

**Biochemische und funktionelle Analyse
der FACIT Kollagene XII und XXII
im Bewegungsapparat**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniela Zwolanek

aus Wien

Köln, September 2010

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Zentrum für Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Mats Paulsson angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Mats Paulsson

Prof. Dr. Günther Schwarz

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der Disputation: 16. November 2010

„Ein Problem ist halb gelöst, wenn es klar formuliert ist.“

(John Dewey)

„An alle Freunde und Verwandten, ...“

Zusammenfassung

Die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix des Bewegungsapparats sind Kollagene, Elastin, Proteoglykane und Adhäsionsproteine, wie Laminin und Fibronectin. Im Muskel stabilisiert die extrazelluläre Matrix sowohl die Myofibrillen untereinander, als auch die Übergänge zu anderen Geweben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Kollagene XII und XXII funktionell und biochemisch charakterisiert werden.

Kollagen XII, ein Multidomänenprotein der Subfamilie der fibrillassozierten Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT), bindet über seinen Kollagenanteil sowohl an Kollagen I-Fasern als auch mit seiner dritten Nicht-Kollagendomäne (NC3) an das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin-X. Als weiterer Interaktionspartner konnte Kollagen VI identifiziert werden. Immunfluoreszenzanalysen belegen die Kollokalisierung von Kollagen XII und Kollagen VI in der Haut und im Skelettmuskel. Die Interaktion konnte darüber hinaus auf ultrastruktureller Ebene elektronenmikroskopisch bestätigt werden und weist eine Bindung der N-terminalen Domänen von Kollagen XII an die Kollagendomänen von Kollagen VI auf. Eine humane Kollagen XII Defizienz führt zu einer schweren, kürzlich entdeckten Form der Muskeldystrophie, gekennzeichnet durch eine drastische Muskelschwäche, Kypho-Skoliose und hypermobile Gelenke. Um die Funktion von Kollagen XII im Zusammenhang mit den Phänotypen der humanen Erkrankungen zu klären, wurde eine Kollagen XII defiziente Mauslinie charakterisiert. Diese Mäuse zeigen eine Muskelschwäche mit allen typischen Charakteristika einer Muskeldystrophie der progressiven Art mit frühem Krankheitsbeginn. Zusätzlich weisen Kollagen XII defiziente und heterozygote Mäuse hypermobile Gelenke auf, ein Zeichen des Ehlers-Danlos-Syndroms. Kollagen XII dürfte daher als Modulator der extrazellulären Matrix fungieren und so Stabilität und Integrität von Gewebe gewährleisten. Des Weiteren könnte Kollagen XII auch eine funktionelle Rolle in Regenerationsprozessen spielen, da die Wundheilung in Kollagen XII defizienten Mäusen verzögert zu sein scheint.

Kollagen XXII, ein kürzlich entdecktes Kollagen der FACIT-Subfamilie, zeigt ein sehr restriktives Expressionsmuster am Muskel-Sehnen-Übergang und im artikulären Knorpel. Da dieses Protein an Gewebeübergängen exprimiert wird, sollte die Interaktion zu Zellrezeptoren der Integrinfamilie untersucht werden. Kollagen XXII ist

in der Lage Zelladhäsion über $\alpha 2\beta 1$ -Integrin zu vermitteln und dieses auch in Fokalkontakte zu rekrutieren. Diese Rekrutierung stellt auch gleichzeitig den ersten Schritt einer Integrin-vermittelten Signaltransduktion dar. Direkte Interaktionsstudien bestätigen die Bindung von Kollagen XXII und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin am Muskel-Sehnen-Übergang, wo diese Proteine in Immunofluoreszenzanalysen auch in nächster Nähe zueinander exprimiert werden. Die neuen Motive GLQGER und GFKGER konnten als verantwortliche Bindemotive ausgemacht werden, welche spezifisch an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin exprimierende Zellen binden. Des Weiteren interagiert Kollagen XXII auch mit RGD-bindenden Integrinen exprimiert von Myozyten. Kollagen XXII könnte daher eine funktionelle Rolle für die mechanische Stabilität des Muskel-Sehnen-Übergangs spielen.

Abstract

In addition to elastin, proteoglycans and adhesion proteins like laminin and fibronectin, collagens are the main components of the extracellular matrix of the musculoskeletal system. The extracellular matrix of the muscle interconnects the myofibres and stabilises junctions to other tissues. In this thesis collagen XII and XXII were biochemically and functionally analysed.

Collagen XII, a multidomain protein of the subfamily of fibril associated collagens with interrupted triple helices (FACIT), binds to collagen I fibres with its collagenous domains and to tenascin-X, another matrix protein, with its third non-collagenous domain (NC3). Additionally, collagen VI was identified as a new interaction partner. Immunofluorescence analyses reveal the co-localisation of collagen XII and collagen VI in skin and skeletal muscle. The interaction was further confirmed at the ultrastructural level by electron microscopy that showed the N-terminal domains of collagen XII interacting with the collagenous domains of collagen VI. Deficiency of collagen XII in humans leads to a recently identified form of muscular dystrophy characterised by drastic muscle weakness, kypho-skoliosis and hypermobile joints. To elucidate the function of collagen XII in relation to the phenotypes found in human patients, a collagen XII deficient mouse line was analysed. These mice show a muscle weakness with all typical characteristics of a progressive muscular dystrophy of early onset. In addition collagen XII deficient and heterozygous mice have hypermobile joints, a sign of the Ehlers-Danlos-Syndrome. Taken together, collagen XII could act as modulator of the extracellular matrix and provide stability and integrity to the tissue. Furthermore, collagen XII may also have a functional role in regeneration processes, as wound healing in collagen XII deficient mice seems to be delayed.

Collagen XXII, a novel FACIT collagen, has a more restricted expression pattern and is deposited at the myotendinous junction and the articular cartilage. Because of its expression at border zones between tissues the interaction with the integrin family of cell receptors was analysed. Collagen XXII is able to mediate cell attachment, spreading and formation of focal contacts of $\alpha 2\beta 1$ integrin expressing cells. The recruitment of $\alpha 2\beta 1$ integrin into focal adhesion plaques is known to be the first step of an integrin mediated signalling pathway. Direct interaction studies reveal the binding of collagen XXII and $\alpha 2\beta 1$ integrin at the myotendinous junction, where both

proteins are expressed next to each other. The motifs GLQGER and GFKGER were identified as novel binding motifs showing specific interaction to $\alpha 2\beta 1$ integrin expressing cells. Furthermore, collagen XXII interacts with RGD binding integrins expressed on myocytes. Taken together, there is strong evidence that collagen XXII is functionally important for the mechanical stability of the myotendinous junction.