zu haben, die auch bei solch niedrigen Wellenlängen wenig absorbieren. Die Messungen in dieser Arbeit wurden mit 5 mM Tris-HCl (pH 7,4) durchgeführt. Dieser Puffer hat sich bei den Messungen zwischen 250 und 190 nm bewährt. Grundsätzlich sollten möglichst wenig Fremdstoffen im Puffer vorliegen, nur bei Problemen mit der Löslichkeit von Proteinen kann bis zu 500 mM NaCl zugegeben werden. Der Puffer sollte vor der Dialyse des Proteins sterilfiltriert werden, um kleinste Schwebstoffe zu entfernen. Das Protein musste mindestens in einer Konzentration von 100 µg/ml vorliegen. Die Spektren wurden mit einem Jasco J-715 Spektrometer und einer 1 mm Quarzküvette (Hellma) gemessen. Es wurden zwischen 190 und 250 nm Wellenlänge mit 10 Datenpunkten pro Nanometer aufgezeichnet. Dann wurde der Durchschnitt aus fünf Messungen ermittelt und das Pufferspektrum subtrahiert. Gegebenfalls wurden noch divalente Kationen in Form von CaCl₂ bzw. EDTA vor der Messung zugegeben.

Die spezifische Elliptizität wie folgt aus den Messwerten umgerechnet:

$$\text{spezifische Elliptizität } [\Theta] = \Theta / 10 \times c \times d$$

mit Θ = Messwerte [mdeg]

c = Proteinkonzentration [mg/ml]

d = Schichtdicke der Küvette [mm]

Die spezifische Elliptizität wird in [deg × cm² × dmol⁻¹] angegeben.

Mit Hilfe der CD-spektroskopischen Daten können näherungsweise Sekundärstrukturanteile mittels spezieller Software errechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit geschah die Auswertung mit den frei erhältlichen Programmen Selcon3, und ContinLL und K2D, die gemeinsam unter Dichroweb (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>) abgerufen werden können. Zusätzlich wurden noch Temperatur-Spektren zur Messung der Stabilität der Proteine durchgeführt.

Proteinbindungsversuche nach dem ELISA-Prinzip

Zur Untersuchung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften der rekombinanten Proteine wurden ELISA-ähnliche Versuche durchgeführt. Nicht-collagene Proteine können in TBS verdünnt zur Immobilisierung auf ELISA-Platten (Maxisorb, Nunc) eingesetzt werden. Collagene hingegen wurden mit 3 %iger Essigsäure verdünnt. Die Endkonzentration der zu immobilisierenden Proteine liegt bei 50 µg/ml. Alle verwendeten Lösungen in diesem Versuch enthielten 0,5 mM Zn²⁺. Über Nacht bei 4 °C wurden jeweils 100 µl Lösung pro Vertiefung

eingesetzt. Anschließend wurde drei Mal vorsichtig mit TBS-T 0,05 % gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 5 % MMP-TBS gesättigt (2 h, RT), wonach drei Mal gewaschen wurde. COMP wurde mit einer Konzentration von 0-40 µg/µl in 5 % MMP-TBS für eine Stunde (RT) auf der Platte inkubiert. Dreimaliges Waschen entfernte nichtgebundene Proteine, sodass der spezifische Primärantikörper (1 h, RT, 100 µl pro Vertiefung) die Möglichkeit hatte zu binden. Nachdem ungebundene Antikörper gewaschen wurden, erfolgte die Detektion des Primärantikörpers mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (in 5 % MMP-TBS, 1 h, RT). Es folgten drei Waschschritte mit TBS-T 0,05 % und ein weiterer mit Wasser. Für die Farbreaktion wurden 50 µl einer Substratlösung in die Vertiefungen gegeben und für 20-90 min im Dunkeln inkubiert. Die enzymatische Umsetzung des Substrats konnte an der Blaufärbung erkannt werden. Bei gewünschter Intensität wurde die Reaktion mit 10 %iger Schwefelsäure abgestoppt und die resultierende Gelbfärbung im ELISA-Fotometer bei 450 nm gemessen. Die Versuche wurden jeweils in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Substratlösung

10 ml H₂O

100 mM Natriumacetat / Zitronensäure (pH 6,0)

62,5 µl 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (10 mg/ml in DMSO)

15 µl 3,5 %iges H₂O₂

Collagen-Fibrillogenese

Um den Einfluss von mutiertem COMP auf die Fibrillogenese zu überprüfen, wurde COMP einerseits mit Collagen I andererseits mit einem Gemisch aus Collagen II/XI (8:1) inkubiert. Bei beiden Ansätzen wurden die Proteinlösungen für drei Stunden bei 37 °C fotometrisch bei 313 nm verfolgt. Die Reaktionsansätze umfassten jeweils 200 µl:

- a) 0,4 µg COMP + 36 µg Collagen I (Verhältnis 1:90)
- b) 0,4 µg COMP + 48 µg Collagen II + 6 µg Collagen XI (Verhältnis 1:120:15)

Zur elektronenmikroskopischen Analyse wurden die jeweils 10 µl der Endprodukte obiger Reaktion auf Parafilm pipettiert. Formvar-beschichtete Kupfernetze wurden auf die Tropfen gelegt. Nach fünf Minuten wurden die Netze mit Wasser gespült und für 10 min mit 2 %igem Uranylacetat kontrastiert. Der COMP-Antikörper wurde in 2 % MMP-PBS verdünnt und die Netze für 30 min damit inkubiert. Die Netze wurden anschließend mit einem polyklonalen COMP-Antikörper (aus Kaninchen) für zwei Stunden inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Netze mit einem Gold-gekoppelten Antikörper (18 nm) inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit einem EM 410 Elektronenmikroskop (Phillips) bei 60 kV gemacht.

Ergebnisse

Etablierung eines Zellkulturmodells für die Pathogenese von PSACH und MED

Die Pseudoachondroplasie und die Multiple Epiphysäre Dysplasie sind zwei sehr seltene Knorpelkrankheiten. Für die Erforschung der pathogenen Mechanismen ist daher kaum Patientenmaterial verfügbar.

In dieser Arbeit wurde ein Zellkulturmodell etabliert, in dem die Auswirkungen von verschiedenen mutierten COMP-Varianten auf primäre Chondrocyten analysiert wurden. Zunächst wurde das Rind als Quelle für Knorpelzellen gewählt. Der Vorteil des Rinds besteht im einfachen Zugang großer Mengen von primären Chondrocyten, die aus dem humeroscapularen Gelenkkopf des Vorderbeins von Schlachtrindern gewonnen werden können. Die Zellen wurden mittels enzymatischem Verdau aus ihrer extrazellulären Matrix isoliert und in zwei- bzw. dreidimensionaler Kultur gehalten.

Sekretionsverhalten von Wildtyp- und mutiertem COMP

Um das Sekretionsverhalten der COMP-Varianten zu untersuchen, wurden die Zellen sieben Tage nach ihrer Isolation mit dem Expressionsvektor pCEP-Pu transfiziert. Alle darin enthaltenen COMP-Konstrukte (wt, DY, Δ D, DN und HR) enthielten ein his₆-myc-Motiv, wodurch die Genprodukte von dem endogen produzierten COMP unterschieden werden konnten.

Die Zellkulturüberstände wurden drei Tage nach Transfektion abgenommen und enthaltene Proteine gefällt. Die Zellen wurden durch Zugabe von SDS-PAGE Probenpuffer lysiert, von den Kulturplatten abgeschabt und mit Ultraschall homogenisiert. Die Matrix, die an den Zellen haftete, ist ebenfalls in der Zellfraktion enthalten. Mit diesen Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteine im Gel wurden anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und diese mit einem *myc*-Antikörper inkubiert. In der Abbildung 11 ist ein Vergleich der Sekretion der verschiedenen COMP-Varianten in bovinen Chondrocyten drei Tage nach Transfektion zu sehen.

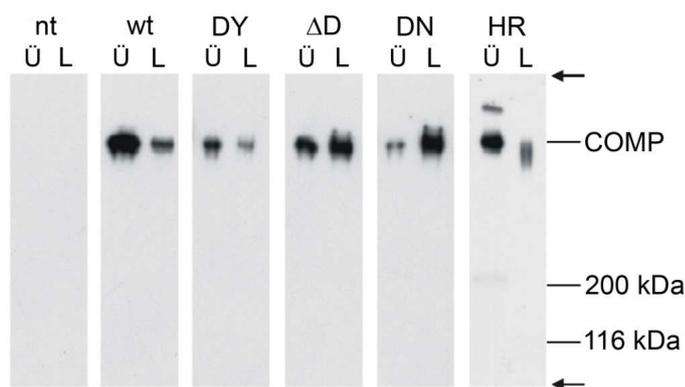


Abbildung 11: Sekretionsanalyse verschiedener COMP-Varianten in transfizierten bovinen Chondrocyten. Die Proben wurden elektrophoretisch (SDS-PAGE 3-12 %iges Gel) unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper, der gegen das *myc*-Epitop gerichtet ist. In Abhängigkeit von der Mutation ist rekombinantes COMP unterschiedlich auf Kulturüberstand (Ü) und Zelllysate (L) verteilt (nt, nicht-transfiziert; wt, Wildtyp COMP; DY, D361Y; Δ D, D469 Δ ; DN, D475N; HR, H587R). Die Pfeile markieren Beginn und Lauffront des Gels, zusätzlich ist das Laufverhalten des Protein-Größenstandards angegeben.

Durch die Verwendung eines Antikörpers, der gegen das *myc*-Motiv gerichtet ist, wurde nur das transgene COMP detektiert. Bei nicht-transfizierten Zellen entstand kein Signal. Das wt Protein wurde hauptsächlich im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Nur wenig rekombinantes COMP war im Zelllysate nachweisbar. Diese Verteilung entspricht einer physiologischen Sekretion und dient nun als Referenz für das Sekretionsverhalten der mutierten Varianten. Bei der MED-assoziierten Mutante DY war ebenfalls der Großteil des Proteins im Überstand detektierbar. Die Gesamtmenge an Protein war etwas geringer, was wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz zurückzuführen ist. Die Δ D Mutation weist dagegen ein unterschiedliches Sekretionsverhältnis auf. Die Menge des sekretierten COMP entspricht ungefähr der Menge des in der Zelle zurückgehaltenen Materials. Dies legt nahe, dass es sich um eine Störung des intrazellulären Proteintransports handelt, die auch schon in Patientenmaterial beschrieben wurde. Bei der DN Mutante war die Sekretion gänzlich unterschiedlich. In der Lysatfraktion befand sich der größte Anteil rekombinanten COMPs. Im Überstand waren dagegen nur geringfügige Mengen detektierbar. Chondrocyten, die HR COMP exprimierten, wiesen im Vergleich zu wt COMP keine wesentlichen Unterschiede auf, d.h. HR wurde ähnlich wie das wt Protein aus der Zelle geschleust. Obwohl die HR Mutation beim Menschen ebenfalls PSACH auslöst, verläuft die Sekretion anders als bei Δ D und DN COMP.

Intrazelluläre Verteilung von rekombinantem COMP

Bei der Herstellung der Zellysate wird die perizelluläre Matrix nicht abgetrennt und ist daher in der Zellfraktion mit enthalten. Auch Matrix-assoziiertes Material wie das rekombinante COMP befindet sich somit in der Probe, obwohl es sekretiert wurde. Eine eingehende Analyse ist durch Immunfluoreszenzfärbungen auf Einzelzellebene möglich. Die intrazelluläre Verteilung von rekombinantem COMP in Chondrocyten wurde mittels Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von Markerproteinen für das ER (PDI, Protein-Disulfid-Isomerase) bzw. den Golgi Apparat (58k Protein) durchgeführt. Eine Co-Lokalisierung mit dem endoplasmatischen Retikulum spricht für einen gestörten Transport. Eine Co-Lokalisierung von COMP mit dem Golgi Apparat bedeutet, dass COMP nicht im ER reteniert, sondern ungehindert weiter transportiert wird.

Chondrocyten wurden mit den verschiedenen COMP-Konstrukten transfiziert und drei Tage später fixiert. Rekombinantes COMP wurde mit einem *myc*-Antikörper detektiert. Die Färbung der Zellkompartimente erfolgte mit Antikörpern gegen PDI und das 58k Protein. Die Primär-Antikörper wurden mit entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern detektiert. In Abbildung 12 sind repräsentative Färbungen zusammengestellt. Das *myc*-COMP Signal ist stets grün, das Signal der jeweiligen Zellkompartimente ist rot dargestellt. In elektronisch überlagerten Bildern erscheint eine Co-Lokalisation gelb.

Wt COMP war fast ausschließlich im Golgi Apparat zu detektieren, wie die Überlagerung mit der Färbung für das 58k Protein belegen. Bei Färbungen von DY COMP erkennt man sowohl Co-Lokalisation mit dem Golgi Apparat als auch mit dem ER. Die Färbung der ΔD -Mutante weist erhebliche Unterschiede im Vergleich zum wt auf. Das *myc*-COMP Signal ist über die gesamte Zelle verteilt. Im Überlagerungsbild mit dem ER Marker wird deutlich, dass ΔD -COMP hier im ER lokalisiert ist. Zudem konnten extrazelluläre, punktförmige *myc*-Färbungen bei ΔD -transfizierten Chondrocyten beobachten werden.

Die Co-Lokalisation von COMP mit dem ER ist auch bei den DN-transfizierten Chondrocyten deutlich zu erkennen. Wie bei ΔD sind auch hier extrazelluläre Signale zu erkennen. Die Signale bei den HR-transfizierten Chondrocyten sind dem Golgi Apparat zuzuordnen, was für eine ungestörte Sekretion spricht.

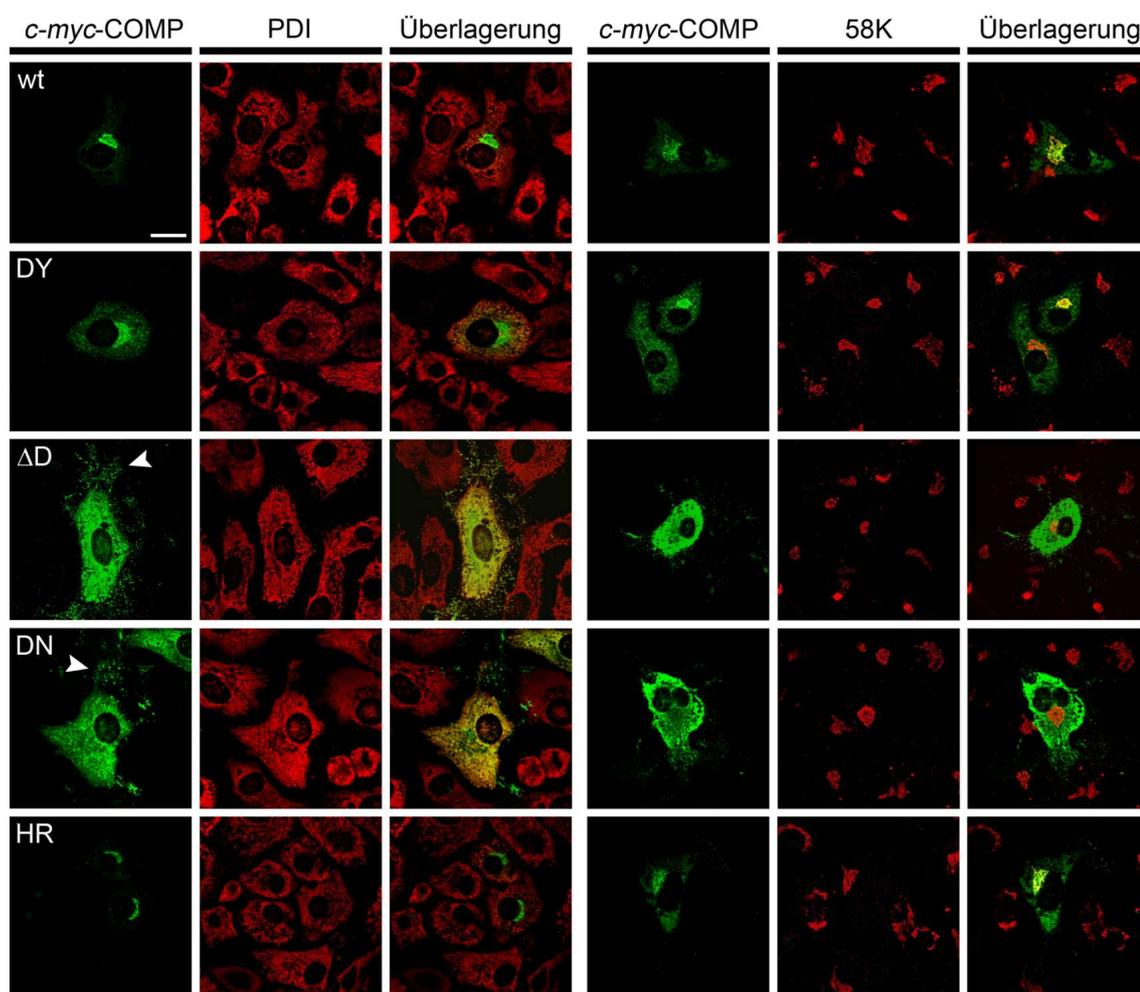


Abbildung 12: wt COMP und krankheitsverursachende COMP Mutanten sind unterschiedlich intrazellulär verteilt. Bovine Chondrocyten wurden mit den angegebenen COMP Konstrukten transfiziert. Nach drei Tagen wurde das rekombinante COMP (grün) durch Immunfluoreszenz (*myc*-Antikörpers) detektiert. Die Zellkompartimente wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Markerproteine von ER (PDI, rot) und Golgi Apparat (58K Protein, rot) gefärbt. Von den beiden Einzelfärbungen ist jeweils ein Überlagerungsbild gezeigt, Co-Lokalisationen erscheinen in gelb. Die Pfeilspitzen weisen auf extrazelluläre COMP-haltige Aggregate. Der Balken im oberen linken Bild entspricht 5 μ m.

Die hier gezeigten Ergebnisse stehen im Einklang mit denen des Western Blots. Wt und HR COMP wird von den Zellen sekretiert. Die Δ D und DN-Varianten sind dagegen durch die Co-Lokalisierung mit dem ER Marker und auffällige extrazelluläre Signale charakterisiert. Die DY Mutante weist diesbezüglich ein intermediäres Verhalten auf, indem Co-Lokalisierungen von rekombinantem COMP im ER und Golgi Apparat zu sehen waren. Extrazelluläre Färbungen konnten bei DY nicht beobachtet werden.

Einfluss von COMP Mutationen auf die Zellvitalität

Ob die Expression mutierter COMP-Varianten, die Retention oder die ER Dilatation Auswirkungen auf die Vitalität von Chondrocyten haben sollte mittels unterschiedlicher Methoden analysiert werden. Mit dem XTT assay wurde die metabolische Aktivität von transfizierten Chondrocyten gemessen. Grundlage dieses Versuchs ist die Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch die Mitochondrien in ein fotometrisch nachweisbares Produkt. Setzt man eine gleiche metabolische Aktivität von Zellen voraus, so kann auf die Zellzahl und somit die Vitalität einer Zellpopulation geschlossen werden.

Hier wurden die transfizierte Chondrocyten nach drei Tagen in XTT-haltigem Medium inkubiert. Die fotometrische Auswertung des Endprodukts ergab einen signifikanten Abfall der metabolischen Aktivität der Zellen, die mit den PSACH-auslösenden Varianten (ΔD , DN und HR) transfiziert worden waren. Die etwas geringere Vitalität von DY-transfizierten Zellen ist, bezogen auf die wt-transfizierten Zellen, nicht signifikant (siehe Abb. 13).

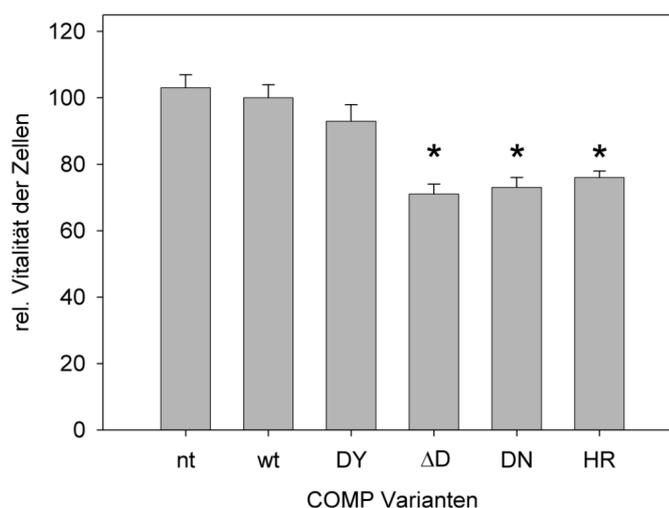


Abbildung 13: Auswirkung der rekombinanten COMP-Expression auf die Zellvitalität. Mit Hilfe des XTT assays wurde die Vitalität als metabolische Aktivität der transfizierten Chondrocyten gemessen. Bovine Chondrocyten wurden drei Tage nach Transfektion untersucht. Die PSACH-assoziierten COMP-Varianten (ΔD , DN, HR) führen zu einer signifikant (*) verminderten Vitalität (zweiseitiger t-Test mit $p < 0,002$, $n=6$). wt und DY unterscheiden sich nicht signifikant von nicht-transfizierten Zellen.

Die Expression von mutierten COMP-Varianten hat folglich einen Einfluss auf die Zellvitalität. In weiteren Untersuchungen sollte nun geklärt werden, welcher Art des Zelltods durch die Expression mutierter COMP-Varianten induziert wurde.

Der nekrotische Zelltod wurde mit Hilfe eines enzymatischen Tests bestimmt. Bei der Nekrose reißt die Membran abgestorbener Zellen auf und Cytoplasmabestandteile diffundieren ins

umgebende Medium. Beim verwendeten CytoTox ONE assay wird die Lactatdehydrogenase (LDH) nachgewiesen.

Zwischen den einzelnen Konstrukten sowie der nicht-transfizierten Kontrolle existieren keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14). Die Expression von mutiertem COMP scheint also keinen nekrotischen Mechanismus auszulösen.

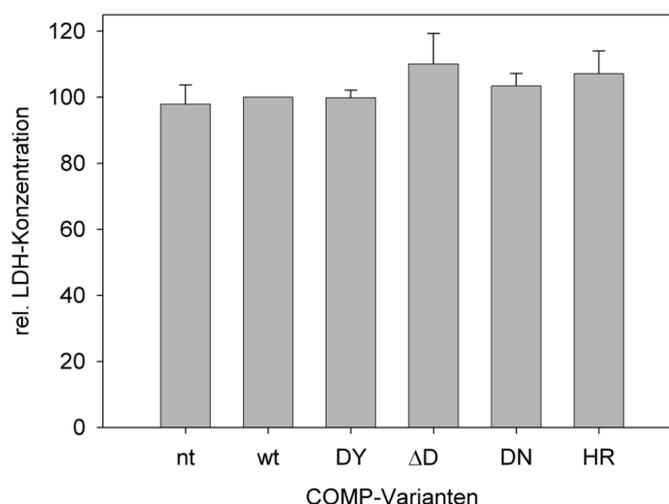


Abbildung 14: Messung des nekrotischen Zelltods bei transfizierten bovinen Chondrocyten. Für diese Bestimmung wurde der CytoTox-ONE assay (Promega) verwendet, bei dem die LDH-Konzentration (Lactatdehydrogenase) im Zellkulturüberstand gemessen wird. Dies gilt als Indikator nekrotisch abgestorbener Zellen, da deren Plasmamembran nicht mehr intakt ist und die cytosolische LDH ins Kulturmedium diffundiert. Die Chondrocyten wurden sechs Tage nach Transfektion untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten und den nicht-transfizierten Zellen festgestellt werden.

Der klassische Weg des programmierten Zelltods ist die Apoptose. Mittels einem TUNEL assay wurde die mögliche Induktion der Apoptose durch Expression von mutiertem COMP untersucht. Bovine Chondrocyten wurden mit den COMP Konstrukten viral transduziert und für sechs Tage in 6-Loch-Titerplatten kultiviert und dem Test unterzogen. Als Kontrollen dienten nicht-transduzierte Zellen (nt) und mit SNP (Natriumnitroprussid) behandelte Zellen. Die charakteristischen Strangbrüche der DNA wurden mittels TUNEL assay nachgewiesen. Die untersuchten Proben wiesen die gleiche Zelldichte auf. Sowohl die nicht-transduzierten als auch die wt-transduzierten Zellen weisen geringe Apoptose-Rate auf (siehe Abb. 15). In Chondrocyten, die mutiertes COMP exprimierten, konnten dagegen vermehrt Strangbrüche nachgewiesen werden. Die MED-auslösende DY Mutante wies im Vergleich zu den anderen Mutationen die geringste Anzahl apoptotischer Zellen auf.

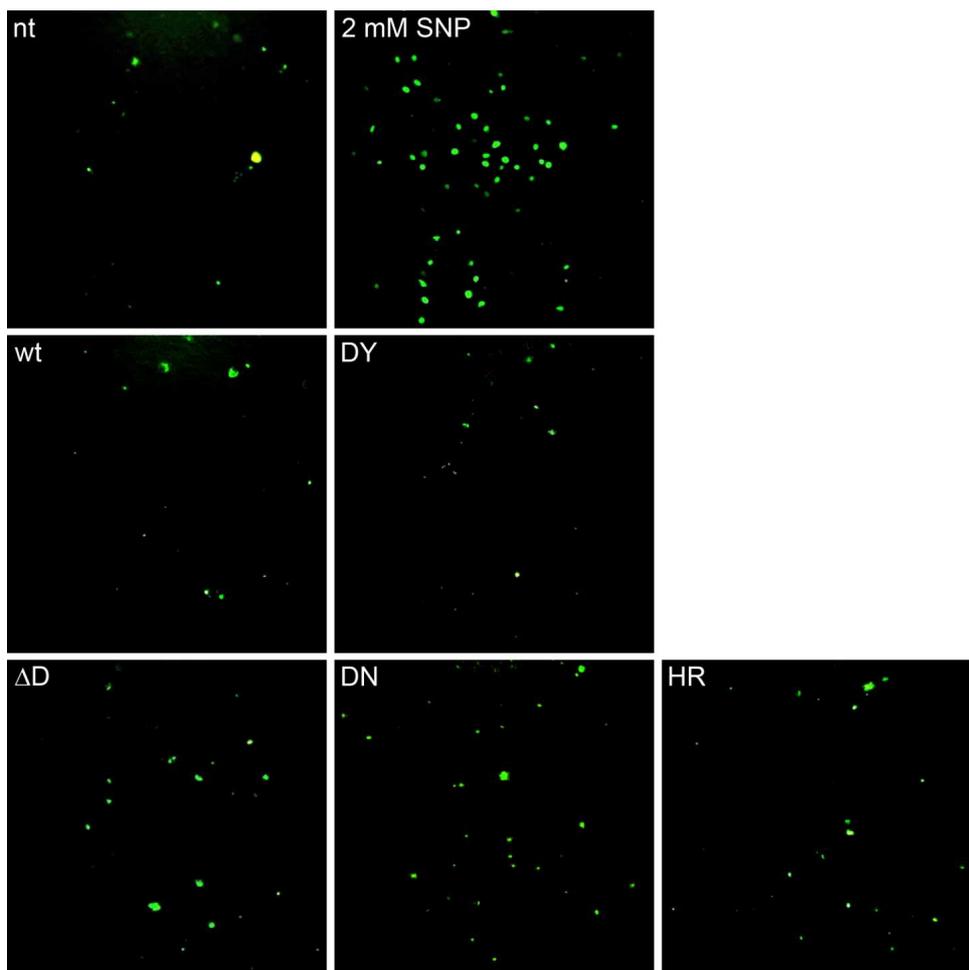


Abbildung 15: Induktion der Apoptose nach Transduktion mit mutiertem COMP. Mit einem TUNEL assay sollte eine evtl. Apoptose induzierende Wirkung von rekombinatem COMP auf Chondrocyten untersucht werden. Hierzu wurden transduzierte Zellen verwendet, um eine größere Anzahl von Zellen zu erhalten, die rekombinantes COMP exprimierten. Als Vergleich dienten nicht-transduzierte und über Nacht mit 2 mM SNP (Natriumnitroprussid) inkubierte Zellen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Christian Weirich (Bad Nauheim) durchgeführt.

Die fluoreszierenden apoptotischen Zellen wurden gezählt und deren Anzahl statistisch ausgewertet (Abb. 16). Die Apoptose-Rate wurde auf die nicht-transduzierten Zellen normiert, sodass im Diagramm die Proben als ein Vielfaches von nicht-transduziert (nt) erscheinen.

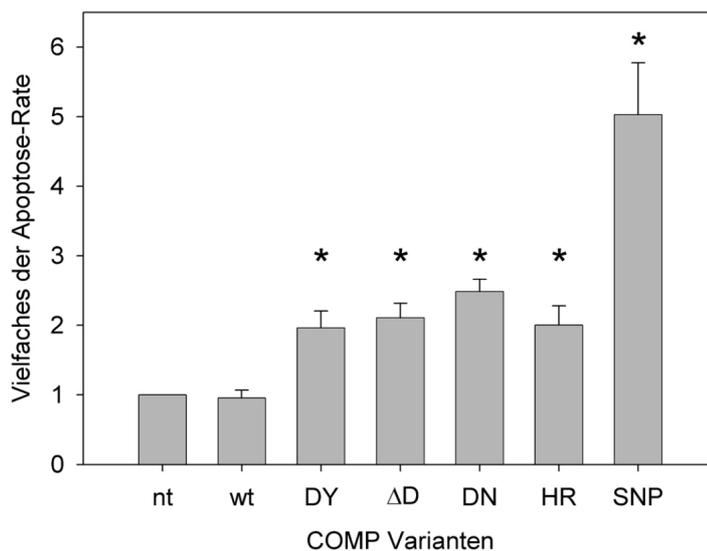


Abbildung 16: Quantifizierung des TUNEL assays. Die apoptotischen Zellen wurden zur Quantifizierung unter dem Mikroskop ausgezählt. Die MED- (DY) und die PSACH-assoziierten Mutanten (Δ D, DN, HR) führen zu einer signifikant höheren Apoptoserate (zweiseitiger t-Test mit $p < 0,0004$, $n=6$) bezogen auf nicht-transfizierte Zellen. Die Apoptoserate von wt transfizierten Zellen unterscheidet sich nicht von den nicht-transduzierten (nt) Chondrocyten. Die Apoptoserate der transduzierten Zellen ist im Diagramm als Vielfaches der nicht-transduzierten Chondrocyten dargestellt.

Die Expression krankheitsauslösender COMP-Varianten hat verglichen mit nicht-transfizierten und wt COMP exprimierenden Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Induktion der Apoptose. Die Apoptose-Rate steigt ca. um den Faktor 2 bis 2,5. Es gab zwischen der DY Mutation und den restlichen Mutationen keinen signifikanten Unterschied.

Einfluss von rekombinant exprimiertem COMP auf die Ultrastruktur von Chondrocyten

Die oben gezeigten Immunfluoreszenzen verdeutlichten eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der rekombinanten COMP-Färbungen. Die Co-Lokalisation einiger COMP-Varianten mit dem ER lässt eine Retention von COMP vermuten. Mögliche ultrastrukturelle Veränderungen der ER-Morphologie wurden daher untersucht. Die Elektronenmikroskopie (EM) erlaubt eine sehr detailreiche Auflösung sowohl der Zellen als auch der umgebenden extrazellulären Matrix. Die Untersuchung der extrazellulären Matrix wurde in Langzeitkulturen (2-4 Wochen) durchgeführt, um die Dedifferenzierung der Chondrocyten zu verhindern wurden sie in einer dreidimensionalen Alginatmatrix kultiviert. Die hierzu verwendete Alginatmatrix eignet sich sowohl für elektronenmikroskopische Präparate als auch für immunhistochemische Färbungen.

Bovine Chondrocyten wurden drei Tage nach ihrer Isolation mit Plasmid-DNA der COMP-Konstrukte transfiziert und Alginat für vier Wochen in kultiviert. Anschließend wurden sie in Araldit eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Blei und Uranylacetat kontrastiert und unter dem Elektronenmikroskop analysiert. In Abbildung 17 ist die ultrastrukturelle Morphologie des ER von Zellen zu sehen, welche mit den verschiedenen COMP-Konstrukten transfiziert wurden. Die linke Spalte stellt jeweils eine repräsentative Übersichtsabbildung einer Zelle dar. Die rechte Spalte zeigt eine typische Detailaufnahme des Zellinneren.

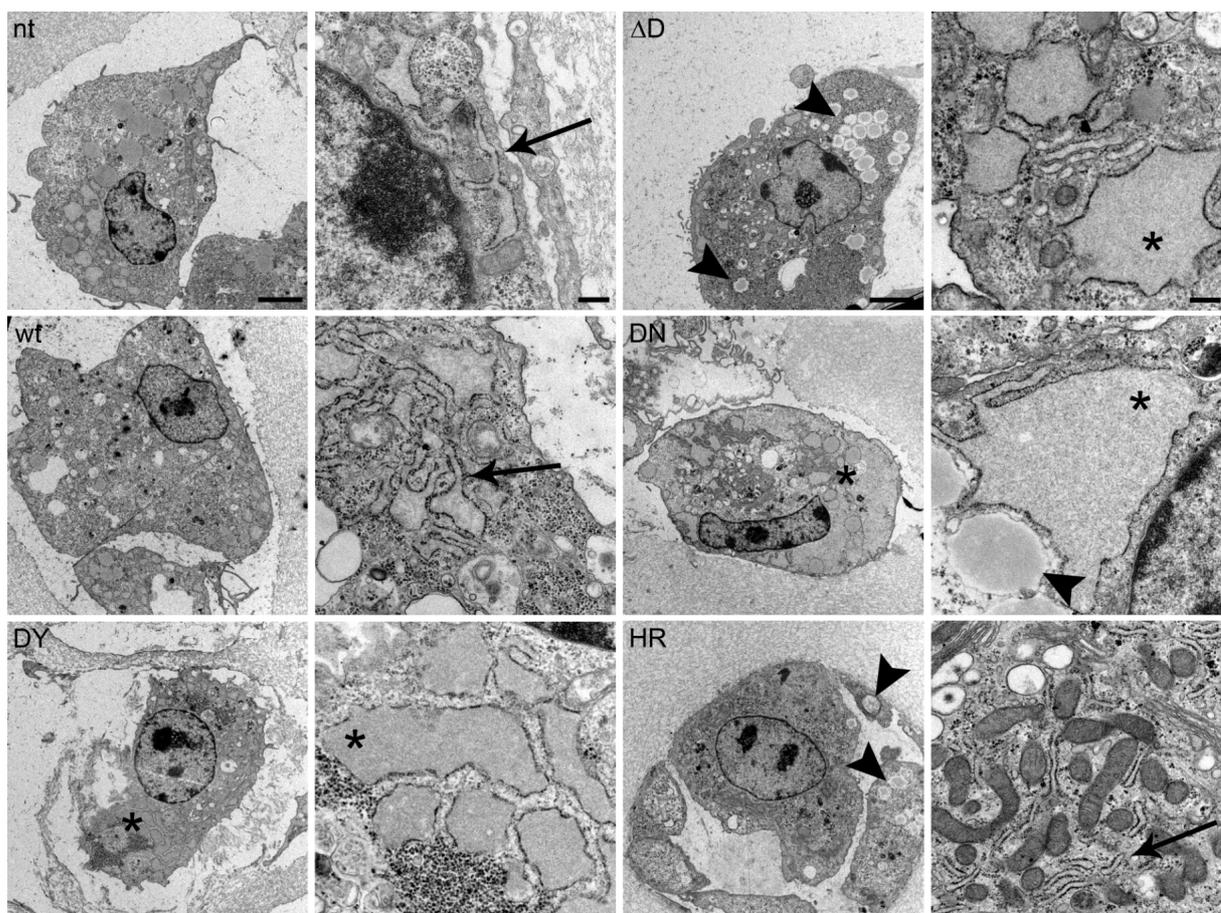


Abbildung 17: Ultrastrukturelle Morphologie des endoplasmatischen Retikulums Plasmid-transfizierter boviner Chondrocyten. Die Zellen wurden mit Plasmid-DNA transfiziert und in Alginat kultiviert. Die Analyse des intrazellulären Phänotyps erfolgte nach vier Wochen. Das ER ist bei nt, wt und HR schmal (siehe Pfeile). Bei den Mutanten DY, ΔD und DN ist ein vergrößertes ER zu erkennen (siehe Stern). Bei ΔD , DN und HR entstehen zahlreiche Lipidtropfen im Vergleich zum wt (siehe Pfeilspitze). Der Balken des Übersichtsbilds entspricht 2 μm . Der Balken der Detailabbildungen entspricht 500 nm.

Die Morphologie des ERs von nicht-transfizierten Chondrocyten ist schmal und lang gestreckt oder mit schlauchartigen Verzweigungen. Durch Überexpression des wt Proteins scheint es etwas angeschwollen. Bei der DY Mutante sind wesentlich erweiterte ER Strukturen zu sehen. Die Morphologie des ERs von ΔD transfizierten Chondrocyten war ebenfalls aufgebläht. Das Cytoplasma dieser Zellen wies zudem erhebliche Störungen auf, besonders in Form von Lipidtropfen. Sie konnten auch in den Zellen anderer Konstrukte beobachtet werden, allerdings nicht in dieser Größe und Häufigkeit. Die DN Mutante zeichnet sich ebenfalls durch ein aufgeblähtes ER aus. Die Struktur des ERs der HR Mutanten ist dagegen sehr schmal und lang gezogen.

Die COMP-Konstrukte, die ihre Mutation in der T3 Domäne tragen (DY, ΔD , DN), wiesen intrazelluläre Auffälligkeiten im Vergleich zu nicht-transfizierten und wt-transfizierten Zellen auf. Die HR Mutante entspricht bzgl. ihres intrazellulären Phänotyps den nicht-transfizierten Zellen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Immunfluoreszenzen.

Etablierung eines Zellkulturmodells mit viral-transduzierten Chondrocyten

Die bisher durchgeführten Experimente beruhen auf Plasmid-Transfektionen. Die Transfektion mit Plasmid-DNA erreicht etwa eine 15 %ige Effizienz. Bei Methoden, bei denen ein direkter Nachweis des rekombinanten Proteins möglich ist, wie z. B. Immunfluoreszenzfärbungen, hat die konventionelle Transfektion keinen Nachteil. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist das jedoch ohne den Einsatz Gold-markierter Antikörper nicht möglich. Diese haben allerdings den Nachteil, dass durch die spezielle Probenverarbeitung eine erheblich schlechtere Auflösung entsteht als bei konventionellen EM-Techniken. Um eine optimale Bildqualität zu erreichen, sollte auf den immunologischen Nachweis verzichtet werden. Für ultrastrukturelle Analysen muss also eine sehr hohe Effizienz erreicht werden, sodass möglichst alle untersuchten Zellen das gewünschte Protein exprimieren.

Zur Verbesserung des Gentransfers wurden bovine Chondrocyten viral transduziert. Die Zellen wurden anschließend für zwei bis vier Wochen in Alginat kultiviert. Zur Ermittlung der geeigneten Virusdosis wurden Chondrocyten mit einer geringen Dosis von 5 MOI (*multiplicity of infections* = infektiöse Partikel pro Zelle), einer mittleren Dosis von 20 MOI und einer hohen Dosis von 100 MOI infiziert. Nicht-transduzierte und mit GFP-transduzierte Zellen dienten hierbei als Negativkontrollen. In der folgenden Abbildung sind beispielhaft wt, ΔD und DN COMP gegenübergestellt. Die Vorgabe war die Virusdosis so zu wählen, dass allein durch die Expression von viralen Proteinen bzw. von wt COMP keine Nebeneffekte auftreten. So sollten unspezifische Effekte auf Grund der Überexpression eines Proteins vermieden werden. Gleichzeitig wurde beobachtet, ob pathogene Effekte bei der Mutante entstanden.

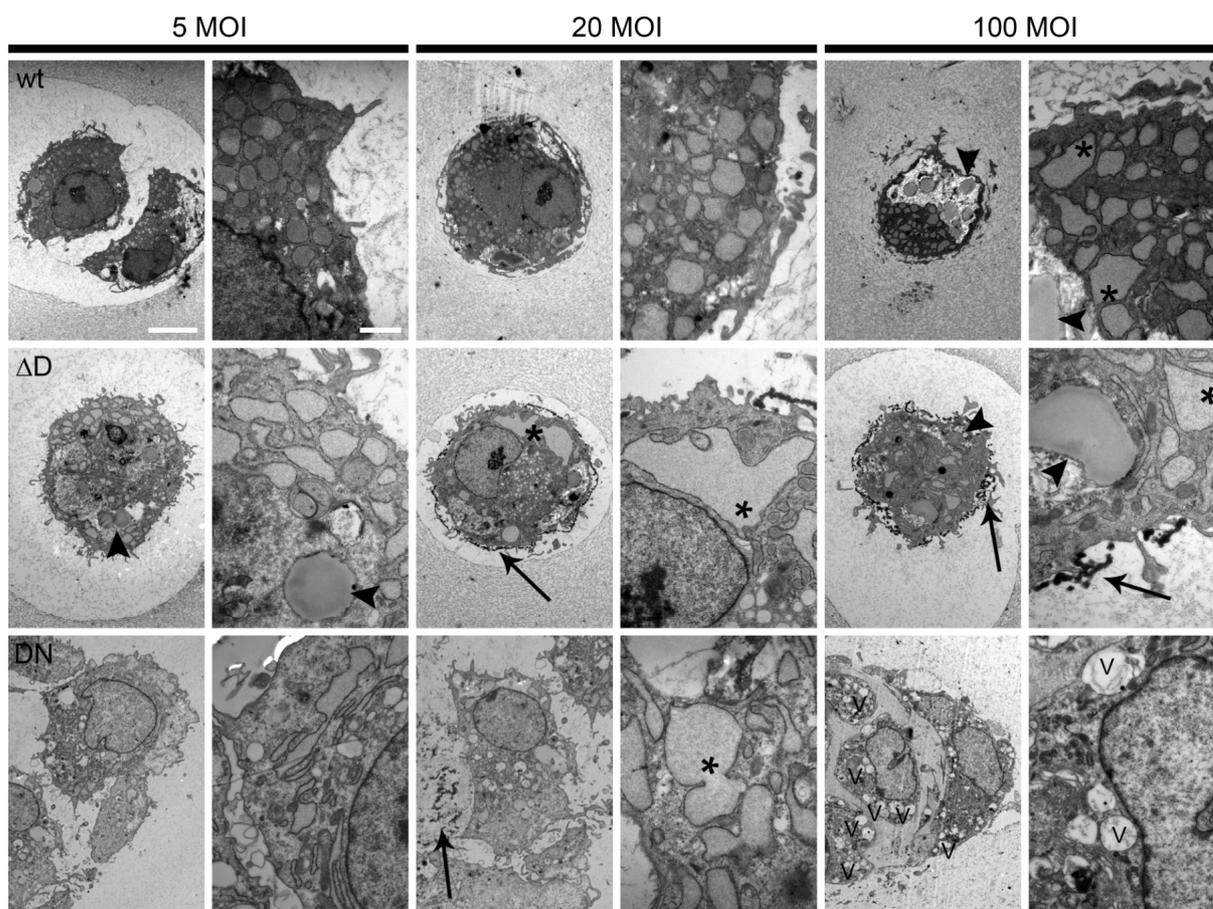


Abbildung 18: Phänotyp infizierter Chondrocyten in Abhängigkeit des eingesetzten Virustiters. Bovine Chondrocyten wurden mit verschiedenen Virustitern (5, 20 und 100 MOI) infiziert und für zwei Wochen in Alginat kultiviert. Durch die EM-Analyse sollte die Gendosis bestimmt werden, bei der erste Veränderungen auftreten. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass alleine die Überexpression von wt COMP zu Veränderungen führt. Exemplarisch werden hier wt, Δ D und DN COMP gegenübergestellt. Bei 5 MOI entstanden keine Unterschiede. Bei 20 MOI gab es keine Veränderungen des intrazellulären Phänotyps beim wt. Bei Δ D und DN entsteht bereits ein vergrößertes ER (siehe Sterne) und extrazelluläre, elektronendichte Aggregate treten auf (Pfeile). Bei 100 MOI entstehen sowohl bei wt als auch Δ D große Lipidtropfen (Pfeilspitzen) und ein vergrößertes ER. Das Cytoplasma von DN weist viele Vakuolen (V) auf. Nicht-transduzierte und mit GFP-transduzierte Zellen (untere Reihe) dienen als Kontrollen. Die Kontrollzellen zeigen keine Auffälligkeiten bzgl. der ER Struktur. In den Übersichtsaufnahmen entsprechen die Balken 5 μ m, in der Detailansicht 1 μ m.

Bei einem Titer von 5 MOI traten keine auffälligen Unterschiede zwischen wt, Δ D und DN COMP auf. Bei Erhöhung auf 20 MOI blieb die Morphologie von wt-transduzierten Zellen unverändert. Das Volumen des ER nach Infektion mit Δ D und DN COMP nahm dagegen zu (siehe Stern) und extrazelluläre, elektronendichte Aggregate waren zu erkennen (siehe Pfeile). Eine Erhöhung der Virusdosis auf 100 MOI bewirkte auch beim wt Veränderungen in Form eines erweiterten ER (Sterne) und zahlreicher Lipidinklusionen (Pfeilspitzen). Ähnliche Effekte waren auch bei Δ D COMP zu sehen, zusätzlich entstanden hier extrazelluläre Aggregate. Die DN COMP exprimierende Zellen wiesen viele Vesikel (V) auf. Die Kontrollen mit nicht-transduzierten und mit GFP-transduzierten Zellen ließen keine Auffälligkeiten erkennen (hier nicht gezeigt). Durch diesen Versuch wurde ein Virustiter von 20 MOI als die geeignete Konzentration für die weitergehenden Untersuchungen ermittelt.

Nachdem eine Virusdosis von 20 MOI als geeignet für die Untersuchung intra- und extrazellulärer Effekte von exprimiertem COMP eingestuft wurde, musste überprüft werden, ob auch die geforderte hohe Effizienz gegeben war.

Es wurden hierfür immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Übersichtsaufnahmen von 20 MOI infizierten Zellen belegen für alle Konstrukte eine Effizienz des Gentransfers, die über 90 % liegt (Abb. 19). Die Effizienz für 5 MOI transduzierte Chondrocyten war niedriger, was möglicherweise das Fehlen von phänotypischen Unterschieden erklärt (hier nicht gezeigt). Es könnten zahlenmäßig zu wenig Zellen infiziert worden sein oder infizierte Chondrocyten exprimieren auf Grund der geringen Virusdosis zu wenig des transgenen Proteins. Trotz der hohen Effizienz bei 100 MOI, waren die unspezifischen Effekte zu ausgeprägt, um solche Zellen weiterhin zu analysieren. Eine Virusdosis von 20 MOI ist daher als optimal einzustufen.

Rekombinant exprimierte Proteine wurden mit Antikörpern detektiert, die gegen das *myc*-Epitop gerichtet waren (Abb. 19). Die nicht-transduzierten Zellen weisen erwartungsgemäß keine *myc*-Signale auf. In der Detailaufnahme von nicht-transduzierten Chondrocyten wurde endogenes COMP detektiert. Die Detailaufnahme der nicht-transduzierten Chondrocyten belegt, dass endogenes COMP exprimiert und in der perizellulären Matrix lokalisiert ist (siehe Pfeil).

Auf den Detailfotos sind Unterschiede zwischen wt und den Mutanten bei der *myc*-Färbung klar erkennbar. Die wt COMP exprimierende Chondrocyten weisen ebenso wie nicht-transduzierte Zellen ein perizelluläres Signal auf (siehe Pfeil). Besonders DY, Δ D und DN exprimierende Zellen sind durch intrazelluläre *myc*-Färbungen charakterisiert. Die HR Mutante tendiert zu einer perizellulären Färbung.

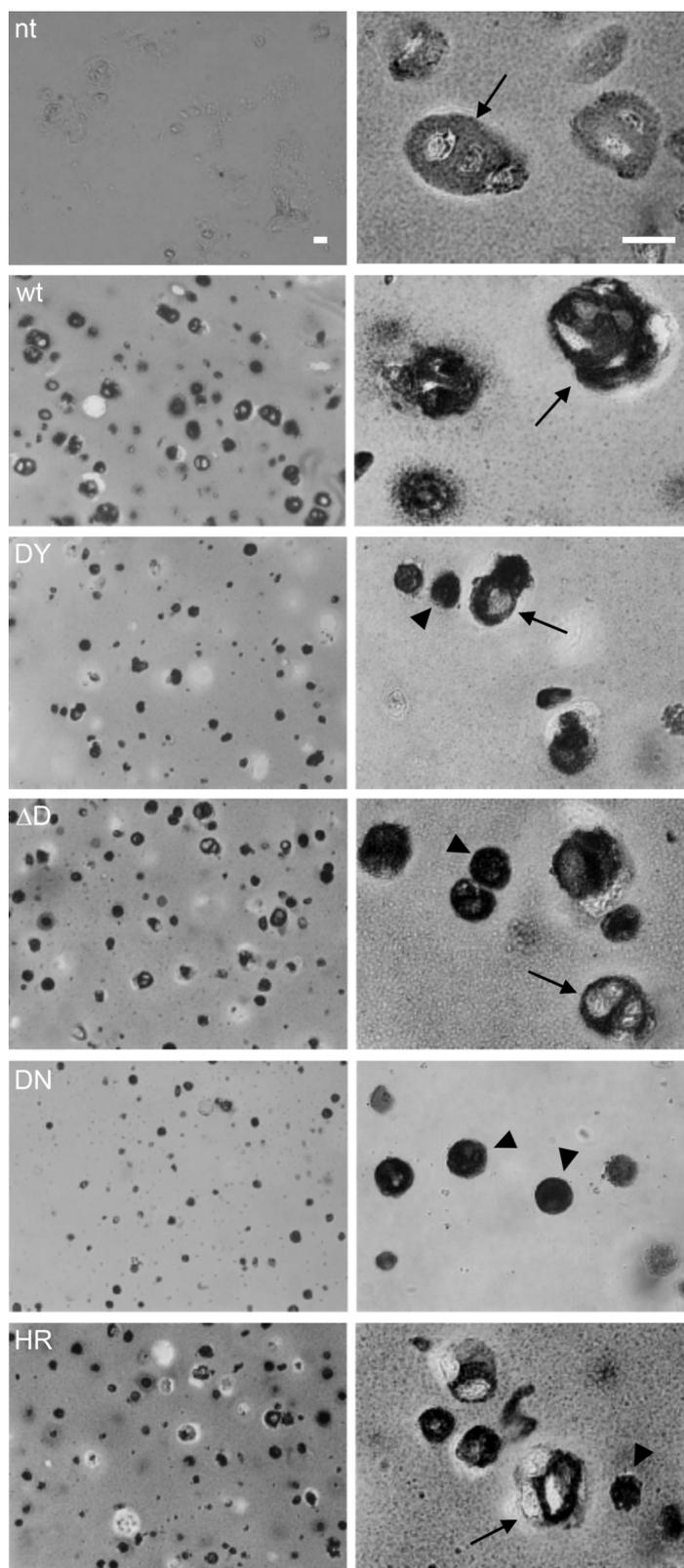


Abbildung 19: Hohe Transduktionsrate von viral-infizierten Alginate-Kulturen (20 MOI). Nach vierwöchiger Kultur wurde auf Paraffinschnitten immunhistochemisch (*myc*-AK) rekombinant exprimiertes COMP nachgewiesen. Bei der Detailaufnahme von nicht-transduzierten Zellen wurde der COMP-Antikörper verwendet, um endogenes COMP zu detektieren. Es ist in der perizellulären Matrix lokalisiert. Die Übersichtsbilder von transduzierten Zellen lassen die hohe Effizienz erkennen. In den Detailaufnahmen ist zum einen die perizelluläre Matrix angefärbt (siehe Pfeile). Zum anderen weisen Kulturen, die DY, Δ D und DN COMP exprimieren, zusätzlich intrazelluläre Färbungen auf (Pfeilspitzen). Die Messbalken entsprechen jeweils 10 μ m.

Die perizelluläre Matrix von Chondrocyten, die DY, Δ D und DN COMP exprimieren, erweckt einen dichteren Eindruck im Vergleich zum wt. Besonders bei DN COMP exprimierenden Zellen ist die Matrix um die Zelle scharf abgegrenzt (siehe Pfeilspitzen in Abb. 19), was in der entsprechenden Übersicht deutlich wird. Die Matrix der Zellen nimmt eine deutlich geringere Fläche ein als bei wt exprimierenden Zellen. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von rekombinatem wt und mutiertem COMP auf die extrazelluläre Matrix detaillierter untersucht. In Abbildung 20 sind jeweils repräsentative Bilder einer Zelle und der Matrix der verschiedenen COMP Varianten zusammengefasst. Die nicht-transduzierten und wt-transduzierten Chondrocyten produzierten organisierte Collagen-Fibrillen (siehe Pfeile). Die Matrix der DY Mutante ist gegenüber nicht-transduzierten und wt COMP transduzierten Zellen bereits deutlich verändert. Die Zellen produzierten neben organisierter Matrix (siehe Pfeil) auch extrazelluläre Aggregate (siehe Pfeilspitze). In der Detailansicht wird eine Mischform aus gut ausgebildeter Matrix und einem losen, nicht-strukturierten Netzwerk deutlich. Die Matrix von Δ D COMP exprimierenden Zellen ist stark kondensiert, wodurch die Aggregate entstehen (siehe Pfeilspitze). Außer diesen elektronendichten Strukturen, ist auch ein unstrukturiertes Netzwerk zu erkennen. Auch bei DN COMP exprimierenden Zellen bildet sich diese dichte Matrix. Es sind keine organisierten Fibrillen mehr zu erkennen. Auch bei HR COMP exprimierenden Chondrocyten dominieren die extrazellulären Aggregate die Matrix.

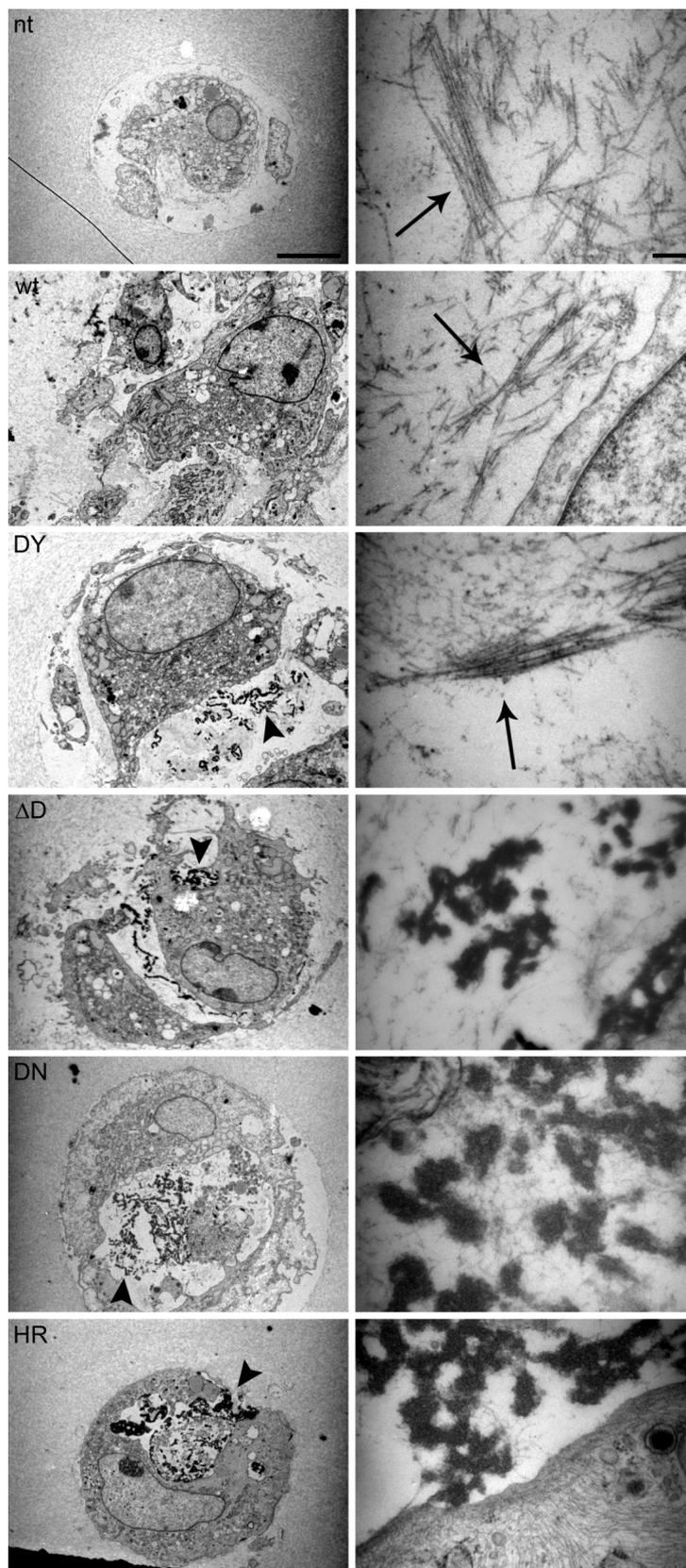


Abbildung 20: Auswirkung der Expression von mutiertem COMP auf die extrazelluläre Matrix. Bovine Chondrocyten wurden viral infiziert (20 MOI) und vier Wochen in Alginate kultiviert. Die Matrix von nicht-transduzierten und wt Zellen weist normale Collagenfibrillen auf (Pfeile). Die Matrix von DY ist heterogen, neben normalen Fibrillen (Pfeile) entsteht ein diffuses Netzwerk und extrazelluläre Aggregate (Pfeilspitzen). Diese Aggregate sind bereits in der Übersicht zu erkennen und dominieren die Matrix von ΔD , DN und HR COMP exprimierenden Zellen. In den Übersichtsbildern entspricht der Balken 1 μm , in den Detailbildern 200 nm.

Um rekombinantes COMP in der Matrix immunologisch zu detektieren, wurden in LR-Gold eingebettete Alginatkulturen verwendet. Abbildung 21 zeigt die Matrix aller untersuchten Konstrukte sowie einer Kontrolle mit nicht-transduzierten Zellen. Das rekombinante COMP wurde mittels einem Gold-gekoppelten *myc*-Antikörper detektiert. Die Negativkontrolle der nicht-transduzierten Zellen weist normale Collagenfibrillen auf. Es wurde kein Signal detektiert. Wt COMP exprimierende Zellen produzierten organisierte Collagenfibrillen auf. In der Matrix konnten nur einige wenige Goldpartikel beobachtet werden (siehe Pfeilspitzen). Die Proben aller anderen Mutationen wiesen ein deutlich stärkeres Signal Gold-gekoppelter Antikörper auf. Wie auch bei den Araldit-eingebetteten Proben war die bei DY gebildete ECM nicht in dem starken Maß kondensiert, wie es bei den anderen Mutanten der Fall war. Die drei PSACH-assoziierten Mutationen zeichneten sich durch sehr viel dichtere Aggregate aus, die in hoher Dichte Gold-markiert waren.

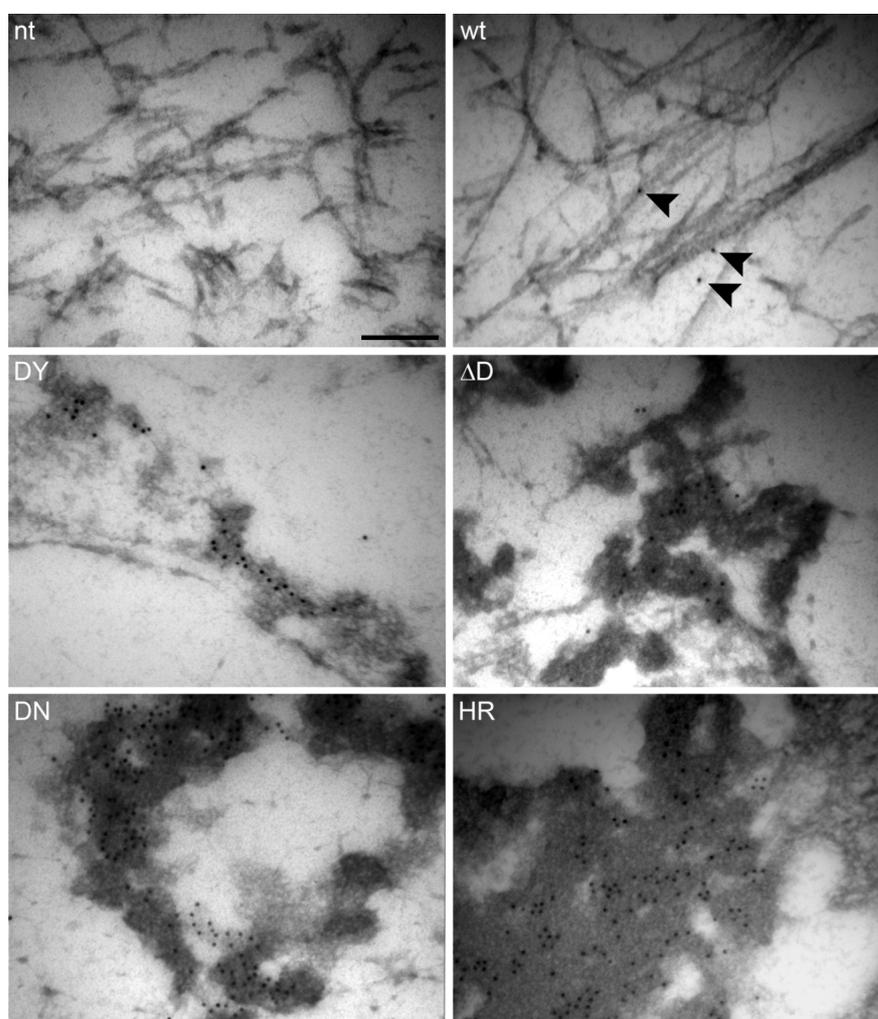


Abbildung 21: Immunologischer Nachweis von rekombinantischem COMP in der extrazellulären Matrix. Bovine Chondrocyten wurden mit 20 MOI infiziert und vier Wochen in Alginat kultiviert. Während bei Nicht-transduzierten und dem wt gut strukturierte Fibrillen entstehen, produzieren die Mutanten eine gestörte Matrix. Das rekombinant exprimierte COMP wurde mittels Gold-gekoppelter *myc*-Antikörper detektiert. Während bei wt nur sehr wenige Goldpartikel nachgewiesen werden konnten (Pfeilspitzen), enthalten die elektronendichten Aggregate bei allen Mutanten sehr große Mengen COMP.

Im Anschluss wurde analysiert, ob neben dramatischen extra- auch intrazelluläre Effekte von mutiertem COMP ausgehen. In Abbildung 22 sind repräsentative Bilder der ER Struktur und anderer intrazellulärer Auffälligkeiten nach Transduktion aller Konstrukte zusammengefasst. Die Struktur des ER von nicht-transduzierten Chondrocyten hatte eine schmale, schlauchartige Form (hier nur Übersichtsaufnahme). Die Morphologie des ER von rekombinantem wt COMP exprimierenden Zellen war leicht erweitert (hier nur Übersichtsaufnahme). Ein vergleichbares Bild ergab sich für die Proben, die mutiertes COMP exprimierten. Die in einigen Patienten beschriebenen lamellären Inklusionen konnten nicht beobachtet werden. In Detailaufnahmen konnten allerdings Unterschiede zwischen den wt COMP und mutiertes COMP exprimierenden Zellen beobachtet werden. Das Cytosol der mit mutierten Konstrukten infizierten Zellen enthielt Autophagosomen (A), eine vermehrte Anzahl von Lysosomen (Pfeilspitzen), Vakuolen (V) und Stressfibrillen (SF).

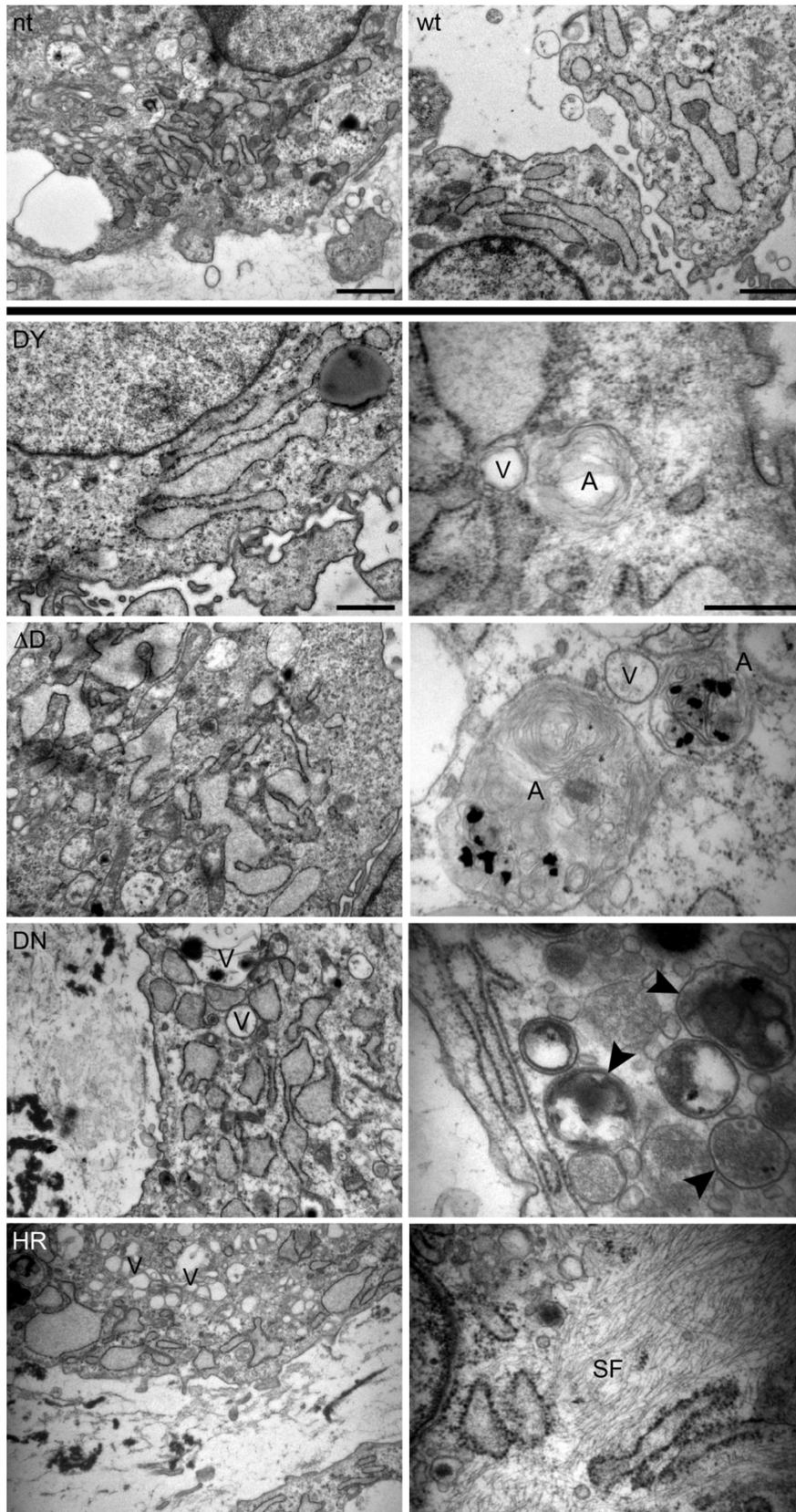


Abbildung 22: Auswirkungen der Expression von mutiertem COMP auf den intrazellulären Phänotyp. Bovine Chondrocyten wurden infiziert (20 MOI) und für vier Wochen in Alginat kultiviert. Nicht-transduzierte Zellen wiesen ein schmales ER (R) auf. Detailaufnahmen zeigen, dass Zellen, die mutiertes COMP exprimierten, vermehrt Autophagosomen (A), Lysosomen (Pfeilspitze), Vakuolen (V) und Stressfibrillen (SF) aufwiesen. Der Balken entspricht 1 μm , bzw. 500 nm im Detailbild.

Proteinchemische Analyse mutierter COMP Varianten

Aufreinigung von rekombinantem COMP

Die proteinchemische Charakterisierung mutierter COMP Varianten erfolgte mit in EBNA-293 Zellen rekombinant exprimierten Proteinen. Die Proteine waren mit einem his₆-tag markiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie auf Ni-NTA-Säulen. COMP eluierte bei ca. 150 mM Imidazol (Abb. 23).

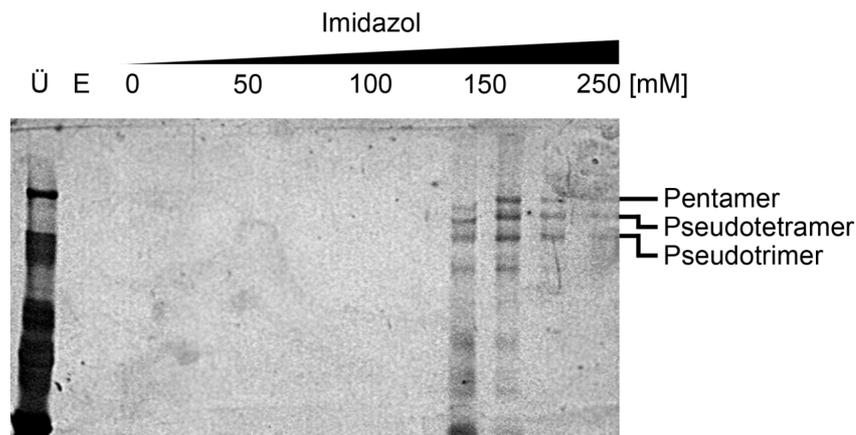


Abbildung 23: Affinitätsreinigung von COMP. Gesammelte Zellkulturüberstände (Ü) wurden mit Proteaseinhibitoren versetzt und auf eine Nickel-NTA-Säule geladen. Die Säule wurde mit Laufpuffer equilibriert. Mittels eines Imidazol-Gradienten (0-250 mM) wurde COMP eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE (3-12 %, nicht-reduzierend) und Silberfärbung analysiert. In den einzelnen Fraktionen sind die Abbauprodukte zu den Pseudooligomeren bereits deutlich erkennbar, die bei ca. 150 mM Imidazol von der Säulenmatrix dissoziieren. Im Überstand ist die gesamte Proteinmenge des Kulturmediums. In der Equilibrierungsfraction (E) ist kein Protein vorhanden.

Bereits in den Eluaten wurde die Prozessierung von COMP deutlich, die auf eine proteolytische Spaltung nahe der Oligomerisierungsdomäne zurückzuführen ist. Letztere bleibt als *coiled-coil*-Struktur erhalten, weshalb man die Abbauprodukte als Pseudooligomere bezeichnet. Um für weitere Experimente eine möglichst reine und homogene Präparation zu erhalten, wurden die Eluate mittels einer Sepharose CL-6B Gelfiltrationssäule weiter aufgereinigt. Die hauptsächlich Penta- und Tetramer enthaltenden Präparationen wiesen keinerlei Unterschiede im Laufverhalten auf (Abb. 24).

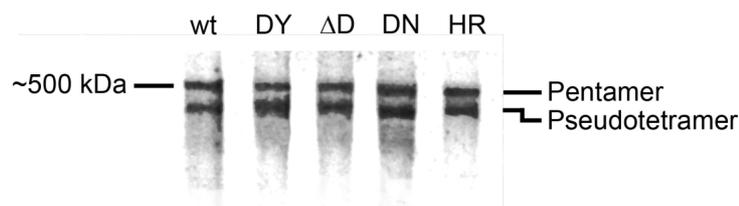


Abbildung 24: Rekombinantes COMP nach der Aufreinigung. Das Eluat aus der Affinitätschromatographie wurde eingeeengt und mittels Gelfiltration (Sepharose CL-6B) wurden kleinere Proteinfragmente aus dem Gemisch entfernt. In der Coomassie-Färbung der SDS-PAGE (3-12 %, nicht-reduzierend) sieht man nun lediglich die Pentamere und Pseudotetramere als prominente Banden.

Strukturanalyse mittels Circular-Dichroismus Spektroskopie

Die Mutationen könnten die Struktur von COMP verändert haben. Aus diesem Grund wurde nach der Aufreinigung der COMP-Konstrukte deren Sekundärstruktur mittels Circular Dichroismus-Spektroskopie (CD) analysiert. Diese Methode ist besonders geeignet, wenn man das Protein bezüglich verschiedener Parameter, z.B. Ionenkonzentration, Temperatur oder Anwesenheit eines Interaktionspartners, auf Veränderungen in der Struktur untersucht. Da COMP in der Lage ist über seine T3 Domänen Calcium zu binden, wurde die Struktur der verschiedenen Konstrukte in Abhängigkeit der Calciumkonzentrationen gemessen. Anschließend sollte untersucht werden, ob eine mögliche Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung reversibel ist. In Abbildung 25 sind die Spektren aller COMP Varianten zwischen 195 und 250 nm Wellenlänge dargestellt. Das Spektrum ohne Ca^{2+} -Zugabe von wt COMP verläuft wie ein charakteristisches Thrombospondin-Spektrum mit einem Minimum bei 205 nm. Durch Zugabe von 0,25 mM CaCl_2 (f.c.) verstärkt sich die Elliptizität bei ca. 220 nm. Eine drastische Veränderung erfolgt nach Zugabe von 1,5 mM CaCl_2 (f.c.). Die Elliptizität bricht vollständig ein. Dieser Effekt ist durch EDTA-Zugabe nicht reversibel. Um zu überprüfen, ob das Protein nach Calciumzugabe präzipitiert, wurde die Probe für 30 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mittels einer SDS-PAGE und einer Coomassie-Färbung analysiert. Dabei konnte kein Protein mehr nachgewiesen werden, was für eine Präzipitation spricht. Bei DY COMP verlaufen das Ausgangsspektrum und das Spektrum nach 0,25 mM CaCl_2 -Zugabe nahezu deckungsgleich. Bei Zugabe von 1,5 mM CaCl_2 erfolgte im Gegensatz zum wt eine Erhöhung der Elliptizität bei 220 nm. Der dramatische Rückgang der Elliptizität ereignete sich bei der Zugabe von 3 mM EDTA. Die DN COMP Spektren sind mit denen von DY COMP zu vergleichen. Die Ausgangskurve unterscheidet sich nicht von der Kurve nach Zugabe von 0,25 mM CaCl_2 . Wie auch bei DY verändert sich die Kurve leicht bei Zugabe von 1,5 mM CaCl_2 . EDTA bewirkt eine Reduzierung der Elliptizität, jedoch keinen totalen Signalverlust wie bei wt oder DY COMP. Die Spektren von ΔD COMP verändern sich in Anwesenheit von Ca^{2+} nur unwesentlich. EDTA bewirkt eine vernachlässigbare Abnahme der Elliptizität. Die Spektren von HR COMP sind mit denen von ΔD vergleichbar, da auch sie nahezu deckungsgleich sind. Das wt COMP scheint im Gegensatz zu mutierten Proteinen verstärkt sensitiv gegenüber einer erhöhten Calciumkonzentration zu sein. Bei DY und DN COMP entstehen bei hohen Calciumkonzentrationen leichte Veränderungen im Kurvenverlauf, dagegen sind ΔD und HR unempfindlich gegenüber Calcium- und EDTA-Zugabe.

Der Einfluss von Temperatur auf Proteine lässt sich mit der CD-Spektroskopie messen. Dabei wird bei einer konstanten Wellenlänge ein langsam ansteigender Temperaturgradient angelegt und die Elliptizität gemessen. Das Schmelzverhalten der Proteine von 20 bis 80 °C belegen eine überraschende Stabilität aller Konstrukte bezüglich hoher Temperaturen (hier nicht gezeigt). Es konnte kein stufenartiger Verlauf der Messkurve beobachtet werden, wie es für einige Proteine bei Erreichen ihrer Denaturierungstemperatur typisch wäre.

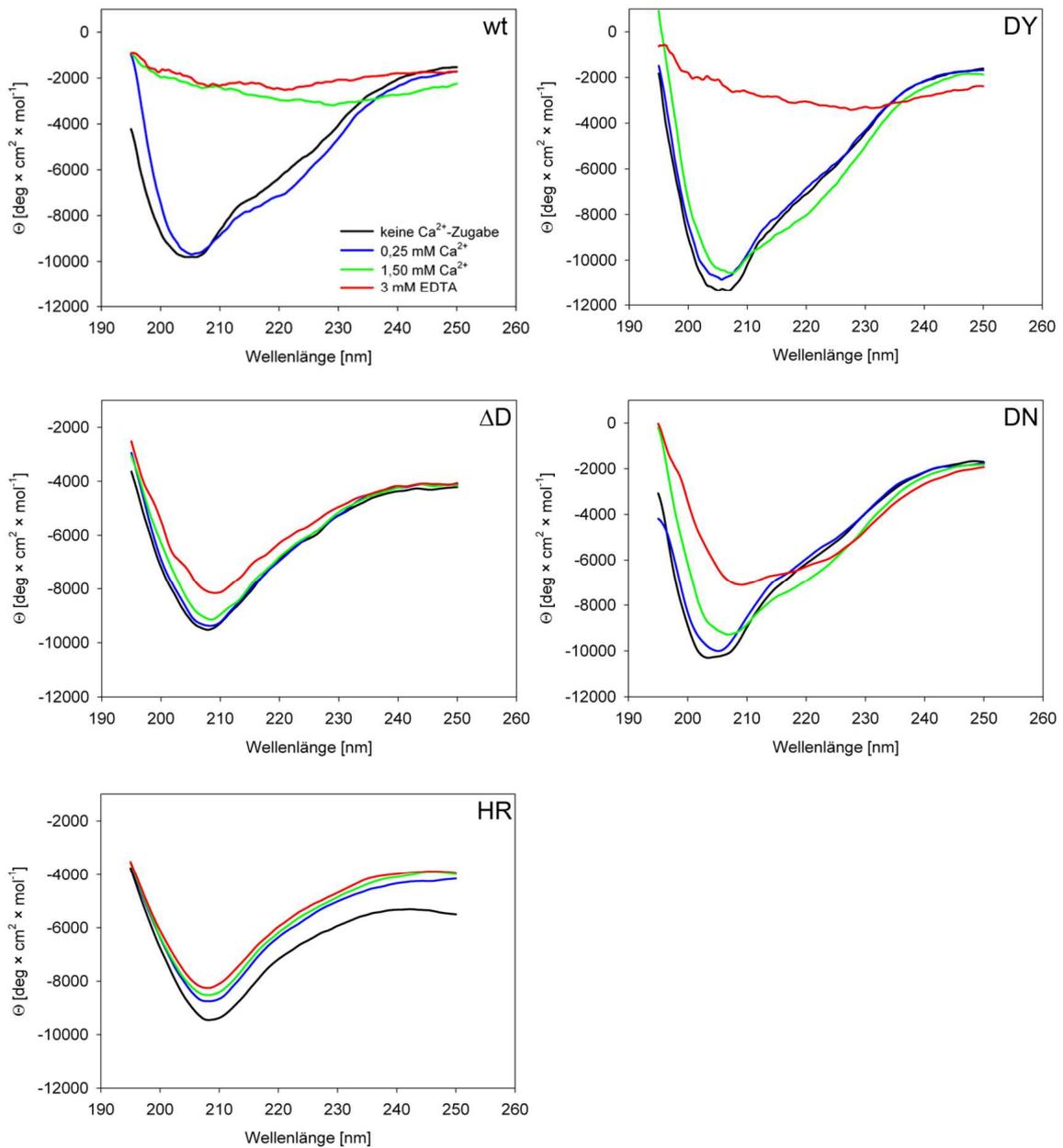


Abbildung 25: CD-Spektren rekombinanter COMP-Proteine. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml in 5 mM Tris (pH 7,4) gelöst (schwarze Kurve) und anschließend CaCl_2 (0,25 mM, blau; 1,5 mM, grün) und EDTA (rot = 3 mM) zugegeben. Besonders auffällig ist der drastische Verlust der Elliptizität bei wt COMP. Bei DY erfolgt der Verlust des CD-Signal bei EDTA-Zugabe. Die Spektren von ΔD , DN und HR COMP verändern sich weder durch Zugabe von Calcium noch EDTA wesentlich.

Aus den gemessenen CD-Spektren lassen sich mittels spezieller Software die relativen Verteilungen der Sekundärstrukturelemente berechnen. Die frei verfügbaren Programme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind *online* (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html>) erhältlich. Es wurden hier drei der zur Verfügung stehenden Programme verglichen: Contin, Selcon und K2D. Sie unterscheiden sich vor allem in ihren Berechnungsroutinen. Contin und Selcon vergleichen die eingegebenen Daten mit denen von strukturell bereits durch Röntgen-Kristallografie aufgelösten Proteinen. K2D ist ein Programm, welches auf virtuellen neuronalen Netzwerken beruht. In der nachfolgenden Tabelle sind die Resultate der Berechnungen mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen angegeben. Die Verteilung der Sekundärstrukturelemente ist weitest gehend konstant und ändert sich nur um wenige Prozent nach Zugabe von Ca^{2+} oder EDTA. Die Programme Contin und Selcon ergeben diesbezüglich bis auf kleinere Abweichungen übereinstimmende Ergebnisse. Die Gewichtung ist bei K2D anders, weil das Programm im Gegensatz zu Contin und Selcon keine β -Schleifen berechnet. Es zählt diese mit zu den ungeordneten Strukturen und unterscheidet somit nur zwischen α -Helix und β -Faltblatt. Bei diesen Programmen verwundert, dass es trotz des drastischen Elliptizitätseinbruches von wt bei 1,5 mM Ca^{2+} und EDTA immer noch Sekundärstrukturen berechnet. Die Werte für β -Faltblätter steigen dadurch um ca. zehn Prozentpunkte. An dieser Stelle hat K2D einen entscheidenden Vorteil bei der Evaluation der Spektren: es gibt die Zuverlässigkeit zu jedem Ergebnis an. Diese wird für wt COMP nach 1,5 mM CaCl_2 - oder EDTA-Zugabe als nicht vertrauenswürdig eingestuft. Auch das Ergebnis zu DY COMP nach EDTA-Zugabe wird als unglaubwürdig eingestuft (in der folgenden Tabelle rot unterlegt) und daher nicht gewertet. Die entsprechenden Resultate von Contin und Selcon werden ebenfalls nicht berücksichtigt. Daher ist eine Erhöhung des β -Faltblattanteils nicht gegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wt COMP bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen ausfällt, wo hingegen alle mutierten COMP-Varianten keine Ca^{2+} -Abhängigkeit aufweisen. EDTA bewirkt eine mehr oder weniger ausgeprägte Verringerung der Elliptizität bei wt, DY und DN. ΔD und HR sind gegenüber An- und Abwesenheit von Calcium völlig unempfindlich. Die Unterschiede, die in Spektren zu erkennen waren, konnten von den verwendeten Vorhersageprogrammen nicht eindeutig als Strukturveränderungen eingestuft werden.

Tabelle 6: Relative Verteilung der Strukturelemente der COMP Varianten. Alle Proteine wurden mit 0,25 mM und 1,5 mM CaCl₂ sowie mit 3 mM EDTA versetzt, um den Einfluss der Kationen auf die Sekundärstruktur zu ermitteln. Die Anteile der Strukturelemente α -Helix (H), β -Faltblatt (F), β -Schleifen (S) und die ungeordneten Anteile (U) wurden mit den Programmen Contin, Selcon und K2D berechnet (*online* erhältlich unter <http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>). K2D gibt eine Treffgenauigkeit an. Die rot unterlegten Ergebnisse in der Tabelle sind als nicht vertrauenswürdig eingestuft worden und können nicht gewertet werden. Diese Einschätzung sollte auf die Resultate der anderen Programme übertragen werden. Entsprechende Werte werden daher auch als unglaubwürdig eingestuft.

Contin	0 mM Ca					0,25 mM Ca			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	17	26	25	33	19	24	26	30
	DY	20	24	25	32	21	22	26	30
	Δ D	19	25	25	31	16	29	22	34
	DN	19	36	26	32	14	30	22	35
	HR	11	23	35	32	12	19	31	41
	1,5 mM Ca					3 mM EDTA			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	12	33	26	29	10	33	26	31
DY	21	23	25	31	14	33	26	26	
Δ D	14	31	25	31	19	39	28	30	
DN	15	8	17	50	16	31	26	27	
HR	11	19	34	39	9	21	33	37	
Selcon	0 mM Ca					0,25 mM Ca			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	16	27	23	35	19	25	23	33
	DY	19	25	24	34	19	26	23	33
	Δ D	18	26	23	34	16	27	22	33
	DN	16	26	23	34	14	30	22	33
	HR	17	27	23	33	16	28	24	32
	1,5 mM Ca					3 mM EDTA			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	9	42	23	27	12	43	21	24
DY	22	23	23	33	20	40	19	21	
Δ D	20	26	24	31	15	27	24	35	
DN	20	26	25	29	18	28	26	29	
HR	16	30	24	31	16	29	24	31	
K2D	0 mM Ca					0,25 mM Ca			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	10	35	--	56	17	26	--	57
	DY	18	26	--	56	16	27	--	57
	Δ D	10	34	--	55	10	35	--	55
	DN	10	35	--	56	10	35	--	56
	HR	23	19	--	58	17	26	--	57
	1,5 mM Ca					3 mM EDTA			
		H	F	S	U	H	F	S	U
	wt	15	32	--	53	13	36	--	51
DY	22	21	--	57	15	32	--	53	
Δ D	24	18	--	58	12	32	--	56	
DN	18	26	--	57	21	22	--	57	
HR	16	27	--	57	16	27	--	57	

COMP als Chaperon für Collagen-Fibrillogenese

Wie eingangs erwähnt, wird für COMP eine Rolle bei der Fibrillogenese diskutiert. Um dies genauer zu untersuchen und einen eventuellen Effekt der Mutationen zu analysieren, wurden Fibrillogenese-Experimente durchgeführt. Die verschiedenen COMP-Konstrukte wurden für drei Stunden bei 37 °C mit Collagen I inkubiert. Während dieser Zeit wurde die optische Dichte der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 313 nm gemessen. Ein Reaktionsansatz von 200 µl enthielt jeweils 0,4 µg COMP und 36 µg Collagen I. Dabei kam es zu einem Anstieg der Absorption. Im folgenden Diagramm ist der zeitliche Verlauf der Trübung der Proteinlösung mit allen COMP-Konstrukten dargestellt.

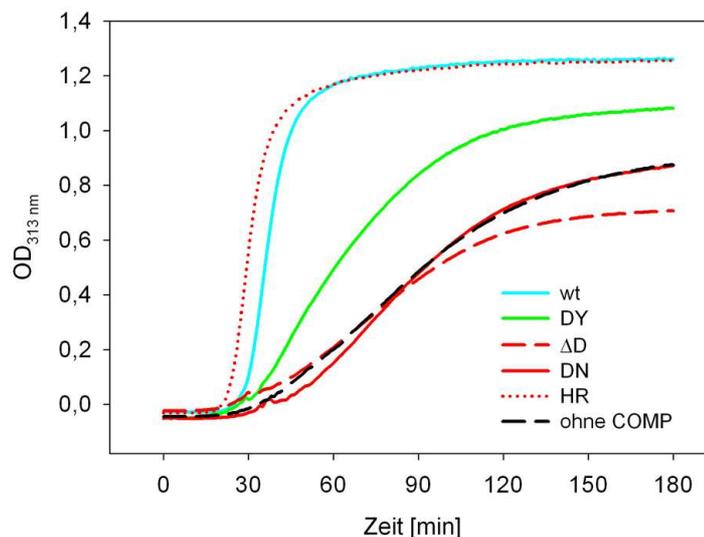


Abbildung 26: Einfluss von COMP auf die Fibrillogenese von Collagen I. Die verschiedenen COMP-Konstrukte wurden in einem Verhältnis von 1:90 mit Collagen I inkubiert. Die optische Dichte wurde über die Zeit gemessen. Die beobachtete zunehmende Trübung entspricht einer Organisation zu höheren Strukturen. Collagen I besitzt die intrinsische Eigenschaft der Fibrillogenese, wie die Negativkontrolle ohne Zugabe von COMP demonstriert (schwarze Kurve). Gibt man wt COMP hinzu (blaue Kurve), so wird der Prozess beschleunigt. Die PSACH-assoziierten Mutanten ΔD (rot gestrichelt) und DN (rot) verlangsamen den Vorgang bzw. beeinflussen seine Geschwindigkeit im Vergleich zur Negativkontrolle nicht. Die DY Kurve (grün) verläuft zwischen wt und Negativkontrolle. Besonders hervorzuheben ist die Kurve von HR (rot gepunktet). Die Geschwindigkeit ist hier gegenüber COMP erhöht. Über die Qualität der entstandenen Strukturen wird hier noch keine Aussage getroffen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Hansen (Münster) durchgeführt.

Collagen I besitzt die intrinsische Fähigkeit zur Fibrillogenese. Deshalb entstehen mit der Zeit auch höhere Strukturen, wenn Collagen allein in Lösung vorliegt (schwarz gestrichelte Kurve). Die beiden PSACH-assoziierten Mutationen ΔD (rot gestrichelt) und DN (durchgezogenes rot) scheinen kaum Einfluss auf die Fibrillogenese zu nehmen. Im Vergleich dazu zeigt das wt Protein eine starke Beschleunigung der Strukturbildung. Schon nach ca. 40 min erreicht die Trübung ihren halbmaximalen Wert, während sie bei der Kontrolle, ΔD und DN erst nach über 80 min halbgesättigt ist. Die DY Mutante erweist sich wiederum als eine Protein-Variante mit intermediären Eigenschaften. Überraschenderweise beschleunigt die HR Mutante die

Strukturbildung noch mehr als es für das wt Protein der Fall ist. Der halbmaximale Wert ist schon unter 40 min erreicht. Das Experiment ermöglichte lediglich Erkenntnisse über die Reaktionskinetik. Um die Qualität der entstandenen Strukturen zu beurteilen, wurden die Endprodukte elektronenmikroskopisch analysiert. COMP wurde mittels Gold-markierter Antikörper nachgewiesen (siehe Pfeilspitzen). Es entstanden sowohl bei der Kontrolle (ohne Zugabe von COMP) als auch bei der Zugabe von wt COMP gut organisierte Collagen I Fibrillen mit regelmäßigen Banden. COMP konnte auf den Fibrillen detektiert werden. Collagen I, welches mit HR COMP inkubiert wurde, bildete dagegen unregelmäßige Strukturen aus. Es entstanden Fibrillen, die erheblich in ihrem Durchmesser variieren sowie diffuse netzartige Collagenstrukturen. Auf beiden Strukturen konnte COMP nachgewiesen werden (siehe Pfeilspitzen).

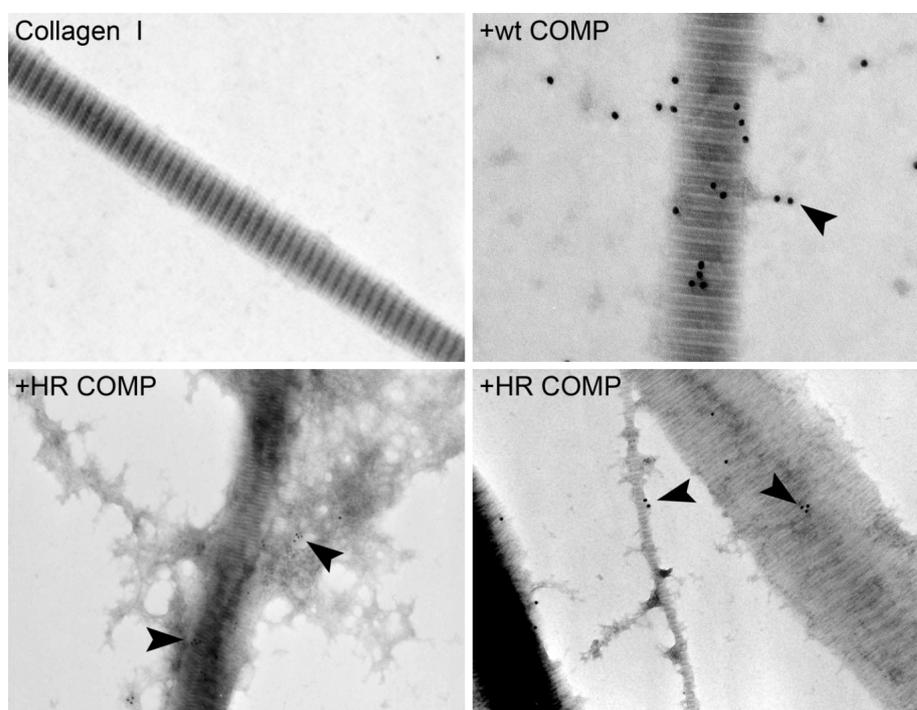


Abbildung 27: Einfluss von mutiertem COMP auf die Fibrillogenese. Collagen I wurde mit wt oder HR COMP im Verhältnis 1:90 für drei Stunden bei 37 °C inkubiert und elektronenmikroskopisch untersucht. COMP wurde immunologisch mit Gold-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen (siehe Pfeilspitzen). Ohne und mit Zugabe von wt COMP entstehen gut organisierte, charakteristisch gestreifte Fibrillen. Die Zugabe von HR COMP bewirkt dagegen eindeutige Veränderungen in der Struktur der Fibrillen.

COMP hat auch einen Einfluss auf die Fibrillogenese von Collagen II und XI. Analog zum bereits beschriebenen Versuch wurde die der Einfluss von wt und HR COMP auf die Fibrillenbildung untersucht. Die Linien verzeichnen einen linearen Anstieg, im Gegensatz zu den Messergebnissen bei Collagen I (Abb. 28). Wt und HR haben die gleiche Steigung, die Werte für HR liegen aber stets höher. Die Kontrollprobe ohne COMP-Zugabe hat eine geringere Steigung. Die optische Dichte ist geringer als beim obigen Experiment, weil die entstehenden Fibrillen kleiner sind und daher das Licht weniger streuen. Die Fibrillen und die Fibrillen mit wt COMP Zugabe waren gut strukturiert. Durch HR COMP Zugabe ergab sich ein heterogenes Bild. Die Fibrillen waren zum einen verbreitert gegenüber normalen Fibrillen. Zum Anderen entstanden diffuse netzartige Strukturen.

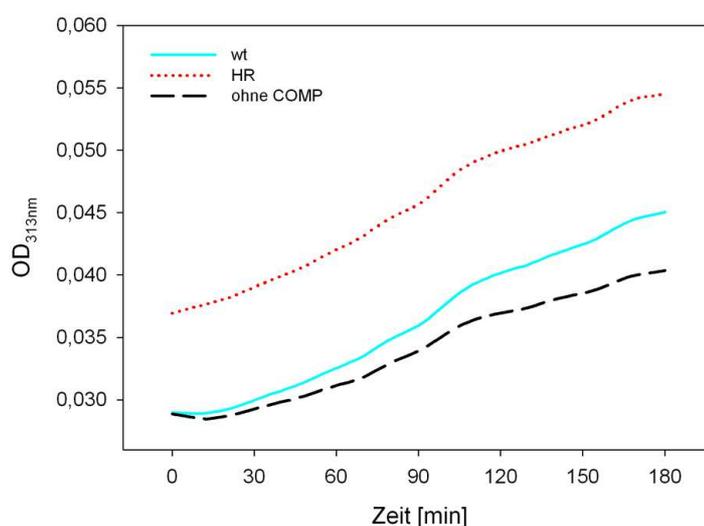


Abbildung 28: Einfluss von COMP auf die Fibrillogenese von Collagen II/XI. wt bzw. HR COMP wurden mit Collagen II und XI im Verhältnis von 1:120:15 bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde über die Zeit gemessen. Es ist eine Zunahme lichtstreuender Strukturen zu beobachten. Die schwarze Linie dokumentiert die intrinsische Fibrillogenese. In blau ist wt COMP und rot gepunktet HR COMP dargestellt. Bei beiden COMP Varianten ist die Geschwindigkeit der Zunahme der optischen Dichte gleich hoch. Die optische Dichte der HR COMP Probe ist aber stets höher. Die intrinsische Fibrillogenese ist im Vergleich langsamer. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Hansen (Münster) durchgeführt.

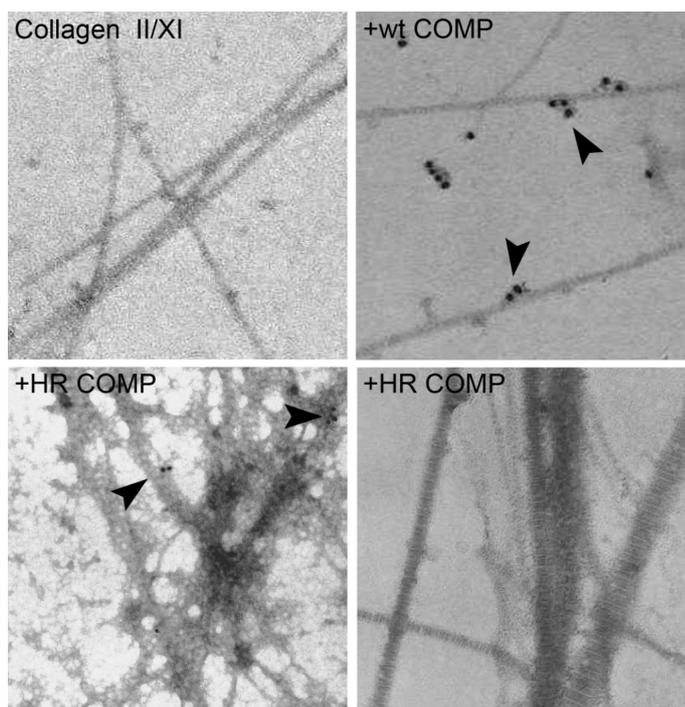


Abbildung 29: Einfluss von mutiertem COMP auf die Fibrillogense von Coll II/XI. Collagen II und XI wurden mit wt oder HR COMP im Verhältnis 1:120:15 für drei Stunden bei 37 °C inkubiert und elektronenmikroskopisch untersucht. COMP wurde immunologisch mit Gold-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen (siehe Pfeilspitzen). Ohne und mit Zugabe von wt COMP entstehen organisierte, charakteristisch gestreifte Fibrillen. Die Zugabe von HR COMP bewirkt dagegen eindeutige Veränderungen in der Struktur der Fibrillen. Es entstehen diffuse Collagenstrukturen und verbreiterte Fibrillen.

ELISA-artige Bindungsstudien mit Collagen IX und COMP-Varianten

Da Collagen IX kein Fibrillen-bildendes Collagen ist, wurden zur Untersuchung der Bindungseigenschaften mit COMP ELISA-artige Experimente durchgeführt. Sie ergaben vergleichbare Bindungseigenschaften aller COMP Varianten an Collagen IX. Mikrotiterplatten wurden hierfür mit Collagen IX beschichtet und die COMP-Varianten in einer Konzentrationsreihe als Ligand zugegeben. Zum Nachweis des gebundenen COMP wurde der *myc*-Antikörper verwendet, der mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper detektiert wurde. Die Messwerte wurden in Abbildung 30 gegen die COMP-Konzentration ausgetragen.

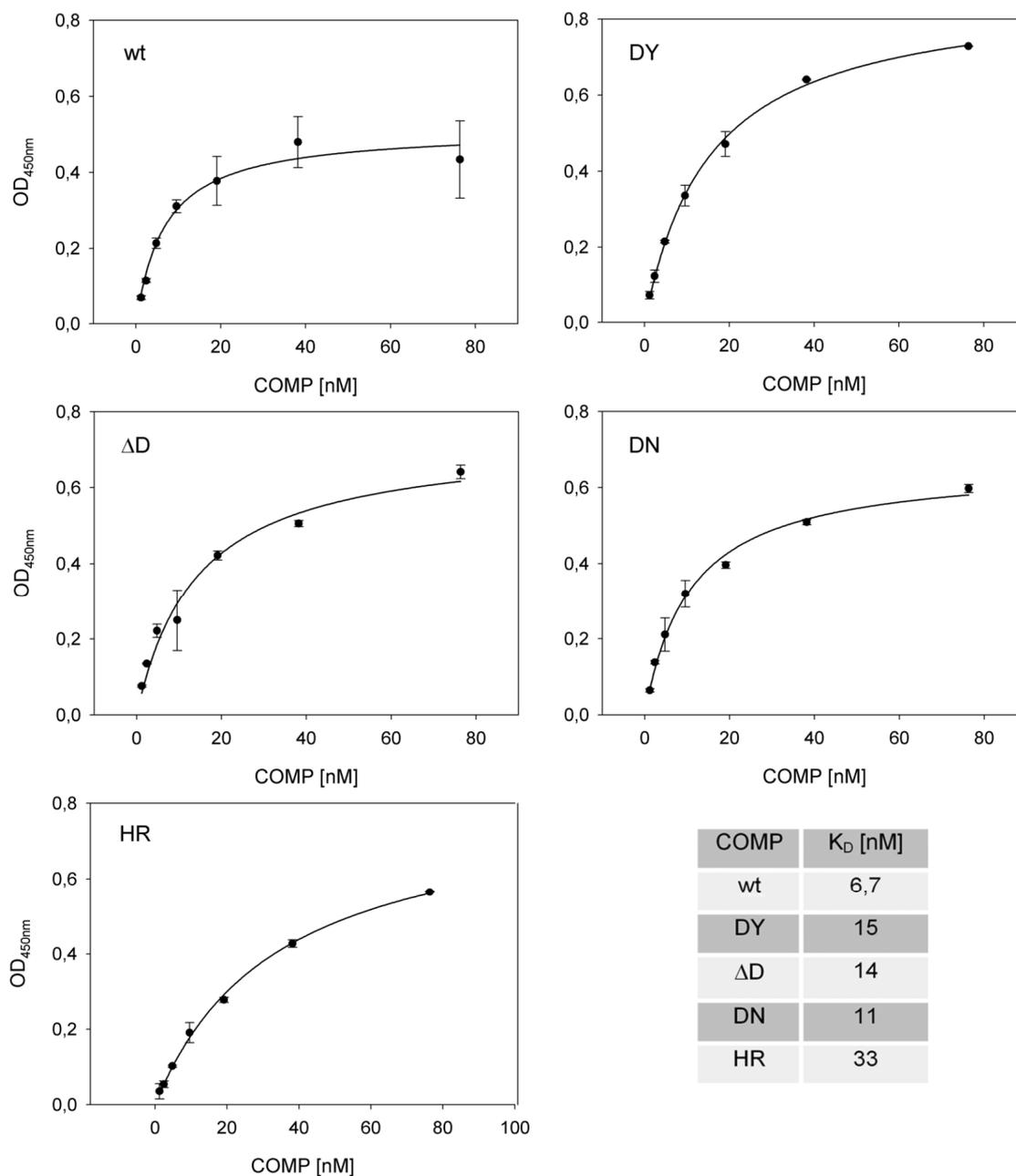


Abbildung 30: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von COMP Varianten an Kollagen IX. Mikrotiterplatten wurden mit $5 \mu\text{g}$ Kollagen beschichtet und mit 0-80 nM COMP in TBS mit $0,5 \text{ mM Zn}^{2+}$ inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen. Die apparenten k_D -Werte der COMP-Varianten, die anhand der Diagramme berechnet wurden, unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Sie entsprechen den in der Literatur bekannten Werte.

Zellanhaftungsexperimente

Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse belegen, dass mutiertes COMP gravierende Störungen in der extrazellulären Matrix verursacht. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von extrazellulärem COMP auf frisch isolierte bovine Chondrocyten eingehender untersucht. Dazu wurden Mikrotiterplatten mit rekombinantem COMP in wt und mutierter Form beschichtet. Mit Chondrocyten wurde anschließend ein Zellanhaftungsexperiment durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Fibronectin, dessen Wirkung als Zellanhaftungsprotein für Chondrocyten bekannt ist. Als Negativkontrolle wurde bovines Serumalbumin verwendet. Die Chondrocyten wurden für 20 h auf den Mikrotiterplatten inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert, mit Kristall Violet gefärbt und fotometrisch ausgewertet. Die optische Dichte wurde im folgenden Diagramm gegen die verwendete Protein-Konzentration aufgetragen.

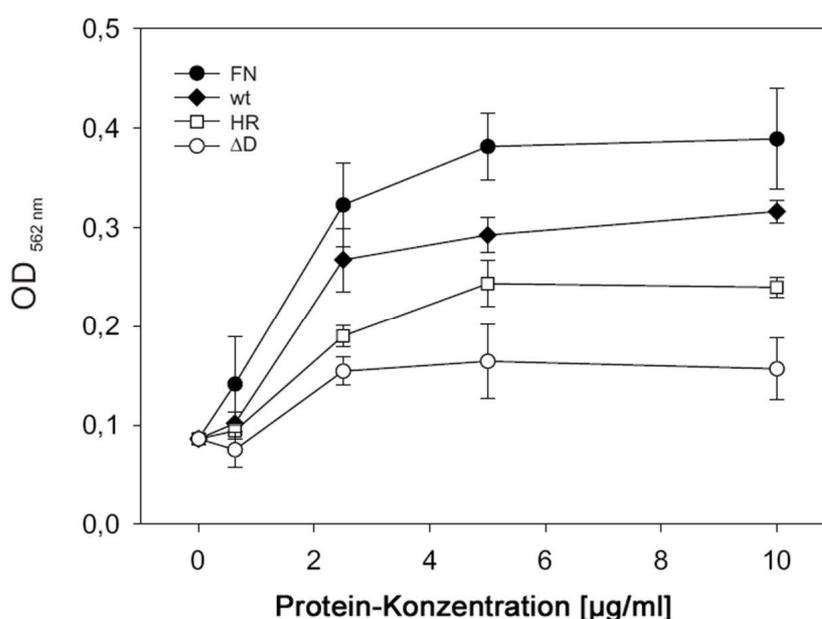


Abbildung 31: Einfluss von mutiertem COMP auf die Zellanhaftung von Chondrocyten.

Mikrotiterplatten wurden mit einer Konzentrationsreihe von wt (schwarzer Rhombus), ΔD (weißer Kreis) und HR (weißes Quadrat) COMP sowie Fibronectin (FN, schwarzer Kreis) und BSA (bovines Serumalbumin) beschichtet. Bovine Chondrocyten wurden für 20 h auf die Platten gegeben. Anschließend wurden sie fixiert, mit Kristall Violet gefärbt und fotometrisch ausgewertet. Die Zellen haften auf wt COMP besser an als auf mutierten Varianten (ΔD , HR). BSA diente als Negativkontrolle dessen Werte von allen anderen subtrahiert wurden.

Die Chondrocyten hafteten konzentrationsabhängig auf Fibronectin (schwarzer Kreis) und den COMP-Konstrukten. Bezüglich der COMP-Konstrukte hafteten die Zellen am besten an wt COMP (schwarzer Rhombus), gefolgt von HR (weißes Quadrat) und ΔD (weißer Kreis). Dies wird auch in den lichtmikroskopischen Aufnahmen deutlich, die in der folgenden Abbildung zusammengefasst sind.

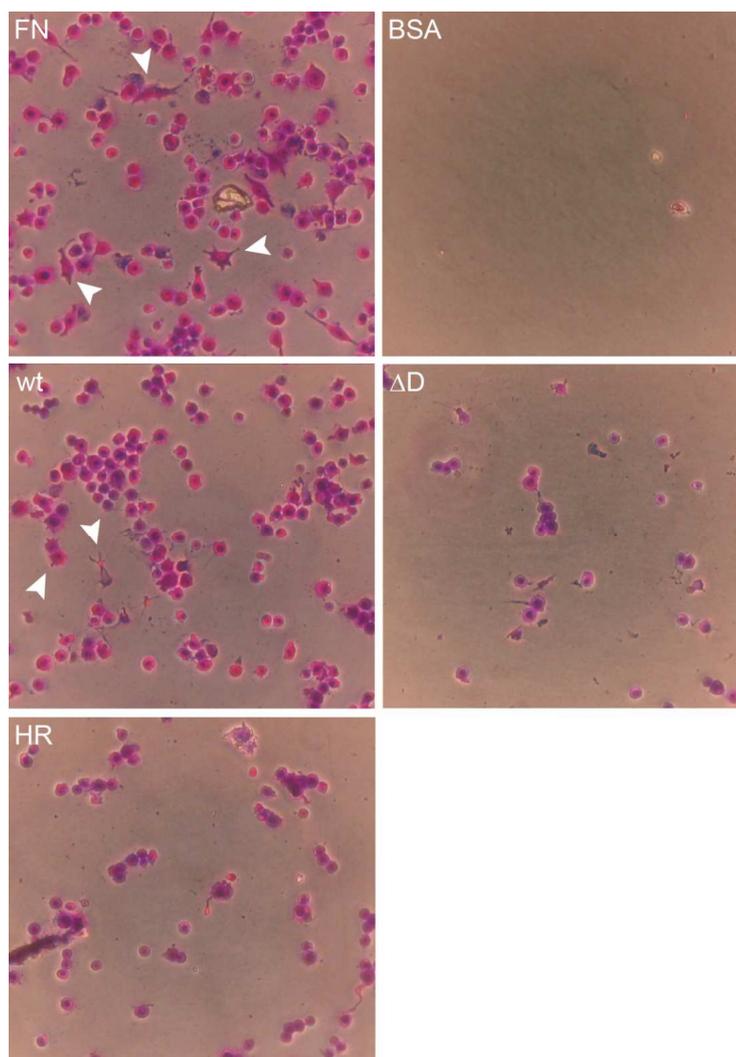


Abbildung 32: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach dem Zellanhaftungsexperiment. Die Bilder zeigen bovine Chondrocyten nach 20-stündiger Inkubation auf Fibronektin (FN), BSA und den COMP Konstrukten wt, Δ D und HR. Die Proteinkonzentration lag jeweils bei 10 μ g/ml. Bei FN und wt COMP haften im Vergleich zu den COMP Mutanten deutlich mehr Zellen an und bildeten im Gegensatz zu den Mutanten bereits Zellfortsätze aus (Pfeilspitzen). Auf der Negativkontrolle mit BSA setzen sich nahezu keine Zellen ab.

Die Chondrocyten, die auf Fibronektin ausgesät wurden, beginnen nach 20 h mit der Spreizung. Bei Zellen, die auf wt COMP inkubiert wurden, ist dies in Ansätzen zu sehen. Eine solche Ausbreitung der Zellen kann man bei Δ D und HR COMP nicht beobachten. An diesen Konstrukten haften deutlich weniger Zellen auf der Mikrotiterplatte als bei wt COMP, auf der Negativkontrolle mit BSA können nahezu keine Zellen anhaften.

Einfluss des Signalpeptids auf die Sekretion von mutiertem COMP

Im Laufe der vorgelegten Arbeit konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das verwendete Signalpeptid durchaus einen Einfluss auf die Sekretion von mutiertem COMP haben könnte. Um auszuschließen, dass dies auch für die hier verwendeten primäre Zellen gilt, wurde die Sekretion sowohl mit dem BM40 als auch mit dem endogenen COMP-Signalpeptid untersucht. Hierfür wurde neben dem wt COMP die Sekretion von ΔD COMP untersucht, einer Variante, die durch eine gestörte Sekretion auszeichnet.

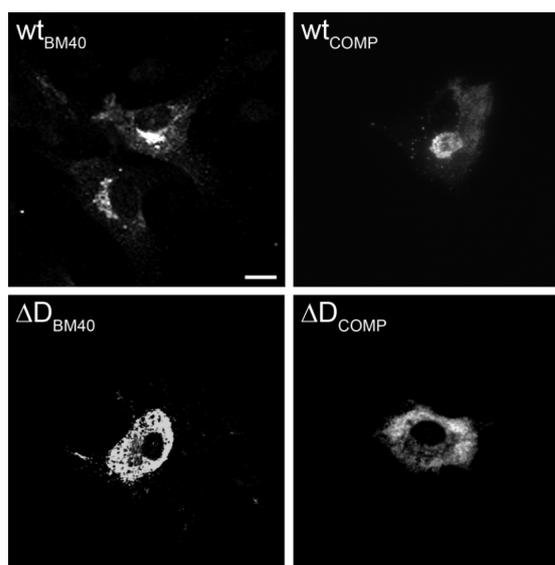


Abbildung 33: Einfluss des Signalpeptids auf die Sekretion von COMP in bovinen Chondrocyten. Für den Vergleich der Signalpeptide wurden die Zellen Plasmid-transfiziert. Die cDNA-Konstrukte wt und ΔD COMP unterschieden sich bezüglich des Signalpeptids (BM40 bzw. COMP). Die rekombinanten Proteine wurden entweder mit einem *myc*-Antikörper (BM40-Signalpeptid, linke Spalte) oder mit einem *his*₆-Antikörper (COMP-Signalpeptid, rechte Spalte) detektiert. Sowohl bei wt als auch bei ΔD COMP hat das Signalpeptid keinen Einfluss auf die intrazelluläre Färbung. Das wt COMP Signal entspricht einer Golgi-Färbung, während ΔD COMP sich im ER befindet. Der Balken entspricht 5 μ m.

Bezüglich der intrazellulären Lokalisation von rekombinant exprimierten COMP-Konstrukten konnten keine Unterschiede zwischen dem BM40- und dem COMP-Signalpeptid beobachtet werden. In allen Fällen entsprach die Färbung zuvor erarbeiteten Ergebnissen. Es wurde eine Co-Lokalisation mit dem Golgi Apparat für wt COMP festgestellt. Das Signal für ΔD COMP entspricht einer Färbung des ER.

Für primäre bovine Chondrocyten konnte somit ausgeschlossen werden, dass das Signalpeptid einen Einfluss auf die Sekretion hat. Alle bisherigen Ergebnisse können also als physiologisch vergleichbar betrachtet werden.

Sekretion von COMP in murinen Chondrocyten

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von COMP und dessen Rolle bei der Pathogenese von PSACH und MED werden bereits murine Modelle verwendet. Es existieren sowohl COMP defiziente als auch transgene Mäuse, die eine PSACH-assoziierte COMP-Mutation überexprimieren. Um festzustellen, ob die bisher beschriebenen Ergebnisse von bovinen Zellen auch auf murine Chondrocyten zu übertragen sind, sollte die Sekretion von mutiertem COMP in primären murinen Chondrocyten untersucht werden. Wie eingangs beschrieben war die Anzahl der erhältlichen Chondrocyten ein limitierender Faktor. Nachdem nun aber optimale Kultur- und Versuchsbedingungen gefunden waren, sollten wesentliche Versuche in murinen Chondrocyten wiederholt werden. Die Zellen wurden aus dem Sternum neugeborener Mäuse (bis zu 3 Tage alt) gewonnen. Murine Chondrocyten wurden drei Tage nach Isolation mit COMP-cDNA transfiziert (wt, Δ D, HR COMP), die das COMP-Signalpeptid enthielt. Die intrazelluläre Verteilung von rekombinantem COMP wurde anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Auch hier wies wt COMP eine charakteristische Golgi-Färbung auf, ebenso wie mit HR COMP transfizierte Zellen. In den Proben zu beiden Proteinen wurden Zell-Cluster beobachtet, die ein ausgeprägtes extrazelluläres Netzwerk ausbildeten, welches rekombinantes COMP enthält. Diese Beobachtung zeigte nochmals, dass die murinen Chondrocyten ein besonders attraktives Modell zur Analyse der ECM darstellen. COMP wird nicht nur sekretiert, sondern auch in die ECM eingebaut. Ein solches Netzwerk war bei Δ D COMP transfizierten Zellen nicht zu erkennen. Die entsprechenden Zellen wiesen stets eine intrazelluläre Färbung bezüglich des transgenen Proteins auf. Die Signale entsprachen einer ER-Färbung, Δ D COMP wird also auch von murinen Chondrocyten reteniert. Das Sekretionsverhalten von murinen Chondrocyten steht also im Einklang mit der Sekretion von bovinen Zellen. Die murinen Zellen produzieren im Vergleich wesentlich mehr extrazelluläre Matrix.

Murine und bovine Chondrocyten gleichen sich in der - für die gesamte vorliegende Arbeit - grundlegende Eigenschaft der Sekretion von mutiertem COMP. Die Ergebnisse der bovinen Chondrocyten lassen sich auf die murinen übertragen. Somit stehen zwei attraktive Modelle für die Untersuchung der Pathogenese von PSACH und MED zur Verfügung.

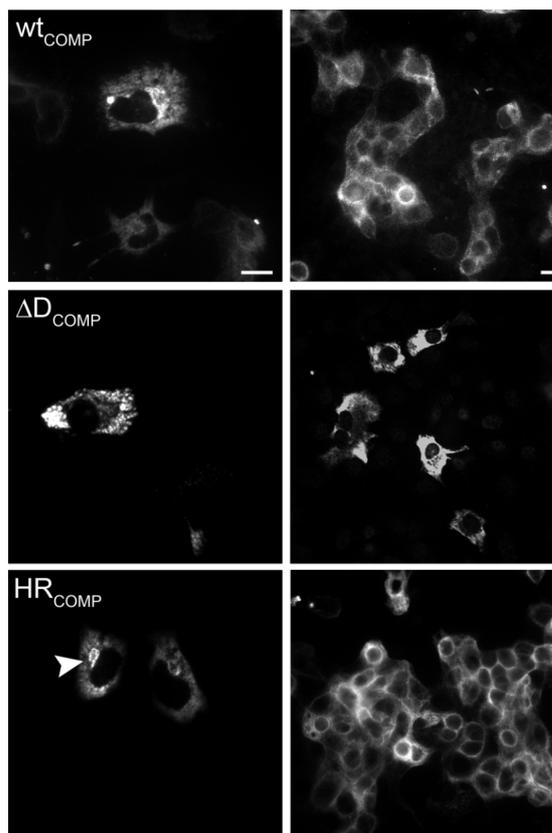


Abbildung 34: Sekretion von mutiertem COMP mit COMP-Signalpeptid bei murinen Chondrocyten. Die Plasmid-cDNA zur Transfektion enthielt das COMP-Signalpeptid. Drei Tage nach der Transfektion erfolgte der Nachweis von rekombinantem COMP. Bzgl. wt und HR COMP wurde es im Golgi Apparat detektiert, während ΔD im ER zu lokalisieren war. Der Balken entspricht 5 μm .

Die murinen Chondrocyten sind mit dem bovinen System vergleichbar. Es können dank verbesserter Isolierung von Chondrocyten genügend murine Zellen gewonnen werden. Das COMP-Signalpeptid wurde erfolgreich in das Arbeitskonzept integriert.

Der Wechsel des Zellkultursystems auf Basis von Chondrocyten neugeborener Mäuse für zukünftige Forschungen ist vielversprechend.

Diskussion

Die Pseudoachondroplasie (PSACH) und die Multiple Epiphysäre Dysplasie (MED) sind zwei konstitutionelle Skeletterkrankungen, die zu disproportioniertem Minderwuchs führen. Zu den klinischen Merkmalen der beiden Dysplasien gehören eine Gangstörung, Bewegungseinschränkungen und Hüftschmerzen. Die Symptome der Krankheiten überlappen, wobei PSACH als die schwerwiegendere Form gilt. Je nach Ausprägungsform sind die Röhrenknochen verschiedenartig betroffen. Die Patienten können plumpe Finger und Zehen aufweisen. Die Extremitäten sind verkürzt und neigen zur Überstreckbarkeit. Zusammen mit einer Fehlstellung der Beine und einer früh einsetzenden Arthrose kommt es zur Abflachung der Hüftgelenke. Der Einsatz einer künstlichen Hüfte ist häufig erforderlich. Der Schädel und der Torso sind bei beiden Krankheiten nicht betroffen.

Während PSACH nur von Mutationen im COMP-Gen ausgelöst wird, entsteht MED durch Mutationen in Collagen IX ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -Kette), Matrilin-3 oder COMP (Czarny-Ratajczak *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 2001; Briggs *et al.*, 1995). Letzteres ist ein nicht-collagenes Protein der extrazellulären Matrix von Knorpel, Bändern und Sehnen. Das ER der Chondrocyten von PSACH- und MED-Patienten ist erweitert und kann lamelläre Strukturen aufweisen (Maddox *et al.*, 1997; Bönnemann *et al.*, 2000). Diese Erweiterungen enthalten neben COMP die Collagene IX, XI und XII sowie die Proteoglycane Decorin und Fibromodulin (Maddox *et al.*, 1997; Vranka *et al.*, 2001). Durch die Anhäufung von COMP im ER ist der Proteintransport dieser Proteine gestört. Die genannten Proteine gelangen verzögert und in geringerer Menge in die extrazelluläre Matrix (Hecht *et al.*, 2004; Schmitz *et al.*, 2006). Andere Proteine, wie Collagen II und VI sowie Aggrecan, sind von dieser Retention nicht betroffen (Vranka *et al.*, 2001). Obwohl der genetische Hintergrund und einige beteiligte Faktoren dieser Krankheiten bekannt sind, wurden die pathogenen Mechanismen noch unzureichend erforscht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellkulturmodelle zur Erforschung der Pathogenese der Pseudoachondroplasie und der Multiplen Epiphysären Dysplasie etabliert. Es wurden Mutationen miteinander verglichen, die z. T. in unterschiedlichen Domänen des Proteins lokalisiert sind sowie PSACH oder MED auslösen. Neben dem Wildtyp Protein (wt) wurden drei PSACH-assoziierte Mutanten (ΔD , DN und HR COMP) und eine MED-assoziierte Mutante (DY COMP) untersucht. Primäre Chondrocyten aus bovinem und murinem Knorpel wurden transfiziert bzw. viral infiziert, um die Eigenschaften der mutierten Proteine in den Zellen zu analysieren.

Zusätzlich wurden die rekombinanten Proteine aufgereinigt, um ihre proteinchemischen Eigenschaften miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit helfen, mögliche pathogene Wirkungen von mutiertem COMP zu verstehen und Zusammenhänge zum Phänotyp der Krankheiten herzustellen. Die Ergebnisse und Zusammenhänge sollen im Folgenden diskutiert werden.

Sekretion der COMP-Konstrukte

Ein grundlegender Aspekt dieser Arbeit ist der Einfluss diverser Mutationen auf die Sekretion von COMP in die extrazelluläre Matrix und die intrazelluläre Verteilung des Proteins. Viele Experimente und deren Interpretation beruhen auf den Ergebnissen der Sekretionsanalysen. Daher wurde die Sekretion mittels unterschiedlicher, unabhängiger Methoden untersucht und untereinander bzw. mit publizierten Daten verglichen. Zum einen wurden gesamte Zellpopulationen mittels Western Blot analysiert, zum anderen wurde auf Einzelzellebene per Immunfluoreszenz die intrazelluläre COMP-Verteilung evaluiert.

Gefällte Zellkulturüberstände und Zellysate transfizierter Chondrocyten wurden elektrophoretisch getrennt und die rekombinant exprimierten Proteine immunologisch nachgewiesen (Abb. 11). Auf diese Weise wurde das Verhältnis von intrazellulär befindlichem COMP zu sekretiertem COMP visualisiert. Bei wt, DY und HR COMP transfizierten Zellen befindet sich mehr COMP in den Kulturüberständen als in den Zellysaten. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei ΔD und DN COMP exprimierenden Chondrocyten in Richtung des Zellysats. Die Sekretion ist aus einem noch nicht genau definierten Grund herabgesetzt. Diese Verhältnisse waren stets reproduzierbar, wenngleich Schwankungen in der Gesamtproteinmenge auftreten konnten. Sie können mit einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden u. a. durch *pulse-chase*-Experimente und Sekretionsversuche mit viral infizierten Chondrocyten erlangt (Dinser *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2006). Untersuchungen mit PSACH/MED-Patientenmaterial wurden ebenfalls unterschiedliche Sekretionsverhalten diverser Mutanten beobachtet. D515G COMP wird im ER retiniert, während keine Defekte bezüglich der Sekretion von G309R, G427E und D446N COMP festgestellt werden konnten (Vranka *et al.*, 2001; Délot *et al.*, 1998). Erst in Langzeitkulturen letzterer Mutationen konnte ein erweitertes ER festgestellt werden.

Nachdem festgestellt worden war, dass ein erheblicher Anteil des mutierten COMP in den Zellen verbleibt, wurde mittels Immunfluoreszenz überprüft, wo sich das intrazelluläre COMP befindet (Abb. 12). Wt und HR COMP wiesen eine Co-Lokalisation mit dem Golgi-Marker-Protein auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass wt und HR COMP ungehindert sekretiert werden. Im Gegensatz dazu weisen die Immunfluoreszenzaufnahmen von ΔD und

DN COMP auf eine gestörte Sekretion hin, da eine Co-Lokalisation mit dem ER-Marker vorhanden war. Die extrazellulären COMP-Färbungen bei ΔD , DN und HR COMP exprimierenden Zellen belegen, dass letztendlich auch mutiertes COMP zu einem gewissen Teil die extrazelluläre Matrix erreicht. Die auffälligen perizellulären Färbungen bei ΔD und HR COMP exprimierenden Zellen können allerdings nicht einer klassischen Matrixfärbung zugeordnet werden. Sie konnten auch nicht bei wt und DY COMP beobachtet werden, was einen Hinweis auf ein unterschiedliches extrazelluläres Verhalten der COMP-Varianten gibt. DY COMP weist sowohl eine Co-Lokalisationen mit dem ER-Marker als auch dem Golgi-Marker. Dieser intermediäre Charakter wird in den weiteren Ergebnissen immer wieder deutlich.

Die Sekretion vom COMP hängt zudem vom exprimierenden Zelltyp ab. So konnte COMP in der extrazellulären Matrix der Sehnen und Bändern von PSACH-Patienten gefunden werden. Es gab keine intrazellulären Einschlüsse in diesen Patientenzellen (Maddox *et al.*, 1997; Maynard *et al.*, 1972). Die Effizienz des Proteintransports von mutiertem COMP ist abhängig vom exprimierenden Zelltyp (Chen *et al.*, 2004). So wiesen COS-1 Zellen, die nicht knorpelverwandt sind, auch keine Sekretionsstörung auf. Chondrosarkomzellen hingegen sekretierten das mutierte Protein verzögert und bildeten intrazelluläre Einschlüsse. Sowohl im Zellkulturmodell als auch bei Patienten wurde eindeutig die Abhängigkeit der Sekretion vom Zelltyps nachgewiesen.

Nicht nur der Zelltyp, sondern auch das Signalpeptid des Proteins könnten einen Einfluss auf die Sekretion von mutierten Varianten haben. Das hier verwendete BM40-Signalpeptid führte in einigen Zelltypen zu einer effizienteren Sekretion als das endogene COMP-Signalpeptid (Holden *et al.*, 2005). Folglich könnte die Sekretion aller untersuchten COMP-Varianten in den hier durchgeführten Experimenten höher sein, als es physiologisch der Fall wäre.

Bei der humanen embryonalen Nierenzelllinie EBNA-293 und Rattenchondrosarkomzellen wurde der beschriebene Effekt deutlich, jedoch sind dies keine primären Chondrocyten und repräsentieren somit nicht den Prototyp COMP produzierender Zellen. Exemplarisch wurde daher hier die Sekretion von wt und ΔD COMP mit den beiden Signalpeptiden verglichen. Die anderweitig beobachtete gestörte Sekretion von mutiertem COMP in EBNA-293 Zellen lies sich nicht reproduzieren. In primären Chondrocyten wurde ΔD COMP reteniert, was auch der Patientensituation am nächsten kommt, da im Knorpel von PSACH-Patienten Einschlüsse gefunden wurden (Hecht *et al.*, 2001).

Um die bisher gewonnenen Ergebnisse von bovinen Chondrocyten und murinen Chondrocyten vergleichen zu können, mussten die grundlegenden Versuche mit Letzteren wiederholt werden. Durch den Einsatz muriner Chondrocyten ließen sich die Ergebnisse mit bereits existierenden COMP-defizienten und transgenen Mausmodellen vergleichen. Auf diese Weise lassen sich *in vitro* und *in vivo* gewonnene Daten konsistent zu einem Modell zusammenführen.

Wichtigster Aspekt ist die Sekretion der COMP-Varianten in murinen Chondrocyten. Diese wurde exemplarisch mit ΔD und HR COMP überprüft. Somit wurde eine Mutation analysiert, die eine Sekretionsstörung verursacht und eine andere, die normal sekretiert wird. Auch hier stimmen die Ergebnisse mit vorherigen überein. Wt COMP wird wie zuvor gesehen sekretiert - gleiches gilt für HR COMP. Beide Proteine können zudem in der perizellulären Matrix nachgewiesen werden. Dies ist bei ΔD COMP nicht der Fall. Das mutierte Protein verbleibt im ER, es konnte zudem keine Färbung der Matrix beobachtet werden.

Die aufgezählten erheblichen Unterschiede im Sekretionsverhalten der einzelnen Mutanten lassen keine Zusammenhänge zur Ausprägung der Krankheiten zu. So führt die MED-assoziierte DY Mutation in COMP nur zu einer leichten Sekretionsstörung, jedoch finden sich unter den PSACH-assoziierten Mutationen solche, die sowohl eine ungehinderte als auch eine gestörte Sekretion aufweisen. Diese Tatsache impliziert, dass zumindest zwischen intra- und extrazellulären pathogenen Mechanismen unterschieden werden muss.

Intrazelluläre Effekte von mutiertem COMP

Möglicherweise entstehen durch die untersuchten Mutationen strukturelle Unterschiede, die von den intrazellulären Kontrollmechanismen erkannt werden. Diese verhindern einen Transport in die Matrix. Dies wird durch die Befunde unterstützt, nach denen im erweiterten ER von PSACH Patienten erhöhte Mengen von faltungsunterstützenden Chaperonen, wie Hsp47, PDI und Calnexin sowie Calreticulin, BiP und Grp94, gefunden wurden (Vranka *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Des Weiteren werden Collagen IX und Matrilin-3 zusammen mit mutiertem COMP im ER zurückgehalten (Merritt *et al.*, 2006). Mutationen in diesen Proteinen können in MED-Patienten bzw. im Zellkulturmodell zu einer erweiterten ER-Morphologie führen (Otten *et al.*, 2005; Bönnemann *et al.*, 2000). Es wurde postuliert, dass es sich bei PSACH und MED um ER-Speicherkrankheiten handele (Duke *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004). Die beobachteten ER-Erweiterung induzieren demnach Apoptose. Diese Aussage muss allerdings angesichts der ungehinderten Sekretion von HR COMP, wie sie in der vorliegenden Arbeit erwiesen wurde, relativiert werden. Wie im Folgenden gezeigt wird, spielt die Apoptose zwar eine erhebliche Rolle bei der Pathogenese, jedoch tragen auch extrazelluläre Einflüsse zum Erscheinungsbild der Krankheiten bei.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl sekretionshemmende als auch diesbezüglich neutrale Mutationen untersucht. Auf Grund von lichtmikroskopischen Bildern konnten keine eindeutigen Unterschiede nach Transfektion mit verschiedenen COMP Mutanten festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde mit drei von einander unabhängigen Methoden der Einfluss der Mutationen COMP auf die Zellvitalität untersucht.

Zunächst belegte der XTT assay für Zellpopulationen, die mit PSACH-assoziierten COMP-Konstrukten (Δ D, DN, HR COMP) transfiziert wurden, ein signifikantes Absinken der metabolischen Aktivität. Zur Klärung der Frage, um welchen Mechanismus des Zelltods es sich handelte, wurden transfizierte Zellen auf Nekrose und Apoptose überprüft. Die Messung der LDH im Zellkulturüberstand ergab keine signifikanten Erhöhungen der Enzymmenge bei den PSACH-assoziierten COMP-Konstrukten. Ein nekrotischer Zelltod wurde hiermit ausgeschlossen. Die geringen Änderungen könnten auch auf Apoptose beruhen, da in späten Stadien der Apoptose LDH aus den toten Zellen entweicht (Riss and Moravec, 2004).

Der TUNEL assay lieferte eindeutige Ergebnisse. Die krankheitsassoziierten COMP-Varianten wiesen im Vergleich zum wtCOMP und zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der Apoptose-Rate auf. Mutiertes COMP beeinflusst folglich durch einen noch weitgehend unbekanntem pathogenen Mechanismus die Zellvitalität und führt zu einer erhöhten Apoptose-Rate. Für die Δ D und DN Mutante wird der gestörte Proteinverkehr und der damit einhergehende ER Stress als wahrscheinliche Ursache diskutiert. Die Konzentration der

phosphorylierten Form des eukaryotischen Initiationsfaktors 2α (eIF2 α) ist in Zellen, die mutiertes COMP (D472Y) exprimieren, erhöht (Hashimoto *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung dieses Translationsfaktors ist Teil der *unfolded protein response* und bewirkt ein Herabsinken der Proteinsyntheserate. Sie ist als Zeichen von Zellstress anerkannt. Und auch hier führte die Expression einer Asparat-Mutante zu einer erhöhten Apoptose-Rate (Hashimoto *et al.*, 2003). HR COMP weist ebenfalls eine erhöhte Apoptose-Rate auf. Diese kann aber nicht durch eine Retention von COMP erklärt werden. Die hier untersuchten COMP-Mutationen lösen folglich nicht alle den gleichen pathogenen Mechanismus aus. Ob es intrazelluläre Veränderungen und vor allem charakteristische Anzeichen der Apoptose in den untersuchten Chondrocyten gab, wurde auf ultrastruktureller Ebene überprüft.

Nicht-transfizierte, mit wt und HR COMP transfizierte Zellen zeichnen sich durch ein schmal verlaufendes ER aus (Abb. 17). Dies steht im Einklang mit den Western Blot Analysen und den Immunfluoreszenzaufnahmen, wonach diese beiden Varianten nicht reteniert werden. Für ΔD COMP exprimierende Zellen wurden erweiterte ER Zisternen in Patienten-Chondrocyten beschrieben von (Hecht *et al.*, 2001). Diese konnten hier auch für DY, ΔD und DN COMP beobachtet werden. Entsprechende Zellen wiesen auch Lipidakkumulationen auf, welche bei HR COMP exprimierenden Zellen ebenfalls existierten. Solche Lipidtropfen konnten ebenfalls in Chondrocyten von MED-Patienten beobachtet werden (Bönnemann *et al.*, 2000) und wurden in anderen Zusammenhang als Anzeichen für Zellstress sein (Kim *et al.*, 2005). Dies ist ein Hinweis, dass auch HR COMP Zellstress auslösen kann, ohne dass es zu Sekretionsstörungen kommt. Daher muss ein extrazellulärer Einfluss in Betracht gezogen werden, worauf später noch eingegangen wird.

Zunächst wurden ultrastrukturelle Analysen mit konventionell Plasmid-transfizierten Chondrocyten durchgeführt. Diese Methode birgt allerdings den Nachteil, dass die Effizienz des Gentransfers niedrig ist. Sie eignet sich für kurzzeitige Experimente und solche, bei denen das rekombinante Protein eindeutig nachweisbar ist (z.B. Immunfluoreszenzen). Dies ist bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen dagegen nur bedingt möglich. Deshalb wurden weiterführende Untersuchungen mit adenoviral transduzierten Chondrocyten durchgeführt, wodurch eine fast 100 %ige Effizienz erreicht werden kann (Dinser *et al.*, 2001). Die hohe Effizienz des Gentransfers wird in den immunhistochemischen Färbungen (Abb. 19) von transduzierten Chondrocyten besonders deutlich.

Zunächst wurde die Bestimmung des optimalen Virustiters durchgeführt. Dabei wurden transduzierte Zellen verglichen, die wt, ΔD oder DN COMP exprimierten. Als Referenz dienten nicht-transduzierte und mit GFP transduzierte (20 MOI) Zellen. Die nicht-transduzierten Zellen wiesen das erwartete schmale ER auf. Das ER der GFP exprimierenden Zellen war im Vergleich dazu geringfügig vergrößert, was mit der Überexpression des Proteins erklärt werden kann. Zellen, die eine hohe Proteinsynthese aufweisen, können durchaus eine veränderte ER-Morphologie aufweisen. Dilatiertes ER ist aber nicht zwangsläufig ein pathogenes Merkmal. So findet man z.B. in Plasma- und Drüsenzellen erweiterte ER-Strukturen (Zucker-Franklin, 1988). Die geringfügige Erweiterung des ER, die bei allen Konstrukten bei 5 MOI beobachtet werden konnte, lässt sich der hohen Expression zuschreiben. Ab einer Virusdosis von 20 MOI wuchs allerdings das ER bei den Mutanten im Gegensatz zum wt COMP sehr stark an (Abb. 18). Die lamellären Strukturen, wie sie für einige Patientenproben beschrieben wurden, wurden hier bei keiner Mutation gefunden (Hecht *et al.*, 1998). Gleiches gilt für beobachtete granuläre Einschlüsse in Zellkulturmodellen von ΔD COMP exprimierenden Zellen (Dinser *et al.*, 2002). Gelegentlich war ein diffuses Netzwerk in den hier untersuchten Zellen zu sehen, welches sich durch ein erweitertes ER auszeichnete. Möglicherweise entstanden die Einschlüsse in diesem Modell nicht, weil ein geringerer Virustiter (20 MOI gegenüber 200 MOI) zur Transduktion verwendet wurde. Möglicherweise benötigt die Entstehung der lamellären Strukturen mehr Zeit. Bei den Patienten ist diese Zeit gegeben, des Weiteren wurde gezeigt, dass nach Langzeitversuchen in *monolayer*-Kulturen intrazelluläre Einschlüsse entstanden (Délot *et al.*, 1998). Die Ausbildung jener Strukturen scheint nicht nur zellspezifisch und zeitabhängig zu sein, sondern auch je nach Mutation zu variieren. So wurden bezüglich der COMP-Mutation G465S und der Matrilin-3-Mutation R121W in Patientenmaterial auch ER-Erweiterungen ohne die charakteristischen lamellären Muster gefunden (Cotterill *et al.*, 2005). Das Fehlen der lamellären Einschlüsse im ER ist ein weiterer Hinweis, dass ein extrazellulärer Einfluss durch die desorganisierte Matrix auf die Pathogenese ebenso ausschlaggebend ist wie intrazelluläre Mechanismen.

Die cytosolischen Auswirkungen nach der Infektion (20 MOI) können den Mutationen zugeordnet werden, da in wt COMP transduzierten Zellen keine auffälligen Veränderungen beobachtet werden konnten. Bei allen krankheitsassoziierten Varianten wurde dagegen eine erhöhte Anzahl von Autophagosomen, Lysosomen und Vakuolen beobachtet. Es kam ebenso zur Ausbildung von Stressfibrillen. Die Autophagosomen sind Zeichen für ER-Stress und Teil des programmierten Zelltods (Kouroku *et al.*, 2006). Sie waren bei allen mit mutierten Konstrukten transduzierten Zellen zu finden. Durch Autophagosomen werden Zellorganellen wie ER, Mitochondrien und Peroxisomen bei Bedarf abgebaut. Sie umschließen mit ihrer

Membran die Organellen, fusionieren mit Lysosomen und verdauen die Organellen. Dabei können multimembrane Strukturen entstehen (Ogata *et al.*, 2006).

Die beobachteten Lysosomen enthalten teils elektronendichtes, teils elektronendurchlässiges Material. Wie sie im Elektronenmikroskop erscheinen, hängt davon ab, welche Strukturen oder Proteine sie verdauen. Die Lysosomen bleiben meist bis zur völligen Auflösung der Zelle intakt. Somit wird verhindert, dass lysosomale Enzyme das umliegende Gewebe angreifen. Dies ist ein charakteristisches Zeichen der Apoptose (Roach *et al.*, 2004).

In Chondrocyten, die mutiertes COMP exprimierten, fanden sich auffällig viele Vakuolen - ein weiteres Merkmal der Apoptose im Knorpel (Aigner *et al.*, 2002). Dadurch erhärtet sich die These, nach der COMP-Mutationen zu Apoptose führen (Duke *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004). Auch die beobachteten Stressfibrillen sind ein mögliches Indiz für apoptotische Vorgänge. Gleiches gilt für die Lipidtropfen, die in erhöhter Zahl auftraten (Roach *et al.*, 2004). Ob die beobachteten intrazellulären Effekte primär durch mutiertes COMP entstehen oder die Apoptose sekundär durch die im Folgenden beschriebenen extrazellulären Effekte induziert wird, ist noch zu klären.

Extrazelluläre Effekte von mutiertem COMP

Die Auswirkungen von mutiertem COMP beschränken sich nicht nur auf den intrazellulären Phänotyp, sondern manifestieren sich auch in der Matrix. Betrachtet man zunächst die immunhistologischen Färbungen der viral infizierten Alginatekulturen (Abb. 19), so fallen die ΔD und DN COMP exprimierenden Kulturen auf. Sie deuten eine intrazelluläre Retention von rekombinantem COMP an. Dies steht im Einklang mit den Western Blot Analysen. Die Matrix von nicht-transduzierten und mit wt COMP transduzierten Zellen verdrängt große Bereiche des Alginats bzw. dringt weit in dessen Zwischenräume ein. Dadurch erscheint die perizelluläre Matrix weiter verbreitet als bei Zellen, welche mutiertes COMP exprimieren. Besonders bei ΔD und DN COMP fällt eine scharf abgegrenzte, kompakte Form der ECM auf. Die geringe Ausbreitung könnte dadurch erklärt werden, dass ein geringer Anteil des mutierten COMP die extrazelluläre Matrix erreicht. Die scharf abgegrenzte Form spricht außerdem eher für eine gestörte Ausbildung der ECM. Alle krankheitsassoziierten Mutationen bewirken Störungen in der extrazellulären Matrix. Die beobachteten dunklen Aggregate entstehen aus kondensierender Matrix (Abb. 20). Sie beinhalten wahrscheinlich viele ECM-Komponenten, da außer den Aggregaten keine weiteren Strukturen, wie Collagenfibrillen oder Proteoglycane, zu sehen sind. Bei den PSACH-assoziierten Mutationen sind die noch Defekte stärker ausgeprägt als bei der MED-assoziierten Mutante DY COMP.

Während die extrazellulären Aggregate bei ΔD , DN und HR COMP die Matrix dominieren, entstehen bei DY COMP zumindest teilweise organisierte Fibrillen, wie sie auch bei nicht-transduzierten und wt COMP exprimierenden Zellen vorkommen. Sie fehlen vollständig bei den PSACH-assoziierten Mutanten, statt dessen war zwischen den elektronendichten Aggregaten ein unstrukturiertes, diffuses Netzwerk zu sehen. Es könnte sich dabei um eine Vorstufe der dichten, extrazellulären Aggregate handeln. Erneut wird somit der intermediäre Charakter von DY COMP deutlich.

Die kondensierte Matrix erklärt die scharfe Abgrenzung bei mutierten COMP-Varianten in den immunhistochemischen Bildern. Sobald eine gestörte Matrix vorliegt, schlägt sich neusynthetisiertes Collagen sofort an den Aggregaten nieder und lässt diese anwachsen. Organisierte Fibrillen können dagegen in die Alginat-Zwischenräume eindringen und somit eine ausgeprägte perizelluläre Matrix aufbauen. COMP fungiert bei der Fibrillogenese von Collagen als Chaperon (Rosenberg, 2001). Demnach bindet es mit seiner bouquet-ähnlichen Struktur an mehrere tripelhelicale Collagene, bringt sie in räumliche Nähe, sodass die Fibrillogenese erfolgen kann. Wenn sich die Fibrille ausgebildet hat, beginnt COMP von der Fibrille zu dissoziieren und diffundiert ins umgebende Medium bzw. den extrazellulären Raum. Die Vermutung lag nahe, dass mutiertes COMP bei dem Prozess der Aggregatbildung eine Rolle spielt.

Der immunologische Nachweis von COMP in der kondensierten Matrix belegt, dass es gehäuft in den Aggregaten vorkommt. Auch die Tatsache, dass kaum ein Signal für das rekombinante Protein bei wt COMP Proben gefunden wurde, lässt sich mit dieser Theorie vereinbaren. Demnach dissoziiert wt COMP von den Collagenfibrillen ins Medium und kann somit nicht mehr nachgewiesen werden. Mutiertes COMP scheint die Fibrillogenese zu stören und führt somit zur Aggregatbildung. Diese Aggregate entsprechen offenbar den extrazellulären, gepunkteten Färbungen, die bei PSACH-assoziierten Mutanten in Immunfluoreszenzfärbungen zu sehen waren (Abb. 12). Ob mutierte Proteinvarianten verstärkt an die extrazellulären Aggregate binden bzw. schlechter dissoziieren, bleibt ungeklärt (Abb. 21). Immer mehr COMP schlägt sich unmittelbar an der perizellulären Matrix nieder und es kommt dadurch zu einer erhöhten extrazellulären COMP-Konzentration. Ob das COMP inert gebunden oder durch die extrazelluläre Akkumulation reaktives COMP lokal konzentriert vorliegt, ist noch unbekannt. Eine erhöhte Konzentration von COMP konnte auch in arthritischem Knorpel (spätes Stadium) festgestellt werden (Koelling *et al.*, 2006). Möglicherweise wird COMP dort zur Geweberegeneration benötigt. Inwieweit dies auch für PSACH und MED gilt, bleibt aufzuklären.

Proteinchemische Analyse mutierter COMP Varianten

Die bisherigen Ergebnisse legen eine Veränderung der Eigenschaften mutierter COMP-Varianten im Zellkulturmodell dar. Die molekularen Grundlagen dieser Veränderungen sind noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die biochemischen Eigenschaften von rekombinant exprimiertem COMP untersucht.

Alle COMP-Varianten wurden in EBNA-293 Zellen exprimiert. Diese Zellen produzieren kein endogenes COMP, sodass keine Mischformen von wt und mutierten COMP Monomeren entstehen konnten. Anders als bei bovinen Chondrocyten gab es für die mutierten Proteine keine Unterschiede bezüglich der Sekretion (hier nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass die Retention von mutiertem COMP ein zelltypspezifischer Vorgang ist, was aus Untersuchungen mit Sehnenzellen ebenfalls hervorgeht (Maddox *et al.*, 1997).

Im Zellkulturüberstand COMP exprimierender EBNA-293 Zellen unterliegt das Pentamer der sukzessiven Abspaltung einzelner Ketten. Die Prozessierung erfolgt zwischen der Pentamerisierungsdomäne und den EGF-ähnlichen Domänen (Abb. 35). Die verschiedenen Oligomere konnten nach der Affinitätsaufreinigung mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 23). Die nachgeschaltete Gelfiltration reduzierte die Anzahl der Molekül-Varianten auf das Pentamer und das Pseudotetramer. Diese lagen bei jeder Protein-Variante im gleichen Verhältnis vor.

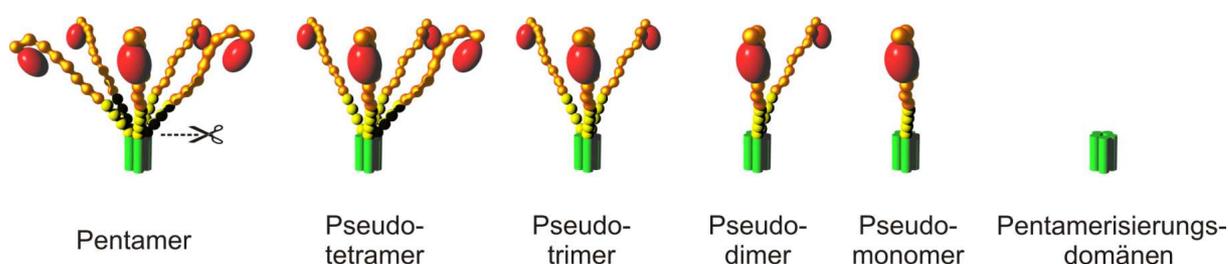


Abbildung 35: Abbauformen von COMP. In der Zellkultur unterliegt COMP einem sukzessiven Abbau vom Pentamer bis hin zur monomeren Form bzw. der Pentamerisierungsdomäne. Die Proteasen greifen bevorzugt am Domänenübergang von der Pentamerisierungsdomäne zu den EGF-ähnlichen Domänen an. Es entstehen sogenannte „Pseudo“-Oligomere, da jedes Molekül noch über die vollständige *coiled-coil*-Struktur der Pentamerisierungsdomäne verfügt.

Die aufgereinigten mutierten Proteine wiesen bei der elektrophoretischen Trennung per SDS-PAGE das gleiche Laufverhalten wie das wt Protein auf. Es scheinen durch die Mutationen also weder drastische Strukturänderungen noch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen wie z. B. Glykosylierungen stattgefunden zu haben. Es bestätigt die Ergebnisse von Spitznagel *et al.* (2004), welche mit H587R COMP gewonnen wurden. Auch kleinere Proteinkonstrukte, die lediglich die T3 Domäne umfassten, zeigten im Laufverhalten keine Unterschiede (Hou *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001).

Mittels CD-Spektroskopie wurden detaillierte Analysen zu den strukturellen Eigenschaften in Abhängigkeit von Ca^{2+} /EDTA und der Temperatur durchgeführt. Für $\Delta\text{D COMP}$ wurde bereits festgestellt, dass die Deletion zu einer reduzierten Ca^{2+} -Bindekapazität führt, die auf eine veränderte Struktur zurückgeführt wurde (Chen *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Varianten voller Länge erstmals miteinander verglichen.

Bereits bei erster Betrachtung war deutlich, dass sich die Spektren der Varianten nach Ca^{2+} bzw. EDTA Zugabe wesentlich unterscheiden. Das wt Protein erscheint im Gegensatz zu den Mutanten erheblich beeinflussbar durch die An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen. Es ist fragwürdig, ob die Aggregation unter den gegebenen Messbedingungen von physiologischer Relevanz ist, da die Ca^{2+} -Konzentration noch in einem physiologischen Bereich liegt. Der Vergleich zu den sich anders verhaltenden Proteinen ist diesbezüglich wichtiger. Demnach bleibt die Konformation der mutierten Proteine auch im Ca^{2+} gesättigten Zustand erhalten. Ähnliches wurde bereits für HR COMP beschrieben. Während das wt Protein bei steigender Ca^{2+} -Konzentration an Sekundärstruktur verlor, blieb das Spektrum von HR COMP konstant (Spitznagel *et al.*, 2004). Eventuelle mutationsbedingte Strukturveränderungen sind wahrscheinlich nur lokaler Art. Innerhalb des Volllänge Proteins geht die mögliche Signaländerung im Gesamtspektrum verloren. Die Analyse kürzerer Proteinfragmente könnte eventuell subtile Veränderungen darstellen, allerdings bliebe die physiologische Relevanz solcher Ergebnisse fragwürdig. Die vergleichbaren Schmelzkurven von wt COMP und mutiertem COMP deuten ebenfalls darauf hin, dass durch die Mutation kein dramatischer Stabilitätsverlust entstand.

Die CD-spektroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, dass es durch die Mutationen nur zu subtilen Strukturänderungen kommt. Offenbar reichen diese Änderungen im Protein allerdings aus, um die Dysplasien entstehen zu lassen. Die COMP-Varianten wurden daher auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht. Wie bereits erwähnt, wird COMP eine Rolle bei der Fibrillogenese zugesprochen. Daher wurden Fibrillogenese-Experimente mit Collagen I bzw. einem Gemisch aus Collagen II und XI durchgeführt. Collagen besitzt eine intrinsische Fähigkeit zur Fibrillogenese. In Anwesenheit einiger Proteine, z. B. Collagen IX oder XI,

verändern sich sowohl Geschwindigkeit als auch Endprodukt der Fibrillogenese (Hansen *et al.*, 2003). Zur Überprüfung der Eigenschaften von COMP als ein die Fibrillenbildung förderndes Protein, wurden die einzelnen Varianten mit Collagen I inkubiert und die Entstehung von Superstrukturen über die Zeit in Trübungsmessungen und mittels EM analysiert. Der charakteristische Kurvenverlauf von Trübungsmessungen an Collagen I ist sigmoidal (Abb. 26). Die Form der Kurve bleibt durch Zugabe der COMP-Varianten erhalten. In manchen Fällen verändert sich jedoch der zeitliche Verlauf. Die Zugabe von wt COMP beschleunigt die Fibrillogenese von Collagen I, während ΔD und DN COMP sie scheinbar nicht beeinflussen. Möglicherweise hemmt ΔD die Fibrillenbildung sogar. DY COMP offenbart erneut seinen intermediären Charakter und beschleunigt die Polymerisierung von Collagen I, jedoch nicht in dem Maße wie wt COMP. Möglicherweise kommt bei ΔD COMP die Tatsache zum Tragen, dass das mutierte COMP nicht so flexibel ist, wie das wt Protein (Chen *et al.*, 2000). Es könnte demnach tripelhelicale Collagene nicht in ausreichende räumliche Nähe zueinander bringen. Die Fibrillogenese wäre auf die intrinsische Fähigkeit des Collagens beschränkt. Ist dies der Fall, so ist der gleiche Mechanismus auch für die anderen Mutationen der T3 Domänen wahrscheinlich. Der Kurvenverlauf durch HR COMP ist indes ungewöhnlich. Die Fibrillogenese ist im Vergleich zu wt COMP sogar beschleunigt. Die HR Mutation betrifft nicht die T3 Domänen, sondern ist in der carboxyterminalen Domäne lokalisiert, die unter anderem die Collagenbindung vermittelt. Die HR Substitution liegt nahe bzw. in der postulierten Collagenbindungsstelle, was einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften denkbar macht (Holden *et al.*, 2001). Die apparente Affinität ist allerdings im Vergleich zum wt COMP nicht signifikant unterschiedlich, was eine dortige Bindungsstelle unwahrscheinlich macht. (Spitznagel *et al.*, 2004). Die Bedeutung der HR Mutation bezüglich der Collagenbindung ist noch nicht ausreichend geklärt.

Weitere Hinweise wurden sich durch die elektronenmikroskopische Analyse der Fibrillogenese-Endprodukte erhofft. Tatsächlich konnten erhebliche Unterschiede zwischen den Endprodukten festgestellt werden, die durch Zugabe von wt bzw. HR COMP entstanden (Abb. 27). Im Vergleich zur Eigenpolymerisation von Collagen I entstanden nach wt COMP Zugabe ebenfalls die charakteristisch gestreiften Fibrillen. Durch Inkubation des tripelhelicalen Collagens mit HR COMP entstanden allerdings desorganisierte, z. T. diffuse Strukturen und Fibrillen mit variierenden Durchmesser. Die EM-Bilder stehen im Einklang mit dem Postulat, nachdem COMP sich von vollendeten Fibrillen löst (Rosenberg, 2001). Zwar bindet wt COMP auch an scheinbar schon vollendeten Fibrillen, es konnte aber auch COMP abseits der Fibrillen detektiert werden, was ein Ablösen impliziert. Bei HR COMP kann nur auf desorganisierten Strukturen detektiert werden, mit Ausnahme von organisierten Collagen I Fibrillen, wo kein HR COMP mehr zu detektieren war. Die Fibrillogenese wird durch HR COMP also deutlich gestört. Die Endprodukte erinnern an die extrazellulären Aggregate, die

bei transduzierten Chondrocyten beobachtet wurden (Abb. 20). Wenn man berücksichtigt, dass HR COMP ungehindert von Chondrocyten sekretiert wird, so ist nun die ultrastrukturelle Beschaffenheit der ECM von Patienten mit dieser Mutation von gesteigertem Interesse.

Das dominierende Protein des Knorpels ist Collagen II. Aus diesem Grund wurden ähnliche Fibrillogenese-Experimente mit Collagen II durchgeführt. Sie ergeben vergleichbare Resultate. Die Ausbildung von Strukturen wird durch wt COMP verglichen mit intrinsischer Fibrillogenese beschleunigt. Die gemessene Trübung steigt bei Collagen II/XI Gemisch linear an und weist eine niedrigere Absorption auf, weil die entstehenden Strukturen dünner sind und daher das einfallende Licht weniger stark streuen als Collagen I. Die Trübung bei HR COMP steigt parallel zur wt COMP Probe an, jedoch sind die Werte insgesamt stets höher, obwohl der Versuch mit gleichen Proteinkonzentrationen durchgeführt wurde. Möglicherweise ist es eine initiale sprunghafte Ausbildung von Strukturen innerhalb der ersten Minute ausreichend, um diese Differenz zwischen wt und HR COMP entstehen zu lassen (Hansen *et al.*, 2003). Betrachtet man auch diese Endprodukte auf ultrastruktureller Ebene, so entsprechen die Resultate denen für Collagen I. Auch hier bewirkt die Zugabe von wt COMP die Ausbildung organisierter Fibrillen. Die Endprodukte des mit HR COMP versetzten Collagengemischs sind heterogen. Es bildeten sich neben organisierten Fibrillen diffuse, netzartige Collagenstrukturen. Auch sie erinnern an die extrazellulären Aggregate im Zellkulturmodell.

Neben den tripelhelicalen Collagenen I und II ist Collagen IX ein weiterer Interaktionspartner von COMP im Knorpel (Holden *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1998; Thur *et al.*, 2001). Es gehört zu den sogenannten FACIT-Collagenen (*fibril associated collagen with interrupted triple helices*), die nicht selbst Fibrillen ausbilden, sondern sich an sie lagern bzw. inkorporiert werden. Alternativ zu Fibrillogeneseexperimenten wurden zur Bestimmung der biochemischen Charakteristika der COMP-Varianten ELISA-artige Bindungsstudien durchgeführt. Alle COMP-Varianten weisen vergleichbare apparente Affinitäten auf. Diese stimmen mit den Literaturwerten überein (Thur *et al.*, 2001; Spitznagel *et al.*, 2004). Die hier erstmals ermittelte Bindungsaffinität von DN COMP fügt sich mit einem k_D von 11 nM in die Reihe ein. Auf Ebene der Bindung von COMP an Collagen IX lässt sich kein pathogener Effekt der COMP-Varianten erkennen.

Die bisherigen Ergebnisse implizieren einen negativen Effekt von mutiertem COMP auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix. Des Weiteren wurden COMP bereits Fähigkeiten zur Vermittlung der Zellanhaftung zugeordnet. Die Frage, inwieweit mutiertes COMP die Zellanhaftung beeinflusst und ob extrazelluläres mutiertes COMP ausreicht, um die Zellanhaftung von primären Chondrocyten zu verändern, wurde abschließend untersucht.

Wt COMP vermittelt konzentrationsabhängig eine bessere Zellanhaftung als die mutierten Varianten (Abb. 31), was frühere Arbeiten bestätigten (DiCesare *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2005). Lichtmikroskopischen Bilder (Abb. 32) zeigen, dass Zellen auf Fibronectin und wt COMP im Gegensatz zu Zellen, die auf mutiertem COMP inkubiert wurden, bereits mit der Ausbildung von Zellfortsätzen beginnen. Diese Ausbreitung impliziert eine förderliche Umgebung für die Zellen. Die reduzierte Zellanhaftung auf mutiertem COMP spricht für die Relevanz einer geordneten perizellulären Matrix.

Chondrocyten in Collagen II defizienten Mäusen begehen Apoptose (Yang *et al.*, 1997). Durch die Abwesenheit von Collagen II sind viele Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen aufgehoben, wodurch Signale zur Einleitung der Apoptose ausgesandt werden.

Möglicherweise entsteht ein ähnlicher Mechanismus bei der Ausbildung der extrazellulären Aggregate. Collagen II könnte in diesem Zustand demnach nicht mehr als Mediatormolekül fungieren, was wiederum die Apoptose einleitet. Dies wird durch Ergebnisse bekräftigt, wonach Collagendegradation Apoptose bei Chondrocyten induziert (Lo *et al.*, 2004).

Eine Möglichkeit, den extrazellulären Beitrag von mutiertem COMP zur Pathogenese von PSACH und MED zu evaluieren, ist die Inkubation von COMP-defizienten primären Chondrocyten auf mutierten COMP-Varianten, da die Zellanhaftung über Integrine an COMP vermittelt wird (Chen *et al.*, 2005). Möglicherweise besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen der Apoptose und der COMP-Integrin-Interaktion, da synoviale Fibroblasten über $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_5\beta_1$ Integrin an COMP binden (Neidhart *et al.*, 2005). Die gestörte Zellanhaftung wurde durch solche COMP-Varianten induziert, die einerseits eine Sekretionsstörung aufweisen und andererseits normal sekretiert werden.

Alle obigen Erkenntnisse unterstreichen, dass COMP Mutationen auf zumindest einem intrazellulären Weg und einem extrazellulären Weg die Pathogenese von PSACH und MED auslösen bzw. beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. (2004). "Molecules in focus - The thrombospondins." *Int J Biochem Cell Biol* 36: 961-968.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, *et al.* (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287: 2185-2195.
- Aigner, T. (2002). "Apoptosis, necrosis, or whatever: how to find out what really happens?" *J Pathol* 198: 1-4.
- Archer, C. W. und P. Francis-West (2003). "The chondrocyte." *Int J Biochem Cell Biol* 35: 401-404.
- Aspberg, A., S. Adam, G. Kostka, R. Timpl und D. Heinegård (1999). "Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican." *J Biol Chem* 274: 20444-20449.
- Aszodi, A., J. F. Bateman, E. Gustafsson, R. Boot-Handford und R. Fässler (2000). "Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice?" *Cell Struct Funct* 25: 73-84.
- Bjarnason, R., B. Andersson, H. S. Kim, B. Olsson, D. Swolin-Eide, R. Wickelgren, B. Kristrom, B. Carlsson, K. Albertsson-Wikland und L. M. Carlsson (2004). "Cartilage oligomeric matrix protein increases in serum after the start of growth hormone treatment in prepubertal children." *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5156-5160.
- Bloom, G. S. und T. A. Brashear (1989). "A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules." *J Biol Chem* 264: 16083-16092.
- Bonaventure, J., N. Kadhom, L. Cohen-Solal, K. H. Ng, J. Bourguignon, C. Lasselin und P. Freisinger (1994). "Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads." *Exp Cell Res* 212: 97-104.
- Bonnemann, C. G., G. F. Cox, F. Shapiro, J. J. Wu, C. A. Feener, T. G. Thompson, D. C. Anthony, D. R. Eyre, B. T. Darras und L. M. Kunkel (2000). "A mutation in the alpha 3 chain of type IX collagen causes autosomal dominant multiple epiphyseal dysplasia with mild myopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1212-1217.
- Briggs, M. D., H. Choi, M. L. Warman, J. A. Loughlin, P. Wordsworth, B. C. Sykes, C. M. Irlen, M. Smith, R. Wynne-Davies, M. H. Lipson, *et al.* (1994). "Genetic mapping of a locus for multiple epiphyseal dysplasia (EDM2) to a region of chromosome 1 containing a type IX collagen gene." *Am J Hum Genet* 55: 678-684.
- Briggs, M. D., S. M. Hoffman, L. M. King, A. S. Olsen, H. Mohrenweiser, J. G. Leroy, G. R. Mortier, D. L. Rimoïn, R. S. Lachman, E. S. Gaines, *et al.* (1995). "Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene." *Nat Genet* 10: 330-336.
- Briggs, M. D., I. M. Rasmussen, J. L. Weber, J. Yuen, K. Reinker, A. P. Garber, D. L. Rimoïn und D. H. Cohn (1993). "Genetic linkage of mild pseudoachondroplasia (PSACH) to markers in the pericentromeric region of chromosome 19." *Genomics* 18: 656-660.
- Budde, B., K. Blumbach, J. Ylostalo, F. Zaucke, H. W. Ehlen, R. Wagener, L. Ala-Kokko, M. Paulsson, P. Bruckner und S. Grässel (2005). "Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX." *Mol Cell Biol* 25: 10465-10478.
- Carlson, C. B., D. A. Bernstein, D. S. Annis, T. M. Misenheimer, B. L. Hannah, D. F. Mosher und J. L. Keck (2005). "Structure of the calcium-rich signature domain of human thrombospondin-2." *Nat Struct Mol Biol* 12: 910-914.

- Chapman, K. L., G. R. Mortier, K. Chapman, J. Loughlin, M. E. Grant und M. D. Briggs (2001). "Mutations in the region encoding the von Willebrand factor A domain of matrilin-3 are associated with multiple epiphyseal dysplasia." *Nat Genet* 28: 393-396.
- Chen, F. H., A. O. Thomas, J. T. Hecht, M. B. Goldring und J. Lawler (2005). "Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins." *J Biol Chem* 280: 32655-32661.
- Chen, H., M. Deere, J. T. Hecht und J. Lawler (2000). "Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium-binding protein, and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes." *J Biol Chem* 275: 26538-26544.
- Chen, T. L., J. W. Stevens, W. G. Cole, J. T. Hecht und B. M. Vertel (2004). "Cell-type specific trafficking of expressed mutant COMP in a cell culture model for PSACH." *Matrix Biol* 23: 433-444.
- Cooper, R. R., I. V. Ponseti und J. A. Maynard (1973). "Pseudoachondroplastic dwarfism. A rough-surfaced endoplasmic reticulum storage disorder." *J Bone Joint Surg Am* 55: 475-484.
- Cotterill, S. L., G. C. Jackson, M. P. Leighton, R. Wagener, O. Makitie, W. G. Cole und M. D. Briggs (2005). "Multiple epiphyseal dysplasia mutations in MATN3 cause misfolding of the A-domain and prevent secretion of mutant matrilin-3." *Hum Mutat* 26: 557-565.
- Czarny-Ratajczak, M., J. Lohiniva, P. Rogala, K. Kozlowski, M. Perala, L. Carter, T. D. Spector, L. Kolodziej, U. Seppanen, R. Glazar, *et al.* (2001). "A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity." *Am J Hum Genet* 69: 969-980.
- Deere, M., T. Sanford, H. L. Ferguson, K. Daniels und J. T. Hecht (1998). "Identification of twelve mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in patients with pseudoachondroplasia." *Am J Med Genet* 80: 510-513.
- Delot, E., S. G. Brodie, L. M. King, W. R. Wilcox und D. H. Cohn (1998). "Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture." *J Biol Chem* 273: 26692-26697.
- DiCesare, P. E., F. S. Chen, M. Mörgelin, C. S. Carlson, M. P. Leslie, R. Perris und C. Fang (2002). "Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin." *Matrix Biol* 21: 461-470.
- DiCesare, P. E., C. Fang, M. P. Leslie, H. Tulli, R. Perris und C. S. Carlson (2000). "Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts." *J Orthop Res* 18: 713-720.
- DiCesare, P. E., M. Mörgelin, K. Mann und M. Paulsson (1994). "Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding." *Eur J Biochem* 223: 927-937.
- Dietz, H. C. und R. E. Pyeritz (1995). "Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders." *Hum Mol Genet*: 1799-1809.
- Dinser, R., F. Kreppel, F. Zaucke, C. Blank, M. Paulsson, S. Kochanek und P. Maurer (2001). "Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes." *Histochem Cell Biol* 116: 69-77.
- Dinser, R., F. Zaucke, F. Kreppel, K. Hultenby, S. Kochanek, M. Paulsson und P. Maurer (2002). "Pseudoachondroplasia is caused through both intra- and extracellular pathogenic pathways." *J Clin Invest* 110: 505-513.
- Duke, J., D. Montufar-Solis, S. Underwood, Z. Lalani und J. T. Hecht (2003). "Apoptosis staining in cultured pseudoachondroplasia chondrocytes." *Apoptosis* 8: 191-197.
- Efimov, V. P., A. Lustig und J. Engel (1994). "The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83." *FEBS Lett* 341: 54-58.

- Fang, C., C. S. Carlson, M. P. Leslie, H. Tulli, E. Stoleran, R. Perris, L. Ni und P. E. DiCesare (2000). "Molecular cloning, sequencing, and tissue and developmental expression of mouse cartilage oligomeric matrix protein (COMP)." *J Orthop Res* 18: 593-603.
- Greenfield, N. J. (1996). "Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data." *Anal Biochem* 235: 1-10.
- Guo, Y., D. Bozic, V. N. Malashkevich, R. A. Kammerer, T. Schulthess und J. Engel (1998). "All-trans retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein." *Embo J* 17: 5265-5272.
- Hall, C. M. (2002). "International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001)." *Am J Med Genet* 113: 65-77.
- Hansen, U. und P. Bruckner (2003). "Macromolecular specificity of collagen fibrillogenesis: fibrils of collagens I and XI contain a heterotypic alloyed core and a collagen I sheath." *J Biol Chem* 278: 37352-37359.
- Hashimoto, Y., T. Tomiyama, Y. Yamano und H. Mori (2003). "Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis." *Am J Pathol* 163: 101-110.
- Hecht, J. T., M. Deere, E. Putnam, W. Cole, B. Vertel, H. Chen und J. Lawler (1998). "Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues." *Matrix Biol* 17: 269-278.
- Hecht, J. T., C. A. Francomano, M. D. Briggs, M. Deere, B. Conner, W. A. Horton, M. Warman, D. H. Cohn und S. H. Blanton (1993). "Linkage of typical pseudoachondroplasia to chromosome 19." *Genomics* 18: 661-666.
- Hecht, J. T., E. Hayes, R. Haynes und W. G. Cole (2005). "COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix." *Matrix Biol* 23: 525-533.
- Hecht, J. T., E. Hayes, M. Snuggs, G. Decker, D. Montufar-Solis, K. Doege, F. Mwale, R. Poole, J. Stevens und P. J. Duke (2001). "Calreticulin, PDI, Grp94 and BiP chaperone proteins are associated with retained COMP in pseudoachondroplasia chondrocytes." *Matrix Biol* 20: 251-262.
- Hecht, J. T., O. Makitie, E. Hayes, R. Haynes, M. Susic, D. Montufar-Solis, P. J. Duke und W. G. Cole (2004). "Chondrocyte cell death and intracellular distribution of COMP and type IX collagen in the pseudoachondroplasia growth plate." *J Orthop Res* 22: 759-767.
- Hecht, J. T., D. Montufar-Solis, G. Decker, J. Lawler, K. Daniels und P. J. Duke (1998). "Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiated pseudoachondroplasia chondrocytes." *Matrix Biol* 17: 625-633.
- Hecht, J. T., L. D. Nelson, E. Crowder, Y. Wang, F. F. Elder, W. R. Harrison, C. A. Francomano, C. K. Prange, G. G. Lennon, M. Deere, *et al.* (1995). "Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia." *Nat Genet* 10: 325-329.
- Hedbom, E., P. Antonsson, A. Hjerpe, D. Aeschlimann, M. Paulsson, E. Rosa-Pimentel, Y. Sommarin, M. Wendel, Å. Oldberg und D. Heinegård (1992). "Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage." *J Biol Chem* 267: 6132-6136.
- Holden, P., D. R. Keene, G. P. Lunstrum, H. P. Bächinger und W. A. Horton (2005). "Secretion of cartilage oligomeric matrix protein is affected by the signal peptide." *J Biol Chem* 280: 17172-17179.

- Holden, P., R. S. Meadows, K. L. Chapman, M. E. Grant, K. E. Kadler und M. D. Briggs (2001). "Cartilage oligomeric matrix protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenetic mechanism in a bone dysplasia family." *J Biol Chem* 276: 6046-6055.
- Hou, J., J. A. Putkey und J. T. Hecht (2000). "Delta 469 mutation in the type 3 repeat calcium binding domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) disrupts calcium binding." *Cell Calcium* 27: 309-314.
- Ikegawa, S., H. Ohashi, F. Hosoda, Y. Fukushima, M. Ohki und Y. Nakamura (1998). "Pseudoachondroplasia with de novo deletion [del(11)(q21q22.2)]." *Am J Med Genet* 77: 356-359.
- International Working Group on Constitutional Diseases of Bone (1998). "International nomenclature and classification of the osteochondrodysplasias (1997)." *Am J Med Genet* 79: 376-382.
- Issack, P. S., C. Fang, M. P. Leslie und P. E. DiCesare (2000). "Chondrocyte-specific enhancer regions in the COMP gene." *J Orthop Res* 18: 345-350.
- Jakkula, E., O. Makitie, M. Czarny-Ratajczak, G. C. Jackson, R. Damignani, M. Susic, M. D. Briggs, W. G. Cole und L. Ala-Kokko (2005). "Mutations in the known genes are not the major cause of MED; distinctive phenotypic entities among patients with no identified mutations." *Eur J Hum Genet* 13: 292-301.
- Kanazawa, H., H. Tanaka, M. Inoue, Y. Yamanaka, N. Namba und Y. Seino (2003). "Efficacy of growth hormone therapy for patients with skeletal dysplasia." *J Bone Miner Metab* 21: 307-310.
- Kennedy, J., G. C. Jackson, F. S. Barker, S. Nundlall, J. Bella, M. J. Wright, G. R. Mortier, K. Neas, E. Thompson, R. Elles, *et al.* (2005). "Novel and recurrent mutations in the C-terminal domain of COMP cluster in two distinct regions and result in a spectrum of phenotypes within the pseudoachondroplasia -- multiple epiphyseal dysplasia disease group." *Hum Mutat* 25: 593-594.
- Kim, A. J., Y. Shi, R. C. Austin und G. H. Werstuck (2005). "Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3." *J Cell Sci* 118: 89-99.
- Kipnes, J., A. L. Carlberg, G. A. Loreda, J. Lawler, R. S. Tuan und D. J. Hall (2003). "Effect of cartilage oligomeric matrix protein on mesenchymal chondrogenesis in vitro." *Osteoarthritis Cartilage* 11: 442-454.
- Kleerekoper, Q., J. T. Hecht und J. A. Putkey (2002). "Disease-causing mutations in cartilage oligomeric matrix protein cause an unstructured Ca²⁺ binding domain." *J Biol Chem* 277: 10581-10589.
- Koelling, S., T. S. Clauditz, M. Kaste und N. Miosge (2006). "Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis." *Arthritis Res Ther* 8: R56.
- Kohfeldt, E., P. Maurer, C. Vannahme und R. Timpl (1997). "Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican." *FEBS Lett* 414: 557-561.
- Kohler G und Hesse B (2004). "Epiphyseal dysplasia – symptoms and differential diagnostic aspects." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142: 397-402.
- Kouroku, Y., E. Fujita, I. Tanida, T. Ueno, A. Isoai, H. Kumagai, S. Ogawa, R. J. Kaufman, E. Kominami und T. Momoi (2006). "ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation." *Cell Death Differ*.
- Kreppel, F., V. Biermann, S. Kochanek und G. Schiedner (2002). "A DNA-based method to assay total and infectious particle contents and helper virus contamination in high-capacity adenoviral vector preparations." *Hum Gene Ther* 13: 1151-1156.

- Kvansakul, M., J. C. Adams und E. Hohenester (2004). "Structure of a thrombospondin C-terminal fragment reveals a novel calcium core in the type 3 repeats." *EMBO J* 23: 1223-1233.
- Lachman, R. S., D. Krakow, D. H. Cohn und D. L. Rimoin (2005). "MED, COMP, multilayered and NEIN: an overview of multiple epiphyseal dysplasia." *Pediatr Radiol* 35: 116-123.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Liu, C. (2005). "Transcriptional mechanism of COMP gene expression and chondrogenesis." *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5: 340-341.
- Liu, C. J., L. Prazak, M. Fajardo, S. Yu, N. Tyagi und P. E. DiCesare (2004). "Leukemia/lymphoma-related factor, a POZ domain-containing transcriptional repressor, interacts with histone deacetylase-1 and inhibits cartilage oligomeric matrix protein gene expression and chondrogenesis." *J Biol Chem* 279: 47081-47091.
- Lo, M. Y. und H. T. Kim (2004). "Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1." *J Orthop Res* 22: 140-144.
- Loughlin, J., C. Irlen, Z. Mustafa, M. D. Briggs, A. Carr, S. A. Lynch, R. G. Knowlton, D. H. Cohn und B. Sykes (1998). "Identification of five novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia." *Hum Mutat Suppl* 1: S10-17.
- Mann, H. H., S. Özbek, J. Engel, M. Paulsson und R. Wagener (2004). "Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias." *J Biol Chem* 279: 25294-25298.
- Maurer, P. und E. Hohenester (1997). "Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins." *Matrix Biol* 15: 569-580.
- Maynard, J. A., R. R. Cooper und I. V. Ponseti (1972). "A unique rough surfaced endoplasmic reticulum inclusion in pseudoachondroplasia." *Lab Invest* 26: 40-44.
- McKeand, J., J. Rotta und J. T. Hecht (1996). "Natural history study of pseudoachondroplasia." *Am J Med Genet* 63: 406-410.
- Merritt, T. M., J. L. Alcorn, R. Haynes und J. T. Hecht (2006). "Expression of mutant cartilage oligomeric matrix protein in human chondrocytes induces the pseudoachondroplasia phenotype." *J Orthop Res* 24: 700-707.
- Mok, S. S., K. Masuda, H. J. Häuselmann, M. B. Aydelotte und E. J. Thonar (1994). "Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools." *J Biol Chem* 269: 33021-33027.
- Mörgelin, M., D. Heinegård, J. Engel und M. Paulsson (1992). "Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure." *J Biol Chem* 267: 6137-6141.
- Muragaki, Y., E. C. Mariman, S. E. van Beersum, M. Perala, J. B. van Mourik, M. L. Warman, B. C. Hamel und B. R. Olsen (1996). "A mutation in COL9A2 causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2)." *Ann N Y Acad Sci* 785: 303-306.
- Nakashima, E., H. Kitoh, K. Maeda, N. Haga, R. Kosaki, A. Mabuchi, G. Nishimura, H. Ohashi und S. Ikegawa (2005). "Novel COL9A3 mutation in a family with multiple epiphyseal dysplasia." *Am J Med Genet A* 132: 181-184.
- Neidhart, M., F. Zaucke, R. von Knoch, A. Jungel, B. A. Michel, R. E. Gay und S. Gay (2005). "Glectin-3 is induced in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after adhesion to cartilage oligomeric matrix protein." *Ann Rheum Dis* 64: 419-424.
- Newton, G., S. Weremowicz, C. C. Morton, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins und J. Lawler (1994). "Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein." *Genomics* 24: 435-439.

- Nicholson, A. C., S. B. Malik, J. M. Logsdon, Jr. und E. G. Van Meir (2005). "Functional evolution of ADAMTS genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization." *BMC Evol Biol* 5: 11.
- Oehlmann, R., G. P. Summerville, G. Yeh, E. J. Weaver, S. A. Jimenez und R. G. Knowlton (1994). "Genetic linkage mapping of multiple epiphyseal dysplasia to the pericentromeric region of chromosome 19." *Am J Hum Genet* 54: 3-10.
- Ogata, M., S. I. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tani, K. Yoshinaga, *et al.* (2006). "Autophagy is activated for cell survival after ER stress." *Mol Cell Biol*.
- Oldberg, Å., P. Antonsson, K. Lindblom und D. Heinegård (1992). "COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins." *J Biol Chem* 267: 22346-22350.
- Paassilta, P., J. Lohiniva, S. Annunen, J. Bonaventure, M. Le Merrer, L. Pai und L. Ala-Kokko (1999). "COL9A3: A third locus for multiple epiphyseal dysplasia." *Am J Hum Genet* 64: 1036-1044.
- Posey, K. L., E. Hayes, R. Haynes und J. T. Hecht (2004). "Role of TSP-5/COMP in pseudoachondroplasia." *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1005-1012.
- Provencher, S. W. und J. Glockner (1981). "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism." *Biochemistry* 20: 33-37.
- Rehm (2000). "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics." 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- Reynolds, E. S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." *J Cell Biol* 17: 208-212.
- Riessen, R., M. Fenchel, H. Chen, D. I. Axel, K. R. Karsch und J. Lawler (2001). "Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 47-54.
- Riss, T. L. und R. A. Moravec (2004). "Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays." *Assay Drug Dev Technol* 2: 51-62.
- Roach, H. I., T. Aigner und J. B. Kouri (2004). "Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes?" *Apoptosis* 9: 265-277.
- Rosenberg, K. (2001). "Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) - function in collagen binding and assembly." Dissertation, Lund University, Faculty of Medicine.
- Rosenberg, K., H. Olsson, M. Mörgelin und D. Heinegård (1998). "Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen." *J Biol Chem* 273: 20397-20403.
- Saxne, T. und D. Heinegård (1992). "Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood." *Br J Rheumatol* 31: 583-591.
- Schmitz, M., A. Becker, A. Schmitz, C. Weirich, M. Paulsson, F. Zaucke und R. Dinser (2006). "Disruption of Extracellular Matrix Structure May Cause Pseudoachondroplasia Phenotypes in the Absence of Impaired Cartilage Oligomeric Matrix Protein Secretion." *J Biol Chem* 281: 32587-32595.
- Smith, R. K., H. L. Birch, S. Goodman, D. Heinegård und A. E. Goodship (2002). "The influence of ageing and exercise on tendon growth and degeneration--hypotheses for the initiation and prevention of strain-induced tendinopathies." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133: 1039-1050.
- Smith, R. K. und D. Heinegård (2000). "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) levels in digital sheath synovial fluid and serum with tendon injury." *Equine Vet J* 32: 52-58.

- Spitznagel, L., D. P. Nitsche, M. Paulsson, P. Maurer und F. Zaucke (2004). "Characterization of a pseudoachondroplasia-associated mutation (His587-->Arg) in the C-terminal, collagen-binding domain of cartilage oligomeric matrix protein (COMP)." *Biochem J* 377: 479-487.
- Spranger, J. (1997). "Irrtümer der Skelettentwicklung." *Monatsschr Kinderheilk* 145: 334-341.
- Sreerama, N. und R. W. Woody (1993). "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism." *Anal Biochem* 209: 32-44.
- Stenflo, J., Y. Stenberg und A. Muranyi (2000). "Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions." *Biochim Biophys Acta* 1477: 51-63.
- Superti-Furga, A., L. Bonafe und D. L. Rimoin (2001). "Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton." *Am J Med Genet* 106: 282-293.
- Superti-Furga, A., L. Neumann, T. Riebel, G. Eich, B. Steinmann, J. Spranger und J. Kunze (1999). "Recessively inherited multiple epiphyseal dysplasia with normal stature, club foot, and double layered patella caused by a DTDST mutation." *J Med Genet* 36: 621-624.
- Svensson, L., A. Aszodi, D. Heinegård, E. B. Hunziker, F. P. Reinholt, R. Fässler und Å. Oldberg (2002). "Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development." *Mol Cell Biol* 22: 4366-4371.
- Thur, J. (2000). "Die Auswirkungen von Chondrodysplasie-assoziierten Mutationen auf die Struktur und Funktion des Cartilage Oligomeric Matrix Protein." Dissertation, University of Cologne, Faculty of Medicine.
- Thur, J., K. Rosenberg, D. P. Nitsche, T. Pihlajamaa, L. Ala-Kokko, D. Heinegård, M. Paulsson und P. Maurer (2001). "Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX." *J Biol Chem* 276: 6083-6092.
- Unger, S. L., M. D. Briggs, P. Holden, B. Zabel, L. Ala-Kokko, P. Paassilta, J. Lohiniva, D. L. Rimoin, R. S. Lachman und D. H. Cohn (2001). "Multiple epiphyseal dysplasia: radiographic abnormalities correlated with genotype." *Pediatr Radiol* 31: 10-18.
- van Stokkum, I. H., H. J. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle und F. C. Groen (1990). "Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra." *Anal Biochem* 191: 110-118.
- Vranka, J., A. Mokashi, D. R. Keene, S. Tufa, G. Corson, M. Sussman, W. A. Horton, K. Maddox, L. Sakai und H. P. Bächinger (2001). "Selective intracellular retention of extracellular matrix proteins and chaperones associated with pseudoachondroplasia." *Matrix Biol* 20: 439-450.
- Williams, F. M., T. Andrew, T. Saxne, D. Heinegård, T. D. Spector und A. J. MacGregor (2006). "The heritable determinants of cartilage oligomeric matrix protein." *Arthritis Rheum* 54: 2147-2151.
- Yang, C., S. W. Li, H. J. Helminen, J. S. Khillan, Y. Bao und D. J. Prockop (1997). "Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II." *Exp Cell Res* 235: 370-373.
- Zaia, J., R. E. Boynton, A. McIntosh, D. R. Marshak, H. Olsson, D. Heinegård und F. P. Barry (1997). "Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." *J Biol Chem* 272: 14120-14126.
- Zaucke, F., R. Dinser, P. Maurer und M. Paulsson (2001). "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes." *Biochem J* 358: 17-24.
- Zucker-Franklin (1988). *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*. Milan, Ermes.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Mats Paulsson danke ich, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, über die Diplomarbeit hinaus, weiter an meinem Projekt arbeiten zu können. In einem so angenehmen Umfeld promovieren zu dürfen und die Möglichkeit an Kongressen teilzunehmen, bleibt unvergessen.

Bei Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein möchte ich mich für die großzügige Bereitstellung des Zweitgutachtens und bei Herrn Prof. Dr. Thomas Langer über die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Frank Zaucke danke ich für die herausfordernden Terminfristen, die meine Arbeit um einiges beschleunigten. Seine stetige Gesprächsbereitschaft und die Fähigkeit zur wissenschaftlichen Quervernetzung erleichterten meine Arbeit erheblich, ebenso wie der Aufbau eines gut zusammenarbeitenden Teams, auf welches man sich immer verlassen konnte.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinen Kollegen (in alphabetischer Reihenfolge) für die wunderbare Zeit bedanken:

- Ann-Kathrin Becker - meine Schwester und die Hilfsbereitschaft in Person.
- Katrin Blumbach - für die Notfallbereitschaft in allen Lebenslagen, etc.
- Detlef Heep - für Haselnuss, Heiterkeit und viele tolle Highlights.
- Hanni Hülsmann - für Lebensweisheiten und sonstigen Laborkrams.
- Alex Kunze - für jeden Versuch, mich zum Sport zu bewegen, teils sogar mit Erfolg.
- Barbara Maertens - und Sonja für viele nette Abende.
- Tamara Mankart - und Manni für den versprühten Humor und schöne Abende.
- Henning Mann - für Billard, Bier und die nette Begegnungen.
- Mark Milbrandt - für Tonic, Töne und schwarzen Tee.
- Christiane Otten - für Selbstlosigkeit und immer nette (Wider-)Worte.
- Monika Pesch - für die Regenerations-O-Säfte uvm.
- Gerda Pelzer - als Mutter des Instituts.
- Jörg Schulze - für Salben, Skelettmuskulatur ;-) und festliches Schnabulieren.
- Nadine Sauerwald - für ihr Sonnenblumengemüt.
- Markus Schmitz - als lebend(ig)es Lexikon und besonders für die Hilfe bei der IF.
- Judith Seul - für die kleinen Päschen und Aufmerksamkeitsdefizitmails.

- Sarah Steffens - für die ständige Verbreitung der guten Laune.
- Sebastian Teitz - fürs Cave und fachmännische Beratungen fürs Rennradeln.
- Raimund Wagener - für die Einstellung von AnKa und die freundl. Kommentare.
- Daniela Zwolanek - die blinden Aktionismus in richtige Bahnen lenken konnte.

Und natürlich alle übrigen Mitarbeiter des Hauses und solche, die es waren oder sein werden.

Viel Spaß und Erfolg weiterhin!

Ein großer Dank gilt auch Robert Dinser (!) und Christian Weirich für die hervorragende Zusammenarbeit, Nicolai Miosge (!) für die Einführung in die Elektronenmikroskopie sowie Eveline Janßen und Christian Hofmann für die vielfältige Unterstützung.

Am meisten habe ich meiner Familie zu verdanken! Vielen lieben Dank für die großartige Unterstützung in allen Lebenslagen. Diese Arbeit ist euch gewidmet. Ihr habt mir stets geholfen, mich unterstützt und aufgebaut – in privater wie in beruflicher Hinsicht. Ihr habt mir immer Perspektiven aufgezeigt und mir den richtigen Weg gewiesen. Es war immer Verlass auf euch und zu Hause wartete immer ein offenes Ohr – und sei es ein Spitzohr mit weichem Fell in Form von Momo und Janosch. Natürlich sei auch meinen pelzigen Lieblingen Sion und Diebel gedankt, die mich immer wieder aufheiterten und Sorgen im Alltag vergessen ließen.

Lebenslauf

Alexander Becker

Persönliche Daten

Name: Alexander Arnulf Jean Willy Becker

Geburtsdatum: 08.10.1976

Geburtsort: Neuss

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Religion: römisch-katholisch

Anschrift: Luxemburger Str. 46, 50674 Köln

Ausbildung

12/2002 bis 1/2007

Promotion in Biochemie

an der Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln

Titel der Arbeit: „Intra- und extrazelluläre Mechanismen bei der Pathogenese von Chondrodysplasien“, durchgeführt am Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät unter der Leitung von Prof. Dr. M. Paulsson.

10/1996 bis 11/2002

Biologiestudium, Abschluss: Diplom

an der Math.-Nat. Fakultät der Universität zu Köln.

Thema der Diplomarbeit: „Transgene Modelle zur Untersuchung von Chondrodysplasien“, durchgeführt am Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät unter der Leitung von Prof. Dr. M. Paulsson.

Note: Sehr Gut

1987 bis 1996

Leibniz Gymnasium Dormagen-Hackenbroich

Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,0

1985 bis 1987

Städt. Kath. Grundschule Burg Hackenbroich

1983 bis 1985

Städt. Grundschule Nord in Dormagen

Köln, 31.01.2007

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 der unten angegebenen Teilpublikation 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. Mats Paulsson betreut worden.

Teilpublikation

Schmitz, M., A. Becker, A. Schmitz, C. Weirich, M. Paulsson, F. Zaucke und R. Dinser (2006). "Disruption of Extracellular Matrix Structure May Cause Pseudoachondroplasia Phenotypes in the Absence of Impaired Cartilage Oligomeric Matrix Protein Secretion." J Biol Chem 281: 32587-32595.

Köln, 31.01.2007