

Strukturen und Wechselwirkungen von Matrilinen und von Thrombospondinen -
multimere nichtkollagene Proteine der extrazellulären Matrix

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Daniel Patric Nitsche

aus Köln

Köln 2001

Für
Sabine Schmitz
und
in Erinnerung an
Μαρια & Πετρος Εκατό

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Paulsson

und

Prof. Dr. H. W. Klein

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

INHALT

Inhalt	1
Abkürzungen	6
Zusammenfassung	8
Einleitung	10
Die extrazelluläre Matrix	10
<i>Grundsubstanz: Glykosaminoglykane und Proteoglykane.</i>	10
Hyaluronsäure und Hyalektane	11
Proteoglykane der Basalmembran	12
Kleine leucinreiche Proteoglykane (SLRP)	13
<i>Fasersysteme</i>	14
Kollagene	14
Elastische Fasern	20
<i>Nichtkollagene Proteine</i>	21
Die Matrilin-Familie	22
<i>Matrilin-1</i>	24
<i>Matrilin-2</i>	25
<i>Matrilin-3</i>	26
<i>Matrilin-4</i>	27
Die Thrombospondin-Familie	28
<i>Thrombospondin-1 und -2</i>	29
<i>Thrombospondin-3 und -4</i>	30
<i>COMP (Thrombospondin-5)</i>	31
Domänen der Matriline und Thrombospondine	34
<i>Gemeinsame Domänen der Matriline und Thrombospondine</i>	34
Die epidermaler-Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne	34
Coiled-Coil-Domäne	34
<i>Zusätzliche Domäne der Matrilin-Familie – Die von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne</i>	35
<i>Zusätzliche Domänen der Thrombospondin-Familie</i>	37

TSP-Typ-III- und C-terminale Domäne	37
N-terminale Domäne	38
Prokollagenähnliche und TSP-Typ-I-Domäne	39
Aufgabenstellung	40
Ergebnisse	41
Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilinen	41
<i>Konstrukte und Klonierung</i>	41
<i>Expression und Reinigung His₆-markierter Volllängeproteine von Matrilin-2 und Matrilin-3</i>	44
<i>Expression und Reinigung His₆-markierter vWFA-Domänen von Matrilin-2 und Matrilin-3</i>	47
Charakterisierung von rekombinantem Matrilin-3	48
Reinigung und Charakterisierung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren	49
<i>Reinigung von Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötalen Rinderepiphysen</i>	50
<i>MALDI-TOF-Massenspektrometrie an Matrilin-1- und Matrilin-3-haltigen Komplexen aus fötalem Rinderknorpel</i>	53
<i>Zweidimensionale SDS-PAGE zum Nachweis von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren</i>	56
<i>Elektronenmikroskopie an Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren</i>	57
<i>Deglykosylierungsexperimente mit Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötaler Rinderepiphyse</i>	58
Elektronenmikroskopische Charakterisierung von rekombinantem Matrilin-4	59
Wechselwirkungen der Matriline	63
<i>Wechselwirkungsuntersuchungen nach dem ELISA-Prinzip (Wechselwirkungs-ELISA)</i>	63
Auswahl des Blockierungsreagenz	63
Wechselwirkungs-ELISA mit potentiellen Interaktionspartnern von Matrilin-3 und Matrilin-4	64
Kationenabhängigkeit der Matrilin-4-Interaktionen	65
Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung zwischen Matrilin-4 und Kollagen V	66
<i>Elektronenmikroskopische Untersuchung der Matrilinwechselwirkungen</i>	67
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Thrombospondinen	70
<i>Thrombospondin-4</i>	70
<i>Wechselwirkung des Thrombospondin-4 mit Kollagen I</i>	71
Rekombinantes COMP	75
Wechselwirkung des COMP mit Kollagen IX	76

Diskussion	81
Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilinen	81
<i>Rekombinantes Matrilin-2</i>	81
<i>Rekombinantes Matrilin-3</i>	82
N-terminale proteolytische Prozessierung des unmarkierten Matrilin-3	82
C-terminale Prozessierung des Matrilin-3	83
Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen an rekombinanten Matrilinen	85
<i>Struktur des Matrilin-3</i>	85
<i>Struktur des Matrilin-4</i>	86
Reinigung und Charakterisierung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren	89
Wechselwirkungen der Matriline mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix	92
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Thrombospondinen	94
<i>Strukturelle Charakterisierung von rekombinatem Thrombospondin-4 und COMP</i>	94
<i>Wechselwirkung zwischen Thrombospondinen und Kollagenen</i>	96
Wechselwirkung des Thrombospondin-4 mit Kollagen I	97
Wechselwirkung des COMP mit Kollagen IX	99
Ausblick	101
Material und Methoden	103
Molekularbiologie	104
<i>Allgemeine molekularbiologische Methoden</i>	104
Isolation von Gesamt-RNA aus Knorpelzellen (nach Chomczynski und Sacchi, 1987)	104
Bakterienkultur	104
Glycerinstocks	105
Plasmidpräparationen	105
Bestimmung von DNA-Konzentrationen und -Probenreinheit	106
Agarosegelelektrophorese	107
<i>Rekombinante Expression von Matrilinen</i>	107
Klonierungsstrategie	107
Gewinnung matrilinkodierender DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	108
DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	110
Ligation der Konstrukt-DNA mit dem Vektor	111
Bakterientransformation	111
DNA-Sequenzierung des konstruierten Plasmides	112

Zellkultur	114
<i>Das HEK-293-EBNA/pCEP-Pu-System</i>	114
<i>Kulturbedingungen</i>	114
<i>Verteilen von Zellen</i>	115
<i>Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen</i>	115
<i>Selektionierung</i>	116
<i>Expressionskontrolle</i>	116
<i>Produktion und Ernte</i>	116
<i>Einfrieren und Auftauen der Zellen</i>	116
Proteinchemie	118
<i>Proteinfällungen</i>	118
TCA-Fällung	118
Ethanol-Fällung	118
Methanol-Chloroform-Fällung	118
<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	119
Bisacrylamid/Acrylamid-Puffer	119
Gießen des SDS-Polyacrylamidgeles	119
Probenvorbereitung	119
Elektrophorese	120
Zweidimensionale-SDS-PAGE (nichtreduziert gefolgt von reduziert)	120
Färbung mit Coomassie Brilliant Blue	121
Silberfärbung	121
Immunoblot	122
<i>Proteinquantifizierung</i>	123
Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	123
Bradford-Assay	123
<i>Reinigung His₆-markierter Matrilin</i>	124
<i>Reinigung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren</i>	124
Extraktion von bovinem fötalem Knorpel	124
Kationenaustauscher SP Sepharose fast flow	125
Molekularsieb Sepharose CL-6B	125
<i>Reinigung von rekombinantem TSP-4 in Abwesenheit von Harnstoff</i>	125
<i>Proteinsequenzierung</i>	125

<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation– Time Of Flight – Massenspektrometrie</i>	126
<i>Enzymatische Deglykosylierung</i>	127
<i>Wechselwirkungsuntersuchung nach dem ELISA-Prinzip</i>	128
Elektronenmikroskopie	130
<i>Negativkontrastierung (negative staining)</i>	130
<i>Rotationsaufdampfung (rotary shadowing)</i>	131
<i>Protein-Gold-Komplexe</i>	131
Darstellung von kolloidalem Gold	131
Darstellung von Protein-Gold-Komplexen	132
Literatur	133
Anhang	147
Sequenzen muriner Matriline	147
Sequenzvergleich von TSP-4 und COMP aus Ratte	150
Abstract	151
Kurzzusammenfassung	152
Lebenslauf	153
Teilpublikationen	154
Zeitschriftenbeiträge	154
Erklärung	155
Danke	156

ABKÜRZUNGEN

Ac	Acetat
BSA	Rinderserumalbumin
CMP	Cartilage Matrix Protein
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
Δ CT	Matrilin-3-Konstrukt ohne C-terminale Oligomerisierungsdomäne
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EST	expressed sequence tag
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACIT	fibril-associated collagen with interrupted triple helix
FCS	fötale Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
HRP	Meerrettichperoxidase
IAP	integrin-associated protein
LB-	Luria-Bertani-
Lsg.	Lösung
LRR	leucin-rich repeat
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation– time of flight
MED	multiple epiphyseal displasia
MIDAS	metallionenabhängige Adhäsionsstelle (metal ion dependent adhesion site)
MS	Massenspektrometrie
NC	nicht-tripelhelikal (non-collagenous)
NEM	N-Ethylmaleinimid
NMR	nuclear magnetic resonance
o. A.	ohne Angabe
OD	Absorbanz
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSACH	pseudoachondroplasia

q-H ₂ O	Reinstwasser
RCS	Swarm-rat-chondrosarcoma
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
+ SH/ -SH	mit Reduktion / ohne Reduktion
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance)
TBS	trisgepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSP	Thrombospondin
vWFA	von-Willebrand-Faktor A
Vol.	Volumen

ZUSAMMENFASSUNG

Die beiden Familien extrazellulärer Matrixproteine, Matrilin und Thrombospondine verbindet ihre multimere Struktur. Für beide nimmt man an, daß sie eine Brückenfunktion zwischen verschiedenen Matrixkomponenten erfüllen und bei der Entstehung von Kollagenfibrillen mitwirken. Untersuchungen von natürlichen Mutanten zeigen, daß sie entscheidend bei der Bestimmung der morphologischen und mechanischen Eigenschaften des entsprechenden Gewebes mitwirken. So stehen Mutationen in Kollagen IX, COMP (Holden *et al.*, 1999; Muragaki *et al.*, 1996; Briggs *et al.*, 1995) und auch in Matrilin-3 in Verbindung mit der Knorpeldysplasie MED (Chapman *et al.*, 2001). Außerdem gibt es Mutationen in COMP, die zur der verwandten Pseudoachondroplasie führen (Deere *et al.*, 1998; Hecht *et al.*, 1995). Die in der folgenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse aus Struktur- und Wechselwirkungsuntersuchungen bieten Grundlagen für die Erforschung dieser Erkrankungen und erste Einblicke in ihre molekularen Ursachen.

Rekombinante Expression von Matrilinen und ihre Reinigung aus Gewebeextrakten ermöglichte Untersuchungen, die zu einem abschließenden Bild der Matrilin bezüglich ihres Oligomerisierungsgrades und ihres Erscheinungsbildes im Transmissionselektronenmikroskop führten. Rekombinantes Matrilin-3 und Matrilin-4 zeigten wie Matrilin-1 (Hauser und Paulsson, 1994) und Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999) eine bouquet-ähnliche Anordnung ihrer Untereinheiten, die auf eine disulfidstabilisierte Coiled-Coil-Oligomerisierung zurückzuführen war. Matrilin-3 bildet Tetramere, Matrilin-4 Trimere. Wie in Elektronenmikrographien des Matrilin-1 und Matrilin-2 erschienen ihre vWFA-Domänen als globuläre Segmente von etwa 5 nm Durchmesser. Der Proteinbereich aus vier EGF-Domänen, der sowohl im rekombinanten Matrilin-3 als auch im rekombinanten Matrilin-4 vorkam, konnte als dünne langgestreckte Struktur von etwa 7 nm Länge visualisiert werden. Einzeln exprimierte vWFA-Domänen und die Etablierung einer einfachen Reinigung dieser Faltungseinheiten stellen die Grundlage für deren zukünftige strukturelle Charakterisierung dar.

Neben den Homooligomeren von Matrilin-1 und Matrilin-3 wurden in nativen Extrakten fötaler Rinderepiphysen, Heterooligomere aus den Untereinheiten der beiden Proteine entdeckt, die auf eine Feinregulierung der Matrilineigenschaften im Gewebe schließen lassen. Im Gegensatz zur Matrilin-1-Untereinheit war die Matrilin-3-Untereinheit nicht glykosyliert. Außer der Interaktion zwischen diesen beiden Matrilinen wurden auch Kollagen V und

Fibronektin als Wechselwirkungspartner des Matrilin-3 und Matrilin-4 ermittelt. Während die Bindung an Kollagen V annehmen läßt, daß die beiden Matriline an der Fibrillogenese beteiligt sind, läßt ihre Wechselwirkung mit Fibronektin Spekulationen über eine fibronektinvermittelte Zellbindung der Matriline zu.

Rekombinant exprimiertes Thrombospondin-4 (TSP-4) und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) wurden ebenfalls im Elektronenmikroskop strukturell charakterisiert. Durch Vergleich der beiden pentameren Strukturen konnten die N-terminalen Domänen des TSP-4 als zentrale globuläre Struktur identifiziert werden, die vermutlich daher rührt, daß die benachbarte Coiled-Coil-Domäne für die Pentamerisierung verantwortlich ist und die einzelnen globulären Faltungseinheiten der N-Termini dicht beieinander hält. Am COMP, dem diese Domäne fehlt, war eine solche Masseanhäufung nicht zu beobachten. Gemeinsam war den Untereinheiten der beiden Proteine eine dünne langgestreckte Struktur aus vier EGF- und acht TSP-Typ-III-Motiven, deren C-Terminus von einer globulären thrombospondinspezifischen Domäne gebildet wurde.

Die Wechselwirkung zwischen TSP-4 und Kollagen I und die zwischen COMP und Kollagen IX wurden hier elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Beide Bindungen, die von den C-terminalen Domänen des jeweiligen Thrombospondins vermittelt wurden, wurden nachweislich durch die Anwesenheit von Zinkionen beeinflusst. Die Interaktion zwischen COMP und Kollagen IX steht wahrscheinlich in Verbindung mit den Knorpeldysplasien MED und PSACH.

EINLEITUNG

Die extrazelluläre Matrix

Für die Entwicklung vom einzelligen Organismus zum vielzelligen war die Entstehung einer extrazellulären Matrix notwendig, die dem Zellverband Struktur verleiht und deren mechanischen und physiochemischen Eigenschaften bestimmt. Wachstum und die Ausbildung spezialisierter Gewebe erfordern eine Dynamik der extrazellulären Matrix und eine Wechselbeziehung zu den mit ihr in Verbindung stehenden Zellen. Über Zelloberflächenrezeptoren kann sie auf die Zellen einwirken. So kann sie Einfluß auf die Synthese und Sekretion ihrer eigenen Komponenten und damit auf ihre eigene Zusammensetzung und ihren Umsatz nehmen. Durch Interaktion mit Oberflächenrezeptoren der Zellen ist die extrazelluläre Matrix aber auch an deren Adhäsion und Migration beteiligt sowie an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung. Die Anforderungen an sie sind ausgesprochen vielfältig: Beispielsweise kann sie als Basalmembran Adhäsionsgrundlage für Epithel- oder Endothelzellen sein. Im Knochen oder Zahn sorgt sie durch Mineralisierung für die Härte des Gewebes. Während sie in Sehnen deren Zugfestigkeit bedingt, widersteht sie im Gelenkknorpel hohen Kompressionsbelastungen. Dementsprechend unterschiedlich ist die Zusammensetzung aus ihren organischen Hauptbestandteilen: Kollagenen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und anderen nichtkollagenen Proteinen.

Grundsubstanz: Glykosaminoglykane und Proteoglykane.

Die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix bilden Glykosaminoglykane (GAG). Dabei handelt es sich um Polysaccharidketten, mit repetitiven Disaccharideinheiten, die einen Aminozucker (*Glukosamin oder Galaktosamin*) beinhalten. Zumindest eine der beiden Untereinheiten trägt eine Sulfat- oder Carboxylatgruppe. Die Gesamtheit dieser Gruppen verleiht dem Polysaccharid eine hohe negative Ladungsdichte und eine starke Hydrophilie. Aus diesen Eigenschaften resultieren ihr Bestreben nach großer räumlicher Ausdehnung, die gelartige Beschaffenheit und der hohe Schwelldruck (Turgor) der Matrix. Dieser Flüssigkeitsdruck verhilft ihr zu einer beachtlichen Widerstandsfähigkeit gegen Kompression. Nach höherer Beanspruchung sorgt er dafür, daß das Gewebe seine ursprüngliche Form annimmt. Der Gelcharakter der Grundsubstanz ermöglicht eine hohe Diffusionsfähigkeit des

Gewebes. Diese erleichtert die Versorgung eingebetteter Zellen mit niedermolekularen Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen. Die Grundsubstanz bildet, und zwar aus wenig Trockenmasse, aber auch ein Netzwerk, daß abhängig von seiner Zusammensetzung selektiv Proteine zurückhalten kann. Durch Bindung sowohl an Zelloberflächenrezeptoren als auch an Wachstumsfaktoren wie Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF), Gewebewachstumsfaktoren (TGF) und Epidermalwachstumsfaktoren (EGF) sind Proteoglykane an Regulationsmechanismen beteiligt. Nicht nur Betaglykan und die Syndekane, die als Transmembranproteine Bestandteil der Plasmamembran vieler verschiedener Zellen sind und dort als Co-Rezeptoren der Wachstumsfaktoren wirken, sondern auch die unten beschriebenen Matrix-Proteoglykane regeln die Bindung der Wachstumsfaktoren. Sie können dessen Wechselwirkung mit dem Rezeptor fördern oder hemmen.

Hyaluronsäure und Hyalektane

Wegen ihres einfachen Aufbaus aus nichtsulfierten Disaccharideinheiten und ihres Auftretens in einigen Bakterien hält man die Hyaluronsäure (Fraser und Laurent, 1996; Meyer und Palmer, 1934) für das phylogenetisch früheste GAG (Cássaro und Dietrich, 1977). Sie hat eine breite Gewebeverteilung und wird vermehrt während der Entwicklung und Heilung des Gewebes (Toole *et al.*, 1981; Toole *et al.*, 1976; Antonopoulos *et al.*, 1965) sowie in Entzündungsprozessen gebildet (Weigel *et al.*, 1986). Hyaluronsäure besteht aus bis zu 2500 Glucuronsäure/N-Acetylglucosamin-Einheiten und unterscheidet sich nicht nur in der Größe von den andern GAG, die in der Regel nicht mehr als 300 Monosaccharideinheiten besitzen. Im Gegensatz zu diesen wird sie nicht im Zellinneren gebildet und dann durch Exozytose freigesetzt, sie passiert die Plasmamembran bereits während ihrer Synthese durch ein transmembranales Enzym (Philipson und Schwartz, 1984; Prem, 1984).

Andere GAG treten in der Regel, gebunden an ein Kernprotein, als Proteoglykane auf. Im Verlauf des sekretorischen Weges, im rauhen endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, werden die reduzierenden Enden der GAG meist mit dem Serin einer definierten Bindungsregion des Kernproteins O-glykosidisch verknüpft. Die Proteoglykanfamilie der Hyalektane (*hyaluronan- and lectin-binding proteoglycans*), bestehend aus Aggrekan, Brevikan, Neurokan und Versikan, sind außerdem über den N-Terminus ihres Kernproteins, unterstützt von einem zusätzlichen Verbindungsprotein (Link-Protein; Baker und Caterson, 1979), in der Lage mit Hyaluronsäure große Aggregate zu bilden (Abb. 1) (Yamaguchi *et al.*,

1996; LeBaron *et al.*, 1992; Rauch *et al.*, 1991; Mörgelin *et al.*, 1988; Heinegård und Hascall, 1974).

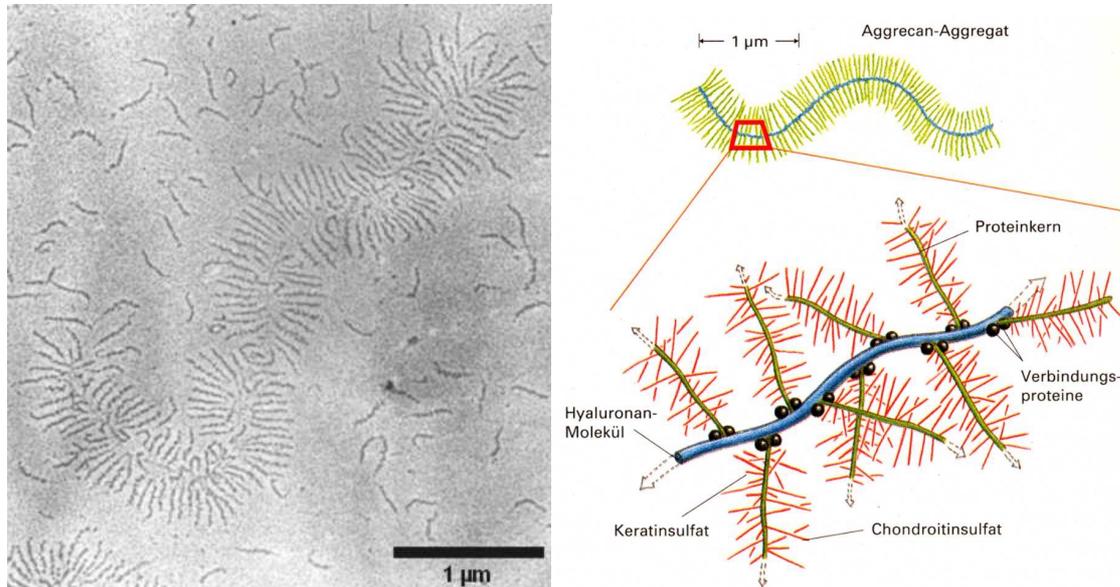


Abb. 1: **Bindung von Aggrecan an Hyaluronsäure** (übernommen aus Alberts *et al.*, 1995)

Proteoglykane der Basalmembran

Basalmembranen bilden widerstandsfähige und selektiv durchlässige Grenzen einer großen Anzahl von Geweben. Sie setzen sich aus Kollagen IV, Lamininen, Nidogen (Entaktin) und Basalmembranproteoglykanen zusammen. Zu den Proteoglykanen der Basalmembran gehören Perlekan, Bamakan und Agrin. Ihr raumfüllender und polyanionischer Charakter legt die Vermutung nahe, daß sie sterisch und elektrostatisch die Permeabilität der Basalmembran beeinflussen. Beispielsweise regulieren die Heparansulfat-Ketten des Perlekan die glomeruläre Filtration in der Niere (Murdoch und Iozzo, 1993). Die Funktionen dieses am weitesten verbreiteten Basalmembranproteoglykans sind ausgesprochen vielfältig. Unter anderem ist es an der Zellbindung, Zelldifferentiation und der Gewebeentwicklung beteiligt. Das spezialisiertere Bamakan hat vermutlich eine Aufgabe bei der Stabilisierung der entwickelten Basalmembran. Während Perlekan die Morphogenese von Geweben fördert (Handler *et al.*, 1997), scheint sie von Bamakan gehemmt zu werden, denn es wird während der Gewebeentwicklung nur wenig oder nicht exprimiert (Couchman und Woods, 1993). Agrin scheint eine Rolle in der Neuronalentwicklung innezuhaben (Ruegg, 1996; Slater, 1996). Einen Überblick über die Vielzahl der Funktionen von Basalmembranproteoglykanen gibt der Übersichtsartikel von Iozzo (1998).

Kleine leucinreiche Proteoglykane (SLRP)

Die Gruppe von kleinen leucinreichen Proteoglykanen (SLRP), zu der beispielsweise Dekorin, Biglykan und Fibromodulin gehören, zeichnet sich durch den Besitz von 6-10 leucinreichen Wiederholungseinheiten (leucin-rich repeats, LRR) aus. Dieser Bereich wird beidseitig flankiert von cysteinreichen Regionen. LRR-Bereiche werden in verschiedenen molekularen Erkennungsvorgängen verwendet. So treten sie bei der Zelladhäsion und Signaltransduktion aber auch bei der DNA-Reparatur und der RNA-Prozessierung auf. Basierend auf der röntgenkristallographisch ermittelten Struktur des Ribonukleaseinhibitors (Kobe und Deisenhofer, 1993) läßt sich für die strukturell homologen SLRP eine hufeisenähnliche Form vorhersagen (Weber *et al.*, 1996), die man für Dekorin in Elektronenmikrographien (Abb. 2) beobachten kann (Scott, 1996). *In-vitro*-Bindungsstudien zeigen Wechselwirkungen einiger SLRP mit fibrillenbildenden Kollagenen. Es wird angenommen, daß Bindungsmotive dafür an den Innenflächen der Hufeisenstruktur liegen und daß die tripelhelikalen Kollagenmoleküle von den bogenförmigen Proteoglykanen umschlossen werden (Weber *et al.*, 1996).

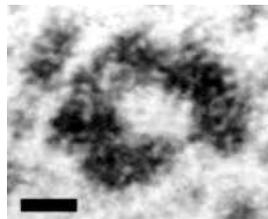


Abb. 2: **Elektronenmikrographie von Dekorin.** In dieser Darstellung nach *rotary shadowing* entspricht der Balken 2 nm. (übernommen aus Scott, 1996)

In-Vitro-Studien der Kollagenfibrillogenese und Beobachtungen an transgenen Mäusen zeigen, daß SLRP die Fibrillenbildung verzögern und den Durchmesser der fertigen Fibrillen begrenzen. Einen Überblick über die Literatur gibt der Artikel von Iozzo (1999).

Fasersysteme

Kollagene

Unter dem Begriff Kollagen faßt man eine Familie aus Proteinen mit einer besonderen Struktureigenschaft zusammen. Sie bilden tripelhelikale Bereiche aus, deren Einzelstränge linksgängige Helices vom Polyprolin-II-Typ ausbilden. Diese Fähigkeit basiert auf einer Wiederholungssequenz vom Typ Gly-X-Y, in der die variable Position X meist von Prolin eingenommen wird. Das Auftreten der seltenen Derivate 4-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin ist für Kollagene charakteristisch. Abstoßung unter den Pyrolidinringen der Iminosäuren begünstigt die helikale Form der Einzelketten. Die kleinen Glycinreste erlauben, daß sich die einzelnen Stränge eng umeinanderwinden. Stabilisiert wird die Helix durch verschiedene Wasserstoffbrückenbindungen und kovalent durch intramolekulare Aldolquerbrücken.

Kollagene bestimmen entscheidend die Gewebestruktur. Erkrankungen, die auf Defekten in den Proteinen (z.B.: Skorbut) oder gar in den Genen der Kollagene beruhen (z.B.: Ehlers-Danlos-Syndrom, Osteogenesis Imperfekta, Epidermolysis Bullosa, Alport-Syndrom und Knorpeldysplasien), haben meist massive strukturelle Gewebeschäden zur Folge. Darüber hinaus sind Kollagene an Regulationsprozessen beteiligt. So binden beispielsweise Integrine (Emsley *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 1998) und die beiden Discoidindomäne-Rezeptoren DDR-1 und DDR-2 tripelhelikale Kollagenbereiche (Vogel *et al.*, 1997; Shrivastava *et al.*, 1997).

Fibrillenbildende Kollagene - Kollagen I, II, III, V und XI: Fibrillenbildendes Kollagen wird in seiner löslichen Form, dem Prokollagen sezerniert. Spezifische Proteasen (Prokollagenpeptidasen) spalten extrazellulär ein N-terminales und ein C-terminales Propeptid ab. Die dabei entstehenden Tropokollagen-Moleküle des Kollagen I, II und III bestehen bis auf kurze nichttripelhelikale Bereiche am N- und C-Terminus, den sogenannten Telopeptiden, aus einer durchgehenden Kollagen-Tripelhelix von 300 nm Länge (Abb. 3). Bei der Prozessierung des Kollagen V und des Kollagen XI, bleibt ein N-terminaler nichttripelhelikaler Bereich erhalten, der eine globuläre Struktur ausbildet und im Falle des Kollagen V die Eigenschaft aufweist Heparin zu binden (Delacoux *et al.*, 2000; Chernousov *et al.*, 2000; Delacoux *et al.*, 1998; Yaoi *et al.*, 1990).

Fibrillenbildende Kollagene lagern sich in charakteristischer, gestaffelter Anordnung zu Fibrillen zusammen. Im Elektronenmikroskop zeigt sich diese Anordnung als typische Querstreifung. Die fibrilläre Struktur wird durch kovalente intermolekulare Quervernetzung zusammengehalten. Zwei Hydroxylysine treten dazu mit einem Lysin zu einer Hydroxypyridinium-Querbrücke zusammen. Lysine und Hydroxylysine, die in den Telozeptiden liegen, verbinden den C-Terminus des einen mit dem N-Terminus des anderen Moleküls. Unter dem Einfluß von fibrillenassoziierten Kollagenen, Proteoglykanen, anderen nichtkollagenen Proteinen und der kollagensezernierenden Zellen ordnen sich die Fibrillen zu höheren Strukturen wie Netzwerken.

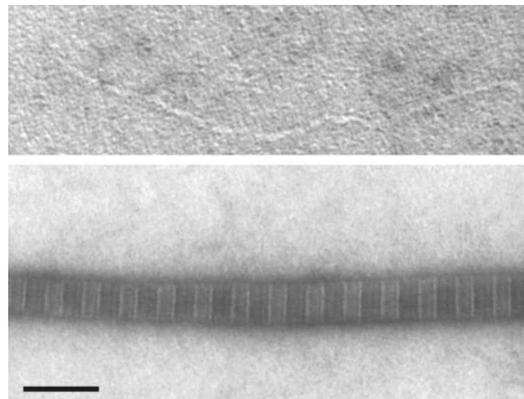


Abb. 3: **Fibrillenbildendes Kollagen.** Exemplarisch sind Elektronenmikrographien des Kollagen II nach Negativkontrastierung mit Uranylformiat dargestellt. Im *oberen* Teil ist ein Tropokollagen-II-Molekül dargestellt, das eine Länge von 300 nm besitzt. Der *untere* Teil zeigt eine Fibrille aus Kollagen II mit ihrer typischen Querstreifung. Der *Balken* entspricht 60 nm im *oberen* und 200 nm im *unteren* Teil der Abbildung.

Kollagen I ist das am häufigsten vorkommende Kollagen. Als Heterotrimer aus zwei unterschiedlichen Ketten, kommt es in zahlreichen Geweben wie Haut, Knochen und Sehnen vor, denen es durch Bildung von Mischfibrillen eine hohe Zugfestigkeit verleiht. Die fibrillenbildenden Kollagene III und V sind ebenfalls Bestandteile dieser Mischfibrillen. Man nimmt an, daß Kollagen V eine zentrale Kernfibrille bildet, an die koaxial Kollagen I angelagert ist (Birk *et al.*, 1988). Der Kollagen-III-Anteil der Mischfibrille ist gewebeabhängig und man glaubt, daß er einen Einfluß auf die Flexibilität und Elastizität der Fibrillen hat.

Kollagen II ist eine Hauptkomponente des Knorpels. Es ist homotrimer und liegt in Mischfibrillen vor (Abb. 4), in denen Kollagen XI eine zentrale Kernfibrille ausbildet (Petit *et al.*, 1993). An ihrer Oberfläche sind in gegenläufiger Richtung und in regelmäßigen

Abständen Kollagen-IX-Moleküle (Vaughan *et al.*, 1988) gebunden, die zu den fibrillenassoziierten Kollagenen gehören (s.u.).

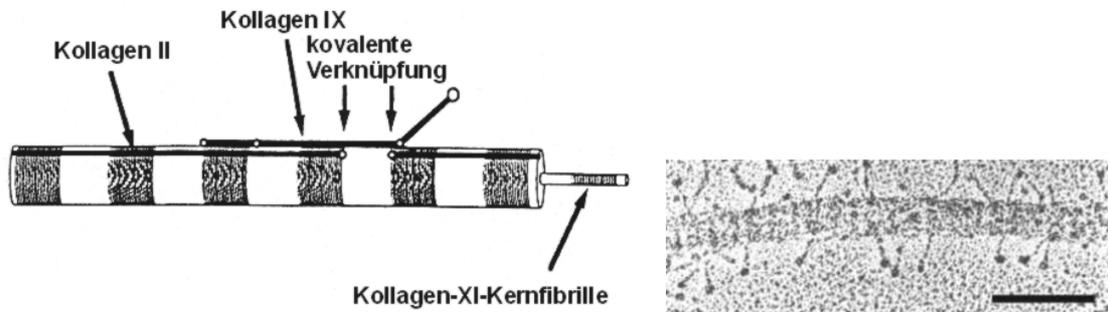


Abb. 4: **Kollagen-Mischfibrille**. Links: Schematische Darstellung (aus: van der Rest und Bruckner, 1993), rechts: Elektronenmikrographie (aus: Vaughan *et al.*, 1988; *Balken*: 100 nm) einer knorpeltypischen Kollagenfibrille. Deutlich sichtbar stehen die N-terminalen Bereiche aus der NC4 und der COL1 Region des Kollagen IX von der Fibrille ab.

Fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT): Die Kollagene IX, XII und XIV bilden selbst keine Fibrillen. Ihre typische superspiralisierte Kollagenstruktur ist von nichttripelhelikalen Domänen (NC) unterbrochen, so daß sich mehrere tripelhelikale Bereiche (COL) ergeben (Abb. 5). Kollagen IX ist unter ihnen das bestuntersuchte. Es bildet Heterotrimere und kommt assoziiert und kovalent verknüpft mit Kollagen-II-haltigen Fibrillen vor (Abb. 4) (Vaughan *et al.*, 1988). Wegen der Homologien in der Region COL1 nimmt man an, daß auch Kollagen XII und XIV in ähnlicher Weise an Kollagenfibrillen anhaften. Man glaubt, daß ihre Funktion darin liegt, Wechselwirkungen unter den Fibrillen oder zwischen Fibrillen und anderen Makromolekülen des Knorpels zu ermöglichen.

Kollagen IX besitzt vier nichttripelhelikale Bereiche. Der N-Terminus wird von der NC4-Domäne, der C-Terminus von der NC1-Domäne gebildet. Je nach Expressionsort tritt es als Proteoglykan auf. Die Länge seiner GAG-Kette, die mit der NC3-Region verbunden ist, variiert stark. Die NC3-Domäne ist sehr flexibel. Deshalb kann der Bereich aus COL3 und NC4 von der Fibrille abstehen. Diese Eigenschaft läßt vermuten, daß in diesem Bereich weitere Bindungsmotive des assoziierten Moleküls liegen, die zu den Interaktionen der Fibrille beitragen. Dafür spricht auch die Variabilität der NC4-Domäne, die gewebeabhängig durch Verwendung eines alternativen Promotors (Nishimura *et al.*, 1989) nur in verkürzter Form exprimiert wird und in manchen Geweben gänzlich fehlt (Olsen *et al.*, 1995).

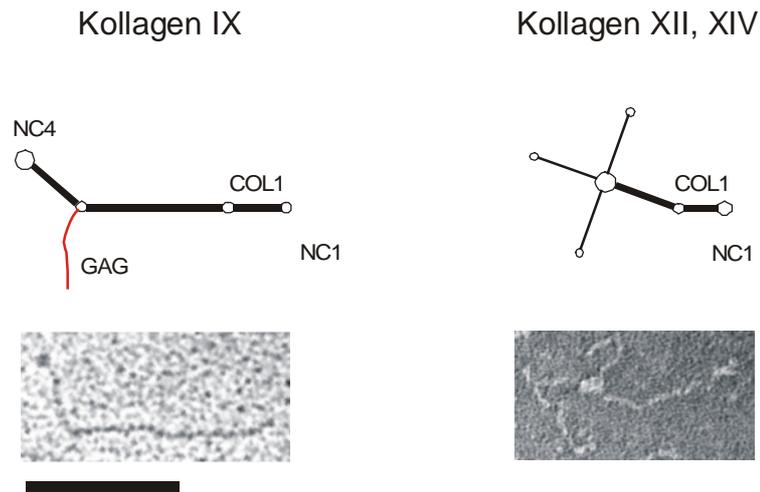


Abb. 5: **Fibrillenassoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices.** Die Kollagene IX, XII und XIV sind schematisch dargestellt. Nichttripelhelikale Domänen (NC) sind als *Kreise* dargestellt. Außerdem sind Mikrographien von Kollagen IX (*links*) nach *rotary shadowing* und von Kollagen XII (*rechts*) nach Negativkontrastierung abgebildet. Der *Balken* entspricht 100 nm

Basalmembran Kollagen - Kollagen IV: Kollagen IV ist ausschließlich in Basalmembranen lokalisiert. Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen 7S-Domänen führen zur Bildung von Tetrameren, die sich zu Netzwerken zusammensetzen (Abb. 6). Neben einer Dimerisierung der C-terminalen NC1-Domänen unter Ausbildung einer Disulfidbrücke sind vermutlich auch Interaktionen zwischen den tripelhelikalen Bereichen des Kollagen IV daran beteiligt. Das entstehende Netzwerk und ein Laminingeflecht, mit dem es über Nidogen (Entaktin) verbunden ist (Aumailley *et al.*, 1989; Paulsson *et al.*, 1987), bilden das strukturelle Gerüst der Basalmembran (Yurchenco und Schittny, 1990). Gemeinsam mit den Basalmembranproteoglykanen kann es Einfluß auf ihre Permeabilität nehmen; als Interaktionspartner der Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ nimmt Kollagen IV aktiv an der Zellanhftung teil (Goblik *et al.*, 2000; Käpylä *et al.*, 2000; Dickeson *et al.*, 1999; Calderwood *et al.*, 1997; Kern *et al.*, 1993; Tomaselli *et al.*, 1987).

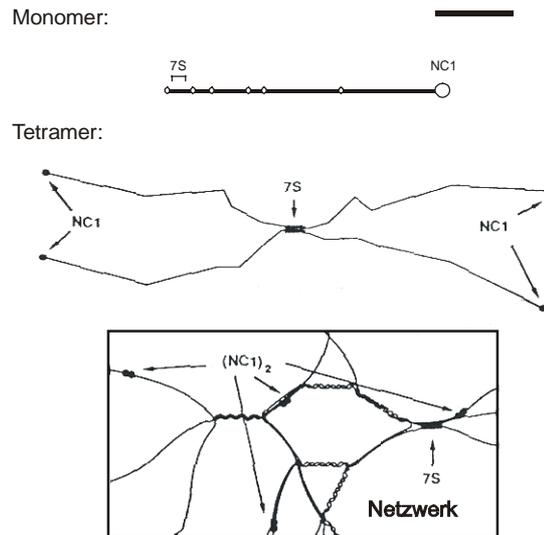


Abb. 6: **Netzwerk aus Basalmembrankollagen - Kollagen IV.** Der *Balken* entspricht 100 nm (verändert übernommen aus van der Rest und Garrone, 1991)

Mikrofibrilläres Kollagen - Kollagen VI: Als weites Netzwerk aus geperlten Filamenten tritt Kollagen VI auf (Abb. 7). Drei unterschiedliche α -Ketten des Kollagen VI sind bekannt, die Heterotrimere der Form $\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI})$ bilden. Die Enden des Moleküls bestehen aus großen, globulären Bereichen, die mehrere von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domänen (s.u.) beinhalten. Die tripelhelikalen Bereiche der Kollagen-VI-Moleküle lagern sich zunächst zu übergeordneten antiparallelen Dimeren und dann parallel zu Tetrameren zusammen (Bonaldo *et al.*, 1990). Durch Wechselwirkungen zwischen den globulären Bereichen der beiden Moleküle setzen sich diese zu langen perlenschnurähnlichen Strukturen zusammen. Alternatives Spleißen, das an der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette beobachtet wurde, könnte die Organisation dieser Filamente beeinflussen. Komplexe aus Biglykan und Matrilin-1 binden an die N-terminale Region des Kollagen VI (Wiberg, Dissertation, 2001). Man nimmt an, daß sie eine verbrückende Funktion zwischen diesem und den Netzwerken aus Kollagen-II und Aggrekan haben. Da das alternative Spleißen der $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette auch Einfluß auf den N-terminalen Bereich nimmt, kann es auf die Interaktion mit dem Biglykan/Matrilin-1-Komplex wirken. Mutationen im Kollagen VI führen zu einer neuromuskulären Erkrankung, der Bethlem-Myopathie (Pepe *et al.*, 1999 a, b; Lamande *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998; Jobis *et al.*, 1996).

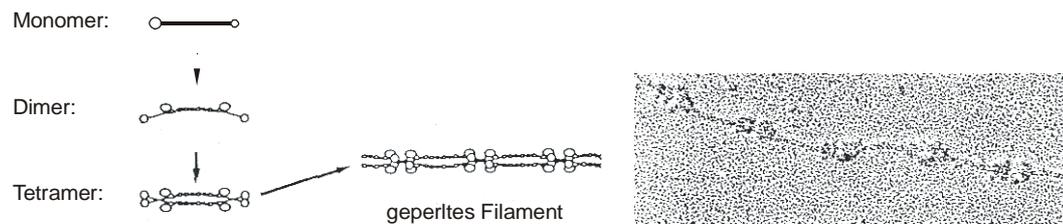


Abb. 7: **Geperkte Filamente aus Kollagen VI.** (verändert übernommen aus van der Rest und Garrone, 1991)

Ankerfibrillen – Kollagen VII: Antiparallele Dimere aus Kollagen VII bilden den Hauptbestandteil von Ankerfibrillen (Abb. 8), die Basalmembranen mit Ankerplaques des benachbarten Gewebestromas verbinden. Nachgewiesen wurden sie in den Verbindungen zwischen der Lamina Densa und der Dermis (Burgeson *et al.*, 1990).

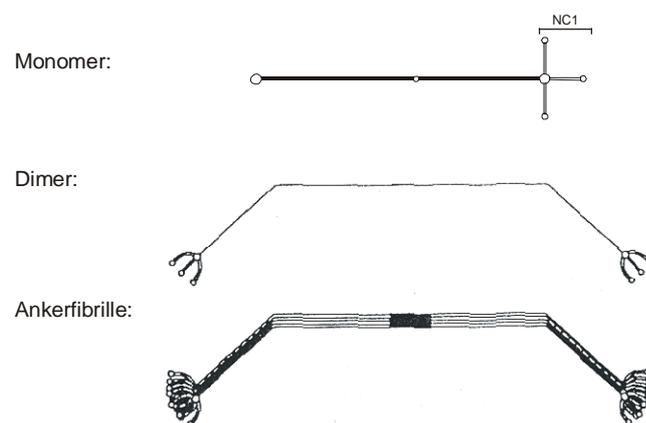


Abb. 8: **Ankerfibrillen aus Kollagen VII.** (verändert übernommen aus van der Rest und Garrone, 1991)

Hexagonale Netzwerke – Kollagen VIII und X: Isoliertes Kollagen X bildet *in vitro* hexagonale Netzwerke (Abb. 9). Im Knorpel wurde es mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Elektronenmikroskopisch wies man es dort assoziiert an Fibrillen und in filamentartigen, mattenähnlichen Strukturen um hypertrophe Knorpelzellen herum nach. Die Vermutung, daß Kollagen X dort als hexagonales Geflecht vorliegt, stützt sich auf die Homologie zum Kollagen VIII, das in dieser Form in der Descemet'schen Membran des Auges vorkommt.

Monomer:  (Kollagen VIII, X)

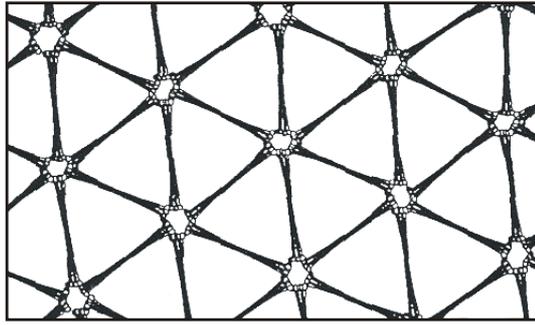


Abb. 9: **Hexagonale Netzwerke aus Kollagen VIII bzw. X.** (verändert übernommen aus van der Rest und Garrone, 1991)

Andere Kollagene: Die Kollagenfamilie umfaßt heute 24 Mitglieder (M. Koch, persönliche Mitteilung). Von vielen sind bisher nur die DNA-Sequenzen bekannt. Homologien mit den charakterisierten Kollagenen lassen aber Schlüsse auf deren Strukturen und Funktionen zu. Kollagen XVI und XIX weisen beispielsweise die charakteristischen Merkmale der FACIT-Gruppe auf.

Elastische Fasern

Elastinhaltige Fasern verleihen Geweben wie elastischem Knorpel, Blutgefäßen, oder der Haut Biegsamkeit und Elastizität bei Zugbeanspruchung. Die glycin-, alanin- und prolinreiche Aminosäuresequenz des Elastin besitzt einen hohen Anteil an hydrophoben Bereichen. Hydroxyprolin ist im Elastin selten und Hydroxylysin nicht vertreten. Die Elastinmoleküle sind untereinander verknüpft und zwar über Lysinonorleucin- und Desmosin-Querbrücken, die sich zwischen zwei bzw. vier Lysinresten ausbilden. Es wird vermutet, daß diese Brücken für die Elastizität des Proteins verantwortlich sind. Auch von der Val-Pro-Gly-Val-Wiederholungseinheit der hydrophoben Bereiche, die vermutlich eine helikale Anordnung von β -Schleifen bewirkt (β -Spirale), wird angenommen, daß sie zur elastischen Beschaffenheit beiträgt. (Urry *et al.*, 1983; Sandberg *et al.*, 1981; Ross und Bornstein, 1971).

Nichtkollagene Proteine

Die extrazelluläre Matrix besitzt eine Vielfalt an nichtkollagenen Proteinen. Wie die Proteoglykan-Kernproteine und einige Kollagene besitzen sie einen modulären Aufbau aus Domänen und sind in der Regel glykosyliert. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix aus den einzelnen nichtkollagenartigen Glykoproteinen ist ausgesprochen gewebeabhängig und sie verändert sich im Laufe ihrer Entwicklung. Dies deutet darauf hin, daß die nichtkollagenartigen Proteine die spezifischen Gewebeeigenschaften beeinflussen oder daß sie Zellen als Marker für ihren Zustand und den Zustand der umliegenden Gewebe dienen.

Das bereits erwähnte Link-Protein (Baker und Caterson, 1979), das die Verbindung zwischen Aggrecan und Hyaluronsäure stabilisiert und die Familie der Laminine, die eine Hauptkomponente der Basalmembranen sind und direkt an deren Zellinteraktion teilnehmen (Übersichtsartikel: Colognato und Yurchenco, 2000), seien hier exemplarisch erwähnt. Ein weiteres Beispiel ist Fibronectin, das von einem einzelnen Gen kodiert wird, aber auf Grund von alternativem Spleißen in verschiedenen Formen vorkommt (Burton-Wurster *et al.*, 1999; MacLeod *et al.*, 1996). Als C-terminal disulfidverknüpftes Dimer beeinflusst es in vielen unterschiedlichen Geweben integrinabhängig die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Unter Ausbildung weiterer Disulfidbrücken ist es in der Lage, fibrilläre Strukturen auszubilden, die zur gesteigerten Zelladhäsion und verminderten Zellwanderung führen.

Zu den nichtkollagenen Proteinen der extrazellulären Matrix gehören auch die Thrombospondin-Familie und die Matrilin-Familie, deren jüngste Mitglieder erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entdeckt wurden (Wagener *et al.*, 1997 und 1998 a). Beide Proteinfamilien werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

Die Matrilin-Familie

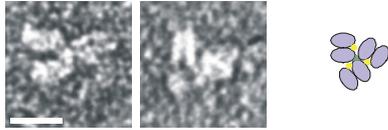
Matrilin-4 (Wagener *et al.*, 1998 a) ist das jüngste Mitglied der Matrilin-Familie, die zudem von Matrilin-1 (ehemals CMP) (Paulsson und Heinegård, 1979), Matrilin-2 (Deák *et al.*, 1997) und Matrilin-3 (Wagener *et al.*, 1997) gebildet wird. Die Matriline zeigen den bei Proteinen der extrazellulären Matrix häufig zu beobachtenden modulären Aufbau (Abb. 10). Die Zusammensetzung aus von-Willebrand-Faktor-A- (vWFA-) und epidermalen-Wachstumsfaktor-ähnlichen (EGF-) Domänen sowie einer C-terminalen Coiled-Coil-Region ist ihnen gemeinsam. Die EGF-Domänen der Matriline sind nicht vom calciumbindenden Typ (s. u.). Einen Überblick über die Matrilinfamilie gibt auch der Artikel von Deák *et al.* (1999).

Das nahezu vollständig aufgeklärte menschliche Genom läßt vermuten, daß außer den vier bekannten, keine weiteren Matriline existieren. Dies wird gestützt von einer Betrachtung der genetischen Umgebung, die annehmen läßt, daß der Bereich des Genoms, in dem die Matrilin-Gene lokalisiert sind einer zweifachen Duplikation unterlag, so daß aus einem Ur-Matrilin-Gen vier distinkte Gene entstanden sind (Gibson und Spring, 2000).

Matrilin-1 (Argraves et al., 1987; Kiss et al., 1989; Jenkins et al., 1990)



(Hauser, N. and Paulsson, M., 1994)



Matrilin-2 (Deak et al., 1997)



(Piecha et al., 1999)



Matrilin-3 (Wagener et al., 1997)



?

Matrilin-4 (Wagener et al., 1998)



?

- Signalpeptid □++ hohe positive Ladungsdichte ■ Oligomerisierungsdomäne
- A vWFA-Domäne ● EGF-Domäne ■ homologielose Sequenz

Abb. 10: **Modulärer Aufbau der Matrilin-Familie.** Die Mitglieder der Matrilin-Familie sind in einer schematischen Darstellung der Monomere und zum Teil in Elektronenmikrographien (*Balken*: 10 nm) und zugehörigen Modellen abgebildet. Die elektronenmikroskopische Untersuchung von Matrilin-3 und Matrilin-4 sowie das Aufstellen entsprechender Modelle war ein Ziel dieser Arbeit.

Matrilin-1

Matrilin-1 (CMP) ist ein nichtkollagenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 148 kDa. Sein Gewichtsanteil an Kohlenhydraten beträgt 3,9 %. Es besteht aus drei identischen, 52 kDa schweren Untereinheiten (Paulsson und Heinegård, 1981). Diese sind - gezeigt an der Primärstruktur von Hühner-Matrilin-1 (Argraves *et al.*, 1987, Kiss *et al.*, 1989), murinem (Aszódi *et al.*, 1996) und humanem Matrilin-1 (Jenkins *et al.*, 1990) - zusammengesetzt aus zwei vWFA-Domänen, die über eine EGF-ähnliche Domäne verknüpft sind. C-terminal schließt sich ein Coiled-Coil-Motiv aus fünf Heptad-Wiederholungseinheiten an, das die Oligomerisierung zum Homotrimer ermöglicht. Benachbarte Disulfidbrücken sorgen für eine kovalente Verknüpfung der Untereinheiten. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben diese Untereinheiten eine ellipsoide Form (Abb. 10). Diese kompakte Anordnung wird vermutlich durch Wechselwirkungen zwischen den beiden vWFA-Domänen erreicht (Hauser und Paulsson, 1994).

Außer in hyalinem Knorpel wie dem in der Trachealwand, dem Schwertfortsatz des Brustbeins (Processus xyphoideus), der Nasenscheidewand und den Epiphysen (Paulsson und Heinegård, 1982), konnte Matrilin-1 im Auge (Aszódi *et al.*, 1996, Tsonis und Goetinck, 1988), in Bändern und Sehnen, im Herzen und in muriner embryonaler Dermis (Segat *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Jüngste Ergebnisse zeigen eine Matrilin-1 Expression in Knochen (A. Klatt und O. Pullig, persönliche Mitteilung). Im Gelenkknorpel und dem Knorpel der Zwischenwirbelscheiben fehlt Matrilin-1 (Paulsson und Heinegård, 1982).

Die Funktion des Proteins ist bis heute nur unzureichend geklärt. Die im Laufe der Gewebereifung zunehmende Quantität und der steigende Grad an kovalenter Verknüpfung mit Aggrecan im Rindertrachealknorpel, lassen vermuten, daß Matrilin-1 einen Marker darstellt, der den Entwicklungszustand des Gewebes anzeigt (Hauser *et al.*, 1996). Es wurde beobachtet, daß Matrilin-1 in Chondrozyten-Kulturen mit Kollagen-II-haltigen Netzwerken co-lokalisiert ist, aber auch an Kollagen-II-unabhängigen Netzwerken beteiligt ist (Chen *et al.*, 1995). Seine Co-Fraktionierung mit Proteoglykanen (Paulsson und Heinegård, 1979) und Bindungsstudien mit Aggrecan (Hauser *et al.*, 1996) und Kollagen II (Winterbottom *et al.*, 1992) und eine erst kürzlich nachgewiesene biglykanvermittelte Wechselwirkung des Matrilin-1 an Mikrofibrillen aus Kollagen VI (Wiberg, Dissertation, 2001) deuten darauf hin, daß Matrilin-1 als Bindeglied zwischen diesen Komponenten der Knorpelmatrix fungiert. Daß Matrilin-1 in größeren Mengen erst nach EDTA-Zugabe extrahiert wird, läßt auf einen von zweiwertigen Kationen abhängigen Verankerungsmechanismus schließen (Hauser und

Paulsson, 1994). Matrilin-1-defiziente Mäuse weisen zwar eine normale Skeletalentwicklung auf (Aszódi *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999), die ultrastrukturelle Betrachtung deckte aber Anomalien in der Morphologie und der Organisation der Kollagen-II-haltigen Fibrillen auf (Huang *et al.*, 1999).

Matrilin-2

Matrilin-2 zeichnet sich durch eine breite Gewebeverteilung aus. In Bindegewebsarten wie beispielsweise Bändern und Sehnen, Perichondrium und Periost, der Dermis sowie im proliferierenden und im hypertrophen Knorpel wird es exprimiert und ist auch im fibrösen Stroma innerer Organe wie Herz und Milz nachzuweisen. In Muskel- und in Epithelzellen wurde die Transkription seines Genes beobachtet (Piecha *et al.*, 1999).

N-terminal beginnt das reife Matrilin-2 mit einem argininreichen Teilstück, dem die erste von zwei vWFA-Domänen folgt. Zwischen den beiden vWFA-Faltungseinheiten liegt ein Bereich aus zehn aufeinanderfolgenden EGF-Modulen. Der zweiten vWFA-Domäne folgt ein Sequenzbereich, der keine signifikanten Homologien zu anderen bekannten Proteinen zeigt und vermutlich keine höheren Strukturen ausbildet. Auch Matrilin-2 endet C-terminal mit einem Coiled-Coil-Motiv aus fünf Heptad-Wiederholungseinheiten und zwei vorangehenden Cysteinen. Das errechnete Molekulargewicht des murinen monomeren Proteins beträgt 104 kDa. SDS-PAGE und eine elektronenmikroskopische Untersuchung des rekombinanten Proteins ließen auf eine Tetramerisierung der Matrilin-2-Untereinheiten schließen, die disulfidstabilisiert ist (Piecha *et al.*, 1999). Das Ergebnis der Untersuchung des C-terminalen Coiled-Coil-Fragmentes, das eine Trimerisierung zeigte, läßt folgern, daß auch der übrige Teil des Proteins einen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad hat (Pan und Beck, 1998). In Elektronenmikrographien erscheinen die Untereinheiten des Matrilin-2 trotz der hohen Anzahl an EGF-Modulen als kompakte schlaufenförmige Struktur, die wahrscheinlich auf Grund einer intrachenaren Wechselwirkung der beiden vWFA-Domänen zustande kommt (Piecha *et al.*, 1999). Eine N-Glykosylierung des Proteins bei rekombinanter Expression in HEK-293-EBNA-Zellen konnte nachgewiesen und eine O-Glykosylierung mit Chondroitinsulfat, Dermatansulfat oder Heparansulfat ausgeschlossen werden (Piecha *et al.*, 1999).

Wechselwirkungsstudien mit Matrilin-2, die zur Ergründung seiner bisher unbekanntem Funktion beitragen sollten, geben Hinweise auf Interaktionen mit fibrillenbildenden

Kollagenen, Laminin, Fibronektin und Fibrillin (Piecha, Dissertation, 1999). In Zellkulturexperimenten mit glatten Muskelzellen bildet Matrilin-2 ein extrazelluläres, fibrilläres Netzwerk aus (Piecha *et al.*, 1999).

Matrilin-3

Das reife Monomer des Matrilin-3 besitzt wie Matrilin-2 einen N-terminalen, argininreichen Sequenzabschnitt aus 40 Aminosäuren, an den sich eine vWFA-Domäne anschließt. Im Gegensatz zu allen anderen Matrilinen besitzt Matrilin-3 nur diese eine vWFA-Domäne, der sich C-terminal vier EGF-Motive und dann eine potentielle C-terminale Coiled-Coil-Domäne anschließen. Zwei konservierte Cysteine und die darauf folgenden vier Heptad-Wiederholungseinheiten stellen innerhalb der Matrilin-Familie das Coiled-Coil-Motiv dar, das den betreffenden Konsensus am wenigsten erfüllt. (Wagener *et al.*, 1997; Wagener *et al.*, 2000). Das errechnete Molekulargewicht des murinen Matrilin-3 beträgt 49 kDa. In HEK-293-EBNA-Zellen rekombinant exprimiertes Matrilin-3, zeigt in der SDS-PAGE ein Laufverhalten, das einen starken Hinweis auf eine Tetramerisierung des Proteins darstellt. An der Oligomerisierung ist die Coiled-Coil-Region entscheidend beteiligt, denn rekombinantes Matrilin-3 dem die Coiled-Coil-Region fehlt, besitzt nicht die Fähigkeit Oligomere zu bilden. Die Oligomere des Vollängenkonstruktes zerfallen nach Reduktion in ihre Untereinheiten. Daß die der Coiled-Coil-Domäne benachbarten Cysteine für die Disulfidverknüpfung der Untereinheiten verantwortlich sind, ist wahrscheinlich, aber noch nicht nachgewiesen (Nitsche, Diplomarbeit, 1997; Klatt *et al.*, 2000).

Wie die Expression des Matrilin-1, ist die des Matrilin-3 hauptsächlich auf skeletale Gewebe beschränkt. Im Gegensatz zu Matrilin-1, das beispielsweise mit zunehmendem Alter eines Rindes in dessen Trachealknorpel akkumuliert, sinkt die Gewebekonzentration an Matrilin-3 drastisch nach Abschluß von Wachstums- und Umwandlungsprozessen. Das Protein läßt sich hauptsächlich in Knorpel wie dem der Trachea, des Anulus Fibrosus und dem der Epiphysen fötaler und neugeborener Mäuse detektieren. Dort ist es Bestandteil der territorialen wie der interterritorialen Matrix der Ruhe-, Proliferations- und hypertrophen Zone. Auch nach der Ossifikation der knorpeligen Knochenanlagen ist das Protein vorhanden. Die Expression des Matrilin-3-Gens durch Osteoblasten wurde durch *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Wie Matrilin-1 ist Matrilin-3 in der oberen Schicht des artikulären Knorpels nicht vorhanden (Klatt *et al.*, 2000). In Zellkulturexperimenten mit RCS-Zellen (*Swarm-rat-chondrosarcoma-*

Zellen), bildet extrazelluläres Matrilin-3 ein kollagenabhängiges, zellverbindendes Netzwerk (Klatt *et al.*, 2000). Neulich wurde von Mutationen im Matrilin-3-Gen von Patienten berichtet, die an multipler epiphysärer Dysplasie leiden (Chapman *et al.*, 2001).

Matrilin-4

Matrilin-4 besteht aus zwei vWFA-Domänen. Dazwischen liegt ein Sequenzbereich aus vier EGF-Modulen. Den C-Terminus des Proteins bildet ein potentiell Coiled-Coil-Motiv aus 4,5 Heptad-Wiederholungseinheiten. Die beiden Cysteine am N-Terminus der Coiled-Coil-Sequenz sind, wie in den anderen Mitgliedern der Matrilin-Familie, konserviert. Eine Spleißvariante des murinen Matrilin-4, der die N-terminale vWFA-Domäne fehlt (Wagener *et al.*, 1998 a) und humane Spleißvarianten mit veränderter Anzahl von EGF-Modulen, wurden per RT-PCR nachgewiesen (Wagener *et al.*, 1998 b).

Von allen Matrilinen zeigt Matrilin-4 die breiteste Gewebeverteilung. Immunhistochemisch detektierbar in dichtem und lockerem Bindegewebe kommt es in nahezu jedem Gewebe vor, in dem auch ein anderes Matrilin exprimiert wird, seien es die skeletalen Matriline Matrilin-1 und Matrilin-3 oder das zu diesen komplementäre Matrilin-2. Zusätzlich ist Matrilin-4 auch in der oberen Schicht des sich entwickelnden Gelenkknorpels vertreten, in dem keine anderen Matriline nachgewiesen wurden. In ascorbathaltigen Kulturen primärer embryonaler Mausfibroblasten bildet Matrilin-4 ein extrazelluläres Netzwerk (Klatt *et al.*, 2001).

Die Thrombospondin-Familie

Wie die Matriline, sind auch die Thrombospondine (TSP) multimere nichtkollagene Proteine der extrazellulären Matrix. Auch sie sind modular aufgebaut (Abb. 11). Charakteristischerweise besteht ihr C-terminaler Teil aus einer Serie von acht calciumbindenden TSP-Typ-III-Motiven und einer C-terminalen Domäne, die beide thrombospondinspezifisch sind. Der Besitz von drei bis vier EGF-Domänen, die teilweise vom calciumbindenden Typ sind (s.u.) und von einer Coiled-Coiled-Region, die im Falle des TSP-1 und TSP-2 der Trimerisierung und im Falle des TSP-3, TSP-4 und COMP (TSP-5) der Pentamerisierung dient, ist den Thrombospondinen gemeinsam. Wie bei den Matrilinen, sind die Untereinheiten der Oligomere in der C-terminalen Nachbarschaft der Coiled-Coil-Domäne durch Cysteinbrücken reihum miteinander verbunden. Mit Ausnahme des COMP, das mit einem N-terminalen Coiled-Coil-Motiv beginnt, tragen Thrombospondine eine heparinbindende N-terminale Domäne, die keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufweist. Außer im Oligomerisierungsgrad unterschieden sich TSP-1 und TSP-2 von den übrigen Familienmitgliedern durch den Besitz einer prokollagenähnlichen Domäne und dreier darauf folgender TSP-Typ-I-Domänen. Dieser Sequenzabschnitt liegt zwischen der Oligomerisierungsregion und der ersten EGF-Domäne. In ihrer Gewebeverteilung zeigen die Thrombospondine nur eine geringe örtliche und zeitliche Überlappung. Es ist daher anzunehmen, daß sie sich in ihren Funktionen genauso deutlich unterscheiden.

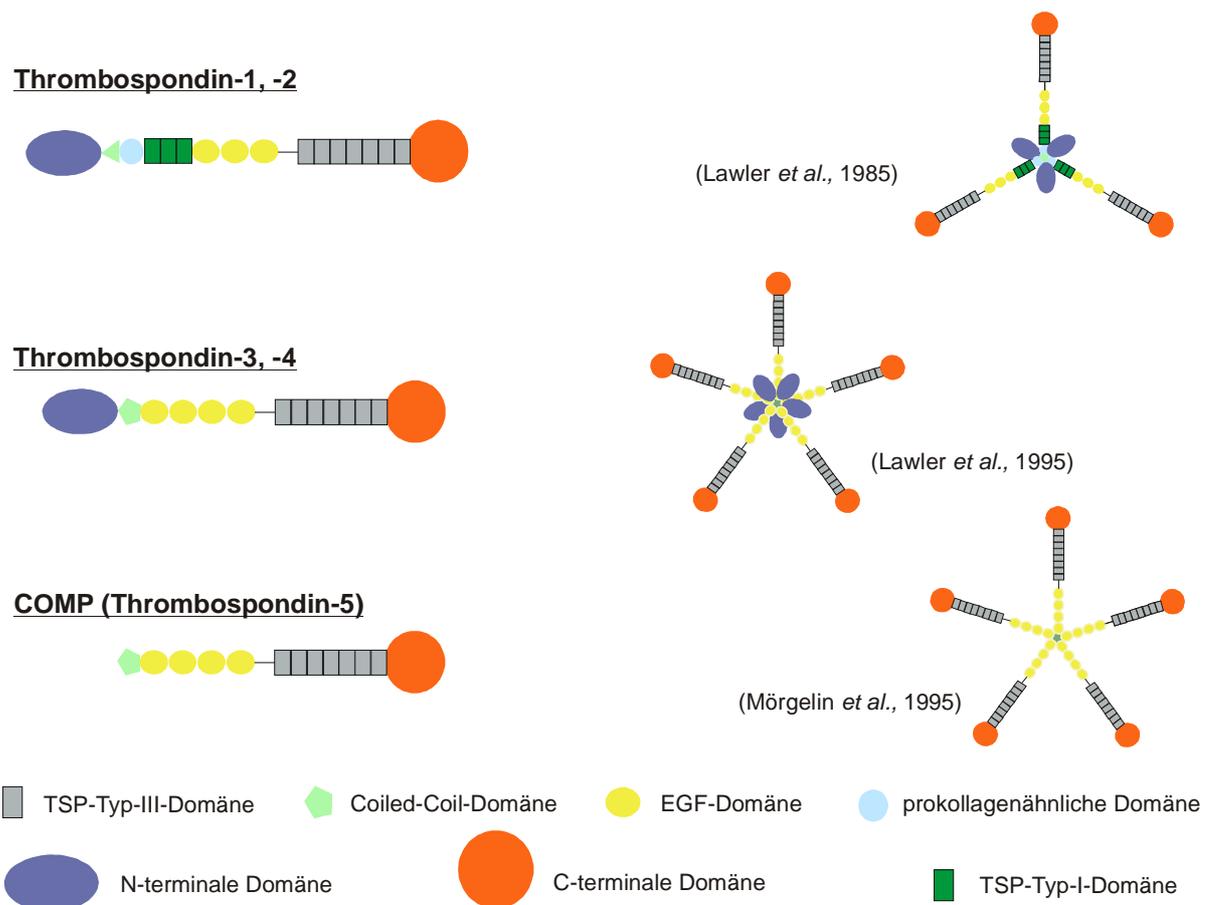


Abb. 11: **Die Thrombospondin-Familie.** Den modulären Aufbau der Thrombospondine zeigt eine schematische Darstellung der Monomere. Die abgebildeten Modelle der oligomeren Proteine basieren auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Thrombospondin-1 und -2

Das bestcharakterisierte Thrombospondin ist TSP-1. Wie TSP-2 bildet es Trimere mit einem apparenten Molekulargewicht von 450 kDa in der SDS-PAGE (Lawler *et al.*, 1978) und einer dreiarmligen Struktur in Elektronenmikrographien (Chen *et al.*, 1996 a; Lawler *et al.*, 1985; Coligan und Slayter, 1984). Beide sind in einer Vielzahl von Geweben präsent. Zahlreich sind auch die für TSP-1 vorgeschlagenen Eigenschaften und Funktionen. Einen Überblick über die Eigenschaften der beiden Thrombospondine geben folgende Artikel: Chen *et al.*, 2000 a; Bornstein *et al.*, 2000.

In relativ großen Mengen kommt TSP-1 in den α -Granula der Blutplättchen vor, aus denen es erstmalig isoliert wurde (Lawler *et al.*, 1982). Es zeigt Interaktionen mit vielen Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Laminin (Lawler *et al.*, 1986), Fibronektin (Lahav *et al.*, 1984), Kollagen I und Kollagen V (Galvin *et al.*, 1987; Mumby *et al.*, 1984). Durch Bindung

aktiviert es die Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie (Schultz-Cherry *et al.*, 1995; Murphy-Ullrich und Poczatek, 2000). Damit und durch Zellbindung über diverse Rezeptoren, darunter auch Integrine, nimmt es an einer Reihe von Regulationsmechanismen in Entzündungsprozessen, Wundheilung und Angiogenese teil. Es hat Einfluß auf Zellproliferation, -migration und Apoptose.

TSP-1-defiziente Mäuse zeigen in den ersten vier Wochen nach der Geburt keinen auffälligen Phänotyp. Danach wurden vermehrt Pneumonien und eine erhöhte Anzahl von Leukozyten im Blut beobachtet (Lawler *et al.*, 1998). Obwohl weniger schwerwiegend, ähneln die beobachteten Gewebeanomalien denen in TGF- β 1-defizienten Mäusen (Crawford *et al.*, 1998). Zahlreichen Gewebedefekte weisen TSP-2-defiziente Mäuse auf. Der Mangel an TSP-2, das in der Wildtypmaus in Knorpel, Perichondrium, Periost, Skelettmuskel, den Stratum Retikulare der Dermis, und dem in der Entwicklung befindlichen Knochen zu finden ist (Tooney *et al.*, 1998; Iruela-Arispe *et al.*, 1993), äußert sich beispielsweise in einer gestörten Fibrillogenese (Kyriakides *et al.*, 1999). Besonders in der Embryonalentwicklung der Maus besitzen TSP-1 und TSP-2 deutliche Unterschiede in ihrer örtlichen und zeitlichen Gewebeverteilung (Tooney *et al.*, 1998; Iruela-Arispe *et al.*, 1993). Hinweise auf Heterooligomere aus TSP-1 und TSP-2 gibt es bisher nicht. Zusammenfassend bleibt zu sagen, daß TSP-1 und TSP-2 trotz der hohen Homologie offensichtlich unterschiedliche Funktionen besitzen.

Thrombospondin-3 und -4

TSP-3 und TSP-4 bilden Pentamere, die in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von etwa 600 kDa zeigen. Ihre Struktur wurde durch Elektronenmikroskopie nach *rotary shadowing* dargestellt. Murines TSP-3 (Chen *et al.*, 1996 a) und humanes TSP-4 (Lawler *et al.*, 1995) wurden dazu nach rekombinanter Expression unter nativen Bedingungen isoliert. Außerdem wurde natives, aus Rindersehnen isoliertes TSP-4 untersucht (Hauser *et al.*, 1995). Nach einem von Lawler *et al.* (1995) postulierten Modell für TSP-4, das aufgrund der hohen Homologie zum TSP-3 wahrscheinlich auf dieses übertragbar ist, stellen fünf terminale globuläre Einheiten die C-terminalen Domänen des TSP-4 dar. Jeweils ein dünnes flexibles Segment, das aus den TSP-Typ-III- und EGF-Motiven aufgebaut ist, verbindet das C-terminale Modul mit einer pentameren Coiled-Coil-Domäne im Molekülzentrum. Eine größere Masseansammlung im Molekülzentrum resultiert wahrscheinlich aus eng

aneinanderliegenden globulären N-terminalen Domänen, die nicht als Einzelstrukturen aufzulösen waren. Ob diese Masseanhäufung, die an manchen TSP-4-Molekülen fehlte (Hauser *et al.*, 1995), ein Artefakt der rotary-shadowing-Technik war, bleibt zu untersuchen. Das Fehlen einer solchen Masseanhäufung kann auf eine proteolytische Spaltung zwischen der N-terminalen- und der Coiled-Coil-Domäne zurückzuführen sein (Hauser *et al.*, 1995).

Die Gewebeverteilung des TSP-3 ist bislang nur auf mRNA-Ebene untersucht. Die Transkription des Gens konnte ab dem 15. Tag der Embryonalentwicklung in Gehirn, Lunge und Neuronen von Mäusen beobachtet werden. In der adulten Maus ist die mRNA nur noch in der Lunge stark transkribiert (Iruela-Arispe *et al.*, 1993). In 15-Tage-alten Hühnerembryonen wurde sie im Perichondrium und im artikulären, proliferierenden und hypertrophen Knorpel nachgewiesen (Tucker *et al.*, 1997). Funktionen des TSP-3 sind bislang nicht bekannt. Ein RGD-Motiv zur integrinvermittelten Zellbindung, wie es im Bereich der TSP-Typ-III-Domänen des TSP-1 und des TSP-2 vorkommt, ist weder in der murinen noch in der humanen TSP-3-Sequenz konserviert. An TSP-3 defizienten Mäusen konnte bisher kein Phänotyp festgestellt werden.

Ungeklärt ist auch die Funktion des TSP-4. Seine Expression ist etwa ab dem 10. Tag der Embryogenese erkennbar. Mit fortschreitender Entwicklung nehmen die Orte der Expression zu. Häufig ist sie dann in Bindegeweben um Organe, im Perichondrium und Periost zu finden. Ab dem 17. Tag der Embryogenese entspricht die Gewebeverteilung der in neugeborenen und adulten Mäusen. Es kommt beispielsweise in Sehnen und Bändern, in den lockeren Bindegeweben der Dermis und der Skelettmuskulatur vor. Während der Wundheilung wird es überexprimiert (Narouz-Ott, Dissertation, 1999). Humanes TSP-4 besitzt im Gegensatz zum TSP-4 der Ratte und des Krallenfrosches ein RGD-Zellbindungsmotiv im Bereich der TSP-Typ-III-Domänen.

COMP (Thrombospondin-5)

Die bouquetähnlichen Pentamere des COMP besitzen ein Molekulargewicht von etwa 524 kDa (Hedbom *et al.*, 1992). Das nach elektronenmikroskopischer Untersuchung vorgeschlagene Modell für COMP (Mörgelin *et al.*, 1992) entspricht dem des TSP-4 mit Ausnahme der zentralen N-terminalen Domänen, die COMP nicht besitzt. Interessanterweise gibt es Hinweise auf Heterooligomere dieser beiden Thrombospondine (Hecht *et al.*, 1998 a; F. Zaucke, persönliche Mitteilung)

Zu finden ist COMP in der extrazellulären Matrix von Knorpel, Sehnen und Bändern (Hedbom *et al.*, 1992; DiCesare *et al.*, 1994 a, b; Hauser *et al.*, 1995), aber auch in der Membrana Synovialis (DiCesare *et al.*, 1997) und der Synovia (Saxne und Heinegård, 1992). Im sich entwickelnden Knorpel ist COMP im territorialen Bereich der Chondrozyten detektierbar (Shen *et al.*, 1994; Hedbom *et al.*, 1992). Im adulten Knorpel liegt es in den tieferen Schichten der interterritorialen Matrix vor. Über die Funktionen von COMP wird zur Zeit nur spekuliert. Die Bindung an primären Rinderchondrozyten in Zellkulturexperimenten (Sommarin *et al.*, 1989; DiCesare *et al.*, 1994 b) und die territoriale Lokalisierung im jungen Knorpel lassen vermuten, daß das Protein an für die Knorpelentwicklung wichtigen Zellinteraktionen teilnimmt. Ein RGD-Motiv ist im humanen und murinen COMP konserviert, im Protein der Ratte jedoch nicht. Ob COMP an einer direkten integrinabhängigen oder -unabhängigen Zellbindung beteiligt ist oder ob andere Proteine der extrazellulären Matrix als Bindeglied dienen, bedarf noch der Klärung. Kürzlich wurde gezeigt, daß COMP in zinkionenabhängiger Weise an die fibrillenbildenden Kollagene I und II bindet (Rosenberg *et al.*, 1998).

Eine Vielzahl von COMP-Mutationen wurde identifiziert, die zu den Knorpeldysplasien PSACH (*pseudoachondroplasia*) oder MED (*multiple epiphyseal dysplasia*) führen (Holden *et al.*, 1999; Deere *et al.*, 1998; Muragaki *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1995); bis auf vier Mutationen in der C-terminalen Domäne betreffen alle übrigen den Bereich der Ca²⁺-bindenden TSP-Typ-III-Domänen. Meist sind dort Aspartate betroffen, die wahrscheinlich an der Koordination von Calciumionen oder aber Cysteine, die an der Bildung der Ca²⁺-bindenden Struktur beteiligt sind. Mutierte Exon/Intron-Übergänge, eine Verschiebung des Leserasters oder vorzeitige Stop-Kodons, also Mutationen, die zum Verlust größerer Bereiche im reifen COMP führen können, wurden bisher bei PSACH oder MED nicht entdeckt. Neben Mutationen im COMP-Gen wurden auch mutierte Kollagen-IX-Gene entdeckt, die MED zur Folge haben. Die unauffällige Entwicklung COMP-defizienter Mäuse zeigt, daß die Expression von mutiertem COMP notwendig ist, um die entsprechende Knorpeldysplasie auszulösen (L. Svensson und Å. Oldberg, persönliche Mitteilung).

Chondrozyten von Patienten, die an den oben genannten Knorpeldysplasien leiden, lassen im Elektronenmikroskop große, lamelläre bis granuläre Einlagerungen im rauhen endoplasmatischen Retikulum erkennen (Hecht *et al.*, 1998 b; Maddox *et al.*, 1997; Maynard *et al.*, 1972; Stanescu *et al.*, 1993, 1982 a, 1982 b), die Aggrekan, COMP und Kollagen IX aber kein Kollagen II enthalten (Maddox *et al.*, 1997; Stanescu *et al.*, 1993, 1982 a, 1982 b).

Mit einer starken Reaktivität in diesen charakteristischen Einlagerungen geht eine sehr schwache extrazelluläre Markierung mit dem gegen COMP gerichteten Antikörper einher, die eine stark verminderte COMP-Sekretion anzeigt (Delot *et al.*, 1998).

Domänen der Matrilin und Thrombospondine

Gemeinsame Domänen der Matrilin und Thrombospondine

Die epidermal-Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, epidermal growth factor) ist ein kleines extrazelluläres Protein aus 53 Aminosäuren, das nach dem Binden an einen zellmembrandurchspannenden Rezeptor Mitose und Wachstum von Epidermis- und anderen Zellen anregt (Carpenter und Cohen, 1990). Mittlerweile sind zahlreiche zum EGF homologe Domänen aus extrazellulären Proteinen bekannt. Auffällig ist, daß sie paarweise oder sogar in längeren Ketten auftreten (Doolittle, 1995). Strukturuntersuchungen mit nuklearmagnetischer Resonanzspektroskopie ergeben: epidermal-Wachstumsfaktor-ähnliche Domänen (EGF-Domänen) sind ein kompaktes Paket aus fünf kurzen β -Strängen (Montelione *et al.*, 1992), das von drei Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Einige EGF-Domänen sind in der Lage Calciumionen zu binden (Rees *et al.*, 1988). Dazu benötigen sie vor ihrem ersten Cystein die Konsensussequenz D/N-X-D/N-E/Q (X: hydrophobe Aminosäure, der Schrägstrich trennt alternative Aminosäuren). Solche finden sich in den Proteinen der Thrombospondin-Familie, aber nicht im Matrilin.

Coiled-Coil-Domäne

Coiled-Coil-Domänen dienen in einer Vielzahl von Proteinen der Oligomerisierung, für die folgendes Modell existiert (Abb. 12). Proteinsequenzen, die in der Lage sind Coiled-Coil-Domänen auszubilden, zeichnen sich durch Heptad-Wiederholungseinheiten vom Typ **abcdefg** und eine α -helikale Sekundärstruktur aus. Die fett hervorgehobenen Positionen **a** und **d** werden von hydrophoben Aminosäuren - mit Ausnahme von Prolin - eingenommen. Die übrigen Positionen sind mit hydrophilen Aminosäuren besetzt. Der Glycinanteil ist dabei gering. An den Stellen e und g befinden sich häufig gegensätzlich geladene Reste. Wegen der α -helikalen Sekundärstruktur der Einzelstränge, sind die Reste **a** und e (**a** + 4) so wie **d** und g (**d** + 3) räumlich benachbart. Unter Ausbildung interchenarer hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Resten **a** und **d** und Salzbrücken zwischen den geladenen Gruppen e und g treten die Untereinheiten durch Superspiralisierung zur α -helikalen Coiled-Coil zusammen (Beck *et al.*, 1996). Für Matrilin-1 (Dames *et al.*, 1998) und COMP (Malashkevich *et al.*,

1996) wurde gezeigt, daß zwei Cysteine, die dem Coiled-Coil-Motiv N-terminal benachbart sind, unter Ausbildung von interchenaren Disulfidbrücken für zusätzliche Stabilität sorgen.

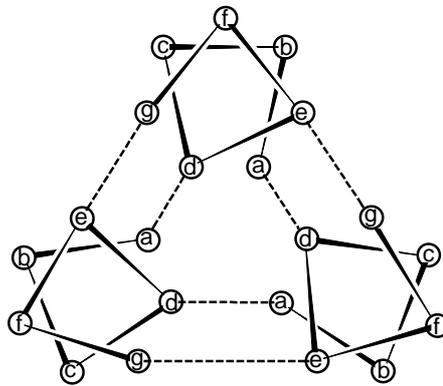


Abb. 12: Rolle der Heptad-Wiederholungseinheiten in der Coiled-Coil-Tripelhelix: Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die trimere superspiralisierte Struktur. Die gestrichelten Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Resten **a** und **d** wie auch die Salzbrücken zwischen den Gruppen **e** und **g** an.

Die beobachteten Oligomerisierungsgrade variieren vom Dimer bis hin zum Pentamer. Wie eine Punktmutationen (Arg → Gln) annehmen läßt, haben die meist geladenen Gruppen **e** und **g** Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad (Beck *et al.*, 1997). Diskrepanzen zwischen Untersuchungen an Peptiden (Pan und Beck, 1998) und an Volllängeproteinen (Piecha *et al.*, 1999) zeigen, daß auch die übrigen Bereiche des Proteins einen Einfluß auf die Coiled-Coil-Oligomerisierung haben können. Die Positionen **e** und **g** bestimmen wahrscheinlich auch, welche Einzelstränge interagieren und damit die Stöchiometrie möglicher Heterooligomere.

Außer in Matrilinen und Thrombospondinen findet man Coiled-Coil-Domänen beispielsweise auch in den Proteinen Keratin (Haar), Myosin (Muskel), Laminin (Basalmembran) und Fibrin (Blutgerinnsel).

Zusätzliche Domäne der Matrilin-Familie – Die von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne

Im namensgebenden von Willebrand Faktor liegen unter anderem drei homologe Domänen vom Typ-A vor (vWFA-1, vWFA-2 und vWFA-3). Der von Willebrand Faktor, ein multimeres Glykoprotein, nimmt an der Blutgerinnung teil. Er ermöglicht die Anlagerung der Blutplättchen (Thrombozyten) an das durch Verletzung freigelegte Subendothelium, indem er Bestandteile des Subendotheliums wie Kollagene und heparinähnliche Polysaccharide mit Thrombozytenrezeptoren verbrückt (Turitto *et al.* 1984, Girma *et al.* 1987). Von-Willebrand-

Faktor-A-ähnliche Domänen (vWFA-Domänen) findet man in Proteinen des Immun- und Komplementsystems, in den α -Ketten einiger Integrine und Proteinen der ECM wie Kollagen VI, in dem sie sehr zahlreich (15 bis 18 je Molekül) vertreten sind (Colombatti und Bonaldo, 1991). Sie besitzen die Fähigkeit, Proteoglykane, Laminin und Kollagene der Typen I bis VI zu binden (Colombatti und Bonaldo, 1991). Auch von Wechselwirkungen der vWFA-Domänen untereinander (Fowler und Fretto, 1989) wird berichtet. In Röntgenstrukturanalysen von vWFA-Domänen des von Willebrand Faktors (Emsley *et al.*, 1998; Huizinga *et al.*, 1997) und der vWFA-Domänen von Integrinen (Emsley *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995), konnte deren typische α/β -Rossmann-Faltung gezeigt werden (Abb. 13, A), in der ein zentrales β -Faltblatt zwischen charakteristisch angeordneten α -helikalen Abschnitten liegt. N- und C-Terminus dieser Domäne liegen dicht beieinander. Auf der gegenüberliegenden Seite dieser globulären Faltungseinheit liegt eine metallionenabhängige Bindungsstelle (MIDAS). Ein solches MIDAS-Motiv besteht aus dem Konsensus DXSXS (X: beliebige Aminosäure) und anderen geeigneten Aminosäuren, die nichtkontinuierlich mehr C-terminal gelegen sind. Es ist in der Lage Kationen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} koordinativ zu binden (Abb. 13, B). Unter Beteiligung von drei Wassermolekülen (ω) resultiert dabei eine oktaedrische Koordination (Emsley *et al.*, 1997). Mutationsexperimente (Kamata und Takada, 1994) und Co-Kristallisation konnten die Beteiligung des MIDAS-Motives und der Proteinoberfläche in seiner Umgebung an der Kollagenbindung dieser Domäne beweisen (Emsley *et al.*, 2000). Ein zentrales Mg^{2+} -Ion geht eine koordinative Interaktion mit einer Glutamat-Gruppe des Kollagens ein, die Teil einer GER-Sequenz (Gly-Glu-Arg) ist. Zwar können auch Mn^{2+} -Ionen die Position des Mg^{2+} -Ions einnehmen, nicht jedoch Ca^{2+} -Ionen, da diese einen wesentlich größeren Ionenradius besitzen. Die Bindung der vWFA-Domäne der Integrinketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ an unterschiedliche GER-haltige Sequenzen des Kollagen I wurde nachgewiesen (Xu *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 1998). Die Beteiligung des MIDAS-Motives an der Kollagenbindung erklärt die Abhängigkeit der Interaktion von der Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Konzentration. Obwohl gezeigt werden konnte, daß Ca^{2+} -Ionen alleine keinen fördernden Effekt auf die Interaktion der $\alpha 2$ -vWFA-Domäne mit Kollagen haben, wirken mikromolare Konzentrationen dieses Kations im Beisein von 2 mM Mg^{2+} -Ionen bindungsfördernd (Onley *et al.*, 2000).

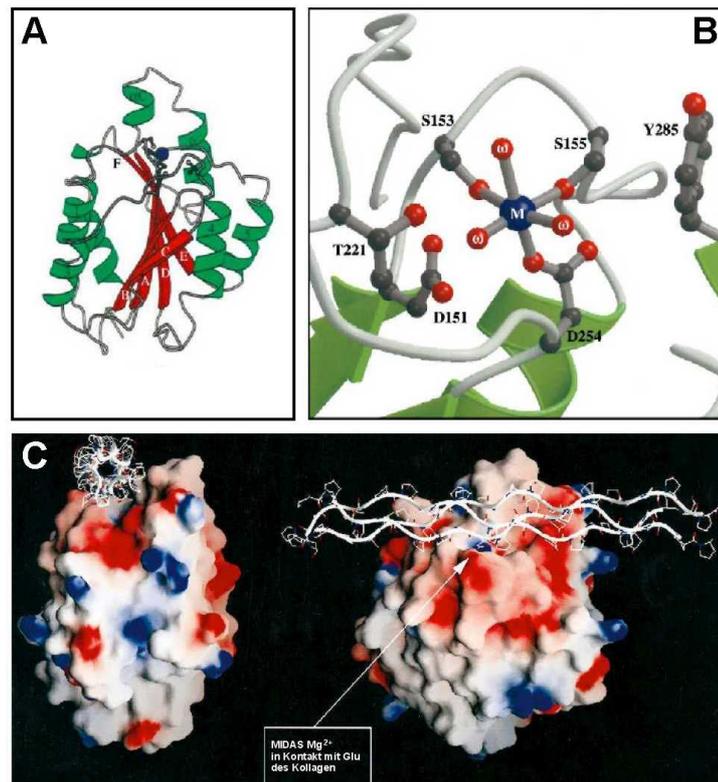


Abb. 13: vWFA-Domäne der Integrin $\alpha 2$ -Kette und ihr Bindungsmotiv für GER-Sequenzen in Kollagen-Tripelhelices. In A ist die Tertiärstruktur der Domäne in der Band-Darstellung abgebildet. α -Helices sind grün, β -Stränge rot und Schleifen grau dargestellt. Deutlich ist die α/β -Rossmann-Faltung zu erkennen. Wie in der vergrößerten Darstellung des MIDAS-Motives (B), sind die Seitenketten, die das zentrale Mg^{2+} -Ion koordinieren (blaue Kugel), als Kugel-Stab-Modell gezeigt. C verdeutlicht die Bindung einer Kollagen-Tripelhelix an die vWFA-Domäne. Das Mg^{2+} -Ion des MIDAS-Motives bindet dabei koordinativ den Glutamatrest einer GER-Sequenz. Die errechneten Oberflächenladungen des Proteins sind wie folgt dargestellt: blau: positiv, rot: negativ, weiß: neutral. (übernommen aus: Emsley *et al.*, 1997)

Zusätzliche Domänen der Thrombospondin-Familie

TSP-Typ-III- und C-terminale Domäne

Allen Thrombospondinen ist gemeinsam, daß ihr C-terminaler Teil aus mehreren TSP-Typ-III-Motiven und einer C-terminalen Domäne besteht. Beide sind sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen den verschiedenen Thrombospondintypen hoch konserviert. Die C-terminale Domäne des TSP-1 bindet an den Zelloberflächenrezeptor IAP (integrin-associated protein) (Gao *et al.*, 1996). Ein RGD-Motiv im Bereich seiner TSP-Typ-III-Domänen ist für eine integrinabhängige Zellbindung verantwortlich (Lawler und Hynes, 1989). Eine auf der Oberfläche von Endothelzellen befindliche Proteindisulfidisomerase kann

einen Disulfidaustausch katalysieren. Damit verbundene Strukturänderungen führen zur Freilegung der RGD-Sequenz (Hotchkiss *et al.*, 1998).

TSP-Typ-III-Motive zeigen eine Homologie zur calciumbindenden EF-Hand des Calmodulins, einem Strukturelement aus einer α -Helix, einer Schlaufe und einer weiteren α -Helix. Calciumionen werden im Bereich der Schlaufe unter pentagonal-bipyramidaler Anordnung der Bindungen koordiniert (Übersichtsartikel: Maurer und Hohenester, 1997; Maurer *et al.*, 1996). Obwohl den TSP-Typ-III-Motiven die flankierenden α -Helices der EF-Hand fehlen, sind sie in der Lage Calciumionen zu binden (Misenheimer und Mosher, 1995; Thur *et al.*, 2001; Maddox *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000 b). Man nimmt an, daß Cysteine in den Typ-III-Domänen, durch Ausbildung von Disulfidbrücken am Aufbau calciumbindender Schleifen beteiligt sind (Lawler und Hynes, 1986). Die Koordination von Calciumionen in diesem Bereich ist mit drastischen Konformationsänderungen verbunden (Thur *et al.*, 2001; Maddox *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000 b; Lawler *et al.*, 1982), die sich wahrscheinlich auch auf die C-terminale Domäne auswirken. Deshalb wurde vorgeschlagen, den Bereich aus TSP-Typ-III-Motiven und C-terminaler Domäne als strukturelle Einheit zu betrachten (Chen *et al.*, 2000 b). Mit steigender Anzahl gebundener Calciumionen wird diese Proteinregion kompakter. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an TSP-1, TSP-4 und COMP zeigen eine Verkürzung dieser Struktur nach Zugabe von Calciumionen (Chen *et al.*, 2000 b; Lawler *et al.*, 1995; Lawler *et al.*, 1982). Experimente von Misenheimer und Mosher (1995) zeigen, daß Zinkionen einen senkenden Effekt auf die Calciumbindung haben. Eine Bindung von Zinkionen an Thrombospondine wurde bisher aber nicht nachgewiesen.

N-terminale Domäne

Die geringsten Homologien weisen die verschiedenen Thrombospondintypen im Bereich der N-terminalen Domäne auf. Genauer studiert, ist soweit nur die N-terminale Domäne des TSP-1. Sie ist heparinbindend und man nimmt an, daß sie der Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen dient, die beispielsweise als membrangebundene Co-Rezeptoren der Zelloberfläche (z. B. Syndekan) fungieren (Frazier, 1991). Die Bindung des TSP-1 an den Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor führt zu seiner Endozytose und darauf folgend zu seiner Degradation. Sie bedarf der Anwesenheit von Heparansulfatproteoglykanen und erfolgt über die N-terminale Domäne (Chen *et al.*, 1996 b; Mikhailenko *et al.*, 1997).

Prokollagenähnliche und TSP-Typ-I-Domäne

Der Sequenzbereich aus prokollagenähnlicher Domäne und drei TSP-Typ-I-Domänen ist in TSP-1 und TSP-2, aber nicht in den anderen Thrombospondinen zu finden. Die Funktion der cysteinreichen prokollagenähnlichen Region, die homolog zum N-terminalen Propeptid der $\alpha 1$ -Kette des Kollagen I ist, ist bis heute unklar. Domänen mit Homologien zu TSP-Typ-I-Motiven sind in den Proteinen vieler unterschiedlicher Organismen verbreitet. Diese Proteine werden als Thrombospondin-Repeat-Superfamilie zusammengefaßt. Darunter sind Properdin, die Komplementfaktoren C6 bis C9 und Metalloproteasen der ADAMTS-Familie.

Die von den TSP-Typ-I-Domänen vermittelte Wechselwirkung mit dem Zelloberflächenrezeptor CD-36 bedingt wahrscheinlich die antiangiogenetische Eigenschaft des TSP-1 (Dawson *et al.*, 1997) und die der mit den ADAMTS verwandten Proteasen METH-1 und METH-2 (Vazques *et al.*, 1999). Die TSP-Typ-I-Domänen sind an der Aktivierung von TGF- β durch TSP-1 beteiligt, einem Vorgang, der durch TSP-2 inhibiert werden kann (Schultz-Cherry *et al.*, 1995; Murphy-Ullrich und Poczatek, 2000). TSP-Typ-I-Motive, die in Proteinen von Malariaparasiten vorkommen, sollen, einer unbestätigten Hypothese nach, an deren Zellbindung und damit an deren Eindringen in die Leber beteiligt sein (Frazier, 1987).

AUFGABENSTELLUNG

Strukturelle Untersuchungen und Wechselwirkungsstudien stellen die Grundlage für die Ermittlung der Funktionen von Proteinen dar und bilden die Basis für die Erforschung von Erkrankungen, die durch Abnormitäten in Proteinen hervorgerufen werden. Die Proteinfamilie der Matrilin- und der Thrombospondine, von denen einzelne Familienmitglieder mit Knorpeldysplasien in Verbindung gebracht wurden, sollten studiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die in der Diplomarbeit begonnene strukturelle Untersuchung des rekombinanten murinen Matrilin-3 weiterzuführen und es mit nativ aus Gewebe gereinigtem Matrilin-3 zu vergleichen. Gemeinsam mit dem später in unserer Arbeitsgruppe entdeckten und rekombinant exprimierten Matrilin-4 sollten sie im Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden, so daß die elektronenmikroskopische Charakterisierung aller Mitglieder der Matrilinfamilie auf den gleichen Stand gebracht würde. Die zugehörigen Techniken sollten dazu an unserem Arbeitskreis etabliert werden.

Weil sich rekombinantes Matrilin-3 und Matrilin-2 bislang nur mit mäßiger Ausbeute isolieren ließen, sollten rekombinante Varianten der Volllängepeptide mit einer Markierung hergestellt werden, die eine geeignete affinitätschromatographische Ein-Schritt-Reinigung ermöglichen sollte. Gegebenenfalls sollten Wechselwirkungspartner der Matrilin identifiziert werden.

Die von-Willebrand-Faktor-A-ähnlichen Domänen (vWFA-Domänen) des Matrilin-2 und des Matrilin-3 sollten als einzelne markierte Fragmente exprimiert werden. Sie gelten als wichtige funktionelle Einheiten der Matrilin und könnten deren Bindungsmotive tragen. Für einige ihrer Homologe aus anderen Proteinen sind solche Bindungseigenschaften bereits beschrieben (Colombatti und Bonaldo, 1991). Wenn erforderlich, sollten die vWFA-Domänen wie die Vollängen-Matrilin in Wechselwirkungsexperimenten eingesetzt werden.

Die im Laufe der Arbeit mit den Matrilinen etablierten Methoden sollten bei der Erforschung von Mitgliedern einer weiteren, den Matrilinen ähnlichen Familie extrazellulärer Matrixproteine, den Thrombospondinen eingesetzt werden. Auch hier sollten Strukturen und Wechselwirkungen untersucht werden.

ERGEBNISSE

Gemeinsame Merkmale der Matriline und Thrombospondine sind die Oligomerisierung über eine disulfidbrückenstabilisierte Coiled-Coil-Domäne und der Besitz von EGF-ähnlichen-Einheiten, die meist in Serien auftreten. Sie unterscheiden sich in den Bereichen, die man für funktionell hält. An Stelle der heparinbindenden N-terminalen-, der Typ-III- und C-terminalen Domäne der Thrombospondine, besitzen Matriline ein oder meist zwei vWFA-ähnliche Motive. Deren Homologe sind in der Lage Wechselwirkungen mit Proteoglykanen und Kollagenen einzugehen (Colombatti und Bonaldo, 1991).

Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilinen

Konstrukte und Klonierung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein kompletter Satz rekombinanter Matriline hergestellt und isoliert werden, der ausgedehnte Struktur- und Wechselwirkungsuntersuchungen erlauben sollte. Dazu wurden neben den Volllängeproteinen Matrilin-2 und Matrilin-3, auch deren einzelne vWFA-Domänen exprimiert (Abb. 14). Dies geschah in Erwartung einer geringeren Aggregationsneigung der Fragmente im Vergleich zum Volllängeprotein und um Interaktionen gegebenenfalls auf einzelne vWFA-Domänen eingrenzen zu können. Domänengrenzen wurden dabei unter Berücksichtigung von Intron-Exon-Grenzen gezogen, sofern diese bekannt waren (Deák und Wagener persönliche Mitteilung). In allen geplanten Fragmenten waren sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Cystein enthalten, die unter dem Verdacht standen eine intrachene Disulfidbrücke zu bilden (Huizinga *et al.*, 1997, Bienkowska *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1995).

Zur Vereinfachung der jeweiligen Proteinreinigung wurden die Konstrukte mit einer N-terminalen His₆-Markierung versehen. Ein bereits beschriebenes Volllängenprotein des Matrilin-3 ohne His₆-Markierung (Mat3fl; Nitsche, Diplomarbeit, 1997) wurde in dieser Arbeit weitergehend charakterisiert. Eine N-terminale proteolytische Prozessierung, die bei rekombinanter Expression in HEK-293-EBNA-Zellen am Mat3fl beobachtet wurde, wurde bei der Planung des His₆-markierten Proteins berücksichtigt, indem die ersten sieben N-terminalen Aminosäuren ausgelassen wurden. Die Erkennungssequenz der Schnittstelle, die hinter der siebten Aminosäure lag, sollte so zerstört werden.

Matrilin-2:

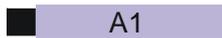
HisMat2fl:



5' GC CCA CTA GTT AGA GAG CGT CCC CAA GCC 3' $T_m = 60^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TCA TCT GTA TTT TAG GCG ATT TTC C 3' $T_m = 68^\circ\text{C}$

HisMat2A1:



5' GC CCA CTA GTT GAG AGT TCC TGT GAG AAT AAG C 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TTA TGT GCA CAG TTT GTT CTG GAA C 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

HisMat2A2:



5' GC CCA CTA GTT AGA TGC ACT GAA GGC CCA ATT G 3' $T_m = 66^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TTA TTC ACA GAT GCC TTC TTT CAG C 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

Matrilin-3:

Mat3fl:



5' GC CCA CTA GTC CGT TTG GCC CGC GCG AGC 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TTA ACG ATG TAC TTG TCC ATA TTC T 3' $T_m = 60^\circ\text{C}$

HisMat3fl:



5' GC CCA CTA GTT CGC CGG CTG GGG ACA C 3' $T_m = 58^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TTA ACG ATG TAC TTG TCC ATA TTC 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

HisMat3A:



5' GC CCA CTA GTT TGC AAG AGC AGG CCT TTG 3' $T_m = 64^\circ\text{C}$

5' C AAT GAC TGC GGC CGC TTA AGC ACA AAA GGT TTC CTG GAA TC 3' $T_m = 66^\circ\text{C}$



Abb. 14: Schematische Darstellung der rekombinant exprimierten Matrilin-Konstrukte. Unterhalb des jeweiligen Konstruktnamens und der schematischen Darstellung des Proteins sind die Primer angegeben, die zu seiner Generation dienen. Der 5'-Spel-Adapter ist blau, der 3'-NotI-Adapter grün und das Stop-Kodon rot hervorgehoben. Die Erkennungsstellen der Enzyme sind dabei kursiv dargestellt. Die Schmelztemperaturen (T_m) der in schwarz wiedergegebenen matrilinspezifischen Sequenzen wurden nach der „4+2-Regel“ errechnet.

Expression und Reinigung His₆-markierter Volllängeproteine von Matrilin-2 und Matrilin-3

Nach Transfektion und Selektionierung wurden die Zellkulturüberstände mit Hilfe von Immunoblots getestet. Zum Erhalt einer möglichen Oligomerisierung wurden die Volllängeproteine unter nichtreduktiven Bedingungen analysiert. Mit spezifischen Antiseren gegen Matrilin-2 bzw. Matrilin-3 konnte die Sekretion des jeweiligen rekombinanten, His₆-markierten Volllängeproteines gezeigt werden (Abb. 15, *Spur 1* und *1'*). Die Banden der überexprimierten Proteine waren nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue deutlich erkennbar (*Spur 2* und *2'*).

Das Volllängenkonstrukt des Matrilin-2 wurde vergleichsweise schwach exprimiert (*Spur 1* und *2*). Die stärksten Signale konnten im Bereich zwischen 66 kDa und 97 kDa detektiert werden. Ihre apparenten Molekulargewichte lagen damit deutlich unter der errechneten Molekülmasse eines Matrilin-2-Monomers von 104 kDa. Die schwache Expression und die mengenmäßige Dominanz der niedermolekularen Formen mit einer apparenten Molmasse zwischen 66 kDa und 97 kDa, deckte sich mit den Erfahrungen für das unmarkierte Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999).

Im Falle des Volllänge-Matrilin-3 konnte ein charakteristisches Muster aus potentiellen Tetra-, Tri-, Di- und Monomeren beobachtet werden (*Spur 1'* und *2'*), das bereits vom unmarkierten Matrilin-3 bekannt war (Nitsche, Diplomarbeit, 1997 und Klatt *et al.*, 2000). Im Vergleich zum Matrilin-2 war seine Expression schätzungsweise zehn mal höher.

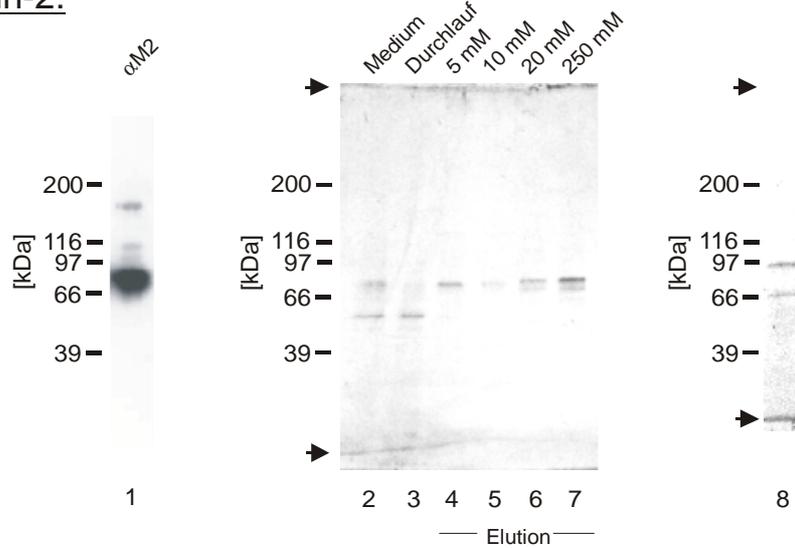
Nach Zellkultur im präparativen Maßstab wurden die His₆-markierten rekombinanten Proteine mit Hilfe der Metallionenaffinitätschromatographie aus den Kulturüberständen isoliert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand (pH 7-8) über eine Säule mit Cobaltaffinitätsmatrix gegeben (TALONTM Metal Affinity Resin, CLONTECH Lab., Inc.) und stufenweise durch Konkurrenz mit Imidazol eluiert (*Spur 4-7* bzw. *4'-7'*). Elution mit 250 mM Imidazol lieferte homogene Proben der rekombinanten Proteine.

Vom schwach exprimierten Volllängeprotein des Matrilin-2 (*Spur 7*). konnten nur die niedermolekularen Formen isoliert werden. Nach Reduktion zeigt die Probe im SDS-Polyacrylamidgel zwei Banden auf (97 kDa und 67 kDa), von denen die obere dem errechneten Molekulargewicht des Matrilin-2-Monomers von 104 kDa nahe kam. Ursache für das Auftreten einer 67-kDa-Bande ist wahrscheinlich eine proteolytische Prozessierung.

Nennenswerte Mengen der bekannten Matrilin-2-Oligomere (Piecha *et al.*, 1999) wurden mit der Ein-Schritt-Reinigung nicht erhalten.

Das Volllängenprotein des Matrilin-3 zeigte auch nach der Reinigung das charakteristische Bandenmuster (*Spur 7*). Wie im Folgenden noch gezeigt wird, bestand es aus unterschiedlichen Formen vom Monomer bis zum Tetramer. Auffällig war ein Doppelbandencharakter des Monomers im 50-kDa-Bereich und das Auftreten einer zweiten Bande im 60-kDa-Bereich nach Reduktion (*Spur 8*).

Matrilin-2:



Matrilin-3:

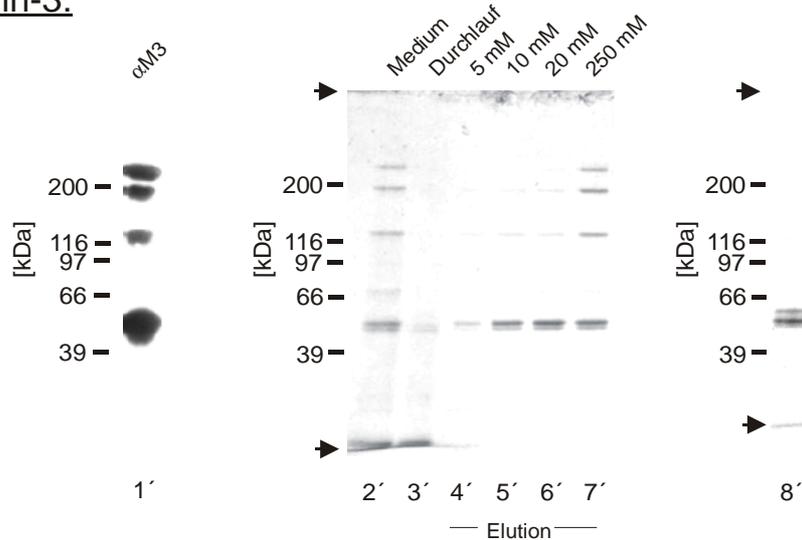


Abb. 15: **Expression und Reinigung His₆-markierter Volllänge-Matriline.** Je 25 µl des entsprechenden Zellkulturüberstandes wurde nach zwei Tagen Kultur mittels SDS-PAGE (ohne Reduktion, Trenngele: 4-15%) analysiert. Pfeile geben Ursprung und Lauffront der Gele an. Die Standardmolekulargewichte sind *links* in kDa angegeben. Die Expression der Vollängenkonstrukte von *Matrilin-2* (*oben*) und *Matrilin-3* (*unten*) wurde im Immunoblot nachgewiesen (1 und 1'), die zugehörigen Banden waren im *Medium* auch nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue erkennbar (2 und 2'). Die SDS-PAGE-Analysen der Reinigungen sind in den *Spuren 3-7* bzw. *3'-7'* dokumentiert (ohne Reduktion). Spur 3 und 3' zeigen den Säulendurchlauf. Die Spuren 4-7 bzw. 4'-7' zeigen die Elutionen mit den oben angegebenen Konzentrationen an Imidazol. Nach Reduktion der isolierten Proteine ergaben sich das in Spur 8 bzw. 8' dargestellte Bandenmuster.

Expression und Reinigung His₆-markierter vWFA-Domänen von Matrilin-2 und Matrilin-3

Die Sekretion der vWFA-Domänen in ihr Kulturmedium konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 16). Durch Vergleich mit einem Kontrollmedium (1, *Kontrolle*) von Zellen, die ein rekombinantes Protein von deutlich geringerer Mobilität (> 66 kDa) sezernierten, war die starke Überexpression der vWFA-Domänen des Matrilin-2 (2, *HisM2A1*; 3, *HisM2A2*) und der des Matrilin-3 (4, *HisM3A*) an jeweils einer Bande erkennbar, die in der Kontrolle fehlte. Die Banden zeigten eine Mobilität, die in etwa ihrem errechneten Molekulargewicht von 21 kDa entsprach.

Die stark sezernierten vWFA-Domänen ließen sich bei guter Ausbeute, mit der bei den Vollängenproteinen beschriebenen Methode isolieren. In der SDS-PAGE zeigte sich die Reinheit der eluierten Proteine (5-10).

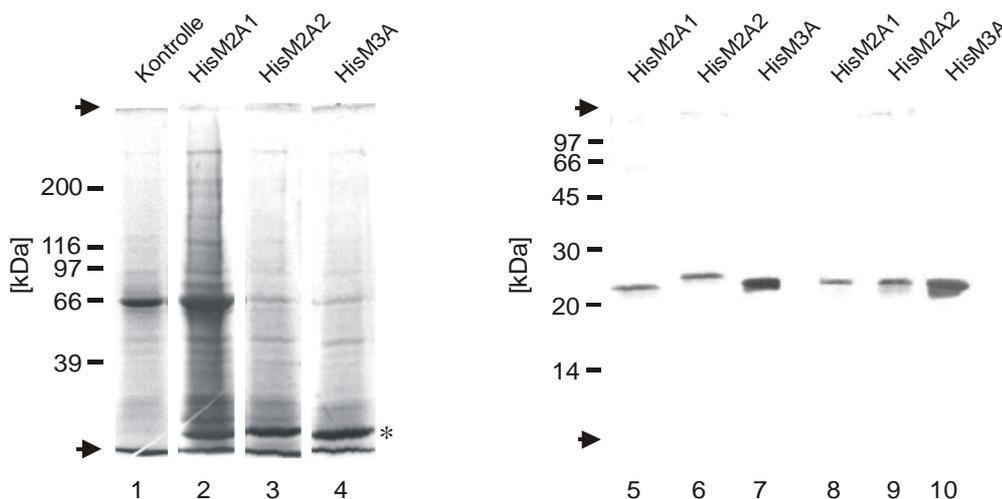


Abb. 16: **Expression und Reinigung His₆-markierter vWFA-Domänen der Matriline.** Nach zwei Tagen Kultur wurde je 1 ml des entsprechenden Zellkulturüberstandes abgenommen und die darin enthaltenen Proteine nach TCA-Fällung und Reduktion in der SDS-PAGE (Trenngele: 4-15%) analysiert. Durch Vergleich mit einem Kontrollmedium (1, *Kontrolle*), konnte die Expression der vWFA-Domänen von Matrilin-2 (2 und 3, *HisM2A1* und *HisM2A2*) und Matrilin-3 (4, *HisM3A*) nachgewiesen werden. Die Bandenlage der stark überexprimierten Proteine ist mit einem Stern (*) markiert. Die mittels Metallionenaffinitätschromatographie isolierten Proteine wurden nach (5-7) und vor (8-10) Reduktion einer SDS-PAGE unterzogen (Trenngel: 15%) und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (5, 8: *HisM2A1*; 6, 9: *HisM2A2*; 7, 10: *HisM3A*). Die Standardmolekulargewichte sind links in kDa angegeben, Ursprung und Lauffront mit Pfeilen markiert.

Charakterisierung von rekombinantem Matrilin-3

Struktur und Oligomerisierung des rekombinanten Matrilin-3 sollten elektronenmikroskopisch untersucht werden. Isoliertes, unmarkiertes Matrilin-3 wurde dafür nach Negativkontrastierung visualisiert. Die sichtbaren Partikel zeigten Heterogenität bezüglich ihrer Größe. Bei genauerer Untersuchung konnte das Vorhandensein aller Formen vom Monomer bis zum Tetramer beobachtet werden. Die Monomere wie die Untereinheiten der Oligomere besaßen eine kaulquappenähnliche Form. Basierend auf den Modellen für Matrilin-1 und Matrilin-2 (Hauser und Paulsson, 1994, Piecha *et al.*, 1999) wurde angenommen, daß es sich um eine globuläre vWFA-Domäne handelte (Durchmesser: 5 ± 1 nm), an die sich eine langgestreckte, dünne Struktur aus vier EGF-Domänen anschloß (Länge: 7 ± 2 nm). In den Oligomeren waren diese Untereinheiten in einem einzelnen Punkt miteinander verknüpft und bildeten die bouquetähnliche Anordnung aus, die auch für Matrilin-1 und Matrilin-2 beobachtet wurde. Von diesen unterschied sich Matrilin-3 durch eine weniger kompakte Gestalt, die auf Grund fehlender C-terminaler vWFA-Domänen mehr Kontrastmittel im Molekülzentrum zuließ. Dort waren die armähnlichen Strukturen deutlich zu sehen. Besonders im Falle der Dimere war eindeutig sichtbar, daß diese fadenförmigen Strukturen terminal miteinander verknüpft waren. Die Existenz eines Coiled-Coil-Motives, C-terminal von der Serie von EGF-Domänen, ließ annehmen, daß die Oligomerisierung durch Ausbildung einer Coiled-Coil erfolgte. Daß diese von ihren benachbarten Cysteinen unter Ausbildung interchenarer Disulfidbrücken stabilisiert wurde, ist sehr wahrscheinlich, denn der Zerfall der Oligomere in ihre Untereinheiten war in der reduktiven SDS-PAGE erkennbar. Dies galt sowohl für das unmarkierte Matrilin-3 (Nitsche, Diplomarbeit, 1997 und Klatt *et al.*, 2000) als auch für das neue Protein mit N-terminaler His₆-Markierung (Abb. 15, 8'). MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) an Letzterem, die im Rahmen einer Prozessierungsuntersuchung durchgeführt wurde, bestätigte dies (Klatt, Dissertation, 2001).

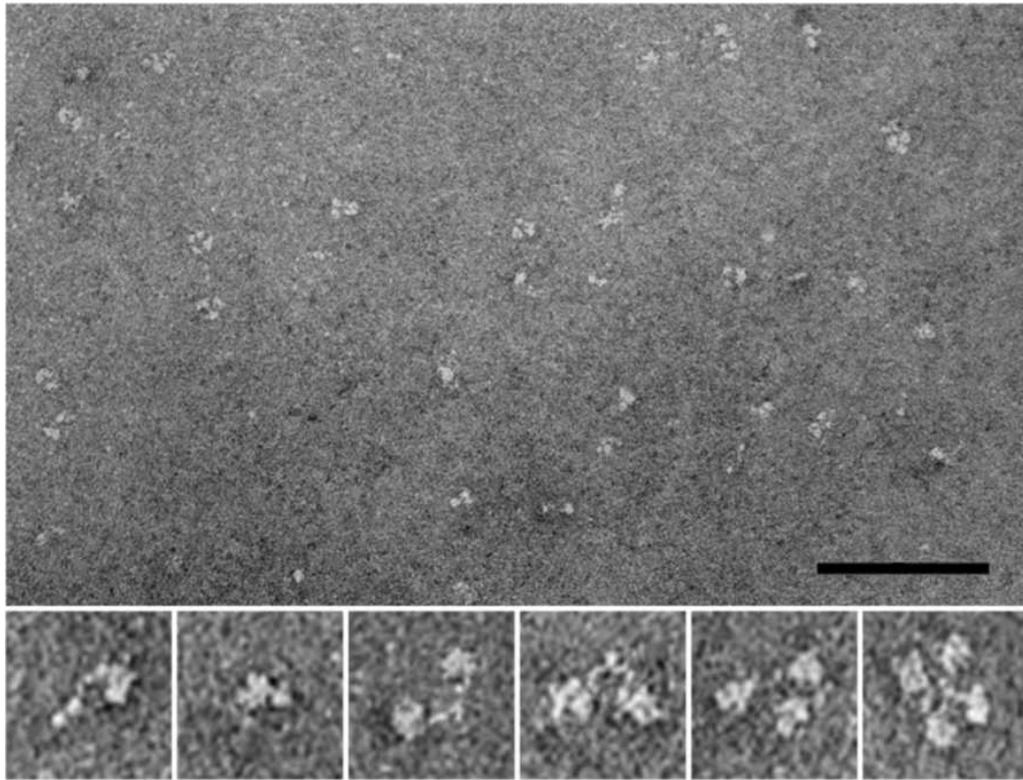


Abb. 17: **Elektronenmikroskopische Charakterisierung von rekombinantem Matrilin-3.** Murines rekombinantes Matrilin-3 wurde nach Negativkontrastierung im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Der *Balken* entspricht 100 nm in der Übersicht und 25 nm in den Vergrößerungen der ausgesuchten Moleküle, in denen von links nach rechts zwei mal ein Monomer, zwei mal ein Dimer, ein Trimer und ein Tetramer gezeigt sind.

Reinigung und Charakterisierung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren

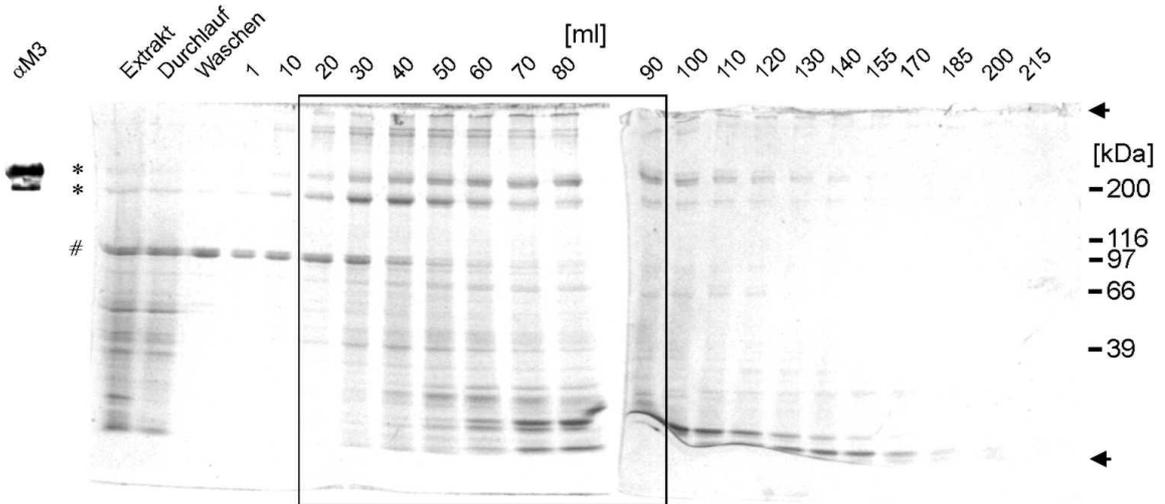
Das oben beschriebene rekombinante Matrilin-3 wurde zwar in eukaryontischen Zellen exprimiert, die eine möglichst getreue Faltung, posttranslationale Modifikation und Oligomerisierung gewährleisten sollten. Diese aber können sich, in Abhängigkeit von der Art der sezernierenden Zelle, also vom zellulären Umfeld, aber auch in Abhängigkeit vom extrazellulären Umfeld, unterscheiden. Folglich blieb die Frage, welche Form Matrilin-3 im Gewebe besaß, zunächst offen. Sie sollte durch Isolierung von Matrilin-3 aus Gewebe und dessen anschließende Charakterisierung geklärt werden.

Reinigung von Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötalen Rinderepiphysen

Zur Isolierung von Matrilin-3 sollte ein Gewebe gewählt werden, in dem es in ausreichender Menge vorkam. Brustbeinknorpel eines adulten Rindes und Gelenknorpel eines fötalen Rindes wurden auf ihren Gehalt an nativ extrahierbarem Matrilin-3 getestet. Wegen des erheblich höheren Gehaltes wurden die Epiphysen von Femur und Humerus eines Rinderfötus (5. – 6. Graviditätsmonat) im Beisein von 10 mM EDTA extrahiert. Der Reinigungsplan orientierte sich an der Reinigung des unmarkierten rekombinanten Matrilin-3 und wurde mit einer Kationenaustauschchromatographie begonnen. Bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Salinität von 100 mM NaCl banden Proteine, die eine Immunreaktivität mit dem Matrilin-3-Antiserum zeigten. Die Bindung erfolgte zwar nicht quantitativ, jedoch reichten die Proteinmengen für die weitere Reinigung aus. Die Hauptmenge der gewünschten Proteine eluierte bei einer Salinität von 200 mM bis 500 mM NaCl. Die vereinigten Fraktionen wurden zur weiteren Reinigung einer Gelfiltration unterzogen, die zu einer Probe der zu untersuchenden Proteine führte.

Knorpelextrakt 50 mM Tris HCl (pH = 7,4)
 200 ml (10g Gewebe) 100 mM NaCl
 10 mM EDTA
 je 2 mM NEM und PMSF

Kationenaustauscher 50 mM Tris HCl
 Matrix: SP-Sepharose fast flow 0,1-1 M NaCl-Gradient
 10 mM EDTA
 pH = 7,4



Gelfiltration 50 mM Tris HCl
 Matrix: Sepharose CL-6B 100 mM NaCl
 10 mM EDTA
 pH = 7,4

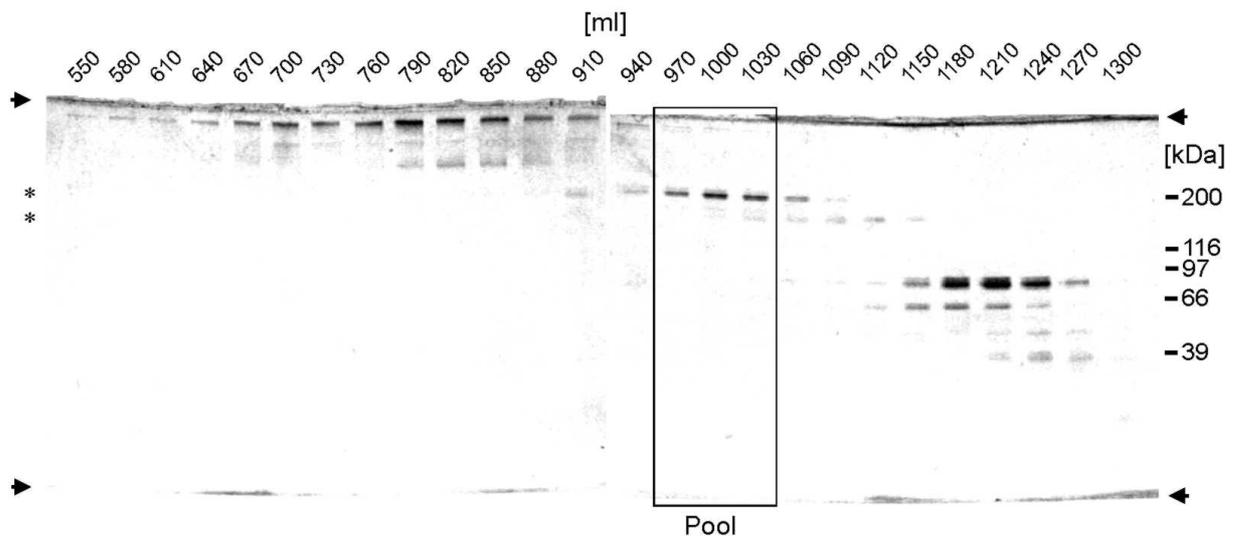


Abb. 18: **Reinigung von Matrilin-1- und Matrilin-3-Oligomeren aus fötalem bovinem Gelenkknorpel.** Die Fraktionen der Chromatographien wurden mittels SDS-PAGE (Trenngel: 4-15%, Silberfärbung) analysiert. Die Standardmolekulargewichte sind *rechts* in kDa angegeben, Ursprung und Lauffront der Gele sind mit *Pfeilen* markiert. Banden, die mit Matrilinantiserum reagierten, sind mit *Sternen* (*) markiert. Ein Immunoblot mit Matrilin-3-Antiserum zeigt *links* daneben die zugehörigen Signale aus einer Probe nach Kationenaustauschchromatographie ($\alpha M3$). Die mit einem *Doppelkreuz* (#) markierte Doppelbande wurde mittels N-terminalem Edman-Abbau als C-terminales Kollagen-II-Propeptid identifiziert. Die anschließend vereinigten Fraktionen der in der Gelfiltration isolierten Proteine sind mit „*Pool*“ gekennzeichnet. Eine Probe aus dem Bereich um 970 ml wurde in der weiter unten beschriebenen zweidimensionalen SDS-PAGE analysiert. Das Totalvolumen der Gelfiltrationssäule betrug 1800 ml, das Ausschlußvolumen 550 ml.

Bei der SDS-PAGE einer nichtreduzierten Probe der isolierten Proteine trat im gefärbten Gel ein Muster aus sechs Banden im Molmassenbereich von 140 – 205 kDa auf (Abb. 17). Die im Vergleich zum rekombinanten Matrilin-3 komplexere Zusammensetzung des Bandenmusters in diesem Bereich erforderte eine ausgedehnte Charakterisierung der Probe.

Der Großteil der Banden zeigte im Immunoblot-Experiment Immunreaktivität sowohl mit Matrilin-3- als auch mit Matrilin-1-Antiserum und stellte mögliche Heterooligomere der beiden Proteine dar (Abb. 17). Nur die Spezies mit der höchsten Mobilität in der SDS-PAGE zeigte deutlich eine reine Matrilin-1-Aktivität. Die Berücksichtigung des apparenten Molekulargewichtes (140 kDa), ließ den Schluß zu, daß es sich um homotrimeres Matrilin-1 handelte.

Nach Reduktion zerfielen die Proteine in zwei Untereinheiten, die im Immunoblot als Matrilin-3 (63 kDa) und Matrilin-1 (56 kDa) identifiziert wurden (Abb. 17). Man beachte, daß die Antiseren keine Kreuzreaktivität zum jeweils anderen reduzierten Matrilin zeigten.

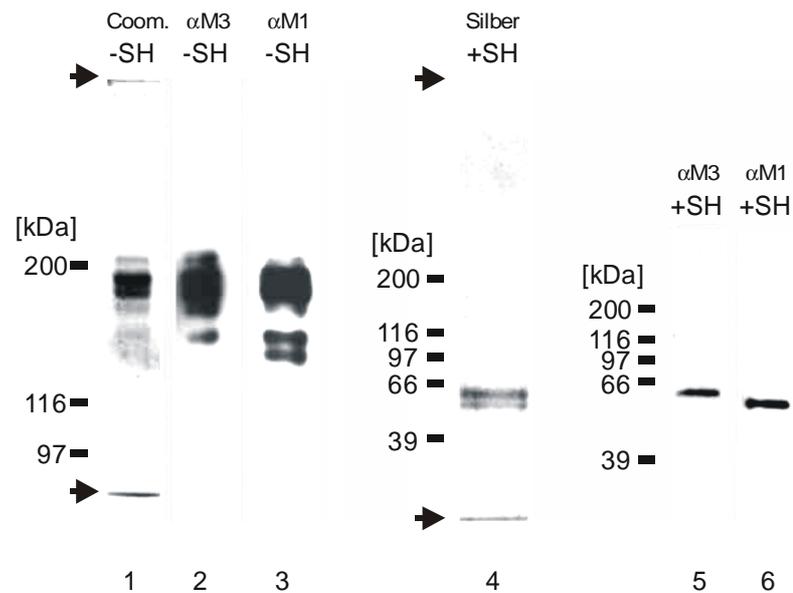


Abb. 17: **Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomere in der eindimensionalen SDS-PAGE.** Eine nichtreduzierte Proteinprobe (1-3) (-SH, 4% Trenngel) zeigte im SDS-Polyacrylamidgel nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (1) fünf Banden. Das Bandenmuster wurde in Immunoblot-Experimenten mit spezifischem Antiserum gegen Matrilin-3 (2) ($\alpha M3$) bzw. Matrilin-1 (3) ($\alpha M1$) analysiert. Die Probe wies nach Reduktion (4-6) (+SH, 4-15% Trenngel) zwei Banden im silbergefärbten Gel (4) auf, deren obere im Immunoblot Reaktivität mit Matrilin-3-Antiserum (5) ($\alpha M3$) und deren untere Reaktivität mit Matrilin-1-Antiserum (6) ($\alpha M1$) zeigte. Die Standard-Molekülmassen sind links in kDa angegeben. Pfeile markieren Ursprung und Lauffront der Gele.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie an Matrilin-1- und Matrilin-3-haltigen Komplexen aus fötalem Rinderknorpel

Für Matrilin-1 war bekannt, daß es in der SDS-PAGE kein ideales Laufverhalten zeigt (Paulsson und Heinegård, 1979). Ähnliches war auch für Matrilin-3 zu erwarten. Zur Bestimmung der Oligomerisierungsgrade wurden daher exakte Molmassen der reduzierten Untereinheiten und der nichtreduzierten Oligomere mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelt. Die reduzierten Monomere wiesen Molekulargewichte von 53,0 kDa und 49,3 kDa auf (Abb. 18, A). Begründet mit den aus den bekannten DNA-Sequenzen errechneten Molekulargewichten von Matrilin-1 und Matrilin-3 aus Mensch (51,3 kDa und 50,0 kDa) und Maus (51,1 kDa und 48,9 kDa) und mit dem durch Ultrazentrifugation (Paulsson und Heinegård, 1981) und MALDI-TOF-MS ermittelten Molekulargewicht des bovinen Matrilin-1 aus Trachealknorpel von 52 ± 2 kDa bzw. 54,8 kDa ist das höhere Molekulargewicht dem Matrilin-1 zuzuordnen, zumal auch gezeigt wurde, daß dieses N-glykosyliert ist (Paulsson und Heinegård, 1981). Die geringen Differenzen zwischen

den errechneten Molmassen des Matrilin-3 aus Mensch und Maus und dem massenspektrometrisch ermittelten Molekulargewicht des Rinder-Matrilin-3 sprechen für ein geringes Ausmaß an möglichen posttranslationalen Modifikationen. Zu Beachten ist das anomale Laufverhalten der beiden Proteine im SDS-Polyacrylamidgel in dem Matrilin-3 eine geringere Mobilität als Matrilin-1 zeigte. Vor Reduktion erhielt man schwache, gering aufgelöste Signale im Bereich von 155 kDa und 200 kDa, die auf die Existenz sowohl von Trimeren als auch von Tetrameren schließen ließen (Abb. 18, *B*). Eine Auflösung in Einzelsignale von Heterooligomeren unterschiedlicher Stöchiometrie wurde nicht erreicht.

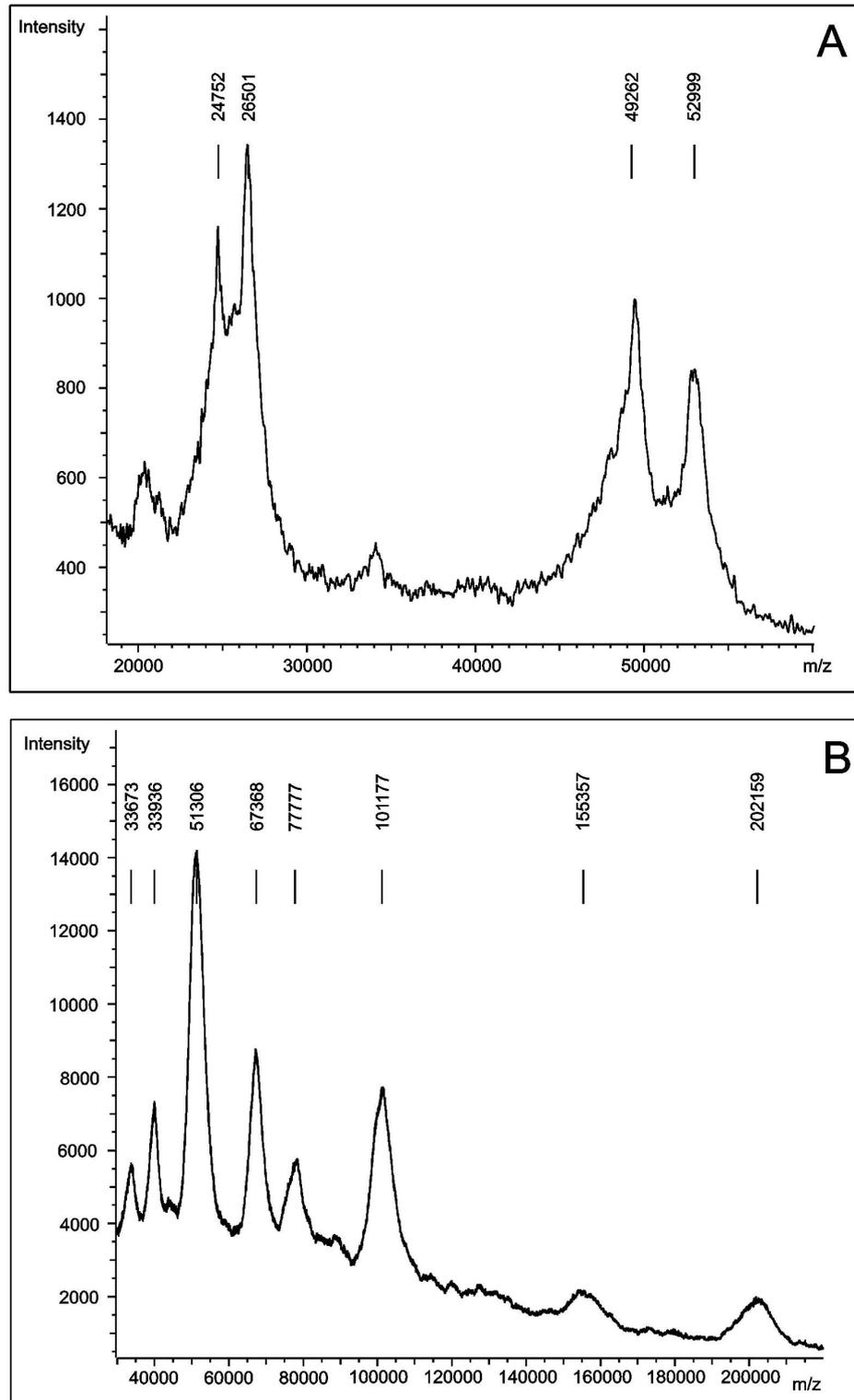


Abb. 18: **MALDI-TOF-MS von Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötalen Rindergelenken.** Die untersuchten Proben entsprachen denen in Abb. 19. Das Spektrum der reduzierten Probe (A) wies zwei Molekülionenpeaks (49262 und 52999) und die Signale der entsprechenden doppelt geladenen Ionen auf (24752 und 26501). Vor Reduktion (B) wurden zwei breite Signale gemessen, die in etwa dem Dreifachen (155357) bzw. dem Vierfachen (202159) der Molmasse der reduzierten Untereinheiten entsprachen. Die Signale der zugehörigen doppelt (77777 und 101177) und dreifach (51306 und 67368) geladenen Spezies sind ebenfalls im Spektrum ersichtlich.

Zweidimensionale SDS-PAGE zum Nachweis von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren

Da die mangelnde Auflösung der MALDI-TOF-MS im hohen Molekulargewichtsbereich keine Unterscheidung zwischen möglichen Homo- oder Heterooligomeren erlaubte, wurde eine Probe, in der die drei größten Oligomere mittels Gelfiltrationschromatographie angereichert waren, einer zweidimensionalen SDS-PAGE unterzogen. In der ersten Dimension, unter nichtreduzierenden Bedingungen waren die drei Banden dieser Oligomere erkennbar. Wegen der reduzierenden Bedingungen der zweiten Dimension zerfielen die Oligomere in ihre Untereinheiten. Dabei wies monomeres Matrilin-1 eine höhere Mobilität auf als das Matrilin-3-Monomer (siehe auch Abb. 19). Es war erkennbar, daß das Oligomer mit der geringsten Mobilität in der ersten Dimension nur aus Matrilin-3-Untereinheiten bestand und damit - seinem apparenten Molekulargewicht nach - ein Homotetramer war. Die beiden mobileren Formen zerfielen sowohl in Matrilin-3- als auch in Matrilin-1-Untereinheiten und stellten demnach Heterotetramere dar, deren Laufunterschied vermutlich von einer unterschiedlichen stöchiometrischen Zusammensetzung herrührte.

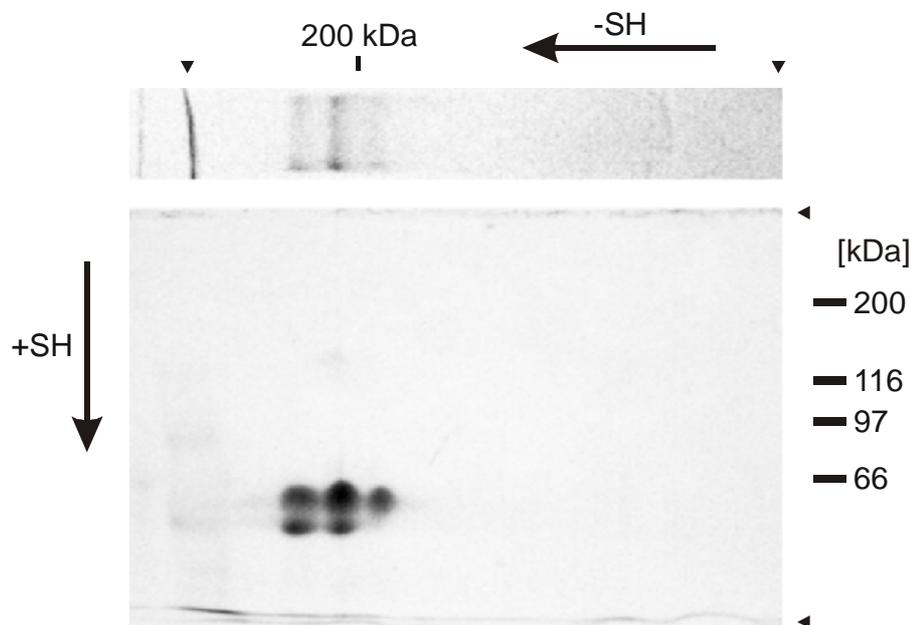


Abb. 21: **Zweidimensionale SDS-PAGE (nichtreduziert gefolgt von reduziert)**. Matrilinoligomere wurden unter nichtreduzierenden Bedingungen im 4% Trenngel separiert (-SH). Die Spur wurde ausgeschnitten, horizontal auf ein weiteres SDS-Gel gegeben und unter reduzierenden Bedingungen, bei einem Trenngel von 7,5% einer erneuten Elektrophorese unterzogen (+SH). Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Pfeile zeigen die Richtung der Elektrophorese an. Die Molekulargewichte der Standardproteine sind oben und rechts in kDa angegeben. Pfeilspitzen markieren Ursprung und Lauffront der Gele.

Elektronenmikroskopie an Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren

Im Vergleich zum rekombinanten Matrilin-3, ließ die elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparation aus fötalem Kalbsgewebe eine höhere Heterogenität in der Länge der armähnlichen Strukturen erkennen. Sie deutete darauf hin, daß die Moleküle aus unterschiedlich langen Untereinheiten aufgebaut waren. Dabei war - in Einklang mit der Massenspektrometrie - sowohl eine Anordnung zu Trimeren, wie auch zu Tetrameren erkennbar. In den Vergrößerungen ausgewählter Moleküle ist ganz links ein Homotrimer aus kurzen Untereinheiten zu erkennen, ganz rechts ein ausschließlich aus langen Untereinheiten bestehendes Tetramer. Die Partikel dazwischen repräsentieren Mischformen der beiden Untereinheiten und damit Heterooligomere.

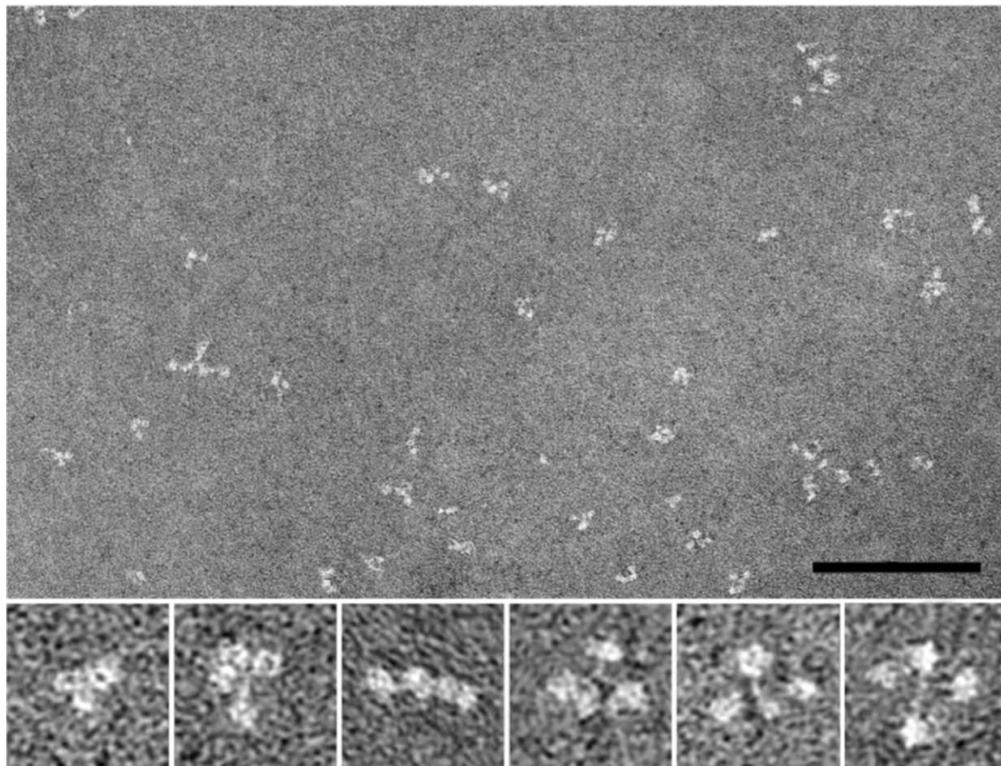


Abb. 22: **Transmissionselektronenmikroskopie der Matrilin-1/Matrilin-3-Komplexe.** Eine Probe, vergleichbar mit der in Abb. 19, wurde nach Negativkontrastierung untersucht. Der *Balken* entspricht 100 nm in der Übersicht und 25 nm in den Vergrößerungen der ausgesuchten Moleküle.

Deglykosylierungsexperimente mit Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötaler Rinderepiphyse

Die meisten Proteine der extrazellulären Matrix sind glykosyliert. Eine N-Glykosylierung von rekombinantem Matrilin-2 wurde kürzlich gezeigt (Piecha *et al.*, 1999). Für Matrilin-1 wurde, bei einem mittels Ultrazentrifugation ermittelten Molekulargewicht von 52 kDa, ein Kohlehydratanteil von 3,9% ermittelt. Das Protein wurde aus Trachealknorpel eines adulten Rindes isoliert und war vornehmlich N-glykosyliert (Paulsson und Heinegård, 1981). Ob Matrilin-1 und -3 aus fötalem Kalbsgelenk ebenfalls N-glykosyliert waren, wurde enzymatisch untersucht. Die Probe der Oligomere aus Matrilin-1 und Matrilin-3 wurde mit N-Glykosidase F verdaut, die alle Typen asparagingebundener N-Glykanketten abspaltet, vorausgesetzt, daß sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe des Asparaginrestes in peptidischer Bindung vorliegen und daß das Oligosaccharid die Mindestgröße der Chitobiose-Grundeinheit aufweist (Tarentino *et al.*, 1985; Chu, 1986). Nach reduzierender SDS-PAGE trat im Vergleich zur Negativkontrolle eine zusätzliche Bande höherer Mobilität auf, die im Immunoblot als Matrilin-1 identifiziert wurde. Die Detektion von zwei Banden zeugte von einer unvollständigen Deglykosylierung des Matrilin-1. Matrilin-3 zeigte im Immunoblot keine sichtbare Mobilitätsänderung, die für eine N-Glykosylierung gesprochen hätte.

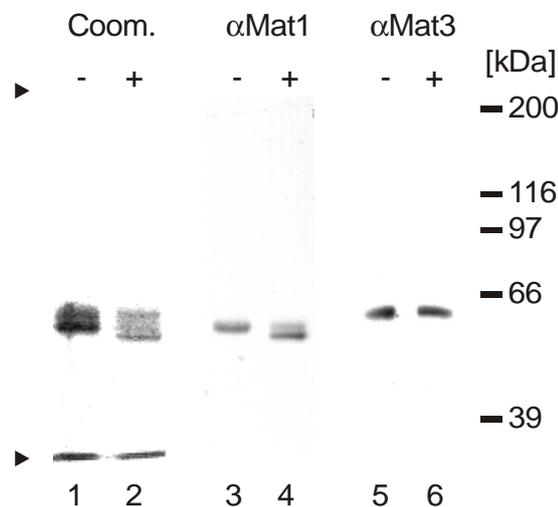


Abb. 23: **Enzymatische Deglykosylierung von Matrilin-1 und Matrilin-3 aus fötalem bovinem Gelenkknorpel.** Nach Verdau mit N-Glykosidase F (+; 2, 4, 6) wurde eine Matrilin-1/Matrilin-3-Probe mittels SDS-PAGE (8% Trenngel) unter reduktiven Bedingungen analysiert. Gleichbehandelte Proben, denen kein Enzym zugesetzt wurde, dienen als Kontrolle (-; 1, 3, 5). Die Bahnen 1 und 2 zeigen die Proben nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (Coom.), die Bahnen 3 und 4 nach Immunoblot mit Matrilin-1-Antiserum (α Mat1). Bahn 5 und 6 zeigen Signale nach Immunoblot mit Matrilin-3-Antiserum (α Mat3). Rechts sind die Standardmolekulargewichte in kDa angegeben.

Elektronenmikroskopische Charakterisierung von rekombinantem Matrilin-4

Neben dem Matrilin-3 wurde in unserer Arbeitsgruppe das Matrilin-4 entdeckt (Wagener *et al.*, 1998 a) und erstmalig charakterisiert.

Zur strukturellen Charakterisierung von rekombinantem C-terminal Strep-markiertem Matrilin-4 wurde das isolierte Protein nach Negativkontrastierung untersucht (Abb. 24). In der nativen Probe des rekombinanten Matrilin-4 waren potentielle Monomere erkennbar, die aus zwei gleich großen globulären Faltungseinheiten bestanden (5 ± 1 nm), die über eine fadenartige Struktur miteinander verbunden waren. Unter Berücksichtigung der Modelle der anderen Matriline (Hauser und Paulsson, 1994 und Piecha *et al.*, 1999), wurde angenommen, daß es sich um die vWFA-Domänen handelte, die über vier EGF-Domänen verknüpft waren. Die Oligomere des rekombinanten Matrilin-4 zeigten die für Matriline typische bouquetähnliche Anordnung der Untereinheiten. Dabei traten Masseansammlungen in den Zentren der Moleküle auf, vermutlich daherrührend, daß die C-terminalen vWFA-Domänen durch die benachbarte Coiled-Coil-Domäne eng zusammen gehalten wurden. Davon ausgehend, erstreckten sich die fadenartigen Strukturen der jeweiligen Untereinheit, die in ein globuläres Ende liefen. Die Länge einer Untereinheit, gemessen von Zentrum zu Zentrum der globulären Faltungseinheit, betrug (14 ± 2 nm). Matrilin-4-Moleküle des höchsten Oligomerisierungsgrades ließen drei Untereinheiten erkennen. Anzeichen auf eine intrachenare Wechselwirkung der N-terminalen mit der C-terminalen vWFA-Domäne, wie sie für Matrilin-1 und -2 angenommen werden (Hauser und Paulsson, 1994 und Piecha *et al.*, 1999), waren nicht sichtbar.

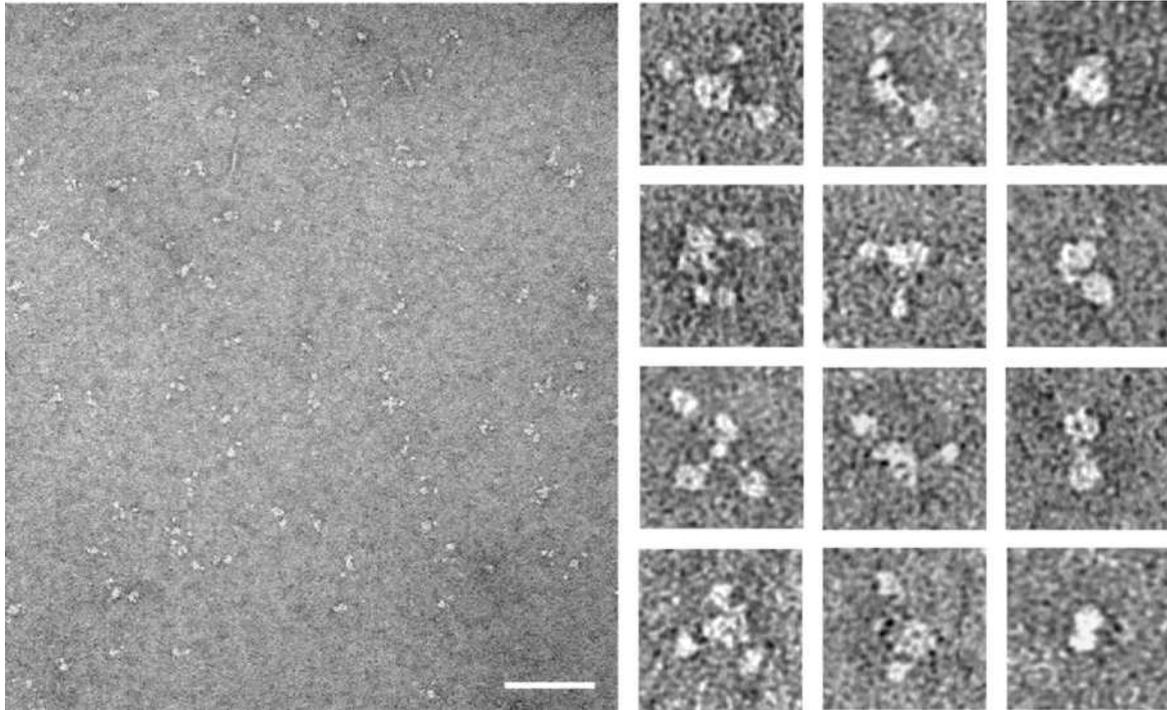


Abb. 24: **Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem Matrilin-4.** Eine Übersicht zeigt die Beschaffenheit der Probe nach Negativkontrastierung. Die vergrößerten Moleküle zeigen spaltenweise von links nach rechts Tri-, Di- und Monomere des Matrilin-4. Der *Balken* entspricht 100 nm in der Übersicht und 25 nm in den Vergrößerungen ausgesuchter Moleküle.

Um die angenommene Monomerstruktur zu bestätigen, wurde rekombinantes Matrilin-4 unter möglichst milden Bedingungen zum Monomer reduziert und nach Negativkontrastierung untersucht. Nach Reduktion mit 5 mM DTT zerfiel oligomeres Matrilin-4 in eine Untereinheit, die nach Alkylierung in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von etwa 81 kDa zeigte (Abb. 25). Der Unterschied zur mittels MALDI-TOF-MS ermittelten Molmasse des Strep-markierten Matrilin-4-Monomers von 72,9 kDa (Klatt *et al.*, 2001) rührt von der Alkylierung und einem abnormalen Verhalten des Proteins in der SDS-PAGE her.

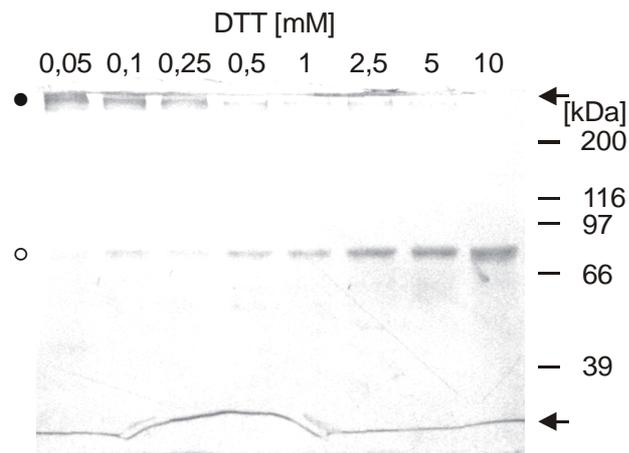


Abb. 25: **Reduktion der Matrilin-4 Oligomere.** Rekombinantes Matrilin-4 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an DTT reduziert (2 h, 20°C). Die Reaktion wurde durch Inkubation mit einem dreifachen molaren Überschuß an NEM gestoppt (2 h, 20°C). Das Verhalten der Probe auf zunehmend reduktive Bedingungen wurde mittels SDS-PAGE untersucht (Trenngel: 8%, Coomassie Brilliant Blue). Die minimale DTT-Konzentration, bei der die Oligomere (●) nahezu vollständig in die Monomere (○) zerfallen waren, wurde ermittelt (5 mM). Die zugehörige Probe wurde für eine weitere elektronenmikroskopische Untersuchung eingesetzt. Die Standardmolekulargewichte sind *rechts* neben dem Gel in kDa angegeben. *Pfeile* zeigen Ursprung und Lauffront des Geles an.

Wenn das durch Reduktion mit 5mM DTT erhaltene Monomerpräparat im Elektronenmikroskop untersucht wurde, waren Strukturen erkennbar, die den potentiellen Monomeren der nichtreduzierten Probe entsprachen (Abb. 26). Die globulären Einheiten (8 ± 1 nm) erschienen aufgeweiteter als vor der Reduktion (vgl. Abb. 24). Vermutlich hatte die Reduktion, durch Spaltung auch von intrachenaren Disulfidbrücken einen Einfluß auf ihre Faltung. Die Länge der Partikel, gemessen vom Zentrum des einen globulären Segmentes bis zum Zentrum des anderen, glich jedoch mit 16 ± 2 nm der Länge der nichtreduzierten Untereinheiten.

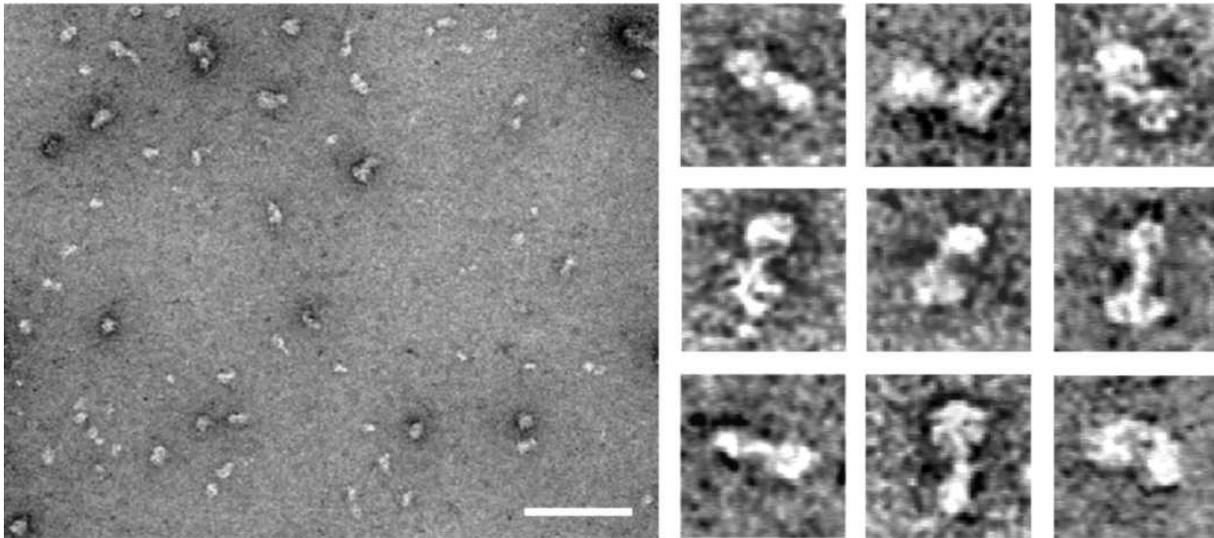


Abb. 26: **Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem Matrilin-4 nach Reduktion.** Eine Übersicht demonstriert den Zerfall der Matrilin-4-Oligomere in Monomere nach Reduktion mit 5 mM DTT. Der *Balken* entspricht hier 100 nm. In den Vergrößerungen ausgesuchter Monomere entspricht er 25 nm.

Das Experiment bestätigte also die angenommene Monomerstruktur und damit auch die maximale Oligomerisierung zu Trimeren. Diese konnte mittels MALDI-TOF-MS bestätigt werden, wie auch der Grund für das Auftreten potentieller Dimere und Monomere aufgeklärt werden konnte. Diese waren weniger eine Folge unvollständiger Oligomerisierung als Produkte einer proteolytischen Prozessierung nahe an der Coiled-Coil-Region (Klatt *et al.*, 2001).

Wechselwirkungen der Matriline

Sowohl für Matrilin-1 (Segat, Dissertation, 1999) als auch für Matrilin-2 (Piecha, Dissertation, 1999) konnte eine Interaktion mit fibrillenformenden Kollagenen gezeigt werden. Matrilin-2 zeigte außerdem eine Bindung an Fibronectin. Vergleichbare Experimente sollten mit Matrilin-3 und Matrilin-4 durchgeführt werden, die nun als rekombinante Proteine in ausreichender Menge verfügbar waren. Als potentielle Wechselwirkungspartner wurden Fibronectin und die Kollagene I, II, III, IV und V untersucht.

Wechselwirkungsuntersuchungen nach dem ELISA-Prinzip (Wechselwirkungs-ELISA)

Auswahl des Blockierungsreagenz

Vor der Durchführung von Wechselwirkungsuntersuchungen nach dem ELISA-Prinzip (Wechselwirkungs-ELISA) wurden unterschiedliche Blockierungsreagenzien für die Verwendung mit Matrilin-4-Antiserum (Klatt *et al.*, 2001) getestet (Abb. 27). Dabei zeigte eine Lösung von 5% Magermilchpulver in TBS das geringste Signal. Weil Magermilchpulver aber chemisch komplex und calciumreich ist, wurde, trotz des etwas höheren Signals, die BSA-Lösung als Blockierungsreagenz ausgewählt. Damit die Ergebnisse vergleichbar waren, wurde es auch für Experimente mit Matrilin-3-Antiserum eingesetzt, denn das vom BSA erzeugte Hintergrundsignal war auch in Tests mit diesem Antiserum nur wenig stärker als das der Magermilchpulver-Lösung.

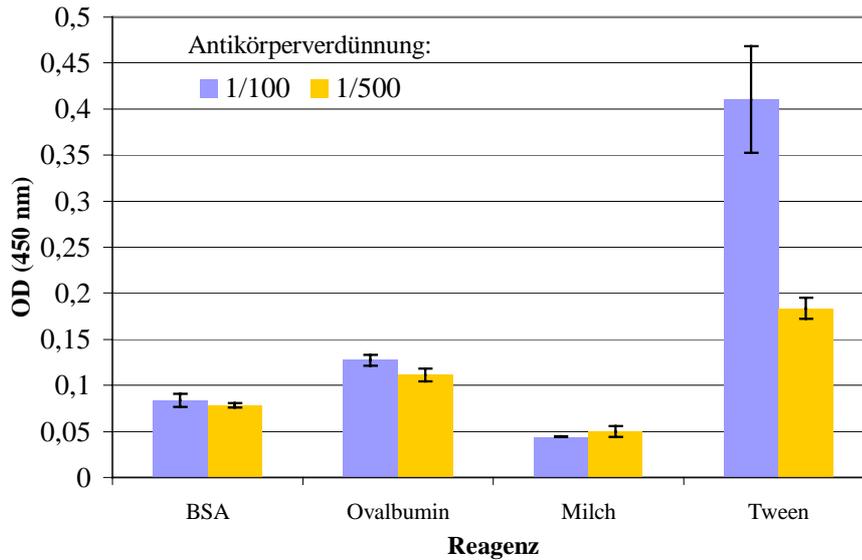


Abb. 27: **Test unterschiedlicher Blockierungsreagenzien für die Verwendung im Wechselwirkungs-ELISA.** 1% Rinderserumalbumin (*BSA*), 1% Ovalbumin (*Ovalbumin*), 5% Magermilchpulver (*Milch*) bzw. 0,02% Tween 20 (*Tween*), wurden in TBS gelöst und immobilisiert. Anschließend wurden sie mit Matrilin-4-Antiserum (α Mat4) in den angegebenen Verdünnungen 1 h bei RT inkubiert.

Wechselwirkungs-ELISA mit potentiellen Interaktionsspartnern von Matrilin-3 und Matrilin-4

Um zu bestimmen, welche der oben genannten Proteine als potentielle Interaktionspartner näher untersucht werden sollten, wurden sie bei einer Konzentration von 50 μ g/ml auf der ELISA-Platte immobilisiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Kunststoffes durch BSA, mit welchem auch Kontrollmulden beschichtet wurden, wurden Matrilin-3 oder Matrilin-4 als in Lösung befindliche Liganden zugesetzt (10 nM). Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde der Interaktionsansatz analysiert.

Im Wechselwirkungs-ELISA zeigten Matrilin-3 und Matrilin-4 ein sehr ähnliches Verhalten (Abb. 28). Bei geringem Hintergrundsignal mit BSA, zeigten beide ein starkes Signal mit immobilisiertem Kollagen V und Fibronectin. Etwas schwächer aber wesentlich höher als das Hintergrundsignal, waren die Meßwerte für Kollagen I, Kollagen II und Kollagen III. Auffällig stark war darunter die Absorbanz für die Interaktion zwischen Matrilin-4 und Kollagen II. Das schwächste Signal wurde mit Kollagen IV gemessen, das aber ebenfalls signifikant über dem Signal des Blockierungsreagenzes lag.

Wegen des ähnlichen Verhaltens im Wechselwirkungs-ELISA, beschränkten sich die weiteren Untersuchungen mittels Wechselwirkungs-ELISA auf Matrilin-4-Interaktionen. Zum näheren

Studium wurden die Liganden, die zu den stärksten Signalen des Matrilin-4-Experimentes gehörten, Kollagen II, Kollagen V und Fibronectin, ausgewählt.

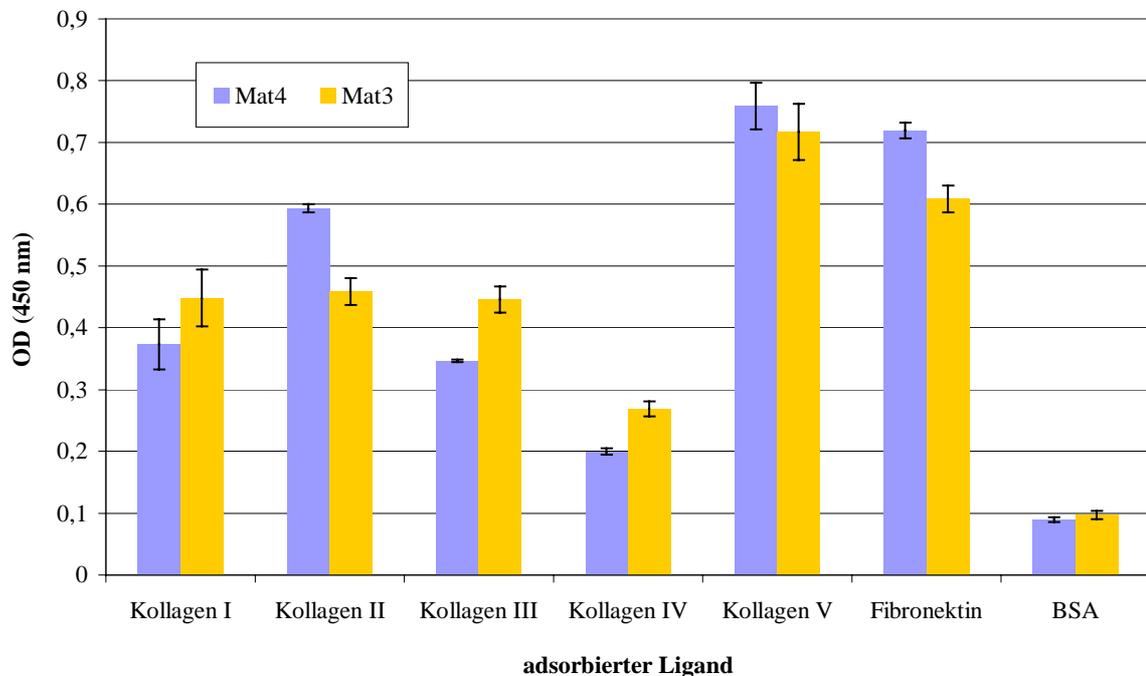


Abb. 28: **Interaktionen von Matrilin-3 und Matrilin-4 im Wechselwirkungs-ELISA.** Die an der *x*-Achse angegebenen Proteine (50 µg/ml, BSA: 1% in TBS) wurden an den Kunststoff der ELISA-Platte adsorbiert. Mögliche Interaktion wurde nach Inkubation mit Matrilin-4 bzw. Matrilin-3 (10 nM in TBS, 1h, RT) gemessen.

Kationenabhängigkeit der Matrilin-4-Interaktionen

Wegen des möglichen Einflusses einer, den Sequenzen nach, konservierten metallionenabhängigen Adhäsionsstelle (metal ion dependent adhesion site, MIDAS) im Matrilin-4 wurde der Einfluß divalenter Kationen auf Matrilin-4-Interaktionen untersucht. Dazu wurden die Liganden bei einer Konzentration von 50 µg/ml immobilisiert und mit Proben gleicher Matrilin-4-Konzentration inkubiert. Der Interaktionspuffer wurde variiert. TBS wurde ohne weiteren Zusatz verwendet oder mit 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ oder 2 mM EDTA versetzt. Der Zusatz eines Überschusses an EDTA sollte für die vollständige Komplexierung eventuell vorhandener divalenter Kationen im TBS sorgen.

Im Vergleich zur ursprünglichen Probe in TBS führte weder die Zugabe von 1 mM Zinkchlorid oder Calciumchlorid, noch die Anwesenheit von 2 mM EDTA zu signifikanten Signalunterschieden. Eine Magnesiumkonzentration von 1 mM führte aber zu deutlich

höheren Absorbanzen (Abb. 29). Bei Betrachtung der auf die Meßwerte in TBS bezogenen relativen Signale wurde eine Verdopplung des Signals für Kollagen V und sogar eine Verdreifachung des Meßwertes für die Fibronectininteraktion festgestellt. Dabei blieb das relative Signal des Kollagen-II-Experiments unter Beachtung der Fehlergrenzen unverändert. Eine Magnesiumabhängigkeit zeigte sich also für die Wechselwirkung mit Fibronectin und Kollagen V.

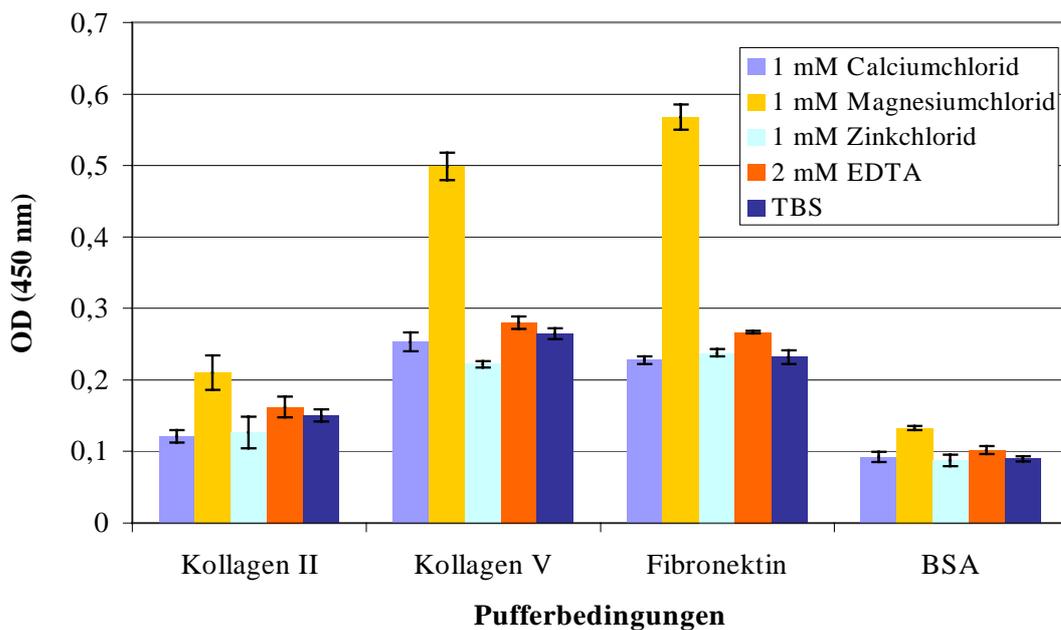


Abb. 29: **Ionenabhängigkeit der Matrilin-4-Interaktionen im Wechselwirkungs-ELISA.** Das Experiment wurde wie unter Abb. 28 beschrieben durchgeführt. Adsorbiert wurden Kollagen II, Kollagen V, Fibronectin (alle 50 µg/ml) bzw. BSA (1% in TBS). Den Matrilin-4-Proben (10 nM in TBS) wurden jeweils die in der Legende angegebenen Salze zugegeben. Die mit TBS beschriftete Probe enthielt keine Zusätze.

Konzentrationsabhängigkeit der Wechselwirkung zwischen Matrilin-4 und Kollagen V

Bei einer wahren Wechselwirkung mit dem immobilisierten Liganden sollten die in den oben beschriebenen Experimenten gezeigten Bindungen konzentrationsabhängig und zur Sättigung zu bringen sein. Exemplarisch wird hier die Interaktion zwischen Matrilin-4 und Kollagen V gezeigt.

Diese verhielt sich in 0,3 mM Magnesiumchlorid konzentrationsabhängig und konnte bis zur Sättigung gebracht werden, wenn immobilisiertes Kollagen V (50 µg/ml) mit Matrilin-4-Proben unterschiedlicher Konzentration inkubiert wurde (Abb. 30). Eine apparente Dissoziationskonstante von 6 nM ließ sich abschätzen.

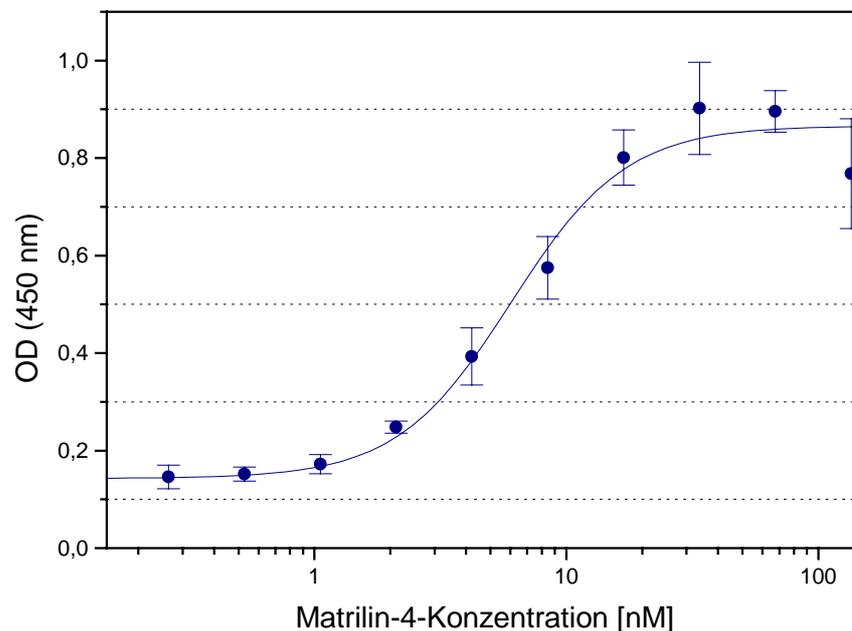


Abb. 30: **Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion zwischen Matrilin-4 und Kollagen V im Wechselwirkungs-ELISA.** Die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurden mit Kollagen V bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ beschichtet. Das adsorbierte Kollagen wurde mit unterschiedlich konzentrierten Matrilin-4-Lösungen inkubiert. Vor der graphischen Darstellung der Meßwerte wurden die BSA-Hintergrundsignale abgezogen.

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Matrilinwechselwirkungen

Eine experimentelle Schwäche der Wechselwirkungs-ELISA war die Immobilisierung eines der beiden Interaktionspartner. Wechselwirkungen, die er in diesem Zustand einging, konnten artifiziellen Charakter besitzen. Mischungsexperimente, bei denen die beiden Liganden in Lösung waren und die anschließend elektronenmikroskopisch betrachtet wurden, boten die Möglichkeit einer direkten Betrachtung der Wechselwirkung und gegebenenfalls einer Bestätigung der Ergebnisse aus Festphasenexperimenten mit einer zweckmäßigeren Methode.

Die Wechselwirkung zwischen Fibronectin und Matrilin-3 bzw. Matrilin-4 sollte im Elektronenmikroskop untersucht werden. Fibronectin wurde dazu entweder mit dem Strep-markierten Volllängenkonstrukt des Matrilin-4 oder mit einem goldmarkierten Matrilin-3-Konstrukt (Mat3 Δ CT; Klatt, Diplomarbeit, 1997), dem die Coiled-Coil-Domäne fehlte, inkubiert. Die Experimente wurden in Anwesenheit von 1 mM Magnesiumchlorid

durchgeführt. Isoliertes Fibronectin (Abb. 31, A) zeigte zum Teil die typische V-förmige Struktur seiner C-terminal zu Dimeren disulfidverknüpften Untereinheiten. Das Molekül war jedoch sehr flexibel und nahm unterschiedliche Formen an (Engel *et al.*, 1981). In äquimolaren Mischungen mit Matrilin-4 (Abb. 31, B) waren Partikel erkennbar, die Anlagerungen trugen, die in Form und Größe dem Matrilin-4 glichen. Diese Anlagerungen waren, wenn bewertbar, nahe des C- oder N-Terminus gelegen. In einem vergleichbaren Experiment, in dem goldmarkiertes, trunkiertes Matrilin-3 (Mat3 Δ CT) als Ligand eingesetzt wurde, war eine Interaktion mit Fibronectin erkennbar (Abb. 31, C). Die Markierung durch Goldpartikel mit einem Durchmesser von 5 nm trat ebenfalls vorwiegend nahe des N- oder C-Terminus auf.

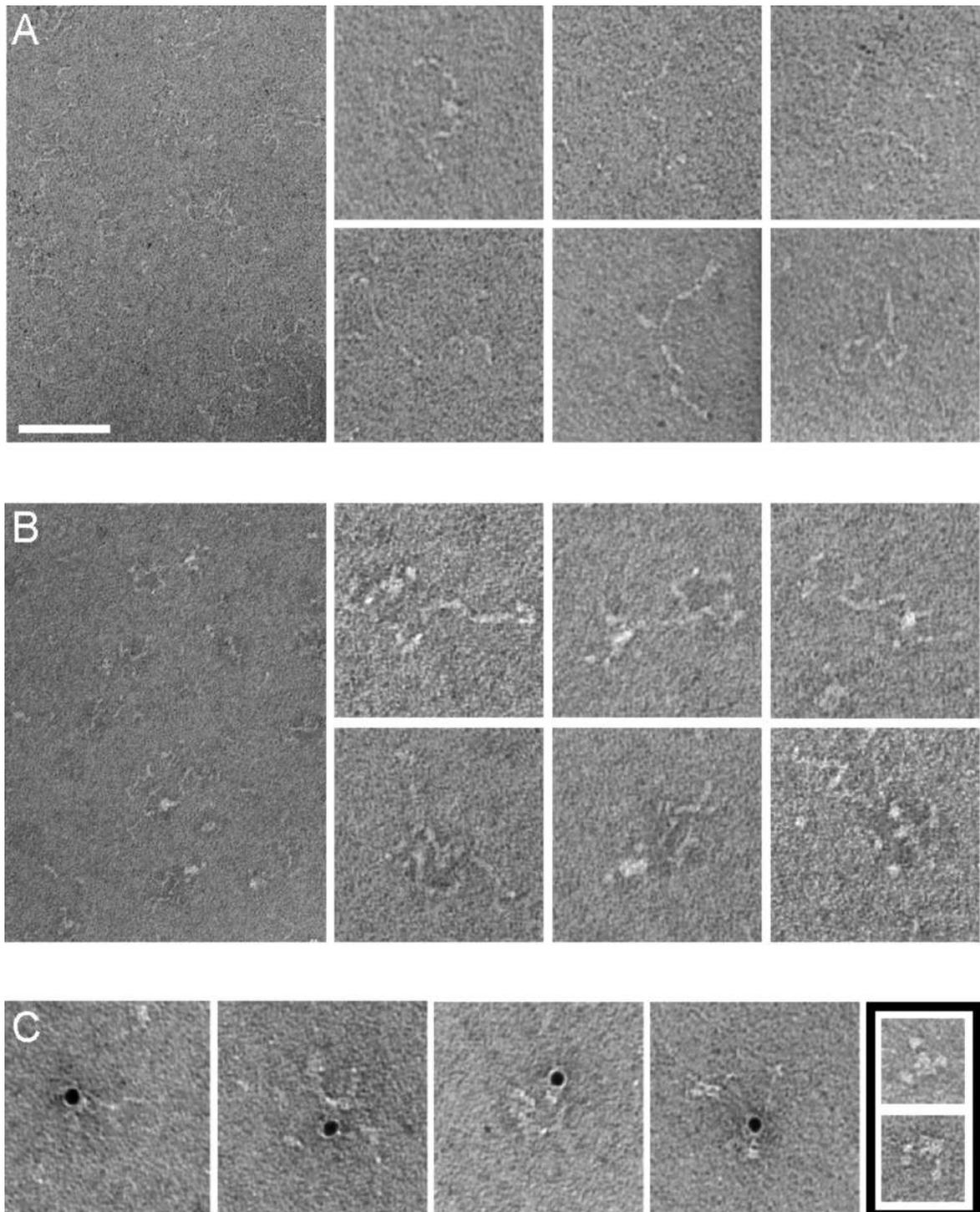


Abb. 31: **Elektronenmikroskopie nach Negativkontrasierung von Matrilin-Fibronectin-Komplexen.** *A* zeigt eine Übersicht und sechs ausgesuchte Moleküle einer reinen Fibronectinpräparation. *B* zeigt in gleicher Bildanordnung ein äquimolares Gemisch aus Fibronectin und Strep-markiertem Matrilin-4. In *C* sind ausgewählte Komplexe aus einem vergleichbaren Experiment mit goldmarkiertem Mat3 Δ CT zu sehen. Schwarz eingerahmt sind Matrilin-4-Trimere dargestellt. Um mit den ausgesuchten Komplexen in *B* vergleichbar zu sein, sind sie im gleichen Maßstab abgebildet. Der *Balken* entspricht 100 nm in den Übersichten und 50 nm in den Vergrößerungen ausgewählter Partikel.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Thrombospondinen

Basierend auf den DNA-Sequenzen der Ratte wurden in unserem Arbeitskreis Thrombospondin-4 (TSP-4) und COMP (Thrombospondin-5) im HEK-293-EBNA/pCEP-Pu-System exprimiert (Narouz-Ott *et al.*, 2000, Thur *et al.*, 2001). Die Vollängeproteine bestanden, wie bereits in der Einleitung beschrieben, aus einer C-terminalen Domäne, an die sich N-terminal eine Serie aus acht TSP-Typ-III-Einheiten anschloß. Dieser folgte ein Bereich aus vier EGF-Motiven und eine Coiled-Coil-Region, die im COMP den N-Terminus bildete und der im TSP-4 eine N-terminale Domäne folgte.

Die im Folgenden beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen dienten einer weitergehenden Charakterisierung der Proteinstrukturen und der mit Festphasenmethoden entdeckten Wechselwirkungen.

Thrombospondin-4

Isoliertes rekombinantes TSP-4, daß von Laila Narouz-Ott zur Verfügung gestellt wurde (Narouz-Ott *et al.*, 2000), wies in der nichtreduktiven SDS-PAGE eine Doppelbande mit apparenten Molekulargewichten von 550 kDa und 600 kDa auf. Unter reduktiven Bedingungen zerfiel das Protein in zwei Untereinheiten mit apparenten Molekulargewichten von 120 kDa und 140 kDa, die der errechneten Molekülmasse eines TSP-4-Monomers von 104 kDa nahe kamen.

Die Struktur des nativen Proteins wurde untersucht. Im Elektronenmikroskop (Abb. 32) zeigte sich die vergleichbar hohe Homogenität der Probe, die nahezu ausnahmslos aus Pentameren mit folgendem Aussehen bestand. Ausgehend von einem Zentrum, das sowohl im *rotary shadowing* als auch im Negativkontrast eine größere Masseanhäufung aufwies, erstreckten sich fünf fadenförmige Strukturen, die in jeweils einem kugelförmigen Segment endeten. Die fadenförmigen Strukturen waren 21 ± 4 nm lang und besaßen eine gewisse Flexibilität. Die zentrale Masseanhäufung, die erstmals auch im Negativkontrast gezeigt wurde, war somit kein Artefakt der *rotary-shadowing*-Technik. Sehr wahrscheinlich besteht sie aus den globulären N-terminalen Domänen der fünf Untereinheiten, die durch die benachbarte Coiled-Coil-Domäne derart nahe beieinander gehalten wurden, daß sie nicht als Einzelstrukturen aufgelöst werden konnten. Die fadenförmige Struktur einer Untereinheit wurde von den

Serien aus EGF- und TSP-Typ-III-Motiven des TSP-4 gebildet und trug an ihrem Ende die globuläre C-terminale Domäne, die einen Durchmesser von $6,0 \pm 0,7$ nm aufwies.

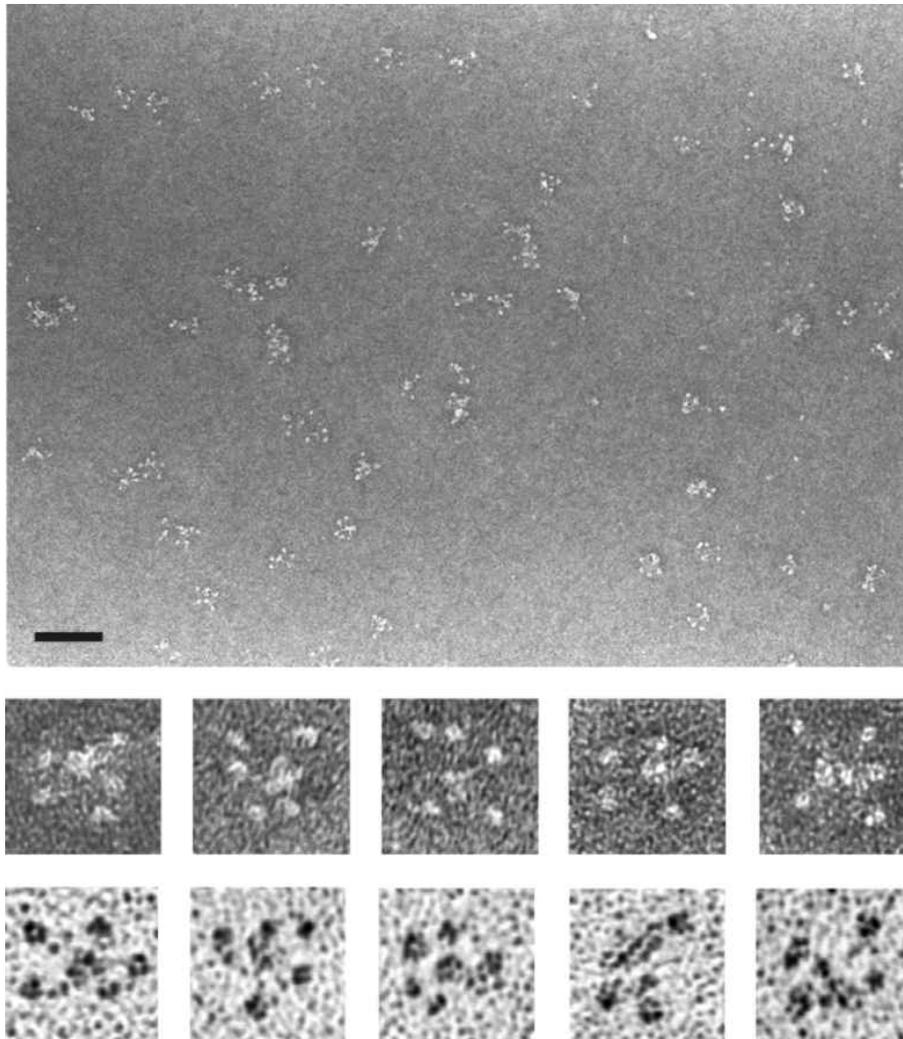


Abb. 32: **Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem TSP-4.** Rekombinantes TSP-4 wurde mittels Negativkontrastierung (*Übersicht und obere Reihe ausgesuchter Moleküle*) und *rotary shadowing* (*untere Reihe ausgesuchter Moleküle*) visualisiert. Der *Balken* entspricht 100 nm in der Übersicht und 25 nm in den Vergrößerungen einzelner Moleküle.

Wechselwirkung des Thrombospondin-4 mit Kollagen I

Zur Optimierung der Ausbeute wurde TSP-4 erst in Gegenwart von 2M Harnstoff aufgereinigt. Das Protein zeigte in Wechselwirkungsuntersuchungen nach dem ELISA-Prinzip (Wechselwirkungs-ELISA) und in der Oberflächenplasmonresonanz-Spektrometrie (SPR-Spektrometrie) eine Wechselwirkung mit Kollagen I, die sich durch Zugabe von Zink

verstärken ließ. Im Wechselwirkungs-ELISA konnte gezeigt werden, daß die Bindungsstelle für Kollagen I auf dem Bereich lag, der den C-terminalen Teil der TSP-4-Untereinheit bis zum Coiled-Coil-Motiv umfaßte. Weder die Coiled-Coil-, noch die N-terminale Domäne waren in entscheidendem Maße an der Bindung beteiligt (Narouz-Ott *et al.*, 2000).

Um auszuschließen, daß TSP-4 unter dem Einfluß von Harnstoff irreversible strukturelle Veränderungen erlitten hatte, die zu artifiziellen Ergebnissen führten, wurde eine weitere Reinigung in Abwesenheit von Harnstoff und im Beisein von 1,8 mM CaCl_2 durchgeführt. Der Einfluß des Harnstoffs wurde untersucht. Dazu wurde eine Probe der nativen Präparation gegen einen Puffer dialysiert, der 2M Harnstoff enthielt. Durch eine weitere Dialyse in TBS mit 1,8 mM CaCl_2 wurde der Harnstoff entfernt. Die so behandelte Probe wurde im Wechselwirkungs-ELISA mit der unbehandelten Präparation verglichen. Die Bindungskurve (Abb. 33, A) des harnstoffbehandelten TSP-4 war nahezu identisch mit der des unbehandelten TSP-4 und lieferte eine apparente Dissoziationskonstante von 2 nM. Durch Vergleich mit einer TSP-4-Standardreihe wurde ermittelt, daß bei halbmaximaler Sättigung 18% des eingesetzten TSP-4 gebunden wurden. Die Anwesenheit von 2 M Harnstoff bei der Proteinisolation führte also nicht zu irreversiblen Strukturveränderungen, die sich in der Kollagen-I-Wechselwirkung hätten bemerkbar machen können. Beide Proben, die behandelte wie die unbehandelte, zeigten auch das gleiche Verhalten bei Zugabe bzw. Entzug von Zink. Die bei Anwesenheit von 1 mM ZnCl_2 deutliche Bindung an Kollagen I wurde aufgehoben, wenn Zink durch Calcium ersetzt oder durch Zugabe von 2 mM EDTA komplexiert wurde (Abb. 33, B). Damit wurde nachgewiesen, daß die Strukturelemente des TSP-4, die für sein zinkabhängiges Bindungsverhalten verantwortlich waren, ebenfalls keinen irreversiblen Veränderungen unterlagen, wenn sie 2 M Harnstoff ausgesetzt waren.

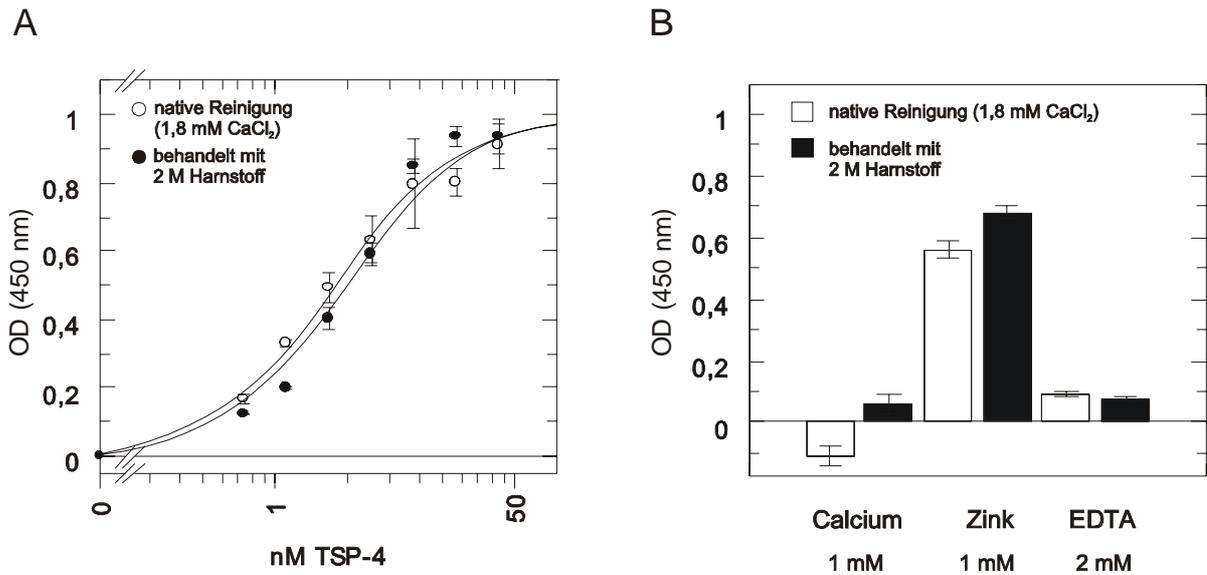


Abb. 33: **Vergleich von nativem mit harnstoffbehandeltem TSP-4 im Wechselwirkungs-ELISA.** Kollagen I (aus Kälberhaut, 2,5 µg/ml) wurde auf der ELISA-Platte immobilisiert und restliche, freie Bindungsstellen des Kunststoffes mit 1% BSA in TBS blockiert. Nativ gereinigtes TSP-4 (*leere Kreise bzw. Balken*) oder TSP-4, das nach Behandlung mit 2 M Harnstoff wieder in harnstofffreien Puffer überführt wurde (*gefüllte Kreise bzw. Balken*), wurde mit dem immobilisierten Kollagen I inkubiert. In A wurde im Beisein von 1 mM ZnCl₂ die Kollagen-I-Bindung in Abhängigkeit von der TSP-4-Konzentration untersucht. In B wurde bei einer TSP-4-Konzentration von 8 µg/ml der Effekt von divalenten Kationen (1 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl₂, Chelator: 2 mM EDTA) auf die beiden Proben untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen nach Subtraktion der Hintergrundsignale.

Die Interaktion zwischen TSP-4 und Kollagen I sollte in Mischungsexperimenten untersucht werden, in denen beide Interaktionspartner während der Reaktion in gelöster Form vorlagen, einem Zustand, der der *in-vivo*-Situation ähnlicher war. Nach Einstellung eines möglichen Assoziationsgleichgewichtes sollten die Mischungen elektronenmikroskopisch analysiert werden, was eine direkte Betrachtung der Interaktion und der dabei entstehenden Proteinkomplexe erlaubte. Dazu wurden die Proben mit dem gleichen Volumen an Glycerin (80% in Wasser) versetzt und zur Replikherstellung durch *rotary shadowing* auf Glimmer gesprüht und getrocknet. Anschließende Elektronenmikroskopie (Abb. 34) zeigte, daß die C-terminale Domäne des TSP-4 entscheidend an der Kollagen-I-Bindung beteiligt war. Bei Anwesenheit von 1 mM ZnCl₂ war TSP-4 meist an den äußersten Enden des Kollagen-I-Moleküls gebunden, es trat aber auch Bindung an internen Stellen der Kollagentripelhelix auf (Tab. 1). Da N- und C-Terminus des Tropokollagens im Elektronenmikroskop nicht zu unterscheiden sind, war es nicht möglich die Bindungsstellen an der Tripelhelix genau zu lokalisieren.

Bei höheren Probenkonzentrationen konnte oft beobachtet werden, wie Kollagen-I-Moleküle terminal über TSP-4 miteinander verbunden wurden. Komplexe, in denen ein Kollagen-I-Molekül an beiden Enden ein TSP-4-Molekül gebunden hatte, zeigten, daß TSP-4 in der Lage war, sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende des Kollagens zu binden.

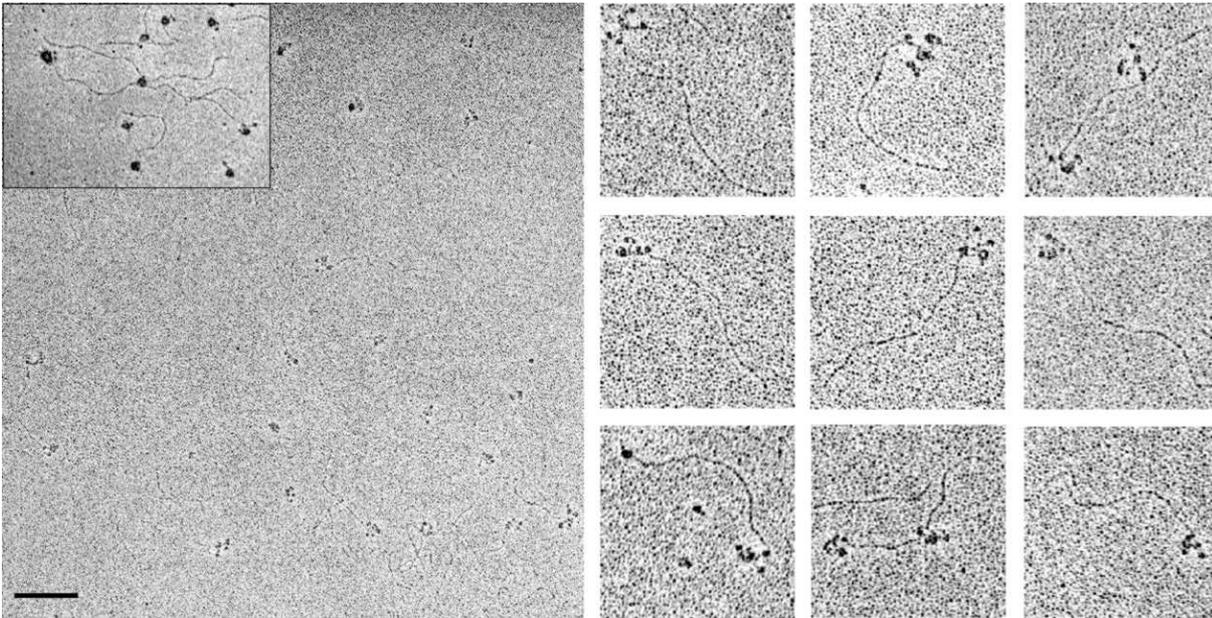


Abb. 34: **Untersuchung der Wechselwirkung zwischen TSP-4 und Kollagen I mittels rotary-shadowing-Elektronenmikroskopie.** TSP-4 und Kollagen I - beide in 200 mM Ammoniumformiat-Puffer mit 1 mM $ZnCl_2$ - wurden im molaren Verhältnis 1:4 zusammengegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Eine Übersichtsaufnahme nach rotary shadowing zeigt die Beschaffenheit der Probe. Ein eingefügter Ausschnitt zeigt eine Probe höherer Konzentration, bei der eine Ende-an-Ende-Assoziation der Kollagenmoleküle über TSP-4 beobachtet wurde. Die Vergrößerungen rechts zeigen ausgewählte Komplexe. Der Balken entspricht 200 nm in der Übersicht und im eingefügten Ausschnitt und er entspricht 100 nm in den Vergrößerungen.

Zur Untersuchung der im Wechselwirkungs-ELISA beobachtbaren Zinkionenabhängigkeit der Bindung, wurde der zinkchloridhaltige Interaktionsansatz vor und nach Zugabe des Chelators EDTA in der oben beschriebenen Weise elektronenmikroskopisch visualisiert. Die Mikrographien wurden quantitativ ausgewertet (Tab. 1). Als Referenzexperiment diente die Interaktion zwischen Kollagen I und COMP (Rosenberg *et al.*, 1998). Die in $ZnCl_2$ -haltigen Proben beobachtete Kollagen-I-Bindung des TSP-4 entsprach in ihrer Häufigkeit, wie in ihrer Topographie der des COMP. In beiden Fällen dominierte die terminale Bindung (>75%). Wurde vor der Interaktion ein Überschuß an EDTA (5 mM) zugesetzt, veränderte sich die Gesamthäufigkeit der Bindung, anders als in den Festphasenexperimenten, nicht wesentlich. Zu beobachten war allerdings, daß sich das Verhältnis von terminaler- zu interner Bindung

deutlich zu Gunsten der internen Bindung änderte (terminale Bindung: ca. 60%). Der Effekt wurde durch eine einstündige Präinkubation der Wechselwirkungspartner mit EDTA verstärkt (terminale Bindung: ca. 50%).

Kollagen-I-Moleküle	TSP-4 (1 mM ZnCl ₂)	TSP-4 (5 mM EDTA)	TSP-4 (5 mM EDTA, 1 h präinkubiert)	COMP (1 mM ZnCl ₂)
Gesamt	247	201	235	197
mit gebundenem Liganden	87 (35,2%)	75 (37,3%)	90 (38,3%)	47 (23,9%)
mit terminal gebundenem Liganden*	78,2%	61,3%	51,1%	76,6%
mit intern gebundenem Liganden*	26,4%	40,0%	52,2%	31,9%

*Ein Teil der Kollagen-I-Moleküle trägt mehr als einen, an einer terminalen oder internen Stelle gebundenen, Liganden.

Tab. 1: **Quantitative Auswertung der elektronenmikroskopisch untersuchten Wechselwirkung von TSP-4 und COMP an Kollagen I.** Die Interaktionen wurden wie unter Abb. 34 beschrieben angesetzt. Wenn erwünscht, wurde den Proteinlösungen vor der Inkubation 5 mM EDTA zugesetzt. In einer Probe wurden Kollagen und Ligand direkt nach der EDTA-Zugabe gemischt und 2 h bei RT inkubiert. In einer anderen Probe wurden die Proteinlösungen nach EDTA-Zugabe 1 h bei RT präinkubiert und erst dann gemischt.

Rekombinantes COMP

Rekombinantes COMP (TSP-5) wurde von Jochen Thur gewonnen und isoliert (Thur *et al.*, 2000). Wie beim TSP-4 wurde zunächst seine Struktur elektronenmikroskopisch untersucht. Wie das aus Gewebe isolierbare COMP (Mörgelin *et al.*, 1992, Hedbom *et al.*, 1992) trat auch das rekombinante Protein als bouquetähnliches Pentamer auf (Abb. 35). Fünf fadenförmige Strukturen, die an einem Ende über die N-terminale Coiled-Coil-Domäne miteinander verbunden waren und die wie beim TSP-4 wahrscheinlich aus den EGF- und TSP-Typ-III-Domänen gebildet wurden, trugen an ihren Enden je ein globuläres Segment, das daraus folgend der C-terminalen Domäne entsprach. Für dieses wurde ein Durchmesser von 8 ± 2 nm ermittelt. Wie sich auf DNA-Ebene vorhersagen läßt, unterscheidet sich COMP von TSP-4 durch das Fehlen der N-terminalen heparinbindenden Domäne. Der Unterschied äußerte sich

im Elektronenmikroskop dadurch, daß die Massenanhäufung, die im Zentrum des TSP-4 beobachtet wurde, beim COMP nicht vorhanden war. Der Nachweis dieses strukturellen Unterschiedes durch Elektronenmikroskopie, stützt die bekannten Modelle von TSP-4 und COMP (Mörgelin *et al.*, 1992, Lawler *et al.*, 1995).

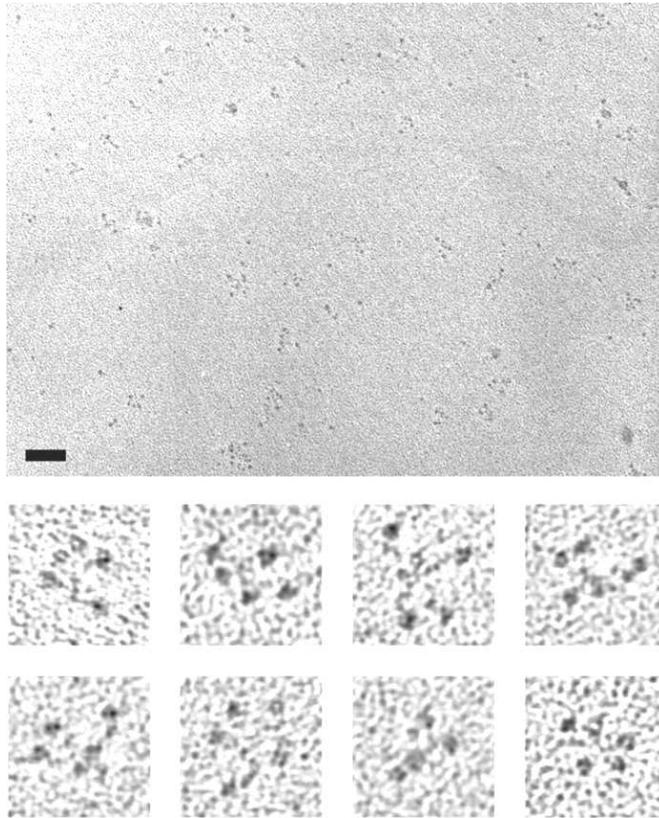


Abb. 35: **Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinantem COMP.** Rekombinantes COMP wurde mittels *rotary shadowing* visualisiert. Der *Balken* entspricht 100 nm in der Übersicht und 25 nm in den Vergrößerungen einzelner Moleküle.

Wechselwirkung des COMP mit Kollagen IX

Krisztina Rosenberg *et al.* (1998) zeigten, daß COMP in der Lage war, die fibrillenformenden Kollagene I und II zinkabhängig zu binden. Eine Interaktion von großer physiologischer Bedeutung wurde zwischen COMP und Kollagen IX vermutet, denn es wurden Mutationen sowohl in COMP als auch in Kollagen IX entdeckt, die zu oft schwerwiegenden Erkrankungen des Stützapparates, zu den Knochendysplasien MED (*multiple epiphyseal dysplasia*) und PSACH (*pseudoachondroplasia*) führten (Holden *et al.*, 1999; Deere *et al.*, 1998; Muragaki *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1995). Kollagen IX, gehört zu

den fibrillenassoziierten Kollagenen und kommt wie COMP im Knorpel vor. Dort ist es Bestandteil von Fibrillen, die aus Kollagen II und Kollagen XI gebildet werden (van der Rest und Mayne, 1987).

Krisztina Rosenberg und Jochen Thur konnten sowohl mit Wechselwirkungs-ELISA als auch mit SPR-Spektrometrie zeigen, daß rekombinantes Ratten-COMP (rrCOMP) und unter nichtdenaturierenden Bedingungen aus Rindergelenk gereinigtes COMP (baCOMP) an Kollagen IX banden. Die Bindung zeigte eine Zinkabhängigkeit, wie auch die Interaktion mit Kollagen I oder Kollagen II. SPR-Spektrometrie ergab bei Anwesenheit von 50 μM ZnCl_2 eine apparente Dissoziationskonstante von 32 nM (Thur *et al.*, 2001).

Die Wechselwirkung von COMP mit Kollagen IX wurde, wie die oben beschriebene Interaktion zwischen TSP-4 und Kollagen I, elektronenmikroskopisch untersucht. Sie wurden am unter nichtdenaturierenden Bedingungen gereinigten baCOMP studiert. Dies und Kollagen IX wurden dazu im äquimolaren Verhältnis zusammengegeben. Das Gemisch wurde durch *rotary-shadowing*-Elektronenmikroskopie visualisiert (Abb. 37). Dabei konnte heterotrimeres humanes Kollagen IX ($\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$, $\alpha 3(\text{IX})$), das von Tero Pihlajamaa erstmals rekombinant hergestellt wurde (Pihlajamaa *et al.*, 1999), erstmalig elektronenmikroskopisch charakterisiert werden (Abb. 36). Sein Erscheinungsbild entsprach dem des aus humanem Knorpel isolierten Proteins (Bruckner *et al.*, 1988). Kollagen IX gehört zu den fibrillenassoziierten Kollagenen mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT-Kollagen). Die Kollagen-IX-Moleküle (vgl. auch Abb. 38) besaßen eine Gesamtlänge von 190 nm und vier nicht-tripelhelikale Domänen (NC-Domänen). Die NC4-Domäne bildete den N-Terminus des Moleküls. Sie war im Transmissionselektronenmikroskop als terminale, globuläre Struktur erkennbar. Etwa 40 nm vom N-Terminus entfernt lag die NC3-Domäne, die dieser Stelle eine hohe Flexibilität verlieh. Weil die tripelhelikalen Bereiche weniger flexibel waren, wiesen Kollagen-IX-Moleküle an dieser Stelle oft einen charakteristischen Knick auf. Vom N-Terminus etwa 150 nm entfernt, befand sich die NC2-Domäne. Den C-Terminus bildete die NC1-Domäne. Beide waren in der *rotary-shadowing*-Elektronenmikroskopie unauffällig.

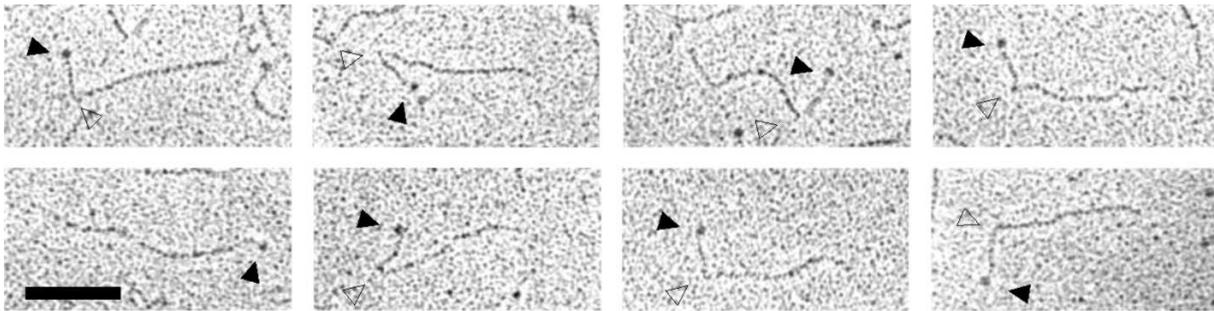


Abb. 36: **Elektronenmikroskopische Untersuchung von rekombinatem Kollagen IX.** In Elektronenmikrographien einzelner Kollagen-IX-Moleküle nach *rotary shadowing* waren die globulären NC4-Domänen (*gefüllte Pfeilspitzen*) und der charakteristische Knick der NC3-Domäne (*leere Pfeilspitzen*) erkennbar. Der *Balken* entspricht 100 nm.

Das Erscheinungsbild des Kollagen IX ließ also eine Unterscheidung zwischen den Termini und damit eine Lokalisierung seiner Bindungsstellen für COMP zu, denn baCOMP zeigte mit ihm eine zinkabhängige Interaktion. Die zugehörigen Mikrographien (Abb. 37) wurden quantitativ ausgewertet (Tab. 2). Enthielt der Interaktionsansatz 0,5 mM ZnCl_2 , waren 50,8% der strukturell als COMP identifizierbaren Moleküle an Kollagen IX gebunden. In Gegenwart von 10 mM EDTA war die Bindungsfähigkeit deutlich herabgesetzt, denn nur noch 27,6% der COMP-Moleküle waren kollagengebunden. Wie im oben beschriebenen Falle der TSP-4/Kollagen-I-Wechselwirkung, zeigten die allermeisten COMP-Moleküle eine Interaktion über ihre C-terminale globuläre Domäne.

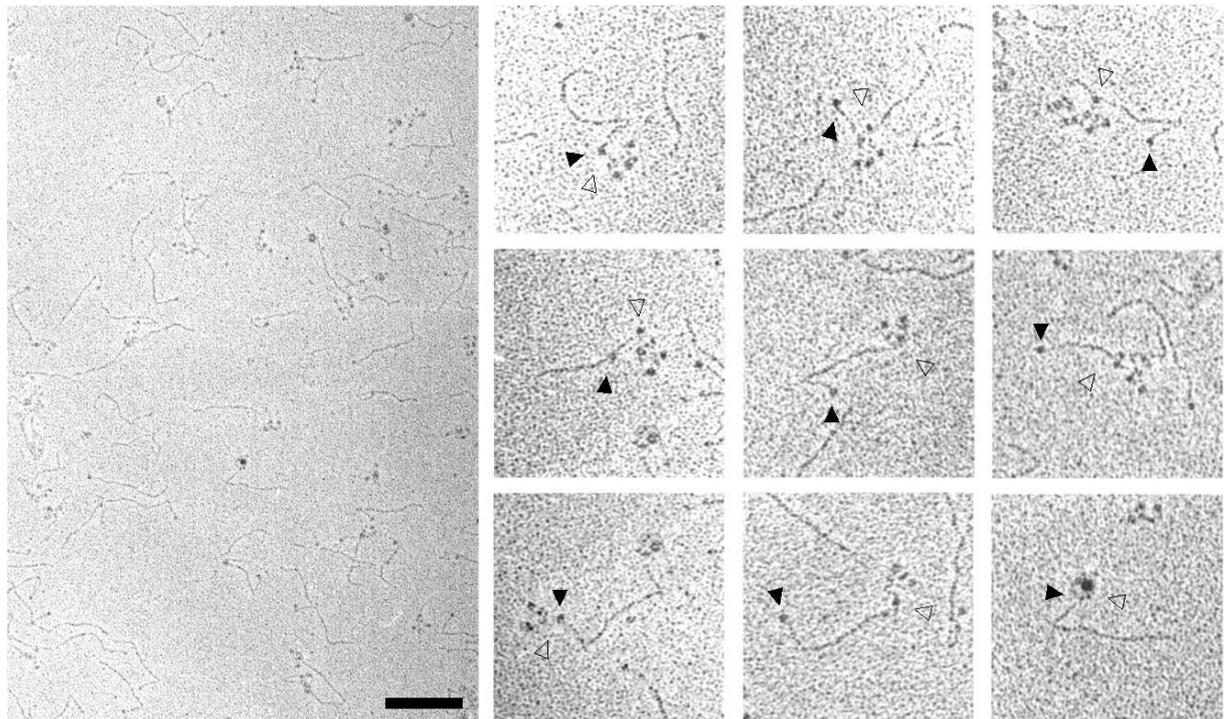


Abb. 37: **Untersuchung der Wechselwirkung zwischen COMP und Kollagen IX mittels rotary-shadowing-Elektronenmikroskopie.** Kollagen IX und baCOMP wurden im äquimolaren Verhältnis zusammengegeben und während der Dialyse gegen 200 mM Ammoniumformiat-Puffer mit 0.5 mM $ZnCl_2$ über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Übersichtsaufnahme (*links*) zeigt die Beschaffenheit der Probe. Die Vergrößerungen (*rechts*) zeigen ausgewählte Komplexe. Auch hier ist die N-terminale NC4-Domäne (*gefüllte Pfeilspitzen*) des Kollagen IX deutlich an ihrer globulären Struktur augenfällig und die NC3-Domäne an einem charakteristischen Knick in der Tripelhelix erkennbar. COMP bindet mit seinem globulären Ende (*leere Pfeilspitzen*) an verschiedenen Stellen des Kollagen IX. Der *Balken* entspricht 200 nm in der Übersicht und 100 nm in den Vergrößerungen.

Ammoniumformiat-Puffer mit...	Anteil an gebundenem COMP
0,5 mM $ZnCl_2$	50,8%
10 mM EDTA	27,6%

Tab. 2: **Zinkabhängigkeit der Interaktion zwischen COMP und Kollagen IX.** Die Wechselwirkung wurde wie unter Abb. 37 beschrieben durchgeführt. Dem Ammoniumformiat-Puffer war wahlweise 0,5 mM $ZnCl_2$ oder 10 mM EDTA zugesetzt.

Ein Histogramm verdeutlicht die Verteilung des COMP entlang der Kollagen-IX-Moleküle (Abb. 38). Vier unterscheidbare Bindungsstellen waren ersichtlich. Die Bindung an den N-Terminus wie an den C-Terminus waren exakt lokalisierbar. Die NC4-, wie die NC1-Domäne,

stellten also eine Bindungsstelle für COMP dar. Die beiden internen Bindungsstellen zeigten eine breitere Werteverteilung. Eine lag in der Nähe der NC3-Domäne, die andere im Bereich der NC2-Domäne.

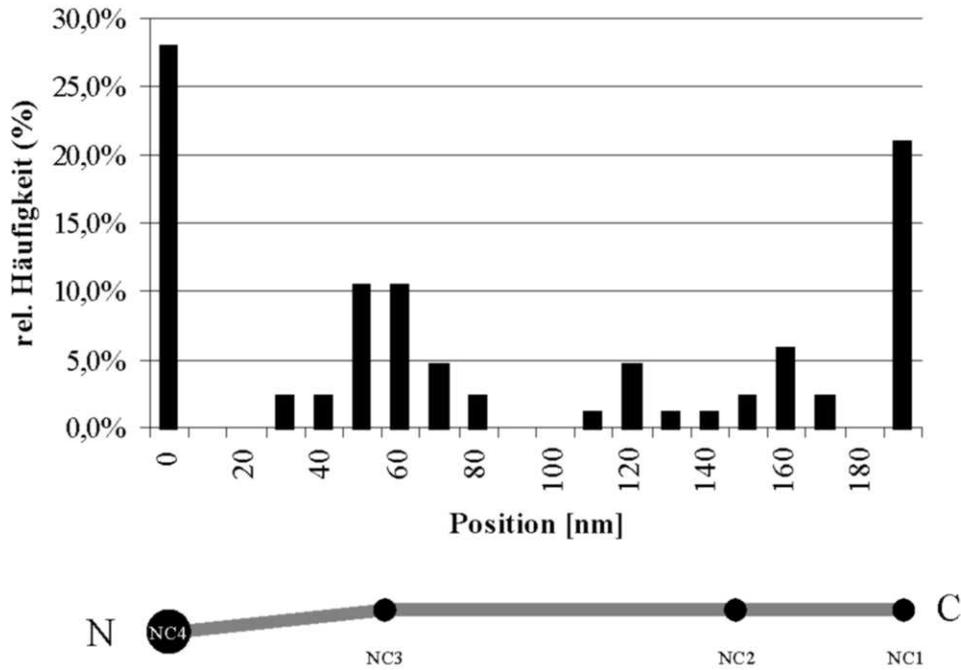


Abb. 38: **Verteilung des COMP entlang von Kollagen IX bei 0,5 mM ZnCl₂.** Die Position gebundener COMP-Moleküle am Kollagen IX wurde ermittelt und im Histogramm dargestellt. Die kleinste Skaleneinheit betrug dabei 10 nm. Eine entsprechend der x-Achsenkalierung des Histogramms abgebildete schematische Darstellung des Kollagen IX veranschaulicht die Lage der Bindungsstellen im Molekül.

DISKUSSION

Rekombinante Expression und Reinigung von Matrilinen

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen die Volllängeproteine Matrilin-2 und Matrilin-3 sowie deren einzelne vWFA-Domänen in eukaryontischen HEK-293-EBNA-Zellen rekombinant zu exprimieren. Zur Vereinfachung der Reinigung trugen die Proteine eine N-terminale His₆-Markierung, die Ein-Schritt-Reinigungen mittels Cobaltaffinitätschromatographie ermöglichte.

Rekombinantes Matrilin-2

Das N-terminale His₆-markierte Volllängeprotein des Matrilin-2 (HisM2) wurde nach Reinigung in seiner niedermolekularen Form erhalten. Die mengenmäßige Dominanz dieser Form deckte sich mit den Erfahrungen bei der rekombinanten Expression von unmarkiertem Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999). Es wurde auch gezeigt, daß diese niedermolekularen Formen bereits kurz nach der Sekretion auftreten und daß sich das Mengenverhältnis zwischen ihnen und den Oligomeren mit zunehmender Inkubation nicht merklich ändert (Piecha, Dissertation, 1999). Die zugehörigen Vorgänge finden also entweder intrazellulär oder kurz nach der Sekretion ins Medium statt. Da Matrilin-2 in HEK-293-EBNA-Zellen nachweislich glykosyliert wird und die in der SDS-PAGE nach Reduktion (Abb. 15, 8) ermittelten apparenten Molekulargewichte der Monomerformen mit 97 kDa und 67 kDa unter dem errechneten Wert für das unglykosylierte Protein von 104 kDa lagen, ist anzunehmen, daß das Matrilin-2 einer Proteolyse unterlag. Dazu könnte auch eine proteolytische Prozessierung in der Nähe des Coiled-Coil-Motives gehören, wie man sie am Matrilin-3 (s.u.) und Matrilin-4 (Klatt *et al.*, 2001) feststellen kann. Eine potentielle Schnittstelle läßt sich durch Sequenzvergleich (Abb. 41) bestimmen. Ein in allen Matrilinen konserviertes Glutamatdublett könnte diese Prozessierungsstelle markieren. Ein biochemischer Nachweis steht aber noch aus.

Rekombinantes Matrilin-3

N-terminale proteolytische Prozessierung des unmarkierten Matrilin-3

Unmarkiertes Volllänge-Matrilin-3, das ebenfalls in HEK-293-EBNA-Zellen exprimiert wurde, unterlag einer N-terminalen proteolytischen Prozessierung (Abb. 39 A). Das Protein wies einen um acht Aminosäuren kürzeren N-Terminus auf, als die Vorhersage der Signalpeptidaseschnittstelle (Nielsen *et al.*, 1997) unter Verwendung des von Heijne Algorithmus ergab (Nitsche, Diplomarbeit, 1997). Auffällig war, daß die Prozessierung C-terminal von der Sequenz RLAR stattfand, denn das Motiv RXXR stellt das Minimalmotiv für Furine, eine Gruppe von subtilisinähnlichen calciumabhängigen Serin-Endoproteasen, dar (Molloy *et al.*, 1992; Klimpel *et al.*, 1992; Hatsuzawa *et al.*, 1992; Übersichtsartikel: Nakayama, 1997). Ob Furine an der Prozessierung beteiligt waren, bedarf aber einer weitergehenden Untersuchung. Wenig wahrscheinlich ist aber eine physiologische Relevanz dieser Prozessierung, denn die Schnittstelle ist weder im bovinen noch im humanen Matrilin-3 konserviert (Abb. 39 B). Der N-terminale Bereich des Matrilin-3 fällt durch seinen hohen Argininanteil auf. Seine Funktion ist bisher unbekannt. Die N-terminale Proteolyse entfernt zwei von sieben Argininen dieses Sequenzbereiches und hat damit wahrscheinlich einen beträchtlichen Einfluß auf dessen Eigenschaften.

A

N-Terminus des Matrilin-3 (murin, rekombinant):

Vorhersage nach v. Heijne	nach N-terminalem Edman-Abbau
▼	▼
MRAWIFFLLCLAGRALA ¹⁷	APLVRLAR ²⁵ ASVRR LGTR

B

Furin-Motiv:

	RXXR
Maus (rekombinant):	1- APLVRLARASVRR LGTR -19
Maus (Wildtyp):	1- AP-GRLARASVRR LGTR -18
Mensch (Wildtyp):	1- AP-DPVARPGFRRL ETR -18
Rind (Edman-Abbau):	NH ₂ - AP - - - MARPGLRRLGTR

Abb. 39: **N-terminale Prozessierung von rekombinantem unmarkiertem Matrilin-3.** (A) Das Computerprogramm SignalP sagt unter Verwendung des von-Heijne-Algorithmus die Abspaltung eines

Signalpeptides aus 17 Aminosäuren voraus. Ein Schnitt nach der 25. Aminosäure, der dem durch N-terminale Ansequenzierung ermittelten Aminoterminus entsprochen hätte, war nach dieser Prognosemethode unwahrscheinlich (Nitsche, Diplomarbeit, 1997). N-terminal von der ermittelten Spaltstelle ähnelt die Proteinsequenz des murinen Matrilin-3 dem **Minimalmotiv der Furine (B)**. Die entsprechenden Sequenzen sind grau unterlegt (X= hydrophobe Aminosäure). Ein Vergleich mit den entsprechenden bovinen Sequenzabschnitten aus Rind (Wu und Eyre, 1999) und Mensch zeigt, daß dieses Motiv nicht konserviert ist. [Unterschiede zur Aminosäuresequenz](#) des rekombinanten murinen Matrilin-3 sind blau dargestellt.

Im Falle des His₆-markierten Volllänge-Matrilin-3 ist es gelungen eine proteolytische Prozessierung des N-Terminus zu verhindern, die ansonsten den Verlust der Markierung zur Folge gehabt hätte. Die potentielle Furinschnittstelle wurde dazu durch ein His₆-Motiv ersetzt (Abb. 40). Wie die Prozessierung hatte auch die Mutation den Verlust von zwei Argininen des argininreichen Bereiches zur Folge. Von geringeren Veränderungen an der Prozessierungsstelle wurde aber abgesehen, da nicht sicher war, ob es sich wirklich um einen Verdau durch Furin handelte. Die erfolgreiche Reinigung des Proteins mittels Cobaltaffinitätschromatographie bewies den Erhalt der His₆-Markierung.

Matrilin-3 (aus DNA):	1- AP-GRLAR--ASVRRLLGTR -16
M3:	1- APLVRLAR--ASVRRLLGTR -17
HisM3:	1- APLVHHHHHHALVRRLLGTR -19

Abb. 40: **N-termini muriner Matrilin-3-Konstrukte im Vergleich mit der Wildtypsequenz.** Das potentielle Furinmotiv ist grau, das His₆-Motiv gelb unterlegt. [Unterschiede zur Wildtypsequenz](#) sind blau dargestellt

C-terminale Prozessierung des Matrilin-3

Das markierte wie auch das unmarkierte rekombinante Matrilin-3 trat in unterschiedlichen Formen vom Monomer bis zum Tetramer auf, wie mit Hilfe der SDS-PAGE und der Elektronenmikroskopie gezeigt wurde. MALDI-TOF-MS an His₆-markiertem Matrilin-3 läßt annehmen, daß die Ursache der Molmassenheterogenität in einer proteolytischen Prozessierung lag (Klatt, Dissertation, 2001). Die Beobachtung von Dimeren und Trimeren in Elektronenmikrographien lassen schließen, daß die Prozessierungsstelle in der Nähe des Coiled-Coiled-Bereiches liegt. Sie ließ sich bisher aber nicht genau bestimmen. Aufgrund eines Sequenzvergleiches (Abb. 41) kann man jedoch vermuten, daß die Schnittstelle C-terminal von einem Glutamatdublett liegt, daß in allen Matrilinen konserviert ist.

Eine Arbeit von Chen *et al.* (1999) ließ vermuten, daß das Fehlen einer geeigneten vWFA-Domäne in der Nachbarschaft des Coiled-Coil-Motives, wie bei der dort beschriebenen Deletionsmutante (CMP Δ A2) des Matrilin-1, die Ausbildung von Coiled-Coil-Domänen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades erlaubte. Eine Deletionsmutante der die N-terminale vWFA-Domäne fehlte (CMP Δ A1) bildete dagegen ausschließlich intakte Trimere.

Vergleicht man die Sequenzen der Hühner-Matrilin-1-Deletionsmutanten mit den Sequenzen der murinen Matrilin, fällt auf, daß beide das Glutamatdublett enthalten, welches im Verdacht steht, Prozessierungsmotiv zu sein. Dennoch zeigte nur die Deletionsmutante CMP Δ A2 in der SDS-PAGE eine entsprechende Heterogenität der apparenten Molmassen. Sequenzunterschiede, die einen Unterschied im Ausmaß der Prozessierung erklären könnten, wurden nicht entdeckt. Vielmehr liegt der Schluß nahe, daß Hühner-Matrilin-1 in den zur rekombinanten Expression verwendeten embryonalen Hühnerfibroblasten nicht oder nur in geringem Maße prozessiert wird und dort die Molmassenheterogenität, wie bereits behauptet (Chen *et al.*, 1999), auf eine unterschiedliche Coiled-Coil-Oligomerisierung zurückzuführen ist.

In einer Folgearbeit berichten Zhang und Chen (2000), daß auch in COS-7-Zellen rekombinant exprimiertes Hühner-Matrilin-3 Unterschiede in seinen apparenten Molekulargewichten aufwies, die auf unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden beruhen könnten. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß Matrilin-3 in COS-7-Zellen, wie oben beschrieben, C-terminal prozessiert wird. Deshalb sind weitere Untersuchungen nötig, um tatsächlich alternative Oligomerisierungsgrade nachweisen zu können.

Matrilin-4 (Maus):	TMTHLLENLKGSICPEE_	GIGAGTELRSP <u>CEC</u> ...
Matrilin-3 (Maus):	PGYTLNDDKKTCSDI EE_	ARSLISIEDA <u>CGC</u>
Matrilin-2 (Maus):	TQKLFHSTKSSGNPLEE_	SQDQ <u>CKC</u> ...
Matrilin-1 (Maus):	TINQIGKKLQKQICV EE_	DP <u>CAC</u>
Matrilin-1 (Huhn, Wildtyp und CMP Δ A1):	TISNIGKKLQMKICV EE_	DP <u>CEC</u>
Matrilin-1 (Huhn, CMP Δ A2):	CKEGFTLNNDGKTCS EE_	DP <u>CEC</u>

Abb. 41: **C-terminale Prozessierung der Matrilin.** Rekombinantes Matrilin-4 wird in der Nähe der Coiled-Coil-Domäne C-terminal von einem **Glutamatdublett** (hellblau unterlegt) proteolytisch gespalten, das in allen Matrilinen konserviert ist und möglicherweise auch eine Prozessierungsstelle in Matrilin-1, Matrilin-2 und Matrilin-3 darstellt.

Elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen an rekombinanten Matrilinen

Das Vorhaben die elektronenmikroskopische Charakterisierung aller Matrilin auf das gleiche Niveau zu bringen wurde, erfolgreich beendet (Abb. 42). Ergänzend zu den Strukturmodellen des Matrilin-1 (Hauser und Paulsson, 1994) und des Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999) wurden hier entsprechende Modelle für das kürzlich entdeckte Matrilin-3 und Matrilin-4 aufgestellt. Die Modelle stehen miteinander in Einklang und stützen sich daher gegenseitig.

Struktur des Matrilin-3

Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung von rekombinatem, unmarkiertem Matrilin-3 der vollen Länge ließ einen maximalen Oligomerisierungsgrad von vier erkennen und führte zu folgendem Modell (Abb. 42): Ausgehend von einer C-terminalen tetrameren Coiled-Coil-Domäne erstrecken sich die EGF-Serien der vier Untereinheiten. Diese Serien bestehen jeweils aus vier EGF-Domänen von kompakter, globulärer Struktur (Montelione *et al.*, 1992), und besitzen aneinandergereiht eine langgestreckte Form von 7 ± 2 nm Länge. Den N-Terminus einer Untereinheit bildet die globuläre und im Vergleich zum EGF-Motiv deutlich größere vWFA-Domäne, deren ermittelter Durchmesser von 5 ± 1 nm mit den für Matrilin-1 (Hauser und Paulsson, 1994) und Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999) veröffentlichten Dimensionen, die auf einen maximalen Durchmesser zweier miteinander interagierender vWFA-Domänen von etwa 8 nm schließen lassen, vereinbar ist. Niedrigere Oligomere sind, wie oben beschrieben, aller Wahrscheinlichkeit nach Produkte einer proteolytischen Prozessierung in der Nähe der Coiled-Coil-Region.

Der durch Reduktion bewirkte Zerfall höhermolekularer Formen in ihre Monomereinheiten wurde mittels SDS-PAGE gezeigt und bewies die Stabilisierung der Oligomerisierung durch Ausbildung interchenarer Disulfidbrücken. Aus den Elektronenmikrographien war, wie schon beim Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999), ersichtlich, daß die Untereinheiten ausschließlich im Bereich der Coiled-Coil-Domäne verknüpft waren, was für eine Disulfidstabilisierung durch die beiden der Coiled-Coil-Sequenz benachbarten Cysteine sprach. Dieses Ergebnis konnten Zhang und Chen (2000) durch Punktmutation erhärten. Da der C-Terminus der Coiled-Coil-Region keine Cysteine enthält, ist eine solche zyklische Verbrückung aus sterischen Gründen nur dann möglich, wenn alle α -helikalen Stränge der Coiled-Coil-Domäne parallel laufen.

Eine analoge Beobachtung war in Elektronenmikrographien des Matrilin-1 nicht möglich, da dessen C-terminalen vWFA-Domänen den Coiled-Coil-Bereich verbargen. Allein die bouquetähnliche Anordnung der Untereinheiten ließ eine Coiled-Coil-Oligomerisierung vermuten (Hauser und Paulsson, 1994). Allerdings konnte die Ausbildung einer parallelen, trimeren Coiled-Coil-Domäne mit einer Cystinverbrückung durch die beiden benachbarten Cysteine mittels NMR-Spektrometrie an der rekombinant exprimierten Coiled-Coil-Region des Matrilin-1 bewiesen werden (Dames *et al.*, 1998).

Struktur des Matrilin-4

Rekombinantes Matrilin-4 mit C-terminaler Strep-Markierung zeigte nach Negativkontrastierung ein matrilintypisches bouquetähnliches Erscheinungsbild, auf dem das in Abb. 42 dargestellte Modell des Proteins gründet. Unter Ausbildung einer trimeren Coiled-Coil-Domäne sind die C-Termini der drei Untereinheiten verbunden. Die sich daran anschließenden vWFA-Domänen - eine je Untereinheit - werden von ihr zusammengehalten, so daß sie im Molekülzentrum eine große globuläre Struktur bilden. Möglicherweise bestehen zwischen diesen C-terminalen vWFA-Domänen Wechselwirkungen, die, wie für Matrilin-1 beschrieben (Chen *et al.*, 1999), einen Einfluß auf die Oligomerisierung haben können. Wie beim Matrilin-3 erstrecken sich vom Zentrum des Matrilin-4-Moleküls längliche Strukturen aus vier EGF-Motiven (8 ± 2 nm), die an ihrem äußersten Ende je eine globuläre N-terminale vWFA-Domäne (5 ± 1 nm) tragen. Die Dimensionen dieser Teilstrukturen ähneln denen des Matrilin-3 (s.o.). Im Vergleich zum Matrilin-2 (Piecha *et al.*, 1999) ist Matrilin-4 trotz seiner geringeren Anzahl von EGF-Einheiten weniger kompakt, was auf das Fehlen einer intrachenen Wechselwirkung der beiden vWFA-Domänen schließen läßt und gleichzeitig als unterstützende Beobachtung für das Matrilin-2-Modell herangezogen werden kann, das eine solche Selbstinteraktion der vWFA-Domänen einer Untereinheit postuliert. Ob im Matrilin-4 per se keine Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen und der C-terminalen vWFA-Domäne bestehen, oder ob sie durch die räumliche Nähe der C-terminalen vWFA-Domänen zueinander sterisch gehindert ist, kann hier nicht sicher beantwortet werden, obwohl im Elektronenmikroskop Monomere sichtbar sind, deren beide vWFA-Domänen aneinander liegen (Abb. 24).

Wie gezeigt werden konnte, ist die Coiled-Coil-Domäne des Matrilin-4 ausschließlich trimer. Di- und Monomere, die ebenfalls beobachtet wurden, sind die Folge einer Proteolyse in der

Nähe der Coiled-Coil-Region (Klatt *et al.*, 2001). Eine Disulfidstabilisierung der Oligomerisierung bewies die SDS-PAGE nach Reduktion, durch Auftreten einer Monomerbande bei 81 kDa (Abb. 25). Elektronenmikrographien der reduzierten Monomere (Abb. 26) ließen hantelförmige Strukturen erkennen, die den durch proteolytische Prozessierung entstandenen Monomeren ähnlich waren und damit das Modell für die Monomereinheit untermauerten. Daß die dem Coiled-Coil-Motiv benachbarten Cysteine für den Zusammenhalt der Oligomere verantwortlich sind, zeigen zweifelsfrei MALDI-TOF-Massenspektren vor und nach Reduktion der Probe. Coiled-Coil-Fragmente (6,9 kDa), die durch die erwähnte Proteolyse entstanden, wurden erst nach Reduktion abgespalten und im Spektrum sichtbar (Klatt *et al.*, 2001). Da der C-Terminus der Coiled-Coil-Sequenz keine Cysteine enthält, müssen nach der oben dargelegten Argumentation die Stränge aller Untereinheiten parallel laufen.

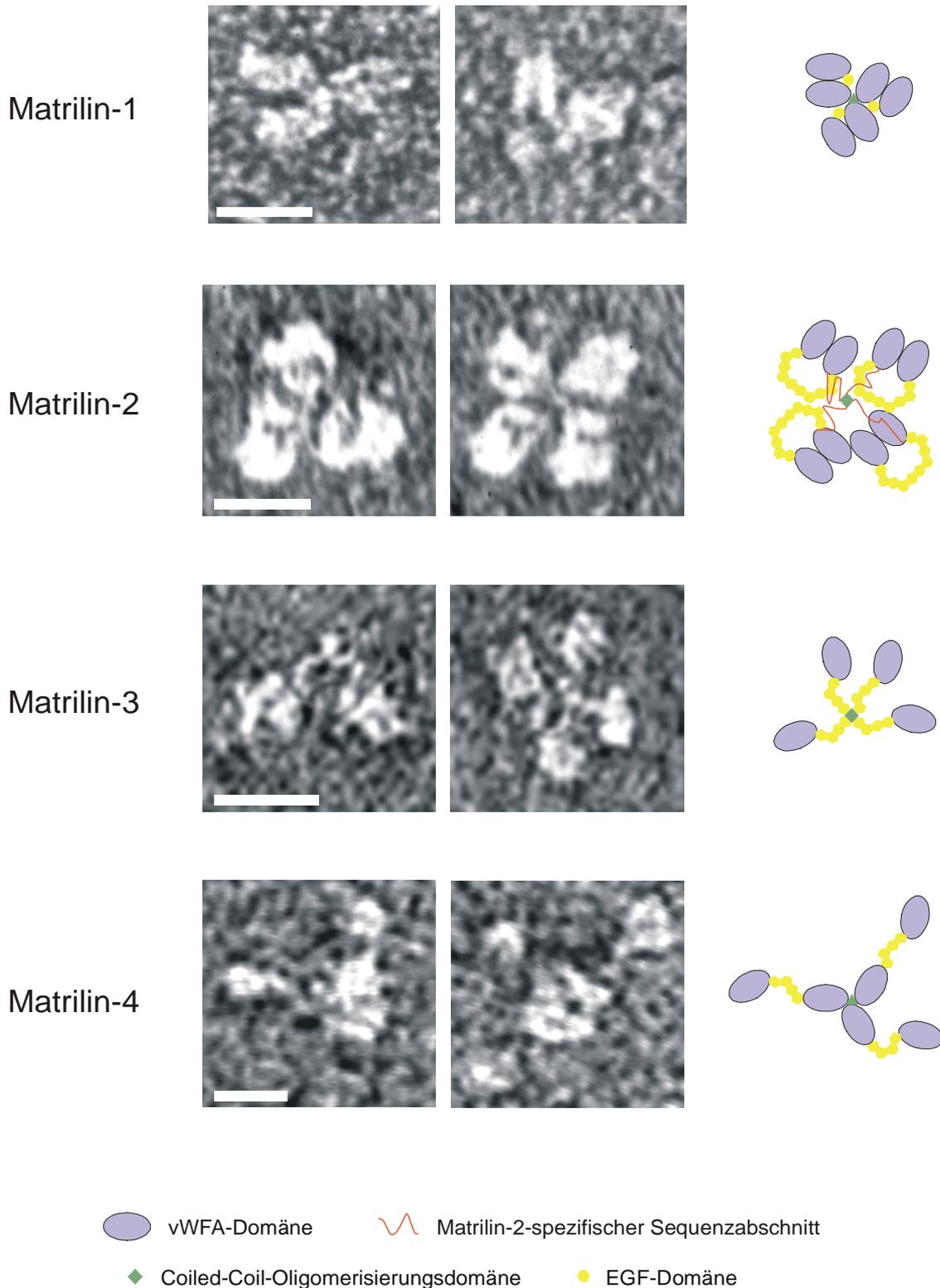


Abb. 42: **Die Matrilin-Familie im Elektronenmikroskop.** Die *Balken* in den repräsentativen Mikrographien einzelner Matrilinoligomere entsprechen 10 nm. *Rechts* sind die vorgeschlagenen Modelle schematisch dargestellt. Die Aufnahmen und das Modell des Matrilin-1 sind entnommen aus Hauser und Paulsson 1994, Aufnahmen und Modell des Matrilin-2 aus Piecha *et al.*, 1999. Die Modelle des Matrilin-3 und des Matrilin-4 beruhen auf den Ergebnissen dieser Arbeit.

Reinigung und Charakterisierung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren

Aus den Epiphysen von Femur und Humerus eines fötalen Rinderkalbes ließen sich erhebliche Mengen an Matrilin-3 extrahieren. Während einer Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie und anschließende Gelfiltration wurde durch Co-Isolierung ein Bindungspartner des Matrilin-3 entdeckt, denn zeitgleich mit einer Arbeit von Wu und Eyre (1999) wurde nachgewiesen, daß Matrilin-3 mit Matrilin-1 disulfidverknüpfte Heterooligomere ausbildet. Während Wu und Eyre jedoch nur von einer Heterotetramerspezies mit 2:2-Stöchiometrie ausgingen und keine Homooligomere des Matrilin-3 nachweisen konnten, ließen die hochauflösenden Gele in Abb. E1 auf die Existenz zusätzlicher Oligomere schießen. MALDI-TOF-MS der nichtreduzierten Probe bewies die Existenz sowohl von Tetrameren als auch von Trimeren. Unter Berücksichtigung der Immunoblots (Abb. 17) kann man folgern, daß die Spezies mit der höchsten Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel, homotrimeres Matrilin-1 ist. Eine wenig langsamer migrierende Bande, die beobachtet wurde, reagierte mit beiden Matrilin-Antisera und stellt vermutlich ein Heterotrimer dar. Die Proteinbande mit der drittgrößten Mobilität reagierte nur mit dem Matrilin-3-Antiserum und ist möglicherweise ein Homotrimer des Matrilin-3. Die drei Proteinformen mit den höchsten apparenten Molekulargewichten wurden in einer zweidimensionalen SDS-PAGE (nichtreduziert gefolgt von reduziert) analysiert, die eindeutig die Existenz von homotetramerem Matrilin-3 und zwei unterschiedlich migrierenden Heterotetrameren aus Matrilin-1 und Matrilin-3 bewies. Nach Reduktion zerfielen die Oligomere in zwei distinkte Untereinheiten, wie mit SDS-PAGE und exakter mit MALDI-TOF-MS gezeigt wurde. Daher konnten weder unterschiedliche Glykosylierung, noch eine proteolytische Prozessierung für den Mobilitätsunterschied der Heterotetrameren verantwortlich sein. Die Anwesenheit von Matrilin-2 und Matrilin-4 konnte damit ebenfalls ausgeschlossen werden, denn deren Molmassen sind wesentlich größer als 60 kDa. Wahrscheinlich sind die unterschiedlichen Mobilitäten der nichtreduzierten Heterooligomere teils auf einen unterschiedlichen Oligomerisierungsgrad, teils auf verschiedene Stöchiometrien zurückzuführen. Da die beobachteten Trimere nicht durch eine proteolytische Prozessierung der Tetramere entstanden sein konnten, ist die Ausbildung einer alternativen, trimeren Coiled-Coil-Domäne anzunehmen.

Im Elektronenmikroskop waren Matrilin-1- und Matrilin-3-Untereinheiten anhand ihrer Form voneinander zu unterscheiden. Es konnten Komplexe beobachtet werden, die sich in ihrem Erscheinungsbild von Partikeln aus reinen Matrilin-1- und Matrilin-3-Präparationen deutlich

unterschieden und den Formen der Untereinheiten nach heterooligomer waren. Bei einer Vielzahl der Moleküle war sichtbar, daß die Untereinheiten an einer distinkten Stelle verbunden waren, die Heterooligomerisierung also wie die Homooligomerisierung durch Ausbildung einer disulfidstabilisierten Coiled-Coil-Domäne erfolgt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden durch neulich erschienene Publikationen bestätigt. Zhang und Chen (2000) konnten durch Co-Transfektion von COS-7-Zellen rekombinante Heterooligomere aus Matrilin-1 und Matrilin-3 herstellen. Die Auflösung der SDS-PAGE reichte aber nicht aus um, die Bildung von Heterooligomeren unterschiedlicher Stöchiometrie nachweisen zu können. So berichteten sie, wie Wu und Eyre (1999), nur von vermeintlichen 2:2-Heterotetrameren. Kleemann-Fischer *et al.* (2000) dagegen konnten in Extrakten von humanen fötalen Epiphysen die Existenz von homotetramerem Matrilin-3 zeigen. Heterooligomere aus Matrilin-1 und Matrilin-3, die sich in der SDS-PAGE aufgrund ihrer Mobilität unterschieden, wurden ebenfalls beobachtet. Das erhaltene Bandenmuster ist analog zu dem des Rindes (Abb. 17).

Matrilin-1- und Matrilin-3-Untereinheiten unterscheiden sich deutlich in ihrem Aufbau und damit wohl auch in ihren Eigenschaften. Während die des Matrilin-1 zwei vWFA-Domänen besitzt, die vermutlich intrachenar wechselwirken (Hauser und Paulsson, 1994) trägt die des Matrilin-3 nur eine vWFA-Domäne und einen N-terminalen argininreichen Bereich, der in der Matrilin-1-Sequenz nicht vorkommt. Mit der Fähigkeit der Heterooligomerisierung besitzen diese beiden stützgewebespezifischen Matriline ein Mittel um Mischformen auszubilden, deren biochemischen Eigenschaften je nach stöchiometrischer Zusammensetzung zwischen denen der entsprechenden Homooligomeren variieren. Diese Fähigkeit könnte eine Rolle in der Feinabstimmung der mit den Matrilinen verbundenen Gewebeeigenschaften spielen.

Beachtlich ist das abnorme Laufverhalten der reduzierten Matriline in der SDS-PAGE. Das des Matrilin-1 wurde bereits von Paulsson und Heinegård (1981) untersucht. Die Bande mit dem größeren apparenten Molekulargewicht (63 kDa) war nach Immunoblot eindeutig dem Matrilin-3-Monomer und die andere (56 kDa) dem des Matrilin-1 zuzuordnen. Die Identität der beiden reduzierten Untereinheiten bestätigte auch die N-terminale Ansequenzierung nach SDS-PAGE durch Wu und Eyre (1999).

Die Proteinsequenzen von Matrilin-1 aus Maus und Mensch ergaben ein minimales Molekulargewicht der monomeren Proteine von 51 kDa. Berücksichtigt man, daß Matrilin-1 aus Rindertrachealknorpel N-glykosyliert ist (Paulsson und Heinegård, 1981), erklärt dies sein mittels MALDI-TOF-MS bestimmtes Molekulargewicht des Monomers von 54,8 kDa, das

nur wenig von dem durch Ultrazentrifugation ermittelten Wert von 52 ± 2 kDa (Paulsson und Heinegård, 1981) abwich. Aus der humanen und murinen Sequenz des Matrilin-3 ließen sich minimale Molmassen der entsprechenden Monomere von 50 kDa und 49 kDa errechnen. MALDI-TOF-MS an der reduzierten Probe aus fötaler Rinderepiphyse, die sowohl Matrilin-1 als auch Matrilin-3 enthielt, ergab Molekulargewichte der Monomere von 53 kDa und 49 kDa. Da das Matrilin-1 aus diesem Gewebe, wie das aus Rindertrachealknorpel nachweislich N-glykosyliert war, Matrilin-3 jedoch nicht, war dem Matrilin-1 das höhere Molekulargewicht zuzuordnen, so daß sich für monomeres bovines Matrilin-3 eine Molekülmasse von 49 kDa ergab. Weil diese mit dem geringsten, aus Sequenzen errechneten Wert übereinstimmte, sind größere posttranslationale Modifikationen des Proteins unwahrscheinlich. Man beachte, daß Matrilin-3 trotz seines niedrigeren Molekulargewichtes, eine geringere Mobilität im SDS-Polyacrylamidgel aufwies als Matrilin-1.

Eine N-Glykosylierung des bovines Matrilin-3 konnte ausgeschlossen werden. Ein in den Sequenzen aus Maus und Huhn vorhandenes potentiell N-Glykosylierungsmotiv des zweiten EGF-Motives ist im Menschen und, wie den von Wu und Eyre (1999) bestimmten Sequenzfragmenten zu entnehmen ist, im Rind nicht konserviert (Abb. 43). Daß bovines Matrilin-3 aus fötalen Rinderepiphysen nicht N-glykosyliert war, zeigte ein enzymatischer Verdau (Abb. 23). Aber auch eine O-Glykosylierung ist nach den Daten der Massenspektrometrie nahezu auszuschließen.

Maus :	315- ICINDR	NGS	YHCECYG	-330
Huhn :	315- ICVSN-	NGS	YVCECFE	-330
Mensch :	320- ICVNDR	SGSYHCECYE		-335
Rind :		TGSYHCECYE		

Abb. 43: **Potentielle N-Glykosylierungsstelle in Matrilin-3.** Das N-Glykosylierungsmotiv im murinen Matrilin-3 ist in der Sequenz aus Huhn, nicht aber in der aus Mensch oder Rind konserviert.

Wechselwirkungen der Matrilin mit anderen Proteinen der extrazellulären Matrix

Eindeutig nachgewiesene Bindungen von Matrilinen an andere Proteine der extrazellulären Matrix sind derzeit nur vom Matrilin-1 (und vom Matrilin-2) bekannt. Matrilin-1 bindet teilweise kovalent in einer altersabhängigen Weise an Aggrecan. Mit zunehmendem Alter des Individuums steigt nicht nur der Anteil an kovalenter Bindung, sondern auch die Anzahl der bestimmbar Bindungsstellen am Core-Protein (Hauser *et al.*, 1996). Matrilin-1 bindet auch an Biglykan, das wiederum im Bereich des N-Terminus von Kollagen VI bindet. Eine Brückenfunktion des Matrilin-1/Biglykan-Komplexes zwischen Kollagen-VI-Fibrillen und Aggrecan wird daher angenommen (Wiberg *et al.*, 2001; Wiberg, Dissertation, 2001). Co-Lokalisation von Matrilin-1 mit Kollagen II und Wechselwirkungs-ELISA geben Hinweise auf eine Wechselwirkung unter den beiden. (Winterbottom *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995). Eine mögliche Verbrückung des Aggrecans mit dem Kollagen-II-Netzwerk im Knorpel könnte von Biglykan oder anderen Co-Liganden unabhängig sein. Im Falle des Matrilin-2 zeigen Festphasenexperimente und elektronenmikroskopisch analysierte Mischungsexperimente, daß Matrilin-2 mit Kollagen I interagiert (Piecha, Dissertation, 1999). Die Bindung von Matrilinen an fibrillenbildende Kollagene konnte auch in dieser Arbeit im Wechselwirkungs-ELISA mit Matrilin-3 und Matrilin-4 beobachtet werden. Stärkere Signale als mit den Liganden Kollagen I oder Kollagen II erhielt man aber mit Kollagen V und Fibronectin. Von der Bindung der vWFA-Domänen von Integrinen an Kollagene weiß man, daß sie durch Magnesiumionen verstärkt wird (Onley *et al.*, 2000). Experimente mit Matrilin-4, in denen der Einfluß unterschiedlicher divalenter Kationen untersucht wurde, ergaben, daß seine Wechselwirkung mit Kollagen V und mit Fibronectin magnesiumionenabhängig ist, nicht aber die mit Kollagen II.

Die Interaktion zwischen Kollagen V und Matrilin-4 legt die Vermutung nahe, daß Matrilin-4 an der Fibrillogenese beteiligt ist, denn eine Wechselwirkung mit dem Kollagen V der vollendeten Fibrille ist unwahrscheinlich, da es den Kern der Fibrille (Birk *et al.*, 1988) bildet und von Kollagen I oder Kollagen II umgeben ist, so daß es für Matrilin-4 nicht mehr zugänglich ist. Kollagen V stellt unter den fibrillenbildenden Kollagenen eine Besonderheit dar, da es wie Kollagen XI und im Gegensatz zu den anderen einer nur unvollständigen N-terminalen Proteolyse unterliegt (Broeck *et al.*, 1985; Morris und Bächinger, 1987; Niyibizi und Eyre, 1993). Ein Teil der im Gewebe vorliegenden Kollagen-V-Moleküle bleibt daher im Besitz eines Großteils seines N-terminalen Propeptids. Dies formt eine globuläre

heparinbindende Domäne, der eine Regulierungsfunktion bei der Fibrillogenese zugesprochen wird. Sollte ein Einfluß des Matrilin-4 auf die Fibrillenentstehung nachgewiesen werden, wird eine zentrale Frage bei der Aufklärung des zugehörigen Mechanismus sein, ob es mit der heparinbindenden Domäne oder dem tripelhelikalen Bereich des Kollagen V interagiert.

Kürzlich wurden Mutationen in der vWFA-Domäne des Matrilin-3 entdeckt. Sie betreffen Aminosäuren, die in allen Mitgliedern der Matrilin-Familie und in allen bisher bekannten Spezies konserviert sind und stehen nachweislich im Zusammenhang mit der Knorpeldysplasie MED (Chapman *et al.*, 2001). Bis dahin ließen sich Knorpeldysplasien vom Typ MED und PSACH nur auf Mutationen im COMP oder Kollagen IX zurückführen (Holden *et al.*, 1999; Deere *et al.*, 1998; Muragaki *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1995). MED-verursachende Mutationen im COMP haben strukturelle Veränderungen im C-terminalen Teil der Proteins zur Folge (Thur *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000 b; Maddox *et al.*, 2000) und eine Störung seiner Kollagenbindung (Thur *et al.*, 2001). Diese ist vermutlich eine molekulare Grundlage der Krankheit. Die Existenz von Mutationen in der mutmaßlichen Kollagenbindungsdomäne des Matrilin-3, der vWFA-Domäne, die mit derselben Symptomatik verbunden sind, läßt einen analogen Mechanismus für Matrilin-3 und damit eine physiologische Bedeutung des Proteins als Kollagenligand annehmen.

Fibronectin zeigte im Elektronenmikroskop eine Wechselwirkung sowohl mit Matrilin-3 als auch mit Matrilin-4. Da Fibronectin in der Lage ist, eigenständig fibrillenbildende Kollagene (Skorstengaard *et al.*, 1984; Fleischmajer und Timpl, 1984) zu binden, ist es wenig wahrscheinlich, daß Matrilin als Adapterproteine zwischen diesen wirken. Da Matrilin aber in der Lage sind, kollagenunabhängige Netzwerke auszubilden (Klatt *et al.*, 2000; Piecha *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1995), ist eine physiologische Relevanz der Interaktion vorstellbar. Da Fibronectin an der Zellbindung beteiligt ist, kann man vermuten, daß hier Fibronectin als Adapter zwischen Matrilinen und Zelloberflächenrezeptoren fungiert. Makihira *et al.* (1999) zeigten eine verstärkte Zelladhäsion und -ausbreitung auf Matrilin-1 beschichteten Platten, die sie auf eine Interaktion des Matrilin-1 mit Integrin $\alpha_1\beta_1$ zurückführten. Die Interaktion der beiden wurde mittels Immunpräzipitation aus Zelllysaten gezeigt. Dabei war die Anwesenheit von Fibronectin nicht sicher auszuschließen. Auch in den Zelladhäsions- und -ausbreitungsexperimenten ist die Abwesenheit von Fibronectin nicht nachgewiesen, so daß dies als Adapter hätte wirken können. Weiterhin denkbar ist aber auch eine Bindung zwischen den vWFA-Domänen des Integrins und des Matrilin-1. Ob auch die anderen Matrilin an Integrine binden und ob ihre Integrinbindungen fibronectinvermittelt sind, bleibt zu klären.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Thrombospondinen

Strukturelle Charakterisierung von rekombinantem Thrombospondin-4 und COMP

Sowohl rekombinantes Thrombospondin-4 als auch rekombinantes COMP wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie strukturell charakterisiert. Die zugehörigen Konstrukte basierten auf den cDNA-Sequenzen der Ratte und kodierten für monomere Untereinheiten aus einer C-terminalen thrombospondinspezifischen Domäne, einer Serie aus acht Thrombospondin-Typ-III-Wiederholungseinheiten und einer sich daran anschließenden Reihe aus vier EGF-Domänen. Stromabwärts davon lag ein Coiled-Coil-kodierender Bereich, dem im Falle des TSP-4 die Sequenz seiner N-terminalen Domäne folgte, eine Sequenz die im COMP nicht vorkommt. (Narouz-Ott *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001).

Die exprimierten und isolierten Proteine zeigten in Elektronenmikrographien eine pentamere Quartärstruktur. Solche Pentamere bestanden aus fünf globulären Einheiten von denen aus fadenförmige Strukturen ins Molekülzentrum liefen. Beim COMP liefen die fadenartigen Strukturen an einer Stelle zusammen, an der sie aller Wahrscheinlichkeit nach unter Ausbildung einer Coiled-Coil-Domäne miteinander verbunden waren. Nicht nur Aufnahmen (Abb. 32) nach *rotary shadowing*, sondern auch nach Negativkontrastierung zeigten eine Masseansammlung im Zentrum der TSP-4-Moleküle, die an mittels *rotary shadowing* visualisierten COMP-Molekülen nicht vorhanden war (Abb. 35). Dies ließ den Schluß zu, daß es sich um die globulären N-terminalen Domänen handelte, die hier erstmalig zweifelsfrei im Elektronenmikroskop identifiziert werden konnten. Wahrscheinlich waren sie deshalb nicht als Einzelstrukturen erkennbar, weil die direkt benachbarte Coiled-Coil-Domäne auch hier für die Pentamerisierung verantwortlich war und sie dicht beieinander hielt. Diese Beobachtungen zu Grunde gelegt, mußten die blumenartigen Strukturen des TSP-4 und des COMP, die vom Molekülzentrum ausgingen, aus den EGF-Domänen, TSP-Typ-III-Domänen und der C-terminalen Domäne aufgebaut sein.

Die Pentamerisierung wurde auch an rekombinantem humanem TSP-4 (Lawler *et al.*, 1995) beobachtet. Die *in-vivo*-Relevanz der Pentamerisierung wurde an aus Rindersehnen nativ gereinigtem TSP-4 (Hauser *et al.*, 1995) und an aus diversen Geweben gereinigtem COMP (Mörgelin *et al.*, 1992, DiCesare *et al.*, 1994 b, 1995) gezeigt.

Beim Vergleich des hier untersuchten rekombinanten TSP-4 mit dem aus Rindersehnen isolierten Protein (Hauser *et al.*, 1995), fiel auf, daß nur wenige nativ aus Gewebe gereinigte

TSP-4-Moleküle globuläre N-terminale Domänen aufwiesen. Die Autoren berichteten von einer proteolytischen Prozessierung des Proteins. Man übertrug die Ergebnisse aus der N-terminalen Sequenzierung des bovinen Proteins auf die bekannten Sequenzen von Mensch und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und zeigte, daß wahrscheinlich die N-terminale heparinbindende Domäne abgespalten wurde. Dies müsse einen Einfluß auf die Eigenschaften des Proteins haben, die von physiologischer Bedeutung sein könne. Diese proteolytische Spaltung wurde auch bei der rekombinanten Expression des TSP-4 aus Ratte (Narouz-Ott *et al.*, 2000) und aus Mensch (Lawler *et al.*, 1995) beobachtet. Bei Betrachtung der wahrscheinlichen Prozessierungsstelle in der Sequenz von Ratte, Mensch und Krallenfrosch fiel auf, daß sie in der N-terminalen Nachbarschaft der Coiled-Coil-Domäne lag, C-terminal von einem Glutamindublett. Dieses Dublett ist an der entsprechenden Stelle der TSP-4-Sequenz des Krallenfrosches zwar nicht konserviert, aber dennoch in der Nähe des Coiled-Coil-Motives vorhanden. Die Prozessierung wies eine gewisse Ähnlichkeit zur Prozessierung von Matrilin-4 (Klatt *et al.*, 2001) auf, in dem die Spaltung C-terminal von einem Glutamatdublett und ebenfalls N-terminal, nicht weiter als 11 Aminosäuren entfernt von einer Coiled-Coil-Region stattfand. Ob das jeweilige Aminosäuredublett Teil des Erkennungsmotives der Protease ist, ist in beiden Fällen noch ungeklärt.

Thrombospondin-4:

Rind:	H ₂ N-SEPLAXXNGGDFNRQ.....
Mensch:	LQQ ¹⁸⁷ SEPLAATGTGDFNRQFLG...
Ratte:	LQQ ¹⁸⁷ SEPLAATGTGDFNRQFLG...
Frosch:	MQK ¹⁸⁴ SEAGQQ TGDVSRQLIG...

Matrilin-4:

Maus:	TMTHLLENLKGSICP ^{EE} ₅₇₂ GIGAGTELRSP ^{CEC} ...
-------	---

Abb. 44: **Prozessierung des TSP-4.** Die am Rinder-TSP-4 bestimmte proteolytische Spaltstelle wird hier mit den TSP-4-Sequenzen aus Mensch, Ratte und Frosch verglichen. Ein **Glutamindublett**, das N-terminal an die potentielle Spaltstelle des TSP-4 aus Mensch und Ratte angrenzt ist gelb hervorgehoben. Die Krallenfroschsequenz besitzt ein ähnliches Motiv das ebenfalls gelb hervorgehoben ist. Ein **Glutamatdublett** auf der N-terminalen Seite der Spaltstelle im Matrilin-4 ist hellblau unterlegt. Der Beginn der Coiled-Coil-Domäne ist doppelt unterstrichen. Die mit X bezeichneten Aminosäuren sind unbestimmt.

Vergleicht man die Proteinsequenzen von TSP-4 und COMP, erkennt man, daß durch die proteolytische Prozessierung von TSP-4, ein Protein mit starker Ähnlichkeit zu COMP entsteht. Deren Bereiche aus Typ-III-Domänen weisen eine Identität von 70%, ihre C-terminalen Domänen sogar eine von 77% auf (siehe auch Anhang: Sequenzvergleich von TSP-4 und COMP aus Ratte). Neben dieser proteolytischen Prozessierung, durch die TSP-4 zu einem pseudo-COMP beschnitten wird, gibt es Hinweise auf Heterooligomere von TSP-4 und COMP in Sehnen (Hecht *et al.*, 1998 a, F. Zaucke, persönliche Mitteilung). Es scheint, als gäbe es zwei Mechanismen für eine Regulierung der Anzahl von N-terminalen Domänen in solchen Pentameren. Und damit eine Regulation der Eigenschaft, die dem gesamten Protein von den N-terminalen Domänen verliehen wird. Anhand des TSP-1 wurde gezeigt, daß diese heparinbindende (Yu *et al.*, 2000; Yabkowitz *et al.*, 1989; Dixit *et al.*, 1984) Faltungseinheit, bei der Zelladhäsion beteiligt ist (Gupta *et al.*, 1999; Celezardin *et al.*, 1997; Kaesberg *et al.*, 1989) und die Degradation des Proteins vermittelt (Mikhailenko *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996 b).

Wechselwirkung zwischen Thrombospondinen und Kollagenen

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von TSP-4 und COMP ließ, mit Ausnahme der geringeren N-terminalen Prozessierung des TSP-4, keine strukturellen Unterschiede zum entsprechenden Protein aus Gewebe erkennen, die für eine funktionelle Beeinträchtigung gesprochen hätten. Beide Proteine wurden daher als geeignet erachtet, in Wechselwirkungsexperimenten eingesetzt zu werden. Da jedoch nativ aus Rindergelenk gereinigtes COMP (baCOMP) zur Verfügung stand, das bereits eine Bindung zum fibrillenformenden Kollagen I und Kollagen II gezeigt hatte (Rosenberg *et al.*, 1998), wurde dies in elektronenmikroskopisch analysierten Interaktionsexperimenten eingesetzt.

Im Laufe dieser Arbeit wurden Wechselwirkungen aufgedeckt, die eine Zinkionenabhängigkeit zeigten. Die minimalen Konzentrationen an Zinkchlorid, die bei der Untersuchung der beiden Thrombospondine im Wechselwirkungs-ELISA einen bindungsfördernden Effekt zeigten, lagen bei etwa 25-50 μM (Narouz-Ott *et al.*, 2000; Thur *et al.*, 2001). Die Zinkionenkonzentration im Blutplasma beträgt 11-17 μM und liegt knapp unter dieser Konzentration. Während über die Zinkionenkonzentrationen in den TSP-4 exprimierenden Geweben wenig bekannt ist, wurden beispielsweise in der Synovialflüssigkeit Zinkionenkonzentrationen von 9-25 μM (Buneaux *et al.*, 1978) gemessen. Im COMP-

exprimierenden Knorpel variiert die Konzentration altersabhängig zwischen 15 μM und 120 μM (Schor *et al.*, 1973). In verschiedenen Bereichen des Knorpels wie der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge wurden lokale Konzentrationen von bis zu 1,4 mM ermittelt (Rizzo *et al.*, 1995). Es gibt also durchaus Gewebe, deren Zinkionenkonzentrationen für eine Bindungsförderung ausreichen. Im Gegensatz zur Bindung von Calciumionen an die Typ-III-Domänen (Thur *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000 b; Maddox *et al.*, 2000) konnte bisher keine Bindung von Zinkionen am Thrombospondin nachgewiesen werden. Die Aufklärung des Mechanismus, mit dem Zink einen Einfluß auf die Kollagen-Interaktion der Thrombospondine nimmt, stellt ein wichtiges Thema für spätere Arbeiten dar. Der Effekt auf die Proteine kann dabei durchaus unterschiedliche Folgen haben, denn für Thrombospondin-1 wurde ein gegenteiliger Effekt, eine Aviditätssenkung gezeigt (Galvin *et al.*, 1987).

Wechselwirkung des Thrombospondin-4 mit Kollagen I

Ältere Ergebnisse aus Ligandenbindungsexperimenten basierten auf TSP-4, das in Anwesenheit von 2 M Harnstoff und 10 mM EDTA aufgereinigt wurde (Narouz-Ott, Dissertation, 1999). Nach einer neuen Reinigung in Abwesenheit von chaotropen Reagenzien und in Anwesenheit von 1,8 mM CaCl_2 wurde der Einfluß des Harnstoffs auf TSP-4 im Wechselwirkungs-ELISA studiert. Es lies sich nachweisen, daß die Bindungseigenschaften von TSP-4 und Einflüsse der untersuchten divalenten Kationen auf TSP-4, von einer Behandlung des Proteins mit 2 M Harnstoff unbeeinflußt blieben. Also entsprechen auch die älteren Daten denen, die man mit nativem TSP-4 erhält.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte die Bindung zwischen TSP-4 und Kollagen I dargestellt und nachgewiesen werden. Als Referenzexperiment diente die Interaktion zwischen COMP und Kollagen I. Die Experimente ergaben, daß die globuläre C-terminale Domäne des TSP-4 eine Bindungsstelle für terminale und interne Motive des Kollagen-I-Moleküls besaß. Wie auch der Wechselwirkungs-ELISA bestätigte (Narouz-Ott *et al.*, 2000), trug die N-terminale Domäne kaum zur Bindung bei. Da die Termini des eingesetzten Tropokollagens nicht unterscheidbar waren, war es nicht möglich die Bindungsstellen an der Tripelhelix genau zu lokalisieren.

Kontrovers zu den Ergebnissen der Festphasenmethoden war die Beobachtung, daß die Anwesenheit von 1 mM Zinkchlorid nicht zu einem höheren Anteil gebundener Proteine führte, als im Beisein von 5 mM EDTA ermittelt wurde. Dennoch konnte ein Zinkeffekt festgestellt werden, denn die terminalen Bindungen, die in zinkhaltiger Lösung überwogen,

nahmen nach EDTA-Zugabe zu Gunsten der internen Bindungen ab. Dieser Effekt ließ sich durch einstündige Präinkubation des TSP-4 mit EDTA verstärken, so daß man annehmen kann, daß die zugehörigen Veränderungen am Protein nur langsam vonstatten gingen. Über die Ursache der Diskrepanz zwischen den Festphasenexperimenten und den elektronenmikroskopisch analysierten Mischungsexperimenten kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß eine zinkabhängige terminale Bindung der internen gegenüber sterisch begünstigt war, wenn Kollagen I an den Kunststoff der Mikrotiterplatte oder die Trägersubstanz des SPR-Chips adsorbiert war. Eine andere Erklärung wäre, daß nur ein Teil des eingesetzten Kollagen I biologisch aktiv war und die Experimente in den Konzentrationsbereichen der Sättigung durchgeführt wurden, denn bis auf den gleichbleibenden Anteil der gebundenen Partikel deckten sich die elektronenmikroskopischen Beobachtungen mit denen aus den COMP-Kollagen-I-Interaktionsexperimenten. Auch dort führte die EDTA-Zugabe - allerdings einhergehend mit einer Abnahme des Anteils gebundener Proteine - zur Zunahme der internen gegenüber der terminalen Bindung (Rosenberg *et al.*, 1998).

Zum Verlust an biologischer Aktivität könnte die Pepsinbehandlung des Kollagen I bei seiner Extraktion geführt haben. Sie trennte die Kollagenmoleküle durch Proteolyse in den Telopeptidbereichen aus der Fibrille und erzeugte, zumindest bei einem Anteil der Kollagenmoleküle, artifizielle Termini. Ob die terminal gebundenen TSP-4-Moleküle an artifiziellen oder an nativen Enden gebunden waren, ließ sich nicht feststellen. Daß die Bindung aber nahezu ausschließlich von der C-terminalen Domäne des TSP-4 eingegangen wurde, sprach zumindest für ihre Spezifität. Außerdem wurde in vergleichbaren Experimenten für die COMP-Interaktionen mit Kollagen I und Kollagen II gezeigt, daß die am pepsinextrahierten Kollagen auftretende terminale Bindung auch am unverdauten Prokollagen auftrat (Rosenberg *et al.*, 1998). Da Pepsin nicht in der Lage ist, tripelhelikale Bereiche des Kollagens zu verdauen, sollten seine internen Bindungsstellen unbeeinflusst geblieben sein. Die spezifische Bindung dieser Stellen über die C-terminale Domäne spricht dafür, daß Kollagen I ein physiologischer Wechselwirkungspartner des TSP-4 ist.

Auf Grund seiner Pentavalenz konnte das Protein mehrere Kollagenmoleküle gleichzeitig binden. Es bleibt daher zu klären, ob seine Oligomerisierung nur einer hohen Avidität dient oder ob das Protein Kollagenmoleküle in gegenseitige räumliche Nähe bringen soll, beispielsweise während der Fibrillogenese. Sollten auch Wechselwirkungen mit anderen

Proteinen der extrazellulären Matrix existieren, könnte es aber auch als Adapterprotein zwischen diesen und Kollagen I fungieren.

Wechselwirkung des COMP mit Kollagen IX

Mutationen in COMP und Kollagen IX, die bei den betroffenen Individuen die Knorpeldysplasien MED und PSACH verursachen (Holden *et al.*, 1999; Deere *et al.*, 1998; Muragaki *et al.*, 1996; Hecht *et al.*, 1995; Briggs *et al.*, 1995) und die Co-Lokalisierung der beiden Proteine in pathologischen Ablagerungen im rauhen ER von Chondrozyten solcher Patienten (Hecht *et al.* 1998 b), waren der Anlaß die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Proteinen zu studieren.

Humanes rekombinantes Kollagen IX (Pihlajamaa *et al.*, 1999) wurde vor dem Einsatz in Interaktionsstudien elektronenmikroskopisch betrachtet. Das Abbild des heterotrimeren Proteins entsprach dem des aus humanem Knorpel isolierten Kollagen IX (Bruckner *et al.*, 1988).

In Wechselwirkungsexperimenten mit baCOMP konnte eine zinkabhängige Bindung an Kollagen IX gezeigt werden. In den Elektronenmikrographien war eindeutig sichtbar, daß das Kollagen IX mit der C-terminalen Domäne des COMP interagiert. Es existieren Mutationen in diesem Bereich des COMP, die zu Knorpeldysplasien führen. Die meisten Mutationen, die diese Krankheiten zur Folge haben, liegen jedoch im Bereich der Typ-III-Domänen. Da diese aber einen Einfluß auf die Faltung der C-terminalen Domäne haben, die deren Bindungsfähigkeit beeinträchtigen könnte (Thur *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000 b), schließt dies nicht aus, daß die Bindungsstelle der Interaktion in der C-terminalen Domäne liegt.

Vier Bindungsstellen für COMP konnten am Kollagen-IX-Molekül ermittelt werden. Sie liegen in den nichttripelhelikalen Domänen NC4, NC3 und NC1 und im Bereich der NC2-Domäne. Holden *et al.* (2001) kommen in analogen Experimenten zu einem ähnlichen Schluß, mit dem Unterschied, daß sie einen engeren Bindungsbereich an der NC2-Domäne angeben. Die bisher identifizierten Mutationen im Kollagen IX, die MED verursachen, betreffen alle Splice-Donor- oder -Akzeptorstellen, die zur Deletion von Exon 3 der $\alpha 2(\text{IX})$ oder der $\alpha 3(\text{IX})$ -Kette führen. In beiden Fällen bedeutet dies eine im-Leseraster-Deletion eines entsprechenden Abschnittes aus 12 Aminosäuren der NC3-Domäne. Daraus ergibt sich ein möglicher Einfluß der Mutation auf die Bindungsstelle in der NC3-Domäne und auf die C-terminal von ihr gelegenen Bindungsstellen im Bereich der NC2- und in der NC1-Domäne.

Daß Beeinträchtigungen der COMP-Kollagen-IX-Interaktion eine molekulare Grundlage für die Knorpeldysplasien MED und PSACH sein könnten, zeigt auch die geringere Avidität entsprechender COMP-Mutanten in Festphasenexperimenten (Thur *et al.*, 2001).

Außer der hier erstmals bewiesenen Wechselwirkung von COMP mit Kollagen IX ist auch eine Affinität des COMP zum fibrillenbildenden Kollagen I und Kollagen II bekannt (Rosenberg *et al.*, 1998). Kollagen IX findet man im Knorpel, assoziiert mit den Kollagen-II-Fibrillen. Vorstellbar ist, daß das ebenfalls im Knorpel exprimierte COMP eine Aufgabe bei der Genese dieser Fibrillen erfüllt. Es könnte als eine Art extrazelluläres Chaperon bei der Aneinanderlagerung von Kollagen-II-Molekülen und bei der Anlagerung von Kollagen IX an die periphere Schicht der Fibrille dienen.

AUSBLICK

Die strukturelle Charakterisierung der bisher bekannten Matriline mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie ist in dieser Arbeit vervollständigt worden. Weitergehende Untersuchungen erfordern den Einsatz anderer Methoden. Durch NMR-, und Massenspektrometrie an synthetischen oder rekombinanten Peptiden können die hier gewonnenen Erkenntnisse und Vermutungen über die Bildung von disulfidstabilisierten Coiled-Coil-Domänen überprüft und erweitert werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Heterooligomerisierung, denn die dabei auftretenden Stöchiometrien sind bisher nicht geklärt. Der mögliche Einfluß der anderen Domänen auf den Oligomerisierungsgrad der Coiled-Coil-Region bedarf ebenfalls weiterer Studien.

Am Thrombospondin-4 aus Rindersehnen wurde eine proteolytische Prozessierung in der Nähe des Coiled-Coil-Motives beobachtet, die vermutlich von physiologischer Bedeutung ist (Hauser *et al.*, 1995). Es muß geklärt werden, ob auch die am rekombinanten Matrilin-3 und Matrilin-4 entdeckte Prozessierung, deren Schnittstelle ebenfalls in der N-terminalen Nachbarschaft einer solchen Oligomerisierungsdomäne liegt (Klatt *et al.*, 2001; Klatt, Dissertation, 2001), von physiologischer Relevanz ist. Dann stellen sich für die Matriline die gleichen Fragen wie für Thrombospondine: Ist die jeweilige Prozessierung gewebespezifisch? Welche Eigenschaften und Funktionen haben die durch die Proteolyse entstehenden Produkte? Und welche Protease ist daran beteiligt? Aus medizinischer Sicht ist von besonderem Interesse, ob es Störungen in diesen Prozessen gibt, die mit Krankheiten verbunden sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen vWFA-Domänen der Matriline bilden die Grundlage für die Analyse ihrer Struktur. Absorptionsspektroskopische Methoden (Circulardichroismus-Spektroskopie und Fluoreszenz-Spektroskopie) können eingesetzt werden, um einen Einfluß divalenter Kationen auf die Proteinkonformation nachzuweisen. Mutagenese und auch die Röntgenkristallographie, die Erkenntnisse über die Struktur auf atomarer Ebene liefern soll und die im Idealfall auch an Co-Kristallen aus vWFA-Domäne und Ligand durchgeführt werden kann, ermöglichen eine genaue Charakterisierung der Bindungsstelle. Die Röntgenkristallographie kann die Frage klären, ob und gegebenenfalls wie ein MIDAS-Motiv an der Bindung beteiligt ist.

Elektronenmikroskopisch analysierte Mischungsexperimente eignen sich für die Fortsetzung der Untersuchung der im Wechselwirkungs-ELISA entdeckten Interaktionen von Matrilinen.

Wegen ihres hohen Zeitaufwandes eignen sie sich aber nicht als Screening-Methode für die Suche nach weiteren Interaktionspartnern. Festphasenuntersuchungen wie Wechselwirkungs-ELISA und SPR-Messungen erlauben zwar einen schnellen Test mit einer vergleichsweise hohen Anzahl an potentiellen Liganden, die Bedingungen unter denen die Proteine dabei interagieren, sind aber verschieden zu denen in Lösung oder gar im Gewebe und können zu artifiziellen Ergebnissen führen. Zur Suche nach weiteren Bindungspartnern der Matrilin- und auch der Thrombospondine bieten sich Methoden an, die eine Isolierung von nativen Proteinkomplexen aus Gewebeextrakten ermöglichen, wie Gelfiltration und Ultrazentrifugation. Die Interaktion findet dort bei nahezu physiologischen Bedingungen und unter Anwesenheit einer Fülle von relevanten Interaktionspartnern statt. Die anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten Komplexe kann die Interaktion nachweisen und zur Identifizierung der Bindungsstellen beitragen. Unterstützend können Immunogold-Techniken eingesetzt werden. In Gewebeschnitten kann die *in-vivo*-Relevanz einer solchen Bindung elektronenmikroskopisch oder mit der hochentwickeltesten lichtmikroskopischen Technik der *Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy* bestätigt werden.

Die gesammelten Erkenntnisse über Struktur und Wechselwirkungen der Matrilin- und Thrombospondine, können bei der Untersuchung und Entwicklung von transgenen Tieren hilfreich sein. Tiere, die bezüglich eines Matrilin- oder TSP-Interaktionspartners transgen sind, können nun gezielter charakterisiert werden. Bei der Erzeugung von matrilin- oder thrombospondindefizienten Tieren ist zu beachten, daß je nach Gewebeverteilung Redundanzeffekte zu erwarten sind, wenn das Gen nur eines Mitgliedes der jeweiligen Proteinfamilie ausgeschaltet wird. So weisen beispielsweise Matrilin-1-defiziente Mäuse nur einen milden Phänotyp und zwar leicht veränderte Kollagen-II-Fibrillen auf (Aszódi *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999). Die Co-Lokalisation mit Matrilin-3 und Matrilin-4 läßt auf funktionelle Redundanzen schließen, die dementsprechend auch für Matrilin-3- und Matrilin-4-defiziente Tiere zu erwarten sind. An Stelle von Null-Mutationen könnten gezielte Mutationen in funktionellen Bereichen der Proteine solche Redundanzeffekte verringern und zu Modelltieren führen, die weiter zum Verständnis der Proteinfunktionen und der damit verbundenen Krankheiten wie MED und PSACH beitragen.

MATERIAL UND METHODEN

Wenn erforderlich wurde Reinstwasser aus der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q Plus PF (Millipor) (im Folgenden q-H₂O abgekürzt) verwendet. Unter anderem wurden die hier angegebenen Standardpuffer verwendet.

PBS:

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

140 mM NaCl

10 mM KCl

pH = 7,4

TBS:

50 mM Tris HCl

150 mM NaCl

pH = 7,4

Molekularbiologie

Soweit nicht anders beschrieben, wurden Methoden von Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

Allgemeine molekularbiologische Methoden

Isolation von Gesamt-RNA aus Knorpelzellen (nach Chomczynski und Sacchi, 1987)

Murine Sterni mit einem Naßgewicht von etwa 100 mg wurden sofort in 1 ml eisgekühltem GITME-Puffer homogenisiert (Polytron Homogenisator, Kinematika). Nach Zugabe von 50 µl 2 M Natriumacetat (pH = 4,0), 500 µl Aquaphenol (puffergesättigtes Phenol, pH = 7,5) und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 Vol./Vol.) wurde gemischt und 15 min auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation erhielt man ein zwei-Phasen-System, dessen wässrige Oberphase abgenommen und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt wurde. Das nach mindestens einstündigem Fällen bei -20°C abzentrifugierte Pellet wurde in 300 µl GITME-Puffer (65°C) aufgenommen und erneut mit 1 Vol. Isopropanol 1 h bei -20°C gefällt. Das abzentrifugierte Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (75%) gewaschen und abzentrifugiert. Das trockene RNA-Pellet wurde in 50 µl q-H₂O aufgenommen und photometrisch und elektrophoretisch analysiert. Die jeweils zwanzigminütigen Zentrifugationen wurden bei 4°C und 1000 × g durchgeführt.

GITME-Puffer:

4 M Guanidin Isothiocyanat

25 mM Na-Citrat

0,5% N-Laurylsarkosin

0,1 M β-Mercaptoethanol

pH = 7,0

Bakterienkultur

Bakterien vom Stamm *Escherichia coli* DH-5α wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) kultiviert. Flüssigkulturen wurden im Schüttelinkubator (Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc., 250 rpm), Luria-Bertani-Agar-Platten wurden im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Transfizierte Bakterien mit Ampicillinresistenz wurden nach Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin kultiviert.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Hefe-Extrakt

10 g/l NaCl

mit 5 M NaOH auf pH = 7,0 eingestellt und durch Autoklavieren sterilisiert

Glycerinstocks

Zur Lagerung wurden Übernachtskulturen von Bakterien im Verhältnis 10:1 mit Glycerin (80%) versetzt, gemischt und bei -80°C eingefroren.

Plasmidpräparationen

Zur Präparation von Plasmiden wurden die Kits der Firma Macherey-Nagel verwendet, die auf alkalischer Lysis mit anschließender Anionenaustauschchromatographie basieren.

Analytischer Maßstab: Einzelkolonien wurden in je 10 ml ampicillinhaltigem LB-Medium kultiviert (über Nacht, Schüttelinkubator, 37°C). Die Bakterien aus 2 ml gesättigter Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation geerntet (Tischzentrifuge, 30 s, 14000 rpm) und in 250 μl Puffer A1 resuspendiert. Zur alkalischen Lysis wurden 250 μl Puffer A2 zugegeben und nach vorsichtigem Mischen für maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach Neutralisation mit 300 μl Puffer A3 wurde das entstandene Präzipitat abzentrifugiert (10 min, $20000 \times g$), der Überstand auf eine NucleoSpinTM Plasmid-Säule geladen (Tischzentrifuge, 1 min, 14000 rpm) und mit 600 μl Puffer A4 gewaschen (Tischzentrifuge, 1 min, 14000 rpm). Die Silica-Membran der Säule wurde durch erneute 2 min Zentrifugation bei 14000 rpm getrocknet und die DNA mit 30 - 50 μl Puffer AE (37°C) eluiert (Tischzentrifuge, 1 min, 14000 rpm).

Puffer A1:

o. A.

Puffer A2:

o. A.

Puffer A3:

o. A.

Puffer AW:

o. A.

Puffer AE:

5 mM Tris HCl

pH = 8,5

(o. A.: ohne Angaben vom Hersteller)

Präparativer Maßstab: Größere Plasmidmengen wurden mit dem NUCLEOBOND-AX-100-Kit™ gewonnen. Dazu wurden die Bakterien aus 100 ml einer entsprechenden ampicillinselektierten Flüssigkultur (LB-Medium, $OD_{600nm} = 1$ bis 1,5, Schüttelinkubator, 37°C), durch Zentrifugation geerntet ($4000 \times g$, 10 min, 4°C) und in 4 ml RNase-A-haltigem Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Lösung S2 und vorsichtigem Durchmischen wurde für nicht länger als 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysis wurde durch Zusatz von Puffer S3 gestoppt und feste Niederschläge nach 10 min Zentrifugieren bei $4000 \times g$ abfiltriert. Das Filtrat wurde über die mit Puffer N2 äquilibrierte AX-100-Säule gegeben. Die gebundene Plasmid-DNA wurde zweimal mit je 4 ml Puffer N2 gewaschen, mit 4 ml Puffer N5 eluiert und mit 0,7 – 0,8 Vol. Isopropanol gefällt (RT). Das abzentrifugierte DNA-Pellet (30 min, $15300 \times g$, 4°C) wurde mit eisgekühlten Ethanol (70%) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (30 min, $15300 \times g$, 4°C) an der Luft getrocknet. Die in einer geeigneten Menge Wasser (in der Regel 50 µl) aufgenommene Plasmid-DNA wurde, wie unten beschrieben, nach Reinheit und Konzentration untersucht. Die Proben wurden bei – 20°C gelagert.

S1:

50 mM Tris HCl
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A
pH = 8,0

S2:

200 mM NaOH
1% SDS

S3:

2,8 M KAc
pH = 5,1

N2:

100 mM Tris H₃PO₄
15% Ethanol
0,9 M KCl
pH = 6,3

N3:

100 mM Tris H₃PO₄
15% Ethanol
1,15 M KCl
pH = 6,3

N5:

100 mM Tris H₃PO₄
15% Ethanol
1 M KCl
pH = 8,5

Bestimmung von DNA-Konzentrationen und -Probenreinheit

DNA-Konzentrationen wurden im Agarosegel gegen einen standardisierten Marker geschätzt und mit dem Photometer ($\lambda = 260$ nm) verifiziert. Über Reinheit gaben ebenfalls Gel und Photometer (OD-Verhältnis 260 nm/280 nm) Aufschluß.

Agarosegelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese wurde, wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, in TAE-Puffer durchgeführt.

TAE:

40 mM Tris Acetat
1 mM EDTA

6 × Probenpuffer:

0,25 % Bromphenol Blau
30% Glycerin
in q-H₂O

Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid zugesetzt (0,5 µg/ml). Interkalierte dies ins Nukleinsäuregerüst, ließ es sich durch UV-Licht zur Lumineszenz anregen (Photolumineszenz) und die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden sichtbar.

Rekombinante Expression von Matrilinen

Klonierungsstrategie

Zur rekombinanten Expression wurde die gewünschte murine Matrilinsequenz per PCR amplifiziert. Die beiden dabei verwendeten Primer beinhalteten eine Adaptersequenz mit Restriktionsschnittstelle. Das 5'-Ende der matrilinkodierenden Sequenz erhielt so einen SpeI-Adapter, während ihr 3'-Ende neben einem Stop-Kodon einen NotI-Adapter erhielt. Das mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und NotI geschnittene Matrilin-Insert wurde gerichtet in die multiple Klonierungsregion des Vektors pCEP-Pu-BM40-His₆ (N-terminal) einkloniert. Der Vektor mit einer Sequenz für das BM-40-Signalpeptid und darauf folgendem His₆-Motiv wurde von Uwe Odenthal (Diplomarbeit, 1998) zur Verfügung gestellt. Man beachte, daß der Verdau des Vektors mit dem Enzym NheI das komplementäre Ende zum SpeI-verdauten Ende des Matrilin-Inserts lieferte. Unter Berücksichtigung der Voraussagen für die Schnittstelle der Signalpeptidase ergab sich der unten dargestellte theoretische N-Terminus mit His₆-Marke. Die generierten Konstrukte und verwendeten Primer sind im Ergebnisteil dargestellt (Abb. 14)

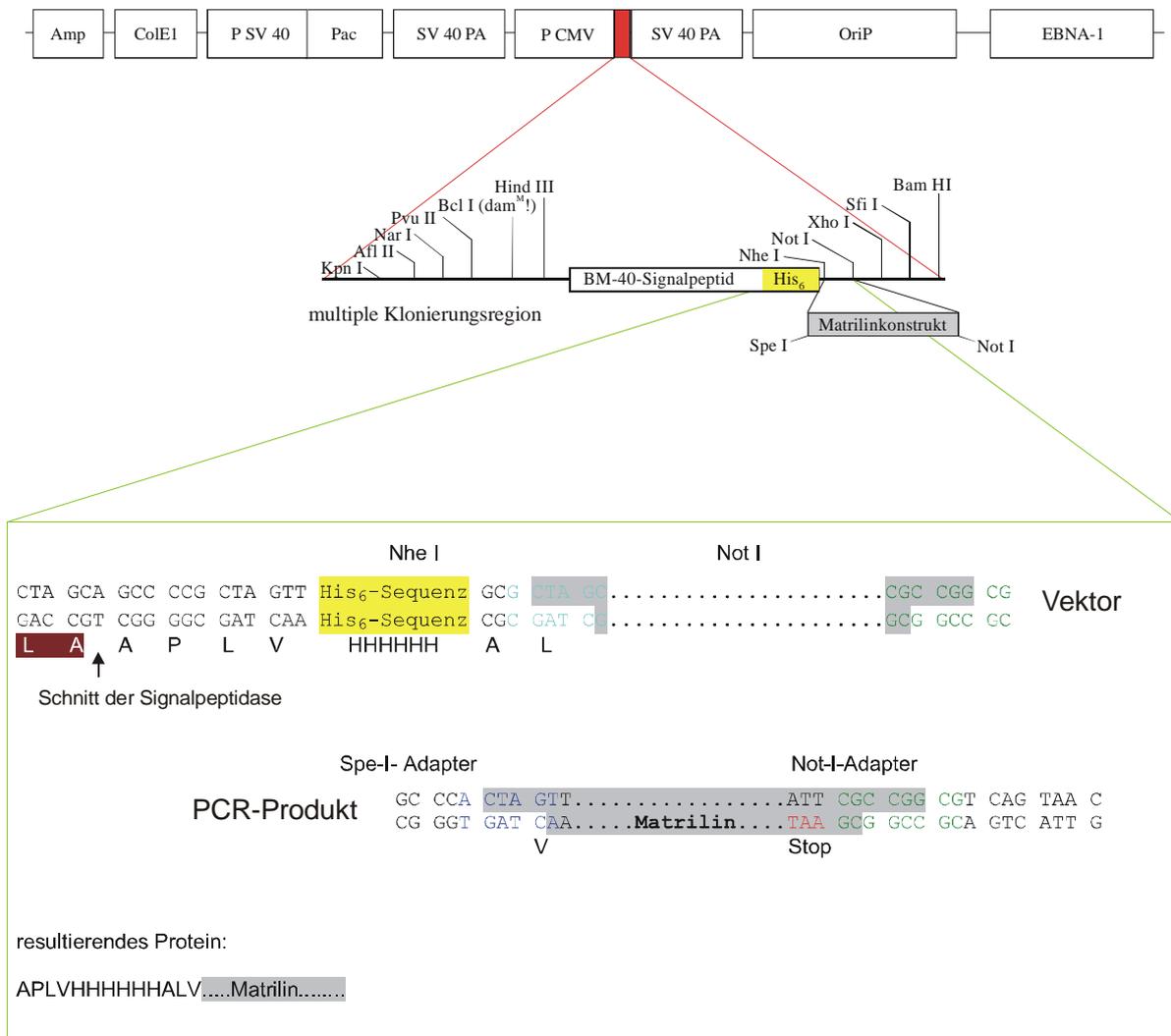


Abb. 45: **Klonierungsstrategie für Matrilin-Expressionsvektoren.** Der zyklische Vektor pCEP-Pu ist hier schematisch linear dargestellt und bei Kohfeldt *et al.* (1997) ausführlich beschrieben. Zwischen dem Zytomegalievirus-Promotor (*pCMV*) und dem SV-40 Polyadenylierungssignal (*SV-40 PA*) lag die multiple Klonierungsregion des Vektors (*rot* und *1. Vergrößerung*). Die verwendete Version pCEP-Pu-BM40-His₆ (N-terminal) trug dort die Sequenz des BM-40-Signalpeptides (*weiß*) mit anschließender **His₆-Sequenz** (*gelb unterlegt*). Stromabwärts von dieser wurde das jeweilige **Matrilin-Konstrukt** (grau) einkloniert. Die Klonierung ist in der 2., *grün eingerahmten Vergrößerung* dargestellt. Die Schnittstellen der Enzyme und das Stop-Kodon sind farblich markiert (*dunkelblau: SpeI, hellblau: NheI, grün: NotI, rot: Stop*).

Gewinnung matrilinkodierender DNA-Fragmente mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Matrize für Matrilin-2-Konstrukte diente murine cDNA, die von Dorothea Piecha (Dissertation, 1999) zur Verfügung gestellt wurde. Konstrukte von Matrilin-1 und Matrilin-3 wurden per RT-PCR aus der mRNA von Knorpelzellen gewonnen, die wie oben beschrieben isoliert wurde.

Reverse Transkription: Für die Reverse Transkription mit dem SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase Kit (GibcoBRL) wurde in oben beschriebener Weise Gesamt-RNA aus murinen Brustbeinen isoliert. 5 µg der RNA wurden mit 0,5 µg Oligo-(dT)₁₇-Primer versetzt, mit q-H₂O auf 12 µl aufgefüllt und nach 10 min Erhitzen auf 70°C schnell mit Eis gekühlt. Dem Hybridisierungsansatz wurden

4 µl 5× Erststrangpuffer (250 mM Tris HCl; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH = 8,3)

2 µl 0,1 M DTT

1 µl 10 mM dNTP-Mix (10 mM je Desoxyribonukleotid)

zugesetzt und nach 2 min Inkubation bei 42°C 1 µl (200 Units) SuperScript™ II Reverse Transkriptase zugegeben. Die Inkubation bei 42°C wurde für 50 min fortgesetzt. Die Reverse Transkription wurde durch 10 min Erhitzen auf 70°C beendet.

PCR: Für die PCR wurden geeignete Primerpaare so gewählt, daß sie ähnliche, nach Formel (A) berechnete theoretische Schmelztemperaturen (T_m) besaßen.

$$(A) \quad T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

T_m : theoretische Schmelztemperatur

G,C,A,T: jeweilige Anzahl des entsprechenden Nukleotides in der Primersequenz

Die cDNA wurde durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, damit einzelsträngige Bereiche für die Primer zugänglich wurden, die dann bei der Anlagerungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) von 53°C mit der DNA-Matrize paarten. In der Extensionsphase bei 72°C folgt der sukzessive Einbau der Desoxyribonukleotide durch eine DNA-Polymerase. Durch vielfaches Wiederholen des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Extension wurde eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht. Die Reaktion wurde dazu in einem programmierbaren Heiz- und Kühlblock (PTC-200, MJ Research Inc.) durchgeführt. Zu Beginn wurde der Einfluß unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen getestet. Für die vorliegenden Kombinationen aus Matrizen (*Templates*) und Primern erwies sich ein DMSO-Anteil von 4% als geeignet. Folgende Methode wurde schließlich zur Amplifikation der gewünschten Sequenzbereiche verwendet.

PCR-Ansatz:

1 µl Matrilin-2 cDNA (10 ng)	
oder	
0,5 µl RT-Ansatz (murines Sternum)	
2,5 µl 10 x PCR-Puffer	
1 µl DMSO	
0,25 µl dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	
0,25 µl DNA-Polymerase (2,5 Units/µl, EXPAND High Fidelity (Boehringer Mannheim))	
1 µl 5'-terminaler Primer (10 pM)	
1 µl 3'-terminaler Primer (10 pM)	
ad 25 µl q-H ₂ O	

10 x PCR-Puffer:

100 mM Tris HCl
15 mM MgCl ₂
500 mM KCl
0,1% Gelatine
pH = 8,3

Temperaturprogramm:

<i>initial:</i>	<i>dann 25 Zyklen:</i>	<i>finale Elongationsphase:</i>
5 min 94°C	70 s 94°C	10 min 72°C
	70 s 53°C	
	70 s 72°C	

Das PCR-Produkt wurde nach Separation durch Agarosegelelektrophorese und Ausschneiden aus dem Gel mit dem GeneCleanTM Kit (Bio 101) isoliert. Die DNA wurde anschließend in q-H₂O aufgenommen.

DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die aus der PCR gewonnene matrilinkodierende cDNA und der Expressionsvektor wurden - zur gerichteten Klonierung - durch Doppelverdau mit Restriktionsendonukleasen mit komplementären Enden versehen (vgl. Abb. 45). Die Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C unter Verwendung der Reagenzien von New England Biolabs. Pufferwahl und BSA-Zugabe richtete sich nach den Empfehlungen von New England Biolabs. Der unten beschriebene allgemeine Reaktionsansatz wurde, wenn nötig, entsprechend erhöht.

Allgemeiner Ansatz für DNA-Verdau:

1-2 µg DNA
5-10 Units Restriktionsendonuklease 1
ggf. 5-10 Units Restriktionsendonuklease 2
2 µl 10× Puffer
ggf. 0,5 µl BSA-Lösung (10 mg/ml)
ad 20 µl q-H₂O

Ligation der Konstrukt-DNA mit dem Vektor

Zur Ligation von Konstrukt-DNA mit dem Vektor wurde der folgende Ansatz über Nacht im Wasserbad auf 14°C gekühlt.

Ligationsansatz:

500 ng doppelverdaute Konstrukt-DNA
250 ng doppelverdauter Vektor
1 µl T4-Ligase (10 Units/µl, New England Biolabs)
1 µl 10 × T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs)
ad 10 µl q-H₂O

10 × T4-Ligase-Puffer:

500 mM Tris HCl
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
10 mM ATP
250 µg/ml BSA
pH = 7,8

Die erhaltene Plasmid-DNA wurde zur Transformation von Bakterien (E. coli DH-5α) eingesetzt.

Bakterientransformation

Herstellung kompetenter Bakterien: 100 ml einer Kultur von E. coli DH-5α (LB-Medium, OD_{600nm} = 0,4) wurden nach 15 min Kühlen auf Eis zentrifugiert (1000 × g, 4°C) und das Bakterienpellet in 33 ml RF1 resuspendiert. Nach weiteren 15 bis 30 min auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (1000 × g, 4°C) und das Pellet in 8 ml RF2 resuspendiert. Im Anschluß wurden die Zellen wieder für 15 min eisgekühlt und dann als 200 µl Aliquots bei -80°C eingefroren und gelagert.

RF1:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM KAc
10 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH = 5,8
in q-H₂O
(sterilfiltriert)

RF2:

75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
10 mM MOPS
15% Glycerin
pH = 7,0
in q-H₂O
(sterilfiltriert)

Transformation von E. coli DH-5 α : Zur Lagerung gefrorene kompetente Bakterien (E. coli DH-5 α) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Ebenfalls unter Eiskühlung wurde dann die zu vermehrende Plasmid-DNA zu 80 μ l der Bakteriensuspension gegeben und 30 min inkubiert. Nach 60 s Erhitzen auf 42°C wurde das Gemisch für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Vor der 60minütigen Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 400 μ l LB-Medium (RT) zugesetzt. Anschließend wurde auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Einzelkolonien wurden nach Präparation ihrer Plasmide auf die gewünschte Transformation hin untersucht. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Kontrollverdau der Plasmid-DNA nach oben beschriebenem Vorgehen für DNA-Verdau gezeigt. (vgl. Anhang: Sequenzen muriner Matriline)

DNA-Sequenzierung des konstruierten Plasmides

Die matrilinkodierenden Sequenzen der generierten Vektoren wurden unter Verwendung geeigneter externer bzw. interner Primer vollständig sequenziert (Tab. 3). Sie entsprachen den publizierten murinen Sequenzen.

Primer	Orientierung	Sequenz
--------	--------------	---------

extern (vektorspezifisch):

BM40SP	sense	5'- gttcccagcaccatgaggg -3'
Rev2	antisense	5'- cdggatccggccttgcc -3'

intern (Matrilin-2):

Mat2seq675	sense	5'- atgccctcaacattgccttc -3'
Mat2seq1058	sense	5'- ctgagcacggatcagaagac -3'
Mat2seq1678	sense	5'- tgatgacctcaagacctgctcc -3'
Mat2seq2347	sense	5'- ttccacacaggtccgaacag -3'

intern (Matrilin-3):

cmpm39	sense	5'- gctcaacacctattccgac -3'
cmpm310	sense	5'- tacgccttgaatgcagac -3'

Tab. 3: Auflistung der Sequenzierprimer

Die DNA-Sequenzierung wurde vom Service-Labor des Zentrums für molekulare Medizin Köln (ZMMK) automatisiert durchgeführt. Die PCR-basierte Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI PRISM™ 377 DNA-Sequencer analysiert. Die Auswertung der Sequenziererergebnisse erfolgte mit Programmen des Programmpaketes Wisconsin Package™ (Genetics Computer Group, 1994).

Zellkultur

Die folgenden Arbeiten wurden im Zellkulturlabor unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das HEK-293-EBNA/pCEP-Pu-System

Das verwendete eukaryontische Expressionssystem HEK-293-EBNA/pCEP-Pu bediente sich der Eigenschaften des *nuclear antigen 1* des Epstein-Barr-Virus (EBNA-1). Bei den adhärent wachsenden HEK-293-EBNA-Zellen handelte es sich um einen gentechnisch veränderten Stamm der humanen embryonalen Nierenzellen HEK-293, in deren Genom das EBNA-1-Gen integriert war. Zur Selektion dieser Zellen diente eine Geneticin-G418-Resistenz. Der episomale Expressionsvektor pCEP-Pu (Invitrogen, siehe auch Abb. 45) enthielt ebenfalls eine Kopie des EBNA-1-Gens. Das zugehörige Protein *nuclear antigen 1* band an den Replikationsstart seines Gens (oriP) und ermöglichte eine starke extrachromosomale Replikation der Episomen und damit, über die Zellteilung hinaus, für eine ausreichende Anzahl des Expressionsvektors. Zur Selektion pCEP-Pu-transfizierter Zellen trug der Vektor ein Puromycinresistenzgen. Das BM-40-Signalpeptid des Vektors sorgte für eine Zielsteuerung des Proteins über ER, Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel in den Extrazellulärraum.

Kulturbedingungen

HEK-293-EBNA-Zellen wurden in Gewebekultur-Petrischalen kultiviert (Greiner Gewebekultur-Petrischalen 100 × 20 mm oder 145 × 20 mm). Als Medium diente DMEM Nut Mix F12 mit 2 mM L-Glutamin, dem je nach Zweck 10% fötales Kälberserum (FCS), Puromycin (0,5 mg/ml) und Geneticin G418 (0,25 mg/ml) zugesetzt wurde (Medium und Zusätze: Gibco BRL), so daß mit drei Mediumarten gearbeitet wurde:

Selektionsmedium:

DMEM Nut Mix F12
+ L-Glutamin
+ FCS
+ Geneticin G418
+ Puromycin

Kultiviermedium:

DMEM Nut Mix F12
+ L-Glutamin
+ FCS
+ Geneticin G418

serumfreies Medium:

DMEM Nut Mix F12
+ L-Glutamin

Die Zellen wurden im Heraeus Begasungsbrutschrank B5060 bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert.

Verteilen von Zellen

Waren Gewebekulturschalen mit einer konfluenten Zellschicht bewachsen, wurden sie wie oben beschrieben trypsinisiert. Die Suspension vereinzelter Zellen wurde dann auf mehrere kleine Schalen verteilt oder auf eine größere Schale gegeben. Untransfizierte Zellen wurden in Kultiviermedium, transfizierte in Selektionsmedium kultiviert.

Transfektion von HEK-293-EBNA-Zellen

Von einer Gewebekulturschale, die dicht mit einer konfluenten Schicht HEK-293-EBNA-Zellen bewachsen war, wurde das Kultiviermedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml PBS gewaschen. Um die Zellen von der Platte zu lösen, wurden sie mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in PBS (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis sie sich von der Platte gelöst hatten (ca. 5 min). Die Trypsinisierung wurde dann durch Zugabe von 3 ml des hoch proteinhaltigen Kultiviermediums gestoppt, die Zellen vereinzelt und abzentrifugiert (5 min, 200 × g). Das Zellpellet wurde dann in 10 ml PBS resuspendiert und die Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (5 min, 200 × g) und das Zellpellet im entsprechenden Volumen kochsalzhaltigem Kultiviermedium (Kultiviermedium zusätzlich 25 mM NaCl) aufgenommen, so daß 10⁶ Zellen/ml vorlagen. 500 µl dieser Suspension wurden mit 300 µl kochsalzhaltigem Kultiviermedium und 3 µg Plasmid-DNA gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm², gap 50) gegeben. Im Gene PulserTM (Biorad) wurde dann die Elektroporation bei einer Kapazität von 500 µF und einer Feldstärke von 0,23 kV/0,4 cm durchgeführt (Zeitkonstante: 5 - 6). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in 10 ml Kultiviermedium ausplattiert und im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) gehalten.

Selektionierung

Der Vektor pCEP-Pu besaß ein Puromycinresistenz-Gen. Nachdem die Zellen zwei bis drei Tage nach der Elektroporation adhärent geworden waren, wurde mit der puromycinbasierten Selektionierung der mit dem Plasmid transfizierten Zellen begonnen. Die Zellen wurden dazu in 10 ml Selektionsmedium kultiviert, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Zellen von konfluent bewachsenen Platten wurden gegebenenfalls auf mehrere Platten verteilt (s.o.).

Expressionskontrolle

Zur Kontrolle der Expression wurden die Zellen einer konfluent bewachsenen Platte serumfrei kultiviert. Dazu wurde das Selektionsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und serumfreies Medium zugesetzt. Nach zweitägigem Bebrüten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Die Proteine aus 1 ml Proben der Zellkulturüberstände wurden wie unten beschrieben mit TCA gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Produktion und Ernte

Zur Produktion serumfreien Kulturüberstandes im präparativen Maßstab, wurden die Zellen in großen Kulturschalen (s.o.) kultiviert. Sobald sie mit einer konfluenten Zellschicht bewachsen waren, wurde das Selektionsmedium abgesaugt und nach zweimaligem Waschen mit 5 ml PBS serumfreies Medium zugesetzt. Die Kulturüberstände wurden alle zwei bis vier Tage abgenommen, gesammelt und durch neues serumfreies Medium ersetzt. Die gesammelten Überstände wurden bei -20°C gelagert. Nach der vierten Ernte wurden die Zellen verworfen.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur Lagerung wurden HEK-293-EBNA-Zellen bei -80°C eingefroren. Gegebenenfalls wurden sie später in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Kulturen wurden dazu trypsinisiert, vereinzelt und abzentrifugiert (5 min, 200 × g). Das Pellet einer konfluent bewachsenen 100mm-Gewebekulturschale wurde in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und die Zellsuspension auf zwei Gefriererörchen (Greiner Cryo Vials) verteilt. Mit Hilfe eines isopropanolgefüllten

Einfrierbehälters (Cryo 1°C Freezing Container, NALGENE), der für eine Abkühlrate von 1°C/min sorgte, wurden die Zellen im -80°C-Gefrierschrank eingefroren.

Bei Bedarf wurden die Zellen durch ständiges Schwenken im 40°C-Wasserbad rasch aufgetaut, dann sofort mit 10 ml Kultiviermedium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 200 × g). Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Kultiviermedium auf einer 100 mm-Gewebekulturschale ausplattiert und bebrütet (37°C, 5% CO₂). Transformierte Zellen wurden nach zwei Tagen in Selektionsmedium kultiviert.

Einfriermedium:

DMEM-F12

20 % FCS

10 % DMSO

Proteinchemie

Proteinfällungen

Häufig mußten Proteinproben eingeeengt oder ihr Salzgehalt vermindert werden, bevor sie weiter analysiert werden konnten. Die Proteine wurden deshalb aus ihrer Lösung gefällt.

TCA-Fällung

Für eine Fällung aus 1 ml Proteinlösung wurden 10 µl des Detergens Triton X-100 und 250 µl TCA-Lösung (50% Trichloressigsäure in Wasser) zugegeben, gemischt und für 30 min eisgekühlt. Der sich bildende Niederschlag wurde abzentrifugiert (4°C, 15 min, 21000 × g) und das Pellet mit kaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 15 min, 21000 × g) wurde das Aceton vorsichtig abgezogen. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde im gewünschten Probenpuffer aufgenommen.

Ethanol-Fällung

Eine Proteinlösung wurde mit dem 10-20fachen Volumen an Ethanol versetzt und über Nacht auf -20°C gekühlt. Gebildeter Niederschlag wurde abzentrifugiert (4°C, 15 min, 21000 × g), das Pellet mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (4°C, 15 min, 21000 × g) wurde das Ethanol vorsichtig vom Pellet abgezogen. Das luftgetrocknete Pellet wurde im gewünschten Probenpuffer aufgenommen.

Methanol-Chloroform-Fällung

Einer 1-ml-Probe der Proteinlösung wurden sukzessive und unter anschließendem Mischen 4 ml Methanol, 2 ml Chloroform und 3 ml q-H₂O zugesetzt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 1000 × g) wurde die Oberphase verworfen und weitere 3 ml Methanol zugesetzt. Das Proteinpellet wurde abzentrifugiert und vor dem Aufnehmen im gewünschten Puffer an der Luft getrocknet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) erfolgte nach dem Verfahren der diskontinuierlichen vertikalen Flachbettelektrophorese mit dem Hoefer SE 200 Mighty Small System (Amersham Pharmacia Biotech) und orientierte sich an einer Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989).

Bisacrylamid/Acrylamid-Puffer

Für unterschiedliche Anforderungen wurden Trenngelpuffer mit verschiedenem Gehalt an Bisacrylamid/Acrylamid hergestellt. Wenn nötig, wurden Gradientengele hergestellt (Gradientenmischer: Hoefer SG Serie, Amersham Pharmacia Biotech).

Trenngelpuffer:

x ml Bis-/Acrylamid-Lsg. (30%, 37,5:1)
1,85 ml 3 M Tris HCl
50 µl 20% SDS-Lsg.
pH = 8,8
ad 10 ml Wasser

Sammelgelpuffer (4%):

1,33 ml Bis-/Acrylamid-Lsg. (30%, 37,5:1)
1,25 ml 1M Tris HCl
50 µl 20% SDS-Lsg.
pH = 6,8
ad 10 ml Wasser

$$x = \frac{\text{Trenngelprozentualität}}{3}$$

Gießen des SDS-Polyacrylamidgeles

Zur radikalischen Polymerisation wurden in 7 ml Trenngelpuffer 100 µl einer Ammoniumpersulfatlösung (6%) und 3,75 µl TEMED gegeben und nach dem Gießen mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Butanol entfernt. Es wurden 5 ml des Sammelgelpuffers mit 300 µl APS und 2,5 µl TEMED versetzt und gegossen. Durch einen zuvor eingesetzten Teflonkamm wurden "Taschen" im Sammelgel ausgespart, die zur Aufnahme der Proben dienen.

Probenvorbereitung

Gefällte Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen. Der Probe wurde zur Analyse im SDS-Polyacrylamidgel das gleiche Volumen an Probenscocktail zugesetzt.

Probenpuffer:

50 mM Tris HCl
0,25 M NaCl
10mM EDTA
pH = 6,8

2 × Probencocktail:

0,2 M Tris HCl
4% SDS
30% Glycerin
1 mM EDTA
0,1% Bromphenol Blau
pH = 6,8

Bei Bedarf wurden Proben durch Zugabe von 2,5 µl β-Mercaptoethanol je 30-µl-Probe und reduziert. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min auf 100°C erhitzt.

Elektrophorese

Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt, und die Proben in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels geladen. Unter Wasserkühlung wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 33 mA durchgeführt. (Spannungsquelle: PS 500 XT DC Power Supply, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech; Laufkammer: SE 250 Mighty Small II Gel Electrophoresis Unit, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech)

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris HCl
250 mM Glycin
0,1% SDS
pH = 8,3

Zweidimensionale-SDS-PAGE (nichtreduziert gefolgt von reduziert)

Zur Analyse disulfidverknüpfter Oligomere in zwei Dimensionen, wurden zwei identische Proteinproben unter nichtreduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE unterzogen. Während die Spur der einen Probe in geeigneter Weise gefärbt wurde, wurde die andere, um 90° gedreht, auf ein weiteres SDS-Polyacrylamidgel gegeben. Überschichtet mit reduzierendem Probencocktail (1×, 10% β-Mercaptoethanol) wurde eine weitere Elektrophorese durchgeführt (Abb. 46).

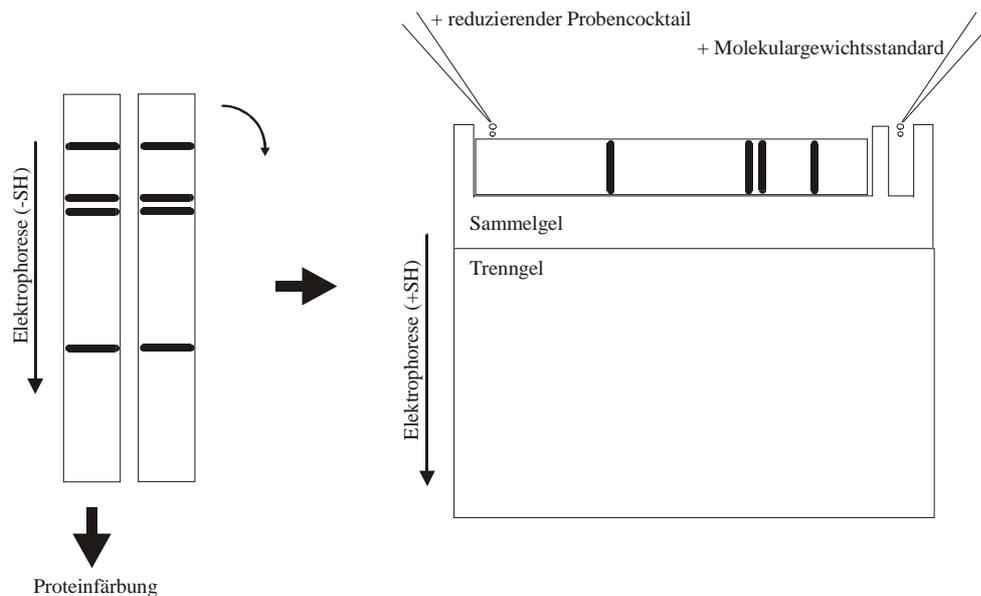


Abb. 46: **Zweidimensionale-SDS-PAGE** (nichtreduziert gefolgt von reduziert).

Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Größere Proteinmengen wurden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt, indem das SDS-Polyacrylamidgel für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in eine Färbelösung gelegt wurde. Das danach durchgehend blaugefärbte Polyacrylamidgel wurde dann mit einer Entfärbelösung, die regelmäßig ausgetauscht wurde, entfärbt, so daß das Bandenmuster der Proteine hervortrat. Färbung und Entfärbung wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Aufbewahrt wurden die behandelten Gele in 7% Essigsäure. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 µg pro Bande.

Färbelösung:

50% Methanol
10% Essigsäure
0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250

Entfärbelösung:

50% Methanol
10% Essigsäure

Silberfärbung

Zur Färbung geringer Proteinmengen diente eine Silberfärbung. Deren Nachweisgrenze lag bei 10 ng pro Bande. Mit Coomassie Brilliant Blue gefärbte Polyacrylamidgele konnten mit der Silberfärbung nachgefärbt werden. Das Protokoll richtete sich nach einer Methode von Heukeshoven and Dernick (1988)

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde zuerst zweimal 10 min in einer Lösung aus 30% Ethanol und 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wurde es 15 min in Lösung L1 gegeben und dann dreimal 5 min und zweimal 10 min in Wasser gewaschen. Nach 15minütigem Tränken mit L2 wurde das Gel zur Entwicklung der Färbung in L3 gegeben. Als erste schwache Banden zu erkennen waren, wurde die Entwicklungslösung L3 erneuert. Gestoppt wurde die Reaktion in 7% Essigsäure. Alle Schritte der Färbung wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Lösungen wurden kurz vor Gebrauch angesetzt.

<u>L1:</u>	<u>L2:</u>	<u>L3:</u>
30% Ethanol (vergällt)	0,1% AgNO ₃	2,5% Na ₂ CO ₃ (wasserfrei)
0,3% Essigsäure	0,25‰ Formalin (30%)	0,4‰ Formalin (30%)
2% Glutaraldehyd		
0,1% Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O		
40 mM NaAc		

Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden im Tankblot-Verfahren auf Nitrozellulose transferiert (2 h, 200 mA, Transfertank: Hoefer TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit, Spannungsquelle: PS 500 XT DC Power Supply, Hoefer, Amersham Pharmacia Biotech). Im angelegten elektrischen Feld wurden die negativ geladenen SDS/Protein-Aggregate in Richtung Anode aus dem Gel und auf die Membran gezogen. Der Blotpuffer bestand aus 50 mM Borsäure (pH = 8,5) und 5% Methanol.

Der Transfer wurde durch Proteinfärbung mit 10% Ponceau S in 1% TCA geprüft. Die Trichloressigsäure in der Färbelösung diente der Fixierung der Proteine auf der Membran. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurde das Proteinbandenmuster sichtbar. Anschließend wurde mit TBS entfärbt. Proteinfreie Membranstellen, die Immunglobuline hätten unspezifisch binden können, wurden durch Inkubation (1h bei RT oder über Nacht bei 4°C) mit 5% Milchpulver in TBS (TBS/Milch) abgesättigt. Für 1 h wurde dann mit einer geeigneten Verdünnung eines Primärantikörpers in TBS/Milch inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 bis 10 min mit TBS/Tween 20 (0,01% Tween 20) gewaschen, bevor mit einer geeigneten Verdünnung des Sekundärantikörpers in TBS/Milch 1,5 h inkubiert wurde. Erneut wurde dreimal für je 5 bis 10 min mit TBS/Tween 20, dann mehrmals mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurden die Blots für 5 min im Wasser belassen.

Zur Detektion der Protein-Antikörper-Antikörper-Komplexe wurden die Lösungen Lum1 und Lum2 im gleichen Volumenverhältnis gemischt und für 1 min zu der Membran gegeben. Röntgenfilme wurden dann in einer Reihe zunehmender Belichtungszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt.

Lum1:

5 ml Tris HCl (100 mM, pH = 8,8)
3 µl H₂O₂ (30%)

Lum2:

5 ml Tris HCl (100 mM, pH = 8,8)
22 µl p-Cumarsäure (90 mM in DMSO)
50 µl Luminol (250 mM in DMSO)

Proteinquantifizierung*Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)*

Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Assay (Pierce) nach der Standardvorschrift für Mikrotiterplatten bestimmt. Als Standard diente eine BSA-Konzentrationsreihe, aus deren Meßwerten mittels linearer Regression eine Eichgerade ermittelt wurde. Die Standards und Proben wurden mit dem ELISA-Reader (Titertek) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

Bradford-Assay

Bei Anwesenheit von Substanzen, die im BCA-Assay störten (z. B. Imidazol oder EDTA), wurde in der Mikrotiterplatte eine Farbreaktion nach Bradford durchgeführt. Bradford-Lösung wurde dazu fünffach verdünnt und im Verhältnis 50:1 mit der Probe versetzt. Nach 5 bis 30 min wurden die Standards und die Proben mit dem ELISA-Reader (s.o.) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Wie im BCA-Assay wurde die Proteinkonzentration im Vergleich zu einer BSA-Standardreihe bestimmt.

Bradford-Lösung (5×):

25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
gelöst in 12,5 ml Ethanol (96%)
+ 25 ml H₃PO₄ (konzentriert)
ad 50 ml H₂O

Reinigung His₆-markierter Matrilin

His₆-markierte Matrilin wurden mit Hilfe der Metallionenaffinitätschromatographie aus den Kulturüberständen isoliert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand (50-100 ml, pH 7 - 8) nach Sterilfiltration (0,22 µm) über eine Säule mit Cobaltaffinitätsmatrix gegeben (800 µl, TALON™ Metal Affinity Resin, CLONTECH Lab. Inc.). Mit 5 bis 10 ml des Puffers P1 wurde die Säule gewaschen, bevor stufenweise durch Konkurrenz mit Imidazol (5 mM, 10 mM, 20 mM, 250 mM) eluiert wurde. Pro Stufe wurde mit 4 ml Puffer eluiert. Die gewünschte Imidazolkonzentration wurde ggf. durch Mischen von Puffer P1 und Puffer P2 erreicht. Die Reinigung wurde durch SDS-PAGE analysiert.

P1:

50 mM NaH₂PO₄
20 mM Tris HCl
100 mM NaCl
pH = 8,0

P2:

50 mM NaH₂PO₄
20 mM Tris HCl
100 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH = 8,0

Reinigung von Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomeren

Extraktion von bovinem fötalem Knorpel

Ein Kalbsfötus (5. bis 6. Woche der Gestation) wurde vom Veterinäramt der Stadt Köln zur Verfügung gestellt. Knorpel vom distalen und proximalen Ende des Femurs und des Humerus wurde unter Eiskühlung im zehnfachen Volumen (g/ml Naßgewicht) des vorgekühlten Puffers P3 bis zur breiigen Konsistenz zerkleinert (3 × 30 s, Polytron Homogenisator, Kinematika) und über Nacht im Kühlraum (4°C) extrahiert. Durch Zentrifugation (1h, 18.000 × g, 4°C) wurde der Extrakt (300 ml) von festen Rückständen befreit.

P3:

50 mM Tris HCl
0,1 M NaCl
10 mM EDTA
2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
2 mM N-ethylmaleimid (NEM)
pH = 7,4

Die im folgenden beschriebenen Säulenchromatographien wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Kationenaustauscher SP Sepharose fast flow

Der Knorpelextrakt wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine mit SP Sepharose fast flow gepackte Säule (XK 26, 10 × 2,6 cm, Amersham Pharmacia Biotech) geladen. Die gebundenen Proteine wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten (300 ml) von 0,1 – 1 M NaCl in 50 mM Tris HCl (pH = 7,4) und 10 mM EDTA eluiert. Die Fraktionierung des Eluates erfolgte in 5 ml Schritten. Der Lauf wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Matrilin-1/Matrilin-3-Heterooligomere eluierten bei Salinitäten zwischen 200 und 500 mM NaCl.

Molekularsieb Sepharose CL-6B

Ein geeigneter Heterooligomer-Pool aus dem Kationenaustauscherschritt wurde zur weiteren Aufreinigung mit einer Flußrate von 0,1 ml/min über ein Molekularsieb gegeben. Während des Laufes der mit Sepharose CL-6B gepackten (XK 50, 90 × 5 cm, Amersham Pharmacia Biotech) und in Puffer P3 äquilibrierten Säule wurden Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml gesammelt. Die Proteinverteilung wurde mittels SDS-PAGE dargestellt. Das Totalvolumen der Säule betrug 1800 ml, das Ausschlußvolumen 550 ml.

Reinigung von rekombinantem TSP-4 in Abwesenheit von Harnstoff

Die Reinigung von rekombinantem TSP-4 entsprach dem Protokoll der Reinigung im Beisein von 2 M Harnstoff (Narouz-Ott *et al.* 2000). Den Puffern wurde kein Harnstoff zugesetzt, sie enthielten aber 1,8 mM CaCl₂.

Proteinsequenzierung

Anzusequenzierende Proteine wurde mittels SDS-PAGE separiert und im Tankblot-Verfahren auf die PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Vorbereitend wurde die

Membran 15 s in Methanol, dann 2 min in Wasser und 5 min in den Blotpuffer (s. u.) gegeben, während das Gel für 15 min in den Blotpuffer gelegt wurde.

Blotpuffer:

50 mM Borsäure

2,5% Methanol

pH = 8,5

Im mit Blotpuffer gefüllten Tank wurde 2 h lang bei 4°C und einer Stromstärke von 200 mA transferiert (siehe Immunoblot).

In einer Lösung aus 0,1% Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50% Methanol wurden die membrangebundenen Proteine gefärbt. Dann wurde mit 50% Methanol so lange entfärbt, bis das Bandenmuster zu sehen war. Die sorgfältig ausgeschnittenen Banden wurden in 90% Methanol entfärbt, kurz in 10 mM NaOH und dann in Wasser gegeben. Getrocknet wurden diese Proben bei 4°C aufbewahrt.

Sequenziert wurde nach dem Prinzip des N-terminalen Edman-Abbaus mit dem 473A Protein Sequenzer der Fa. Applied Biosystems. Die Sequenzierung wurde vom Servicelabor des Zentrum Molekulare Medizin Köln durchgeführt.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation– Time Of Flight – Massenspektrometrie

Molekulargewichte wurden mit der MALDI-TOF-MS ermittelt. Die Ionisierungsmethode der matrixunterstützten Laserdesorption/ionisation setzte eine Kokristallisation des Proteins mit einer sauren, UV-absorbierenden Matrix voraus. Bei Bestrahlung mit einem UV-Laserpuls wurde die Probe verdampft. Dabei wurden Protonen von der sauren Matrix auf das Protein übertragen, das dadurch positiv geladen wurde. Das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) der zuvor in einem elektrischen Feld beschleunigten Ionen, wurde anhand ihrer Geschwindigkeit im *time-of-flight*-Analysator ermittelt, denn es gilt:

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2}mv^2 = z \cdot e \cdot U \Leftrightarrow \frac{m}{z} = \frac{2eU}{v^2}$$

- E_{kin} : kinetische Energie des Ions nach Beschleunigung im elektrischen Feld
 v : Geschwindigkeit des Ions nach Beschleunigung im elektrischen Feld
 e : Elementarladung
 U : Beschleunigungsspannung

Zur massenspektrometrischen Analyse wurden 1 ml einer Matrilin-1/Matrilin-3-Probe aus fötaler Rinderepiphyse einer Methanol-Chloroformfällung unterzogen und in 10 μ l Puffer P4 aufgenommen. Die weitere Präparation der Proben ist bei Vorm und Mann beschrieben (1994). Die Probe wurde im Verhältnis 1:2 zuerst mit 2%iger TFA und dann mit einer gesättigten Lösung α -Cyano-4-hydroxymizsäure (Sigma-Aldrich) in 40% Acetonitril in Wasser versetzt. 0,5 μ l der Lösung wurden auf einen Edelstahlprobenträger getropft und an der Luft getrocknet. Wenn erwünscht, wurde die getrocknete Probe auf dem Edelstahlprobenträger mit 10 mM DDT in Wasser, 1 h bei 37°C reduziert. Die Substanzen wurden mit einem gepulsten Stickstofflaser ($\lambda = 337$ nm) desorbiert und ionisiert. Kationen wurden mit Hilfe des Hochmasse-Detektors im linearen Modus eines Bruker-Biflex-III-Massenspektrometers detektiert und analysiert. Zur Massenkalisierung des *time-of-flight*-Analysators wurden je nach gemessenem Massebereich Protein A ($M_w = 44610,3$ Da, rekombinant, Repligen) oder BSA-Dimer (132859,0 Da, Sigma-Aldrich) verwendet. Die Messungen wurden von der Firma Bruker Daltonics durchgeführt.

P4:

- 50 mM Tris HCl
0,1 M NaCl
10 mM EDTA
4 M Harnstoff
pH = 7,4

Enzymatische Deglykosylierung

Aus bovinem fötalem Gelenkknorpel isolierte Oligomere aus Matrilin-1 und Matrilin-3 (3 μ g in 100 μ l) lagen in einem Puffer aus 50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl und 10 mM EDTA mit einem pH-Wert von 7,4 vor. Sie wurden für 10 min auf 95°C erhitzt und nach Zugabe von 1

Unit rekombinanter N-Glykosidase F (Boehringer Mannheim) über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Negativkontrolle wurde gleichbehandelt, ihr wurde aber kein Enzym zugesetzt.

Wechselwirkungsuntersuchung nach dem ELISA-Prinzip

Getestet wurde die Wechselwirkung zwischen gereinigten rekombinanten Matrilinen und den Kollagen I bis V (Sigma-Aldrich) bzw. Fibronectin gereinigt aus bovinem Serum (Gabe von Frank Zaucke). Außerdem wurde die Interaktion zwischen rekombinatem TSP-4 und Kollagen I untersucht.

Kollagen I:	pepsinextrahiert aus Kälberhaut, säurelöslich.
Kollagen II:	pepsinextrahiert aus bovinem Nasenscheidewandknorpel, säurelöslich.
Kollagen III:	pepsinextrahiert aus humaner Placenta, säurelöslich.
Kollagen IV:	pepsinextrahiert aus humaner Placenta, säurelöslich
Kollagen V:	pepsinextrahiert aus humaner Placenta, säurelöslich
Fibronectin:	aus bovinem Plasma

In die Reaktionskammern einer ELISA-Mikrotiterplatte wurden je 150 µl einer Kollagenlösung (50 µg/ml, in 1% HAc) bzw. einer Fibronectinlösung (35 µg/ml, in TBS) gegeben. Zur Adsorption der Proteine an die Kunststoffoberfläche, wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mulden wurden dann dreimal mit TBS/Tween 20 (0,02% Tween 20) gewaschen. Die folgenden Inkubationsschritte wurden jeweils 1h bei RT durchgeführt. Restliche freie Bindungsstellen in den beschichteten Mulden und freie Kontrollmulden wurden durch Inkubation mit je 200 µl 1% BSA in TBS (BSA/TBS) abgesättigt und dann erneut dreimal mit TBS/Tween 20 gewaschen. Zur Interaktion wurden geeignete Proteinproben (100 µl) in den gewünschten Puffern zugesetzt und für 1 h bei RT inkubiert.

Dreimaligem Waschen mit TBS/Tween 20 folgte die Inkubation mit jeweils 100 µl einer geeigneten Primärantikörperverdünnung in BSA/TBS. Abermals wurde dreimal mit TBS/Tween 20 gewaschen und dann mit jeweils 100 µl einer 1:2000-Verdünnung eines HRP-gekoppelten Schweine-anti-Kaninchenimmunglobulin-G-Antikörpers (DAKO) in BSA/TBS inkubiert. Noch dreimal wurde mit TBS/Tween 20, dann zweimal mit Wasser gewaschen.

Vom frisch angesetzten Detektionsreagenz wurden je 100 µl in die Höhlungen gegeben und maximal 90 min im Dunkeln entwickelt. Die positive Reaktion war an einer Blaufärbung

erkennbar. Vor der Messung im ELISA-Reader (Titertek), bei einer Wellenlänge von 450 nm, wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Schwefelsäure (20%) gestoppt. Dies führte zu einer Farbänderung nach gelb.

Detektiosreagenz:

18 ml H₂O

2 ml 1 M NaOAc/Citronensäure Puffer

125 μ l 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (10 mg/ml in DMSO)

10 μ l 30% H₂O₂

pH = 6,0

Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung von Proteinmolekülen und Molekülkomplexen im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 902) wurden die beiden im Folgenden beschriebenen Kontrastierungsmethoden verwendet.

Negativkontrastierung (*negative staining*)

Die höchste Auflösung ließ sich durch die negativ Kontrastierung erreichen, bei der die Proteine von einer dünnen amorphen Schicht aus Schwermetallsalz umgeben waren. Die Stellen, an denen Protein vorhanden war, waren im Vergleich zur Schwermetallschicht weniger elektronendicht. Daher entstand vor einem dunklen Hintergrund ein helles Abbild der Proteine, das namensgebend für die Methode ist (negativer Kontrast).

Die Probenvorbereitung begann mit der sogenannten Glimmentladung (*glow discharge*). Unter geringem Luftdruck wurde an einem Plattenkondensator eine hohe Spannung (Zündspannung) angelegt. Die Ladungsträger erhielten dabei eine kinetische Energie, die dazu ausreichte neutrale Restgasmoleküle (Luft) zu ionisieren. Die Glimmentladung wurde für 1 min aufrecht erhalten, um eine auf ein Kupfernetzchen aufgebrachte Kohleschicht (10 - 20 nm), die in der Entladungskammer zwischen den Kondensatorplatten platziert wurde, aufzuladen und ihr hydrophile Eigenschaft zu verleihen.

Ein so vorbereitetes kohlebeschichtetes Kupfernetzchen (400 Maschen) wurde 1 min lang auf einen TBS-Tropfen (100 μ l) gelegt und dann mit einem Filterpapier getrocknet, bevor es auf einen 5 - 10 μ l Tropfen der zu untersuchenden Proteinlösungen (2 - 5 μ g/ml) gelegt wurde. Nach 1 min Adsorption wurde erneut mit einem Filterpapier getrocknet und zweimal mit Wasser gewaschen. Dabei wurde jeweils mit dem Filterpapier getrocknet. Nach kurzem Vorkontrastieren (max. 3 s) in einem 100- μ l-Tropfen 0,75% Uranylformiatlösung wurde in einem weiteren Tropfen (100 μ l) der 0,75%igen Uranylformiatlösung 30 s - 40 s kontrastiert. Nach Trocknen mit einem Filterpapier und Trocknung an der Luft war das Präparat zur Untersuchung im Elektronenmikroskop bereit.

Rotationsaufdampfung (*rotary shadowing*)

Die Rotationsaufdampfung ist eine Replik-Technik, die sich der physikalischen Gasphasenabscheidung von Schwermetall und Kohle bedient. Proteinlösungen mit typischen Massenkonzentrationen von 20 - 50 µg/ml wurden mit dem gleichen Volumen an Glycerin (80% in q-H₂O) vermischt und auf ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen gesprüht. Nach mindestens dreistündiger Trocknung im Vakuum der Beschichtungsanlage (Baltec MED 030) wurde unter Rotation des Präparates und unter einem Winkel von 6° - 9° Platin aufgedampft, um das Protein mit dem elektronendichten Metall zu dekorieren. Das Arbeitsvakuum, bei dem eine Platinschicht von 2 nm Dicke aufgedampft wurde, lag unter 10⁻⁵ mbar. Zur Stabilisierung der Replik wurde unter einem Winkel von 90° eine 10 - 20 nm dicke Kohleschicht aufgedampft. Die auf einer Wasseroberfläche abgeflottete Replik wurde schließlich zur Untersuchung im Elektronenmikroskop auf einem Kupfernetzchen (400 Maschen) aufgenommen und getrocknet. Die Dekoration des Proteins mit dem elektronendichten Metall, sorgte für eine dunkle Abbildung des Proteins vor einem hellen Hintergrund (positiver Kontrast).

Die Dekoration des Proteins sowohl mit Glycerin als auch mit Platin verringerten die Auflösung dieser Methode im Vergleich zur Negativkontrastierung. Sie hob allerdings fadenförmige Strukturen hervor, die in der Negativkontrastierung oft schlecht zu erkennen waren.

Protein-Gold-Komplexe

Darstellung von kolloidalem Gold

Kolloidales Gold mit einem Durchmesser von 5 nm wurde durch Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Tannin nach einer Methode von Slot und Geuze (1981, 1985) dargestellt. Sol. A und Sol. B wurden dazu auf 60°C erwärmt, vereinigt und dann rasch durchmischt. Nachdem sich eine charakteristische braun-rote Farbe gebildet hatte, wurde bis zum Sieden erhitzt und zum Schluß eisgekühlt. Die fertigen Goldkolloide wurden bei 4°C gelagert.

Sol. A:

8 ml 0,0125% Tetrachlorgoldsäure

Sol. B:

400 µl 1% tri-Natriumcitrat-Dihydrat

100 µl 1% Tannin

100 µl 25 mM K₂CO₃ad 2 ml q-H₂O*Darstellung von Protein-Gold-Komplexen*

Komplexe aus Protein und Gold wurden wie bei Baschong und Wrigley beschrieben (1990) dargestellt. Ein geeignetes Volumenverhältnis von Goldkolloid- zu Proteinlösung wurde durch Titration ermittelt. Eine Farbänderung von rot nach blau, die durch salzinduzierte Aggregation des kolloidalen Goldes verursacht wurde (10% NaCl in q-H₂O), konnte dabei durch vorherige Bildung von Protein-Gold-Komplexen verhindert werden. Das minimale Volumen an Proteinlösung, das die Aggregation verhinderte, wurde ermittelt. Goldkolloid- und Proteinlösung wurden dann im zugehörigen Volumenverhältnis gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Schließlich wurde durch Zugabe von Polyethylenglykol-20000 (1% in q-H₂O, SERVA) und einstündiger Inkubation bei RT blockiert.

LITERATUR

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle* 3. Aufl., VCH, Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo
- Antonopoulos, C.A., Engfeldt, B., Gardell, S., Hjertquist, S.O., Solheim, K. (1965) Isolation and Identification of the Glycosaminoglycans from Fracture Callus. *Biochim. Biophys. Acta* **101**, 150-156.
- Argaves, W.S., Deák, F., Sparks, K.J., Kiss, I., Goetinck, P.F. (1987) Structural Features of Cartilage Matrix Protein Deduced from cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 464-468.
- Aszódi, A., Bateman, J.F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E.B., Hauser, N., Bösze, Z., Fassler, R. (1999) Normal Skeletal Development of Mice Lacking Matrilin-1: Redundant Function of Matrilins in Cartilage? *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7841-7845.
- Aszódi, A., Hauser, N., Studer, D., Paulsson, M., Hiripi, L. Bösze, Z. (1996) Cloning, Sequencing and Expression Analysis of Mouse Cartilage Matrix Protein cDNA. *Eur. J. Biochem.* **236**, 970-977.
- Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R. (1989) Binding of Nidogen and the Laminin-Nidogen Complex to Basement Membrane Collagen Type IV. *Eur. J. Biochem.* **184**, 241-248.
- Baker, J.R., Caterson, B. (1979) The Isolation and Characterization of the Link Proteins from Proteoglycan Aggregates of Bovine Nasal Cartilage. *J. Biol. Chem.* **254**, 2387-93.
- Baschong, W., Wrigley, N.G. (1990) Small Colloidal Gold Conjugated to Fab Fragments or to Immunoglobulin G as High-Resolution Labels for Electron Microscopy: A Technical Overview. *J. Electron Microscopy Tech.* **14**, 313-323.
- Beck, K., Gambia, J.E., Bohan, C.A., Bächinger, H.P. (1996) The C-terminal Domain of Cartilage Matrix Protein Assembles into a Triple-stranded α -helical Coiled-Coil Structure. *J. Mol. Biol.* **256**, 909-923.
- Beck, K., Gambia, J.E., Kamawal, A., Bächinger, H.P. (1997) A Single Amino Acid Can Switch the Oligomerization State of the α -helical Coiled-Coil Domain of Cartilage Matrix Protein. *EMBO J.* **16**, 3767-3777.
- Bienkowska, J., Cruz, M., Atiemo, A., Handin, R., Liddington, R. (1997) The von Willebrand Factor A3 Domain Does Not Contain a Metal Ion-dependent Adhesion Site Motif. *J. Biol. Chem.* **272**, 25162-25167.
- Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiarz, J.P., Linsenmayer, T.F. (1988) Collagen Type I and Type V are Present in the Same Fibril in the Avian Corneal Stroma. *J. Cell Biol.* **106**, 999-1008.
- Bonaldo, P., Russo, V., Bucciotti, F., Doliana, R., Colombatti, A. (1990) Structural and Functional Features of the $\alpha 3$ Chain Indicate a Bridging Role for Chicken Collagen VI in Connective Tissues. *Biochemistry.* **29**, 1245-1254.
- Bornstein, P., Armstrong, L.C., Hankenson, K.D., Kyriakides, T.R., Yang Z. (2000). Thrombospondin 2, a Matricellular Protein with Diverse Functions. *Matrix Biology* **19**, 557-568.
- Briggs M.D., Hoffman, S.M., King, L.M., Olsen, A.S., Mohrenweiser, H., Leroy, J.G., Mortier, G.R., Rimoin, D.L., Lachman, R.S., Gaines, E.S., Czekleniak, J.A., Knowlton, R.G.,

- Cohn, D.H. (1995) Pseudoachondroplasia and Multiple Epiphyseal Dysplasia Due to Mutations in the Cartilage Oligomeric Matrix Protein Gene. *Nat. Genet.* **10**, 330-336.
- Broek, D.L., Madri, J., Eikenberry, E.F., Brodsky, B. (1985) Characterization of the Tissue Form of Type V Collagen from Chick Bone. *J. Biol. Chem.* **260**, 555-562.
- Bruckner, P., Mendler, M., Steinmann, B., Huber, S., Winterhalter, K. H. (1988) The Structure of Human Collagen Type IX and its Organisation in Fetal and Infant Cartilage Fibrils. *J. Biol. Chem.* **263**, 16911-16917.
- Buneaux, F., Buneaux, J.J., Fabiani, P., Galmiche, P. (1978) Zinc and Enzymes in the Synovial Fluid and Blood in Various Types of Rheumatism. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic.* **45**, 699-701.
- Burgeson, R.E., Lunstrum, G.P., Rokosova, B., Rimberg, C.S., Rosenbaum, L.M., Keene, D.R. (1990) The Structure and Function of Type VII Collagen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **580**, 32-43.
- Burton-Wurster, N., Gendelman, R., Chen, H., Gu, D.N., Tetreault, J.W., Lust, G., Schwarzbauer, J.E., MacLeod, J.N. (1999) The Cartilage-specific (V+C)-Fibronectin Isoform Exists Primarily in Homodimeric and Monomeric Configurations. *Biochem. J.* **341**, 555-561.
- Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., Ebles, J., Kühn, K., Humphries, M.J. (1997) The Integrin $\alpha 1$ A-domain Is a Ligand Binding Site for Collagens and Laminin. *J. Biol. Chem.* **272**, 12311-12317.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1990) Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **265**, 7709-7712.
- Cassaró, C.M., Dietrich, C.P. (1977) Distribution of Sulfated Mucopolysaccharides in Invertebrates. *J. Biol. Chem.* **252**, 2254-2261.
- Chapman, K.L., Mortier, G.R., Chapman K., Loughlin, J., Grant, M.E., Briggs, M.D. (2001) Mutation in the vWFA-domain of Matrilin-3 are Associated with Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Nat. Genet.*, **28**, 393-396.
- Chen, H., Aeschlimann, D., Nowlen, J., Mosher, D.F. (1996 a) Expression and Initial Characterization of Recombinant Mouse Thrombospondin-1 and Thrombospondin-3. *FEBS Lett.* **387**, 36-41.
- Chen, H., Strickland, D.K., Mosher, D.F., (1996 b) Metabolism of Thrombospondin-2: Binding and Degradation by 3T3 Cells and Glycosaminoglycan-variant Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 15993-15999.
- Chen, H., Herndon, M.E., Lawler J. (2000 a) The Cell Biology of Thrombospondin-1. *Matrix Biology* **19**, 597-614.
- Chen, H., Deere, M., Hecht, J.T., Lawler, J. (2000 b) Cartilage Oligomeric Matrix Protein is a Calcium-binding Protein, and a Mutation in its Type 3 Repeats Causes Conformational Changes. *J. Biol. Chem.* **275**, 26538-44.
- Chen, Q., Johnson, D.M., Haudenschild, D.R., Tondravi, M.M., Goetinck, P.F. (1995) Cartilage Matrix Protein Forms a Type II Collagen-independent Filamentous Network: Analysis in Primary Cell Cultures with a Retrovirus Expression System. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1743-1753.
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D.M., Goetinck, P.F. (1999) Assembly of a Novel Cartilage Matrix Protein Filamentous Network: Molecular Basis of Differential Requirement of von Willebrand Factor A Domains. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2149-2162.

- Chernousov, M.A., Rothblum, K., Tyler, W.A., Stahl, R.C., Carey, D.J. (2000) Schwann Cells Synthesize Type V Collagen that Contains a Novel $\alpha 4$ Chain. Molecular Cloning, Biochemical Characterization, and High Affinity Heparin. *J. Biol. Chem.* **275**, 28208-28215.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single Step Method of RNA-isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chu, F. K. (1986) Requirements of Cleavage of High Mannose Oligosaccharides in Glycoproteins by Peptide N-Glycosidase F. *J. Biol. Chem.* **261**, 172-177.
- Clezardin, P., Lawler, J., Amiral, J., Quentin, G., Delmas, P. (1997) Identification of Cell Adhesive Active Sites in the N-terminal Domain of Thrombospondin-1. *Biochem. J.* **321**, 819-827.
- Coligan, J.E., Slayter, H.S. (1984) Structure of Thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **259**, 3944-3948.
- Colognato, H., Yurchenco, P.D. (2000) Form and Function: the Laminin Family of Heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218**, 213-234.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. (1991) The Superfamily of Proteins with von Willebrand Factor Type-A-like Domains: One Theme Common to Components of Extracellular Matrix, Hemostasis, Cellular Adhesion and Defense Mechanisms. *Blood* **77**, 2305-2315.
- Couchman, J.R., Woods, A. (1993) *Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates*. Ed. Roberts D.D., Mecham, R.P., 33-81, Academic, San Diego.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., Bouck, N. (1998) Thrombospondin-1 is a Major Activator of TGF-beta1 *in vivo*. *Cell.* **93**, 1159-1170.
- Dames, S.A., Kammerer, R.A., Wiltscheck, R., Engel, J., Alexandrescu, A.T. (1998) NMR Structure of a Parallel Homotrimeric Coiled Coil. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 687-91.
- Dawson, D.W., Pearce, S.F.A., Zhong, R., Silverstein, R.L., Frazier, W.A., Bouck, N.P. (1997) CD36 Mediates the *in vitro* Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* **138**, 707-717.
- Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulsson, M. und Kiss, I. (1997) Primary Structure and Expression of Matrilin-2, the Closest Relative of Cartilage Matrix Protein within the von Willebrand Factor Type A-like Module Superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**, 9268-9274.
- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I., Paulsson, M. (1999) The Matrilins: A Novel Family of Oligomeric Extracellular Matrix Proteins. *Matrix Biol.* **18**, 55-64.
- Deere, M., Sanford, T., Ferguson, H.L., Daniels, K., Hecht J.T. (1998) Identification of Twelve Mutations in Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Patients with Pseudoachondroplasia. *Am. J. Med. Genet.* **80**, 510-513.
- Delacoux, F., Fichard, A., Cogne, S., Garrone, R., Ruggiero, F. (2000) Unraveling the Amino Acid Sequence Crucial for Heparin Binding to Collagen V. *J. Biol. Chem.* **275**, 29377-29382.
- Delacoux, F., Fichard, A., Geourjon, C., Garrone, R., Ruggiero, F. (1998) Molecular Features of the Collagen V Heparin Binding Site. *J. Biol. Chem.* **273**, 15069-15076.
- Delot, E., Brodie, S.G., King, L.M., Wilcox, W.R., Cohn, D.H. (1998) Physiological and Pathological Secretion of Cartilage Oligomeric Matrix Protein by Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* **273**, 26692-26697.

- DiCesare, P., Hauser, N., Lehman, D., Pasumarti, S., Paulsson, M. (1994 a) Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) is an Abundant Component of Tendon. *FEBS Letters* **354**, 237-240.
- DiCesare, P.E., Mörgelin, M., Mann, K., Paulsson, M. (1994 b) Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Thrombospondin-1. Purification from Articular Cartilage, Electron Microscopic Structure, and Chondrocyte Binding. *Eur. J. Biochem.* **223**, 927-937.
- DiCesare, P.E., Carlson, C.S., Stollerman, E.S., Chen, F.S., Leslie, M., Perris, R. (1997) Expression of Cartilage Oligomeric Matrix Protein by Human Synovium. *FEBS Lett.* **412**, 249-252.
- Dickeson, S.K., Mathis, N.L., Rahman, M., Bergelson, J.M., Santoro, S. (1999) Determinants of Ligand Binding Specificity of the $\alpha(1)\beta(1)$ and $\alpha(2)\beta(1)$ Integrins. *J. Biol. Chem.* **274**, 32182-32191.
- Dixit, V.M., Grant, G.A., Santoro, S.A., Frazier, W.A. (1984) Isolation and Characterization of a Heparin-binding Domain from the Amino Terminus of Platelet Thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **259**, 10100-10105.
- Doolittle, R.F. (1995) The Multiplicity of Domains in Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 287-314.
- Emsley, J., King, S.L., Bergelson, J.M., Liddington R.C. (1997) Crystal Structure of the I Domain from Integrin $\alpha2\beta1$. *J. Biol. Chem.* **272**, 28512-28517.
- Emsley, J., Cruz, M., Handin, R., Liddington, R. (1998) Crystal Structure of the von Willebrand Factor A1 Domain and Implications for the Binding of the Glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **273**, 10396-10401.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Liddington, R.C. (2000) Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin $\alpha2\beta1$. *Cell.* **101**, 47-56.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H., Timpl, R. (1981) Shapes, Domain Organizations and Flexibility of Laminin and Fibronectin, Two Multifunctional Proteins of the Extracellular Matrix. *J. Mol. Biol.* **150**, 97-120.
- Fleischmajer, R., Timpl, R. (1984) Ultrastructural Localization of Fibronectin to Different Anatomic Structures of Human Skin. *J. Histochem. Cytochem.* **32**, 315-321.
- Fowler, W.E., Fretto, L.J. (1989) *Coagulation and Bleeding Disorders: The Role of Factor VIII and von Willebrand Factor*. Eds. Zimmermann, T.S., Ruggeri, Z.S., 181-194, Dekker, New York.
- Fraser, J.R.E., Laurent, T.C. (1996) Hyaluronan. *Extracellular Matrix*. Vol. 2, Ed. Comper W.D., Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Frazier, W.A. (1987) Thrombospondin: A Modular Adhesive Glycoprotein of Platelets and Nucleated Cells. *J. Cell. Biol.* **105**, 625-632.
- Frazier, W.A., (1991) Thrombospondins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 792-799.
- Galvin, N.J., Vance, P.M., Dixit, V.M., Fink, B., Frazier, W.A. (1987) Interaction of Human Thrombospondin with Types I-V Collagen: Direct Binding and Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* **104**, 1413-1422.
- Gao, A.-G., Lindberg, F.P., Finn, M.B., Blystone, S.D., Brown, E.J., Frazier, W.A. (1996 b) Integrin-associated Protein is a Receptor for the C-terminal Domain of Thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **271**, 21-24

- Genetics Computer Group (1994) *Program Manual for the Wisconsin Package*, Version 8, Genetics Computer Group, Madison, WI.
- Gibson, T.J., Spring, J. (2000) Evidence in Favour of Ancient Octaploidy in the Vertebrate Genome. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 259-264.
- Girma, J.P., Meyer, D., Verweij, C.L., Pannekoek, H., Sixma, J.J. (1987) Structure-function Relationship of Human von Willebrand Factor. *Blood* **70**, 605-611.
- Golbik, R., Eble, J.A., Ries, A., Kühn, K. (2000) The Spatial Orientation of the Essential Amino Acid Residues Arginine and Aspartate within the $\alpha 1\beta 1$ Integrin Recognition Site of Collagen IV Has Been Resolved Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Mol. Biol.* **297**, 501-509.
- Gupta, K., Gupta, P., Solovey, A., Hebbel, R.P. (1999) Mechanism of Interaction of Thrombospondin with Human Endothelium and Inhibition of Sickle Erythrocyte Adhesion to Human Endothelial Cells by Heparin. *Biochim. Biophys. Acta* **1453**, 63-73.
- Handler, M., Yurchenco, P.D., Iozzo, R.V. (1997) Developmental Expression of Perlecan During Murine Embryogenesis. *Dev. Dyn.* **210**, 130-145.
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K., Nakayama, K. (1992) Consensus Sequence for Precursor Processing at Mono-arginyl Sites. Evidence for the Involvement of a Kex2-like Endoprotease in Precursor Cleavages at Both Dibasic and Mono-arginyl Sites. *J. Biol. Chem.* **267**, 16335-16340.
- Hauser, N., Paulsson, M. (1994) Native CMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 25747-25753.
- Hauser, N., Paulsson, M., Ashay A. K., DiCesare, P. (1995) Tendon Extracellular Matrix Contains Pentameric Thrombospondin-4 (TSP-4). *FEBS Letters* **368**, 307-310.
- Hauser, N., Paulsson, M., Heinegård, D., Mörgelin, M. (1996) Interaction of Cartilage Matrix Protein with Aggrecan. *J. Biol. Chem.* **271**, 32247-32252.
- Hecht, J.T., Nelson, L.D., Crowder, E., Wang, Y., Elder, F.F.B., Harrison, W.R., Francomano, C.A., Prange, C.K., Lennon, G.G., Deere, M., Lawler, J. (1995) Mutations in Exon 17B of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) Cause Pseudoachondroplasia. *Nat. Genet.* **10**, 325-329.
- Hecht, J.T., Lawler, J. (1998 a) Characterization of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Human Normal and Pseudoachondroplasia Musculoskeletal Tissues. *Matrix Biol.* **17**, 269-278.
- Hecht, J.T., Montufar-Solis, D., Decker, G., Lawler, J., Daniels, K., Duke, P.J. (1998 b) Retention of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) and Cell Death in Redifferentiated Pseudoachondroplasia Chondrocytes. *Matrix Biol.* **17**, 625-633.
- Hedbom, E., Antonsson, P., Hjerpe, A., Aeschlimann, D., Paulsson, M., Rosa-Pimentel, E., Sommarin, Y., Wendel, M., Oldberg, Å., Heinegård, D. (1992) Cartilage Matrix Proteins. An Acidic Oligomeric Protein (COMP) Detected Only in Cartilage. *J. Biol. Chem.* **267**, 6132-6136.
- Heinegård, D., Hascall, V.C. (1974) Aggregation of Cartilage Proteoglycans. Characteristics of the Proteins Isolated from Trypsin Digests of Aggregates. *J. Biol. Chem.* **249**, 4250-4256.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988) Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32.

- Holden, P., Canty, E.G., Mortier, G.R., Zabel, B., Spranger, J., Carr, A., Grant, M.E., Loughlin, J.A., Briggs, M.D. (1999) Identification of Novel Pro- $\alpha 2(\text{IX})$ Collagen Gene Mutations in Two Families with Distinctive Oligo-epiphyseal Forms of Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 31-38.
- Holden, P., Meadows, R.S., Chapman, K.L., Grant, M.E., Kadler, K.E., Briggs, M.D. (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**, 6046-55.
- Hotchkiss, K.A., Matthias, L.J., Hogg, P.J. (1998) Exposure of the Cryptic Arg-Gly-Asp Sequence in Thrombospondin-1 by Protein Disulfide Isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1388**, 478-488.
- Huang, X., Birk, D.E., Goetinck, P.F. (1999) Mice Lacking Matrilin-1 (Cartilage Matrix Protein) have Alterations in Type II Collagen Fibrillogenesis and Fibril Organization. *Dev. Dyn.* **216**, 434-441.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J., Gros, P. (1997) Crystal Structure of the A3 Domain of Human von Willebrand Factor: Implications for Collagen Binding. *Structure* **5**, 1147-1156.
- Iozzo, R.V. (1998) Matrix Proteoglycans: From Molecular Design to Cellular Function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609-652.
- Iozzo, R.V. (1999) The Biology of the Small Leucine-rich Proteoglycans. Functional Network of Interactive Proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 18843-18846.
- Iruela-Arispe, M.L., Liska, D.J., Sage, E.H., Bornstein, P. (1993) Differential Expression of Thrombospondin 1, 2, and 3 During Murine Development. *Dev. Dyn.* **197**, 40-56.
- Jenkins, R.N., Osborne-Lawrence, S.L., Sinclair, A.K., Eddy, R.L. Jr., Byers, M.G., Shows, T.B., Duly, A.D. (1990) Structure and Chromosomal Location of the Human Gene Encoding Cartilage Matrix Protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 19624-19631.
- Jobsis, G.J., Keizers, H., Vreijling, J.P., de Visser, M., Speer, M.C., Wolterman, R.A., Baas, F., Bolhuis, P.A. (1996) Type VI Collagen Mutations in Bethlem Myopathy, an Autosomal Dominant Myopathy with Contractures. *Nat. Genet.* **14**, 113-115.
- Kaesberg, P.R., Ershler, W.B., Esko, J.D., Mosher, D.F. (1989) Chinese Hamster Ovary Cell Adhesion to Human Platelet Thrombospondin is Dependent on Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycan. *J. Clin. Invest.* **83**, 994-1001.
- Kamata, T., Takada, Y. (1994) Direct Binding of Collagen to the I-domain of Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2, CD49b/CD29) *J. Biol. Chem.* **269**, 26006-26010.
- Käpylä, J., Ivaska, J., Riikonen, R., Nykvist, P., Pentikainen, O., Johnson, M., Heino, J. (2000) Integrin $\alpha(2)\text{I}$ Domain Recognizes Type I and Type IV Collagens by Different Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **275**, 3348-3354.
- Kern, A., Eble, J., Golbik, R., Kühn, K. (1993) Interaction of Type IV Collagen with the Isolated Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *Eur. J. Biochem.* **215**, 151-159.
- Kiss, I., Deák, F., Holloway, R.G. Jr., Delius, H., Mebust, K.A., Frimberger, E., Argraves, W.S., Tsonis, P.A., Winterbottom, N., Goetinck, P.F. (1989) Structure of the Gene for Cartilage Matrix Protein, a Modular Protein of the Extracellular Matrix. Exon/Intron Organization, Unusual Splice Sites, and Relation to α -chains of $\beta 2$ -integrins, von Willebrand

- Factor, Complement Factors B and C2, and Epidermal Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 8126-8134.
- Klatt, A. R. (1997) Proteinchemische Untersuchungen an Matrilin-3. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Mörgelin M, Paulsson M, Wagener R. (2000) Molecular Structure and Tissue Distribution of Matrilin-3, a Filament-forming Extracellular Matrix Protein Expressed During Skeletal Development. *J. Biol. Chem.* **275** (6) 3999-4006.
- Klatt, A.R., Nitsche, D.P., Kobbe, B., Paulsson, M., Wagener, R. (2001) Molecular Structure, Processing and Tissue Distribution of Matrilin-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 17267-17275.
- Kleemann-Fischer, D., Kleemann, G.R., Engel, D., Yates, J.R. 3rd, Wu, J.J., Eyre, D.R. (2000) Molecular Properties of Matrilin-3 Isolated from Human Growth Cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**, 209-215.
- Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., Leppla, S.H. (1992) Anthrax Toxin Protective Antigen is Activated by a Cell Surface Protease with the Sequence Specificity and Catalytic Properties of Furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 10277-10281.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Onley, D.J., Peachey, A.R., Messent, A.J., Smethurst, P.A., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., Barnes, M.J. (1998) Identification in Collagen Type I of an Integrin $\alpha 2\beta 1$ -binding Site Containing an Essential GER Sequence. *J. Biol. Chem.* **273**, 33287-33294.
- Kobe, B., Deisenhofer, J. (1993) Crystal Structure of Porcine Ribonuclease Inhibitor, a Protein with Leucine-rich Repeats. *Nature* **366**, 751-756.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., Timpl, R. (1997) Properties of the Extracellular Calcium Binding Module of the Proteoglycan Testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561.
- Kyriakides, T.R., Leach, K.J., Hoffman, A.S., Ratner, B.D., Bornstein, P. (1999) Mice that Lack the Angiogenesis Inhibitor, Thrombospondin 2, Mount an Altered Foreign Body Reaction Characterized by Increased Vascularity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 4449-4454.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahav, J., Lawler, J., Gimbrone, M.A. (1984) Thrombospondin Interactions with Fibronectin and Fibrinogen. Mutual Inhibition in Binding. *Eur. J. Biochem.* **145**, 151-156.
- Lamande, S.R., Bateman, J.F., Hutchison, W., McKinlay-Gardner R.J., Bower, S.P., Byrne, E., Dahl, H.H. (1998) Reduced Collagen VI Causes Bethlem Myopathy: A Heterozygous COL6A1 Nonsense Mutation Results in mRNA Decay and Functional Haploinsufficiency. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 981-989.
- Lawler, J., Slayter, H.S., Coligan, J.E. (1978) Isolation and Characterization of a High Molecular Weight Glycoprotein from Human Blood Platelets. *J. Biol. Chem.* **253**, 8609-8616.
- Lawler, J., Chao, F.C., Cohen, C.M. (1982) Evidence for Calcium-sensitive Structure in Platelet Thrombospondin. Isolation and Partial Characterization of Thrombospondin in the Presence of Calcium. *J. Biol. Chem.* **257**, 12257-12265.
- Lawler, J., Derick, L.H., Connolly, J.E., Chen, J.H., Chao, F.C. (1985) The Structure of Human Platelet Thrombospondin. *J. Biol. Chem.* **260**, 3762-3772.

- Lawler, J., Hynes, R.O. (1986) The Structure of Human Thrombospondin, an Adhesive Glycoprotein with Multiple Calcium-binding Sites and Homologies with Several Different Proteins. *J. Cell Biol.* **103**, 1635-1648.
- Lawler, J., Hynes, R.O. (1989) An Integrin Receptor on Normal and Thrombasthenic Platelets that Binds Thrombospondin. *Blood* **74**, 2022-2027.
- Lawler, J., McHenry, K., Duquette, M., Derick, L. (1995) Characterization of Human Thrombospondin-4. *J. Biol. Chem.* **270**, 2809-2814.
- Lawler, J., Sunday, M., Thibert, V., Duquette, M., George, E.L., Rayburn, H., Hynes, R.O. (1998) Thrombospondin-1 is Required for Normal Murine Pulmonary Homeostasis and its Absence Causes Pneumonia. *J. Clin. Invest.* **101**, 982-992.
- LeBaron, R.G., Zimmermann, D.R., Ruoslahti, E. (1992) Hyaluronate Binding Properties of Versican. *J. Biol. Chem.* **267**, 10003-10010.
- Lee, J.-O., Rieu, P., Arnaut, M.A., Liddington, R. (1995) Crystal Structure of the A-Domain from the α -Subunit of Integrin CR3. *Cell* **80**, 631-638.
- MacLeod, J.N., Burton-Wurster, N., Gu, D.N., Lust, G. (1996) Fibronectin mRNA Splice Variant in Articular Cartilage Lacks Bases Encoding the V, III-15, and I-10 Protein Segments. *J. Biol. Chem.* **271**, 18954-18960.
- Maddox, B.K., Keene, D.R., Sakai, L.Y., Charbonneau, N.L., Morris, N.P., Ridgway, C.C., Boswell, B.A., Sussman, M.D., Horton, W.A., Bächinger, H.P., Hecht, J.T. (1997) The Fate of Cartilage Oligomeric Matrix Protein is Determined by the Cell Type in the Case of a Novel Mutation in Pseudoachondroplasia. *J. Biol. Chem.* **272**, 30993-30997.
- Maddox, B.K., Mokashi, A., Keene, D.R., Bächinger, H.P. (2000) A Cartilage Oligomeric Matrix Protein Mutation Associated with Pseudoachondroplasia Changes the Structural and Functional Properties of the Type 3 Domain. *J. Biol. Chem.* **275**, 11412-11417.
- Makihira, S., Yan, W., Ohno, S., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Okimura, A., Yoshida, E., Noshiro, M., Hamada, T., Kato, Y. (1999) Enhancement of Cell Adhesion and Spreading by a Cartilage-specific Non Collagenous Protein, Cartilage Matrix Protein (CMP/Matrilin-1), via Integrin $\alpha 1\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **274**, 11417-11423.
- Maurer, P., Hohenester, E., Engel, J. (1996) Extracellular Calcium-binding Proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 609-617.
- Maurer, P., Hohenester, E. (1997) Structural and Functional Aspects of Calcium Binding in Extracellular Matrix Proteins. *Matrix Biol.* **15**, 569-580.
- Maynard, J.A., Cooper, R.R., Ponseti, I.V. (1972) A Unique Rough Surfaced Endoplasmic Reticulum Inclusion in Pseudoachondroplasia. *Lab. Invest.* **26**, 40-44.
- Meyer, K., Palmer, J.W. (1934) The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629-634.
- Mikhailenko, I., Krylov, D., McTigue Argraves, K., Roberts, D.D., Liao, G., Strickland, D.K., (1997) Cellular Internalization and Degradation of Thrombospondin-1 is Mediated by the Amino-terminal Heparin Binding Domain HBD : High Affinity Interaction of Dimeric HBD with the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 6784-6791.
- Misenheimer, T.M., Mosher, D.F. (1995) Calcium Ion Binding to Thrombospondin 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 1729-1733.

- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. (1992) Human Furin is a Calcium-dependent Serine Endoprotease that Recognizes the Sequence Arg-X-X-Arg and Efficiently Cleaves Anthrax Toxin Protective Antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 16396-16402.
- Montelione, G., Wuthrich, K., Burgess, A.W., Nice, E.C., Wagner, G., Gibson, K.D., Scheraga, H.A. (1992) Solution Structure of Murine Epidermal Growth Factor Determined by NMR Spectroscopy and Refined by Energy Minimization with Restraints. *Biochemistry* **31**, 236-249.
- Mörgelin M., Paulsson, M., Hardingham, T.E., Heinegård, D., Engel, J. (1988) Cartilage Proteoglycans. Assembly with Hyaluronate and Link Protein as Studied by Electron Microscopy. *Biochem. J.* **253**, 175-85.
- Mörgelin, M., Heinegård, D., Engel, J., Paulsson, M., (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.
- Morris, N.P., Bächinger, H.P. (1987) Type XI Collagen is a Heterotrimer with a Composition (1 α , 2 α , 3 α) Retaining Non-triple-helical Domains. *J. Biol. Chem.* **262**, 11345-11350.
- Mumby, S.M., Raugi, G.J., Bornstein, P. (1984) Interactions of Thrombospondin with Extracellular Matrix Proteins: Selective Binding to Type V Collagen. *J. Cell Biol.* **98**, 646-652.
- Muragaki, Y., Mariman, E.C., Perala, M., Warman, M.L., Olsen, B.R., Hamel, B.C.J. (1996) A Mutation in the Gene Encoding the α 2-Chain of the Fibril-associated Collagen IX, COL9A2, Causes Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Nature Genet.* **12**, 103-105.
- Murdoch, A.D., Iozzo, R.V. (1993) Perlecan: the Multidomain Heparan Sulphate Proteoglycan of Basement Membrane and Extracellular Matrix. *Virchows Arch. A.* **423**, 237-242.
- Murphy-Ullrich, J.E., Poczatek, M. (2000) Activation of Latent TGF- β by Thrombospondin-1: Mechanisms and Physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 59-69.
- Nakayama, K. (1997) Furin: A Mammalian S subtilisin/Kex2p-like Endoprotease Involved in Processing of a Wide Variety of Precursor Proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635.
- Narouz-Ott, L., (1999) Thrombospondin-4: Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehung und der Gewebeverteilung eines neuen extrazellulären Matrixproteins. Dissertation, Universität zu Köln.
- Narouz-Ott, L., Maurer, P., Nitsche, D.P., Smyth, N., Paulsson, M. (2000) Thrombospondin-4 Binds Specifically to Both Collagenous and Non-collagenous Extracellular Matrix Proteins via Its C-terminal Domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37110-37117.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., Von Heijne, G. (1997) Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Signal Peptides and Prediction of their Cleavage Sites. *Prot. Eng.* **10**, 1-6.
- Nishimura, I., Muragaki, Y., Olsen, B.R. (1989) Tissue-specific Forms of Type IX Collagen-proteoglycan Arise from the Use of Two Widely Separated Promoters. *J. Biol. Chem.* **264**, 20033-20041.
- Nitsche, D. P. (1997) Untersuchungen zur Wechselwirkung von Matrilin-3 mit Proteinen der extrazellulären Matrix. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Niyibizi, C., Eyre, D.R. (1993) Structural Analysis of the Extension Peptides on Matrix Forms of Type V Collagen in Fetal Calf Bone and Skin. *Biochim. Biophys. Acta* **1203**, 304-309.

- Odenthal, U. (1998) Vereinfachte Aufreinigung von sekretorischen Proteinen aus eukaryotischen Zellen. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Olsen, B.R. (1995) New Insights Into the Function of Collagens from Genetic Analysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 720-727.
- Onley, D.J., Knight, C.G., Tuckwell, D.S., Barnes, M.J., Farndale, R.W. (2000) Micromolar Ca^{2+} Concentrations are Essential for Mg^{2+} -dependent Binding of Collagen by the Integrin $\alpha 2\beta 1$ in Human Platelets. *J. Biol. Chem.* **275**, 24560-24564.
- Pan, O.H., Beck, K. (1998) The C-terminal Domain of Matrilin-2 Assembles into a Three-stranded α -Helical Coiled Coil. *J. Biol. Chem.* **273**, 14205-14209.
- Pan, T.C., Zhang, R.Z., Pericak-Vance, M.A., Tandan, R., Fries, T., Stajich, J.M., Viles, K., Vance, J.M., Chu, M.L., Speer, M.C. (1998) Missense Mutation in a von Willebrand Factor Type A Domain of the $\alpha 3(\text{VI})$ Collagen Gene (COL6A3) in a Family with Bethlem Myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 807-812.
- Paulsson, M., Heinegård, D. (1979) Matrix Proteins Bound to Associatively Prepared Proteoglycans from Bovine Cartilage. *Biochem. J.* **183**, 539-545.
- Paulsson, M., Heinegård, D. (1981) Purification and Structural Characterisation of a Cartilage Matrix Protein. *Biochem. J.* **197**, 367-375.
- Paulsson, M., Heinegård, D. (1982) Radioimmunoassay of the 148-kilodalton Cartilage Protein. *Biochem. J.* **207**, 207-213.
- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K., Engel, J. (1987) Laminin-Nidogen Complex. Extraction with Chelating Agents and Structural Characterization. *Eur. J. Biochem.* **166**, 11-19.
- Pepe, G., Bertini, E., Giusti, B., Brunelli, T., Comeglio, P., Saitta, B., Merlini, L., Chu, M.L., Federici, G., Abbate, R. (1999 a) A Novel *de novo* Mutation in the Triple Helix of the COL6A3 Gene in a Two-generation Italian Family Affected by Bethlem Myopathy. A Diagnostic Approach in the Mutations' Screening of Type VI Collagen. *Neuromuscul. Disord.* **9**, 264-271.
- Pepe, G., Giusti, B., Bertini, E., Brunelli, T., Saitta, B., Comeglio, P., Bolognese, A., Merlini, L., Federici, G., Abbate, R., Chu, M.L. (1999 b) A Heterozygous Splice Site Mutation in COL6A1 Leading to an In-frame Deletion of the $\alpha 1(\text{VI})$ Collagen Chain in an Italian Family Affected by Bethlem myopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 802-807.
- Petit, B., Ronziere, M.C., Hartmann, D.J., Herbage, D. (1993) Ultrastructural Organization of Type XI Collagen in Fetal Bovine Epiphyseal Cartilage. *Histochemistry* **100**, 231-239.
- Philipson, L.H., Schwartz, N.B. (1984) Subcellular Localization of Hyaluronate Synthetase in Oligodendroglioma Cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 5017-5023.
- Piecha, D., (1999) Matrilin-2, ein neues extrazelluläres Bindegewebe-Protein. Dissertation, Universität zu Köln.
- Piecha, D., Muratoglu, S., Mörgelin, M., Hauser, N., Studeri, D., Kiss, I., Paulsson, M., Deák F. (1999) Matrilin-2, a Large, Oligomeric Matrix Protein, Is Expressed by a Great Variety of Cells and Forms Fibrillar Networks. *J. Biol. Chem.* **274**, 13353-13361.
- Pihlajamaa, T., Perälä, M., Vuoristo, M.M., Nokelainen, M., Bodo, M., Schulthess, T., Vuorio, E., Timpl, R., Engel, J., Ala-Kokko, L. (1999) Characterization of Recombinant Human Type IX Collagen. Association of α Chains Into Homotrimeric and Heterotrimeric Molecules. *J. Biol. Chem.* **274**, 22464-22468.

- Prehm, P. (1984) Hyaluronate is Synthesized at Plasma Membranes. *Biochem. J.* **220**, 597-600.
- Rauch, U., Gao, P., Janetzko, A., Flaccus, A., Hilgenberg, L., Tekotte, H., Margolis, R.K., Margolis, R.U. (1991) Isolation and Characterization of Developmentally Regulated Chondroitin Sulfate and Chondroitin/Keratan Sulfate Proteoglycans of Brain Identified with Monoclonal Antibodies. *J. Biol. Chem.* **266**, 14785-14801.
- Rizzo, R., Grandolfo, M., Godeas, C., Jones, K. W., Vittur, F. (1995) Calcium, Sulfur, and Zinc Distribution in Normal and Arthritic Articular Equine Cartilage: A Synchrotron Radiation-induced X-ray Emission (SRIXE) Study. *J. Exp. Zool.* **273**, 82-86.
- Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M., Heinegård, D. (1998) Cartilage Oligomeric Matrix Protein Shows High Affinity Zinc-dependent Interaction with Triple Helical Collagen. *J. Biol. Chem.* **273**, 20397-20403.
- Ross, R., Bornstein, P. (1971) Elastic Fibers in the Body. *Sci. Amer.* **224**, 44-52.
- Ruegg, M.A. (1996) Agrin, Laminin B 2 (s-Laminin) and ARIA: Their Role in Neuromuscular Development. *Curr. Opin. Neuro-biol.* **6**, 97-103.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandberg, L.B., Soskel, N.T., Leslie, J.G. (1981) Elastin Structure, Biosynthesis, and Relation to Disease State. *New Engl. J. Med.* **304**, 556-579.
- Saxne, T., Heinegård, D. (1992) Cartilage Oligomeric Matrix Protein: a Novel Marker of Cartilage Turnover Detectable in Synovial Fluid and Blood. *Br. J. Rheumatol.* **31**, 583-591.
- Schor, R.A., Prussin, S.G., Jewett, D.L., Ludowieg, J.J., Bhatnagar, R.S. (1973) Trace Levels of Manganese, Copper, and Zinc in Rib Cartilage as Related to Age in Humans and Animals, Both Normal and Dwarfed. *Clin. Orthop.* **93**, 346-355.
- Schultz-Cherry, S., Chen, H., Mosher, D.F. Krutzsch, H.C., Roberts, D.D., Murphy-Ullrich, J.E. (1995) Regulation of Transforming Growth Factor- β Activation by Discrete Sequences of Thrombospondin-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 7304-7310.
- Scott, J.E., (1996) Proteodermatan and Proteokeratan Sulfate (Decorin, Lumican/Fibromodulin) Proteins are Horseshoe Shaped. Implications for their Interactions with Collagen. *Biochemistry* **35**, 8795-8799.
- Segat, D. (1999) Expression of Monomeric and Trimeric Recombinant Matrilin-1 and Analysis of its Role in the Cartilage. Dissertation, Universität zu Köln.
- Segat, D., Frie, C., Nitsche, P.D., Klatt, A.R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M., Smyth, N. (2000) Expression of Matrilin-1, -2 and -3 in Developing Mouse Limbs and Heart. *Matrix Biol.* **19**, 649-655.
- Shen, Z., Heinegård, D. (1995) Distribution and Expression of Cartilage Oligomeric Matrix Protein and Bone Sialoprotein Show Marked Changes During Rat Femoral Head Development. *Matrix Biol.* **14**, 773-781.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., Mc Glynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., Yancopoulos, G.D. (1997) An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors. *Mol. Cell.* **1**, 25-34.
- Skorstengaard, K., Thøgersen, H.C., Petersen, T.E. (1984) Complete Primary Structure of the Collagen-binding Domain of Bovine Fibronectin. *Eur. J. Biochem.* **140**, 235-243.

- Slater, C.R. (1996) Agrin Signals at the Junction. *Nature* **381**, 478-479.
- Slot, J.W., Geuze, H.J. (1981) Sizing of Protein A-Colloidal Gold Probes for Immunoelectron Microscopy. *J. Cell Biol.* **90**, 533-536.
- Slot, J.W., Geuze, H.J. (1985) A New Method of Preparing Gold Probes for Multiple-Labeling Cytochemistry. *Europ. J. Cell Biol.* **38**, 87-93.
- Sommarin, Y., Larsson, T., Heinegård, D. (1989) Chondrocyte-matrix Interactions. Attachment to Proteins Isolated from Cartilage. *Exp. Cell Res.* **184**, 181-192.
- Stanescu, V., Maroteaux, P., Stanescu, R. (1982a) The Biochemical Defect of Pseudoachondroplasia. *Eur. J. Pediatr.* **138**, 221-225.
- Stanescu, V., Stanescu, R., Maroteaux, P. (1982b) Pathogenesis of Pseudoachondroplasia and Diastrophic Dysplasia. *Prog. Clin. Biol. Res.* **104**, 385-394.
- Stanescu, R., Stanescu, V., Muriel, M.P., Maroteaux, P. (1993) Multiple Epiphyseal Dysplasia, Fairbank type: Morphologic and Biochemical Study of Cartilage. *Am. J. Med. Genet.* **45**, 501-507.
- Tarentino, A.L. Gomez, C.M., Plummer, T.H. Jr. (1985) Deglycosylation of Asparagine-linked Glycans by Peptide: N-Glycosidase F. *Biochemistry* **24**, 4665-4671.
- Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (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** (9) 6083-6092.
- Tomaselli, K.J., Damsky, C.H., Reichardt, L.F. (1987) Interactions of a Neuronal Cell Line (PC12) with Laminin, Collagen IV, and Fibronectin: Identification of Integrin-related Glycoproteins Involved in Attachment and Process Outgrowth. *J. Cell Biol.* **105**, 2347-2358.
- Toole, B.P. (1976) Morphogenic Role of Glycosaminoglycans in Brain and Other Tissues. *Neuronal Recognition*, 275-329, Ed. Bardondes, S.H., Plenum Press, New York.
- Toole, B.P. (1981) Glycosaminoglycans in Morphogenesis. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Ed. Hay, E.D., Plenum Press, New York.
- Tooney, P.A., Sakai, T., Sakai, K., Aeschlimann, D., Mosher, D.F. (1998) Restricted Localization of Thrombospondin-2 Protein During Mouse Embryogenesis: a Comparison to Thrombospondin-1. *Matrix Biol.* **17**, 131-143.
- Tsonis, P.A., Goetinck, P.F. (1988) Expression of Cartilage-matrix Genes and Localization of their Translation Products in the Embryonic Chick Eye. *Exp. Eye Res.* **46**, 753-764.
- Tucker, R.P., Hagios, C., Chiquet-Ehrismann, R., Lawler, J. (1997) *In situ* Localization of Thrombospondin-1 and Thrombospondin-3 Transcripts in the Avian Embryo. *Dev. Dyn.* **208**, 326-337.
- Turitto, V.T., Weiss, H.J., Baumgartner, H.R. (1984) Platelet Interaction with Rabbit Subendothelium in von Willebrand's Disease: Altered Thrombus Formation Distinct from Defective Platelet Adhesion. *J. Clin. Invest.* **74**, 1730-1741.
- Urry, D.W. (1983) What Is Elastin; What Is Not. *Ultrastruc. Pathol.* **4**, 227-251.
- van der Rest, M., Bruckner, P. (1993) Collagens: Diversity at the Molecular and Supramolecular Levels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 437-444.
- van der Rest, M., Garrone, R. (1991) Collagen Family of Proteins. *FASEB J.* **5**, 2814-2823.

- van der Rest, M., Mayne, R. (1987) (Mayne, R. und Burgeson, R. E., eds.) Academic Press, Orlando, FL, USA, 195-221.
- Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalter, K.H., Irwin, M.I., Mayne R. (1988) D-periodic Distribution of Collagen Type IX Along Cartilage Fibrils. *J. Cell Biol.* **106**, 991-997.
- Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M.-A., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., Iruela-Arispe, M.L. (1999) METH-1, a Human Ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are Members of a New Family of Proteins with Angio-inhibitory Activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 23349-23357.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., Pawson, T. (1997) The Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinases are Activated by Collagen. *Mol. Cell.* **1**, 13-23.
- Vorm, O., Mann, M. (1994) Improved Mass Accuracy in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry of Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 955-958.
- Wagener, R., Kobbe, B., Paulsson, M. (1997) Primary Structure of Matrilin-3, a New Member of a Family of Extracellular Matrix Proteins Related to Cartilage Matrix Protein (Matrilin-1) and von Willebrand Factor. *FEBS Lett.* **413**, 129-134.
- Wagener, R., Kobbe, B., Paulsson, M. (1998 a) Matrilin-4, a New Member of the Matrilin Family of Extracellular Matrix Proteins. *FEBS Lett.* **436**, 123-127.
- Wagener, R., Kobbe, B., Paulsson, M. (1998 b). Genomic Organisation, Alternative Splicing and Primary Structure of Human Matrilin-4. *FEBS Lett.* **438**, 165-170.
- Wagener, R., Kobbe, B., Aszódi, A., Liu, Z., Beier, D.R., Paulsson, M. (2000) Structure and Mapping of the Mouse Matrilin-3 Gene (Matn3), a Member of a Gene Family Containing a U12-type AT-AC Intron. *Mamm. Genome* **11**, 85-90.
- Weber, I.T., Harrison, R.W., Iozzo, R.V. (1996) Model Structure of Decorin and Implications for Collagen Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 31767-31770.
- Weigel, P.H., Fuller, G.M., LeBoeuf, R.D. (1986) A Model for the Role of Hyaluronic Acid and Fibrin in the Early Events During the Inflammatory Response and Wound Healing. *J. Theor. Biol.*, **119**, 219-234.
- Wiberg, C. (2001) Collagen VI - Molecular Assembly and Interactions. Dissertation, Universität Lund, ISBN: 91-628-4766-X.
- Wiberg, C., Hedbom, E., Khairullina, A., Lamandé, S.R., Oldberg, Å., Timpl, R., Mörgelin, M., Heinegård, D. (2001). Biglycan and Decorin Bind Close to the N-Terminal Region of the Collagen VI Triple Helix. *J. Biol. Chem.* **276**, 18947-18952.
- Winterbottom, N., Tondravi, M.M., Harrington, T.L., Klier, F.G., Vertel, B.M., Goetinck, P.F. (1992) Cartilage Matrix Protein is a Component of the Collagen Fibril of Cartilage. *Dev. Dyn.* **193**, 266-276
- Wu, J.J., Eyre, D.R. (1998) Matrilin-3 Forms Disulfide-linked Oligomers with Matrilin-1 in Bovine Epiphyseal Cartilage. *J. Biol. Chem.* **273**, 17433-17438.
- Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R.L., Owens, R.T., Keenei, D.R., Mayne, R., Höök, A., Höök, M. (2000) Multiple Binding Sites in Collagen Type I for the Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **275**, 38981-38989.

Yabkowitz, R., Lowe, J.B., Dixit, V.M. (1989) Expression and Initial Characterization of a Recombinant Human Thrombospondin Heparin Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **264** 10888-10896.

Yamaguchi, Y. (1996) Brevican: A Major Proteoglycan in Adult Brain. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **3**, 307-317.

Yaoi, Y., Hashimoto, K., Koitabashi, H., Takahara, K., Ito, M., Kato, I. (1990) Primary Structure of the Heparin-binding Site of Type V Collagen. *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 139-145.

Yu, H., Tyrrell, D., Cashel, J., Guo, N.H., Vogel, T., Sipes, J.M., Lam, L., Fillit, H.M., Hartman, J., Mendelovitz, S., Panel, A., Roberts, D.D. (2000) Specificities of Heparin-binding Sites From the Amino-terminus and Type 1 Repeats of Thrombospondin-1. *Arch. Biochem. Biophys.* **374**, 13-23.

Yurchenco, P.D., Schittny, J.C. (1990) Molecular Architecture of Basement Membrane. *FASEB J.* **4**, 1577-1590.

Zhang, Y., Chen, Q. (2000) Changes of Matrilin Forms During Endochondral Ossification. Molecular Basis of Oligomeric Assembly. *J. Biol. Chem.* **275**, 32628-32634.

ANHANG

Sequenzen muriner Matrilin

Im Folgenden sind die in der Nukleotidsequenz-Datenbank Genebank publizierten Proteinsequenzen der murinen Matrilin aufgeführt, die dieser Arbeit zu Grunde lagen. Unter dem Namen ist die Genebank-Zugangsnummer (*accession number*) angegeben. Die Signalpeptide sind einfach, die Coiled-Coil-Domänen doppelt unterstrichen. Potentielle N-Glykosylierungs-Motive sind eingerahmt. Die rekombinant exprimierten Sequenzen der in dieser Arbeit beschriebenen **Volllängenkonstrukte** sind grau unterlegt, die der **vWFA-ähnlichen-Domänen** fett hervorgehoben.

Matrilin-1:

NM_010769.1

GI:6857809

MKVTSGPASALCSLLLLLLLLLQVPDSLSLVPQPRGHLCRTRPTDLVFVVDSSRSVRPVEFEKVKVFL
SQVIESLDVGPNATRVGLVNYASTVKPEFPLRAHGSKASLLQAVRRIQPLSTGTMTGLALQFAITKAL
SDAEGGRARSPDISKVVIVVTDGRPQDSVRDVSERARASGIELFAIGLGRVDKATLRQIASEPQDEHV
DYVESYNVIEKLAKKFQEAFCVSDLCATGDHDCEQLCVSSPGSYTCACHEGFTLNSDGKTCNVCRGG
GSGSATDLVFLIDGSKSVRPENFELVKKFINQIVDTLDVSDRLAQVGLVQYSSSIRQEFPLGRFHSSK
DIKARVRNMSYMEKGTMTGAALKYLIDNSFTVSSGARPGAQKVGIVFTDGRSQDYINDAARKAKDLGF
KMFAVGVGNAVEEELREIASEPVADHYFYTADFKTINQIGKKLQKQICVEEDPCACESILKFEAKVEG
LLQALTRKLEAVSGRLAVLENRII

Matrilin-2:

NM_016762.1

GI:7949075

MEKMLVGCLMLGQLFLVLPVDGRERPQARFPSRGRHVRMYPQTALLESSCENKRADLVFIIDSSRSV
NTYDYAKVKEFILDILQFLDIGPDVTRVGLLQYGSTVKNEFSLKTFKRKSEVERAVKMRHLSTGTMT
GLAIQYALNIAFSEAEGARPLRENVPRIIMIVTDGRPQDSVAEVAAKARNTGILIFAIGVGQVDLNTL
KAIGSEPHKDHVFLVANFSQIESLTSVFNKLCVHMCSVLEHNCAHFCLNTPGSYICKCKQGYILST
DQKTCRIQDLATEDHGCEQLCVNMLGSFVCQCYSGYTLAEDGKRCTAMDYCASENHGCEHECVNAES
SYLCRCHEGFALNSDKKTCISKIDYASSNHGCQHECVNAQTSALCRCLKGFMLNPDRKTCRRINYCAL
NKPGEHECVNTEEGHYCRCRQGYNLDPNGKTC SRVDHCAQQDHGCEQLCLNTEESFVCQCSEGF LIN
DDLKTC SRADYCLLSNHGCEYSCVNTDKSFACQCP EGHVLRSDGKTC AKLDSCALGDHGCEHSCVSSE
DSFVCQCFEGYILRDDGKTCRRKDVCQDVNHGCEHL CVNSGESYVCKCLEGFRLAEDGKRCRRKNVCK
STQHGCHEM CVNNGNSYL CRCSEGFVLAEDGKHCKRCTEGP IDLVFVIDGSKSLGEENFETVKHFVTG
IIDS LAVSPKAARVGLLQYSTQVRTEFTLRGFSSAKEMK KAVTHMKYMGKGSMTGLALKHMFERSFTQ
VEGARPPSTQVPRVAIVFTDGRAQDDVSEWASKAKANGITMYAVGVGKAIEEELQEIASPIDKHLFY
AEDFSTMG EISEKLKEGICEALEDSGGRQDSAAWDL PQQAHQPT EPEPVTIKIKDLLSCSNFAVQHRF
LFEEDNLSRSTQKLFHSTKSSGNPLEESQDOCKCENLILFONVANEEVRKLTQRLEEMTORMEALENR
LKYR

Matrilin-3:

NM_010770.1

GI:6754647

MLLSAPLRHLPGLLLLLLWPLLLLLPSLAAPGRLARASVRR LGTRVPGGSPGHLSALATSTRAPYSGGRG
AGVCKSRPLDLVFIIDSSRSVRPLEFTKVKT FVSRIIDTLDIGATDTRVAVVNYASTVKIEFQLNTYS
DKQALKQAVARITPLSTGTMSG LAIQTAMEEAFTVEAGARGPMSNIPKVAIIVTDGRPQDQVNEVAAR
ARASGIELYAVGVDRADMESLKMMASKPLEEHV FVYVETYGVIEKLSARFQETF CALDQCMLGTHQCQH
VCVSDGDGKHHCECSQGYTLNADGKTCSAIDKCALSTHGCEQICINDRNGSYHCECYGGYALNADRRT
CAALDKCASGTHGCQHICVNDGAGSHHCECFEGYTLNADKKTCSVRNKCALGTHGCQHICVSDGAVAY
HCDCFPGYTLNDDKKTCSDI EEARSLISIEDACGCGATLAFQEKVSSH LQKLNTKLDNII LKKLKVTEY
GOVHR

Matrilin-4:

NM_013592.1

GI:8567373

MRGPCCWPLSLLLLFLQSWETQLQSAGPRCYNGPLDLVFMIDSSRSVRPFEFETMRQFLVGLLRSLDV
GLNATRVGVIQYSSQVQSVFPLGAFSRREDMERAIRAVVPLAQGTMTGLAIQYAMNVAFSEAEGARPS
EERVPRVLVIVTDGRPQDRVAEVAAQARARGIEIYAVGVQRADVGSLRTMASPPLDQHVFLVESFDLI
QEFGLQFQGRLCGKDLCAELVHGCQHLCVNAPGTFYCACNSGYKLAPDNKNCLALDLCAEGTHGCEHL
CVNSVDSYFCRCRAGFALQQDQRSCRAIDYCSFGNHSQCHECVSTLAGPQCRCREGHDLLPDGRSCR
RDFCNGVDHGCEFCVSEGLSFHCLCPEGRRLLQADGKSCDRCREGHVDLVLVLDGSKSVRPQNFELVK
RFVNQIVDFLDVSPGTRVGLVQFSSRVRTFPLGRYGTAAEVKQAVLAVEYMERGTMTGLALRHMVE
HSFSEAQGARPRDLNVPRVGLVFTDGRSQDDISVWAARAKEEGIVMYAVGVGKAVEEELREIASEPSE
LHVSYPDFSTMTHLLENLKGSI CPEEGIGAGTELRS PCECESLVEFQGRTLGALESILTQNLARLTER
LEELENQLASRK

Sequenzvergleich von TSP-4 und COMP aus Ratte

Identische Aminosäuren sind schwarz **ähnliche Aminosäuren** grau unterlegt.

TSP-4 1 ~~~SEPLAATGTGDFNRQFLGQMTQLNQLLGEVKDLLRQQVKETSFLRNTIAECQACGPL
COMP 1 GQGQIPLG...GDLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRHRVKEITFLKNTVMECDACG..

TSP-4 58 SFQSPTPNTLVPIAPPAPPTRRCDSSPCFRGVRCCTDTRDGFQCGPCPDGYTGNGITC
COMP 55MQPARTPGLSVRPVALCAPGSCFPGVVCTETATGARCGPCPPGYTGNGSHC

TSP-4 118 SDVDECKYHPCYPGVRCNTLAPGFRCDACPVGFTGPMVQGVGINFAKTNKQVCTDVDECR
COMP 106 TDVNECNAHPCFPRVRCINTSPGFHCEACPPGFSGPTHEGVGLTFAKTNKQVCTDINECE

TSP-4 178 NGA..CVLNSICINTLGSYRCGPCKPGYTGQTRGC..RTERS CRNPEQNPCSVHAQCIE
COMP 166 TQHNCPNSVCVNTRGSFQCGPCQPGFVGDQRS GCQRRGQHFCDGSPSPCHEKADCIL

TSP-4 234 ERQGDVTCVCGVGWAGRAGYVCGKDVDDISYPDEELPC SARNCKKDNC KYVPNSGQEDAD
COMP 226 ERDGRS RSCVAVGWAGN..GLLCGRD TDL DGF PDEKLRCSERQCRKDCN CVTV PNSGQEDVD

TSP-4 294 RDGIGDACEDEDADGDGILNEQDNCVLTHNVDQRNTDKDIFGDACDNCRGVLNNDQKDTDG
COMP 285 RDRIGDACP DADGDGVPNEQDNCPLVRNPDQRNSDKDKWGDACDNCRSQKND DQKDTDR

TSP-4 354 DGKGDACDDDMGDGINKNILDNCPRVPNRDQQRDGDGVGDACDSCPDVSNPNQSDVDND
COMP 345 DGQGDACDDIDGDRI RNVADNCPVPNFQSDSDGDGVGDACDNC PQKDNPDQRDVVDHD

TSP-4 414 LVGDCDINQDSGDGHQDSTDNCPTVINSAQLD TDKDGIGDECD DDDNDGMPDLFP PG
COMP 405 FVGDACDSDQDQDGDGHQDSR DNCPTVPNSAQDSDHDGKGDACDDDDNDGVDP.....S

TSP-4 474 PDNCR LVPNPAQEDSNNDGVGDI CEADFQDKVIDRIDVCPENAEITL TDFRAYQTVVLD
COMP 461 RDNCR LVPNPGQEDNDRDGVGDACQGFADKVIDKIDVCPENAEVTL TDFRAFQTVVLD

TSP-4 534 PEGDAQIDPNWVVLNQGMEIVQTMNSDPGLAVGYTAFNGVDFEGTFHVNTQTDDDYAGFI
COMP 521 PEGDAQIDPNWVVLNQGMEIVQTMNSDPGLAVGYTAFNGVDFEGTFHVNTATDDDYAGFI

TSP-4 594 FGYQDSSSFYVVMWKQTEQTYWQATPFRAVAEPGIQLKAVKSKTGPGEHLRNSLWHTGDT
COMP 581 FGYQDSSSFYVVMWKQMEQTYWQANPFRAVAEPGIQLKAVKSKTGPGEQLRNALWHTGDT

TSP-4 654 SDQVRL LWKDSRNVGWKDKVSYRWFLQHRPQVGYIRVRFYEGSELVADSGVTIDT TMRGG
COMP 641 ASQVRL LWKDPRNVGWKDKTSYRWFLQHRPQVGYIRVRFYEGPELVADSNVVD TMRGG

TSP-4 714 RLGVFCFSQENI IWSNLKYRCNDTIPEDFQEFQIQTFDRLDN
COMP 701 RLGVFCFSQENI IWANLKYRCNDTIPEDYERHRLRRA~~~~~

ABSTRACT

Matrilins and thrombospondins are multimeric proteins of the extracellular matrix. It has been suggested, that they are involved in connecting different matrix components and the assembly of collagen fibrils. Therefore an importance in the regulation of the morphological and mechanical properties of connective tissues is assumed. Matrilins are able to form autonomous networks, that could participate in the morphogenesis of the corresponding tissue. So far the members of the two protein families were not completely characterized concerning molecular structure and their interactions with other proteins of the extracellular matrix.

Purification of recombinantly expressed proteins and purification of proteins from tissue extracts, both under native conditions, allowed characterization that led to models of the matrilins regarding oligomerization and appearance in transmission electron microscopy. In addition to their homooligomers, heterooligomers of matrilin-1 and matrilin-3 were discovered in extracts of fetal bovine epiphyseal cartilage that could have a function in fine-tuning of the matrilin properties. In addition, collagen V and fibronectin were found to be ligands of matrilin-3 and matrilin-4.

The structures of recombinantly expressed thrombospondin-4 (TSP-4) and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) were characterized using the transmission electron microscope. Interactions between TSP-4 and collagen I and between COMP and collagen IX were described. Presumably, the latter interaction is of relevance for the development of chondrodysplasias.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Matrilin und Thrombospondine sind multimere Proteine der extrazellulären Matrix, von denen man annimmt, daß sie eine Rolle bei der Verbindung verschiedener Matrixkomponenten und bei der Entstehung von Kollagenfibrillen innehaben und damit entscheidend bei der Bestimmung der morphologischen und mechanischen Eigenschaften des entsprechenden Gewebes mitwirken. Matrilin, besitzen die Eigenschaft autonome Netzwerke zu bilden, die an der Strukturgebung des jeweiligen Gewebes teilnehmen könnten. Bislang sind noch nicht alle Mitglieder der beiden Proteinfamilien in Hinsicht auf ihre molekulare Struktur und ihre Wechselwirkungen vollständig charakterisiert.

Rekombinante Expression von Matrilinen und ihre Reinigung aus Gewebeextrakten ermöglichte Untersuchungen, die zu einem abschließenden Bild der Matrilin bezüglich ihres Oligomerisierungsgrades und ihres Erscheinungsbildes im Transmissionselektronenmikroskop führten. In fötalen Rinderepiphysen wurden, neben ihren Homooligomeren, Heterooligomere aus Matrilin-1 und Matrilin-3 entdeckt, die auf eine Feinregulierung der Matrilinseigenschaften schließen lassen. Außerdem wurden Kollagen V und Fibronectin als Wechselwirkungspartner des Matrilin-3 und Matrilin-4 identifiziert.

Rekombinant exprimiertes Thrombospondin-4 (TSP-4) und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) wurden ebenfalls im Elektronenmikroskop strukturell charakterisiert. Die Wechselwirkung zwischen TSP-4 und Kollagen I und die zwischen COMP und Kollagen IX wurden hier nachgewiesen. Die Interaktion zwischen COMP und Kollagen IX steht wahrscheinlich in Verbindung mit einer Familie von Knorpeldysplasien.

LEBENS LAUF

Name: Nitsche

Vorname: Daniel Patric

geb. am: 8. Februar 1969

in: Köln, Bundesrepublik Deutschland

wohnhaft in: Werther Straße 2
D-51145 Köln

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig, zwei Kinder

Schulbildung: 1975-1979 Grundschule, Frechen
1979-1985 Realschule, Frechen
1985-1988 Gymnasium, Köln

Wehrdienst: 1.10.88 - 31.12.89

Universität: seit 1.4.1990 Universität zu Köln
1.6.1997 - 1.2.1999 studentische/wissenschaftliche
Hilfskraft bei Prof. Dr. med. M. Paulsson am Institut für
Biochemie II der Medizinischen Einrichtungen der
Universität zu Köln
6.10.1997 Diplom im Fach Chemie
seit 1.2.1999 bis heute wissenschaftlicher Mitarbeiter bei
Prof. Dr. med. M. Paulsson am Institut für Biochemie II der
Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln

TEILPUBLIKATIONEN

Zeitschriftenbeiträge

geteilte Erstautorenschaft:

Klatt, A.R., Nitsche, D.P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2000) Molecular Structure and Tissue Distribution of Matrilin-3, a Filament-forming Extracellular Matrix Protein Expressed During Skeletal Development. *J. Biol. Chem.* **275**, 3999-4006.

Mitautorenschaft:

Segat, D., Frie, C., Nitsche, D.P., Klatt, A.R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M., Smyth, N. (2000) Expression of Matrilin-1, -2 and -3 in Developing Mouse Limbs and Heart. *Matrix Biol.* **19**, 649-655.

Narouz-Ott, L., Maurer, P., Nitsche, D.P., Smyth, N., Paulsson, M. (2000) Thrombospondin-4 Binds Specifically to Both Collagenous and Non-collagenous Extracellular Matrix Proteins via Its C-terminal Domains. *J. Biol. Chem.* **275**, 37110-37117.

Thur, J., Rosenberg, K., Nitsche, D.P., Pihlajamaa, T., Ala-Kokko, L., Heinegård, D., Paulsson, M., Maurer, P. (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.

Klatt, A.R., Nitsche, D.P., Kobbe, B., Paulsson, M., Wagener, R. (2001) Molecular Structure, Processing and Tissue Distribution of Matrilin-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 17267-17275.

Wuttke, M., Müller, S., Nitsche, D.P., Paulsson, M., Hanisch, F.G., Maurer, P. (2001) Structural Characterization of Human Recombinant and Bone-derived Bone Sialoprotein (BSP) Functional Implications for Cell Attachment and Hydroxyapatite Binding. *J. Biol. Chem.* **elektronische Vorpublikation**

Posterbeiträge

Klatt, A.R., Nitsche, D.P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R., Structural characterisation and tissue distribution of matrilin-3. *XVI. FECTS-Meeting*, 1.-6.8.1998, Uppsala (S).

Nitsche, D.P., Klatt, A.R., Kobbe, B., Paulsson, M., Wagener, R., Structural characterisation and tissue distribution of matrilin-4. *XVII. FECTS-Meeting*, 1.-5.7.2000, Patras (GR).

ERKLÄRUNG

Ich versichere, daß die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, daß die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat, daß sie - abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie daß ich eine solche Veröffentlichung vor Ablauf des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. M. Paulsson betreut worden.

Köln, den

DANKE

Raimund Wagener und Mats Paulsson danke ich herzlich für die hervorragende Betreuung, Matthias Mörgelin für die Anleitung und praktische Hilfe in der Elektronenmikroskopie. Bei Herrn Prof. H. W. Klein bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Andreas Klatt, Birgit Kobbe danke ich für die Zusammenarbeit und die schöne Zeit in unserer Arbeitsgruppe. Ebenso wie den anderen Kollegen, von denen ich hier nur einige namentlich erwähnen kann. Danke der Thrombospondin-Gruppe: Silke 'ELISA' Gösling, Patrik Maurer, Laila Narouz-Ott (Die klangliche Untermalung ist gern geschehen!) und Jochen Thur.

Für die freundliche Unterstützung aus der Arbeitsgruppe von Prof. K. Addicks, deren Elektronenmikroskop ich benutzen durfte, bedanke ich mich bei Christian Hoffmann, Eveline Janßen und Michael Reiner.

Dank auch an die Mittagessen-Runde (Brigitte Kaufmann *et al.*) für wertvolle Diskussionen.

Auch bei meinen treuen Freunden möchte ich mich herzlich bedanken und bei meiner Familie für ihre Geduld und Liebe. Danke Mathilda und Liliane!

Euer Patric