

Kollagen XXII - Charakterisierung eines neuen Markers an Gewebegrenzen

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



vorgelegt von

Jörg Schulze

aus Kaiserslautern

Köln, Oktober 2005

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Institut für Biochemie II (Direktor: Prof. Dr. Mats Paulsson), unter der Betreuung von Prof. Dr. Mats Paulsson, angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans-Günther Schmalz

Tag der Disputation: 16. Januar 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	6
Abstract	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Kollagene.....	10
1.1.1 FACIT Kollagene.....	13
1.1.1.1 Struktur der FACIT Kollagene.....	13
1.1.1.2 Nicht-Kollagen Domänen in FACIT Kollagenen.....	15
1.1.1.2.1 Thrombospondindomäne und seine Lokalisation.....	15
1.1.1.2.2 Fibronektin Typ III Motiv.....	15
1.1.1.2.3 von-Willebrand-Faktor-A ähnliche Domänen.....	16
1.1.1.2.4 „Coiled-Coil“ Domänen.....	17
1.1.1.3 Verteilung der FACIT Kollagene im Organismus.....	18
1.1.1.4 Involvierung von FACIT Kollagenen in pathologische Zustände ..	18
1.1.1.5 Interaktion der FACIT Kollagene mit anderen Proteinen.....	19
1.1.1.5.1 Integrine als Kollagenrezeptoren.....	19
1.1.1.5.2 Weitere Kollagenrezeptoren.....	21
1.2 Der Muskel-Sehnen-Ansatz.....	23
1.3 Knorpel.....	26
1.4. Modellorganismen – Maus und Zebrafisch.....	27
1.4.1 Morpholino “Antisense” Oligonukleotide.....	28
Ziele der Arbeit	29
2. Ergebnisse	30
2.1. Entdeckung, Domänenstruktur und genomische Organisation	
von Kol XXII.....	30
2.1.1 Kol XXII: Ein neues FACIT-Kollagen.....	30
2.1.3 Domänenorganisation von Kol XXII.....	31
2.1.4 Organisation des COL22A1 Gens.....	34
2.1.5 Vergleich von Kol XXI und Kol XXII.....	35

2.1.6 Verwandtschaft der Kol XXII Domänen zu Domänen anderer Proteine	36
2.2. Verteilung von Kol XXII mRNA und Protein in Geweben.....	38
2.2.1 Northern Blot Analyse von Kol XXII in humanen Geweben	38
2.2.2 Herstellung von Antikörpern.....	40
2.2.2.1 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die NC1 Region	40
2.2.3 Kol XXII in Gewebextrakten	41
2.2.4 Immunhistochemische Untersuchungen	43
2.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	45
2.2.6 Herstellung eines zweiten Antikörpers gegen die NC1 Domäne.....	46
2.2.7 Generierung eines Antikörpers gegen die NC5 Domäne	47
2.2.8 Verteilung von Kol XXII während der Embryonalentwicklung	48
2.2.9 <i>In situ</i> Detektion von Kol XXII mRNA.....	52
2.3. Biochemische Charakterisierung von Kol XXII	53
2.3.1 Expression von rekombinantem humanen Kol XXII	53
2.3.2 Elektronenoptische Analyse.....	56
2.3.3 Interaktion von Kol XXII mit Integrinen.....	57
2.3.3.1 Integrin Bindungsstudien.....	57
2.3.3.2 Interaktion von Kol XXII mit Integrin-exprimierenden Zellen.....	59
2.3.3.3 Abhängigkeit der Integrinbindung von tripelhelikaler Konformation.....	60
2.3.3.4 Blockierung des Zell-Attachments durch einen β 1-Integrin inhibierenden Antikörper	62
2.4. In vivo Studien zu Kol XXI	64
2.4.1. Kol XXII defiziente Mauslinie	64
2.4.1.1 Klonierung des "Gene-Targeting" Konstrukts	64
2.4.1.2 ES cell work	65
2.4.2 Kollagen XXII im Zebrafisch.....	68
2.4.2.1 Zebrafisch als Modellorganismus für Kol XXII in vivo Studien.....	68
2.4.2.2 Identifikation von Kol XXII im Zebrafisch	68
2.4.2.3 Kol XXII in anderen Spezies.....	71
2.4.2.4 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Zebrafisch Kol XXII	71

2.4.2.5 Verteilung von Kol XXII im Zebrafisch	72
2.4.2.6 Kol XXII Expression während der Zebrafiscentwicklung	74
2.4.2.7 Morpholino „Knockdown“ Experimente.....	76
3. Diskussion	78
3.1 Kollagen XXII: Ein neues FACIT Kollagen	78
3.1.1 Untersuchung der „Coiled-Coil“ Region	79
3.1.2 Unterschiede zwischen Kol XXII und Kol XXI	80
3.1.3 Homologie zwischen VWA Domänen	81
3.1.4 Molekülstruktur von Kol XXII.....	81
3.2. Kol XXII Lokalisation im Organismus	82
3.2.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopische Untersuchungen	83
3.2.2 Kol XXII Expression in neonatalen Mäusen.....	83
3.2.3 Kollagen XXII Verteilung im Mausembryo	85
3.3 Interaktion von Kollagen XXII mit Integrinen	89
3.4 In-vivo Untersuchungen	91
3.4.1 Kollagen XXII defiziente ES-Zelllinie.....	91
3.4.2.1 Kollagen XXII im Zebrafisch.....	92
3.4.2.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen im adulten Zebrafisch	92
3.4.2.3 Morpholino „Knockdown“-Experimente	94
Ausblick	95
4. Material und Methoden	96
4.1. Allgemeine Reagenzien	96
4.1.1 Protein und DNA Standards.....	96
4.1.2 Liste der verwendeten Antikörper	96
4.1.3 Bakterienstämme.....	97
4.1.4 Bakterientransformation.....	97
4.1.5 Säugerzellen.....	97
4.1.6 Eukaryotischer Expressionsvektor	97
4.1.7 Vektor zur bakteriellen Proteinexpression.....	98
4.1.8 Sequenziervektor.....	98
4.1.9 „Gene-Targeting“ Vektor	98
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	99
4.2.1 cDNA Isolation	99
4.2.2 Plasmid-DNA Isolierung.....	99

4.2.3 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	99
4.2.4 Messung von DNA and RNA Konzentrationen	99
4.2.5 cDNA Synthese	99
4.2.6 Polymerase chain reaction (PCR).....	100
4.2.6 Isolation von Zebrafisch mRNA	100
4.2.7 Isolation der Gesamt-RNA aus Mausgeweben	101
4.2.9. Nested PCR.....	101
4.1.10 Zebrafish Morpholino „Knockdown“	102
4.3 Biochemische Methoden	102
4.3.1 Expression von rekombinantem Kol XXII.....	102
4.3.2. Elektronenmikroskopische Studien.....	103
4.3.3 Generierung des Antikörpers R34 gegen die NC1 Domäne	103
4.3.4 Generierung des Antikörpers NC1GP gegen die NC1 Domäne	103
4.3.5 Generierung des Antikörpers NC5 gegen die NC5 Domäne.....	104
4.3.6 Generierung des Antikörpers zVWA gegen die Zebrafisch VWA-Domäne.....	104
4.3.7 Gewebeextrakte von Kol XXII	104
4.3.8 Zebrafisch Gewebeextrakte	104
4.3.9 „Solid Phase Ligand Binding Assay“	104
4.3.9 Zell-Adhäsionsassay.....	105
4.4. Immunhistochemie	105
4.4.1 Immunodetektion von Kol XXII in Mäusen	105
4.4.2 Immunodetektion von Kol XXII in Zebrafisch	106
4.4.3 In situ Detektion of Kol XXII mRNA.....	106
4.4.4 Zebrafisch „Whole Mount“ <i>in situ</i>	106
4.5 Bioinformatische Analysen	106
4.5.1 „Coiled-Coil“ Vorhersagen	106
4.5.2 Genomische Organisation des <i>COL22A1</i> Gens	106
4.2.3 Phylogenetische Bäume	107
4.6 „Gene-Targeting“ Protokolle	107
4.6.1 Mitomycin-Behandlung embryonaler Fibroblasten.....	107
4.6.2 Kultur von embryonalen Stammzellen	108
4.6.3 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen	108
4.6.4 Einfrieren von embryonalen Stammzellen	109

4.6.5 Isolation genomischer ES Zell DNA.....	109
4.6.7 Southern Blot.....	109
4.6.8 Herstellung von Southern Blot Sonden.....	109
4.6.9 ES Zell karyotypisierung.....	109
4.6.10 Isolating DNA von Maus Schwänzen.....	109
Literaturverzeichnis	110
Anhang	119
Danksagung	121
Erklärung	122
Lebenslauf	123

Zusammenfassung

Kollagen XXII ist ein neu entdecktes Protein, das hauptsächlich an Gewebegrenzen lokalisiert ist. Dieses Protein wurde bei einer Suche nach neuen Kollagenen in der EST Datenbank gefunden und durch anschließende Klonierung und Sequenzierung wurde die komplette cDNA Sequenz des Proteins ermittelt. Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ging hervor, dass Kollagen XXII neben tripelhelikalen Sequenzen eine von-Willebrand-Faktor-A-ähnliche Domäne sowie ein Thrombospondin-Motiv und zwei „Coiled-Coil“-Regionen besitzt. Aufgrund dieser strukturellen Merkmale wurde das neue Kollagen in die Familie der FACIT-Kollagene eingeordnet.

Die Verteilung von Kollagen XXII wurde im Organismus zunächst auf mRNA Ebene untersucht. Hierbei konnte eine Expression hauptsächlich in Herz und Muskel gezeigt werden. Nähere Untersuchungen auf Proteinebene, mit neu hergestellten polyklonalen Antikörpern, ergaben in neugeborenen Mäusen eine sehr distinkte Lokalisation von Kol XXII an Muskel-Sehnen Ansätzen und an der Oberfläche des Gelenkknorpels. Dieses Expressionsmuster konnte mit *in situ* Hybridisierungen, welche auch die Expression von Kollagen XXII durch Muskelzellen zeigten, bestätigt werden.

Die Verteilung von Kollagen XXII wurde während der Entwicklung untersucht. Hier konnte schon ab E8,5, eine permanente Lokalisation im Bereich der Somiten festgestellt werden. Später kann Kollagen XXII in den Vorläufern der gleichen Gewebe gefunden werden, in denen es auch im erwachsenen Tier lokalisiert ist. Aufgrund der co-Expression mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. *MyoF*, *FGF4* und anderen, wird eine Regulation durch diese Moleküle vermutet.

Kollagen XXII besitzt kein typisches Bindemotiv für kollagenbindende Integrine. Trotzdem zeigte sich Kollagen XXII als ein außergewöhnlich guter Ligand für verschiedene Mitglieder dieser Gruppe. Die integrinbindende Region innerhalb des Proteins konnte identifiziert werden.

Kollagen XXII konnte noch in anderen Vertebraten gefunden werden. Um die Funktion des Proteins *in vivo* zu untersuchen wurde eine Kollagen XXII defiziente ES-Zelllinie hergestellt, sowie ein Zebrafisch Morpholino „Knockdown“ generiert und analysiert. Um die Ergebnisse aus der Maus zu bestätigen wurde hier zunächst die Verteilung von Kollagen XXII mRNA und Protein, sowohl im erwachsenen als auch sich entwickelnden Zebrafisch untersucht. Hierbei zeigte der Fisch ein sehr ähnliches Expressionsmuster wie in der Maus. Zusätzlich konnte hier Kollagen XXII im Mesencephalon und Auge, sowie Kiemen und *Chorda dorsalis* detektiert werden. Bei der Analyse des Morpholino „Knockdowns“ zeigten sich drastische Veränderungen im Phänotyp, die auffälligsten sind hier eine Verdrehung und Deformation der Wirbelsäule, sowie Wachstums- und Koordinationsstörungen.

Abstract

Collagen XXII is a novel collagen, localized mainly at tissue junctions, which was found in a search for new collagens in the EST Database. Subsequent cloning and sequencing yielded the cDNA sequence from which the amino acid sequence was derived. In addition to the collagenous domain a von-Willebrand-Factor-A like Module, a thrombospondin-like domain and two coiled-coil motives are present. Because of these structural features Collagen XXII was added to the family of FACIT collagens.

Initially the tissue distribution of Collagen XXII in the organism was determined on mRNA level. Expression could be detected mainly in heart and skeletal muscle. Detailed studies on the protein level, performed with newly generated polyclonal antibodies, demonstrated a very restricted expression pattern limited to the myotendinous junction and the surface of articular cartilage. This pattern was confirmed by *in situ* hybridization studies, which also demonstrated an expression of Collagen XXII by muscle cells.

In the mouse embryo Collagen XXII can be detected from E8.5 onwards. The early expression is restricted to the developing somites, in later stages Collagen XXII signals can be detected in the progenitors of the same tissues, in which the protein is found in the adult mouse. Due to co-expression of Collagen XXII and various growth factors like MyoF, FGF4 and others, a regulation by these molecules is assumed.

Even though a typical motive for integrin binding cannot be found in Collagen XXII, this protein was found to be an exceptionally good ligand for collagen-binding integrins. The location of the integrin binding site within the Collagen XXII molecule was determined.

Many other vertebrates also express Collagen XXII. To study its *in vivo* function a Collagen XXII deficient ES cell line was established and zebrafish morpholino knockdown experiments were analyzed.

To confirm the results, gained from experiments in mouse, the distribution of Collagen XXII mRNA and protein was analyzed in the adult and embryonic zebrafish. The fish showed a very similar expression pattern as seen before in mouse, but additional signals could be detected in mesencephalon, eye, gills and notochord. The analysis of the morpholino knockdown showed a dramatically altered phenotype. The most striking features were the deformation of the vertebrae, retarded development and altered motion and coordination.

Abkürzungsverzeichnis

Gene humaner Kollagene werden mit z.B: COL22A1 abgekürzt, während das Maus Ortholog mit col22A1 abgekürzt wird. Hierbei steht das COL für Kollagen, 22 für die Nummer innerhalb der Proteinfamilie und das A1 für die erste Alpha-Kette.

min.	Minute
sek.	Sekunde
µl	Mikroliter
α-	anti-
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BLAST	basic local alignment search tool
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
COL/ col	Kollagen
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post conceptum, Tage nach der Befruchtung
E	Embryonalstadium (entspricht dpc)
ECM	Extrazelluläre Matrix
ES	Embryonale Stammzelle
EST	Exprimierter Sequenzabschnitt
FACIT	Fibrillen assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fig.	Figur
Fn3	Fibronektin Typ III
GAG	Glucosaminoglycan
Gly	Glycin
GP	Meerschweinchen
h	Stunden
k	tausend
kb	Kilobasen
kDa	KiloDalton
Kol	Kollagen
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm

mRNA	messenger RNA
Myo	Myogenese
n	Stichprobenumfang
N	Asn, Asparagin
NC	Nicht-Kollagen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
P	Postnataltag
Pax	Paired box
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
pg	Pikogramm
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
S	Ser, Serin
Shh	Sonic hedgehog
Sox	Sry like HMG box gene
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TSPN	Thrombospondin
U	units, Einheit der Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
UTR	Untranslated Region, nicht translatierte Region
VWA	Von-Willebrand-Faktor-A
Wnt	Wingless/ int-1 Gen Produkt
wt	Wildtyp
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

1. Einleitung

1.1 Kollagene

Rund 30% unserer Proteinmasse wird von Kollagenen gebildet; sie sind damit die am meisten vorkommenden Proteine im Tierreich. Hierbei spielen diese extrazellulären Matrixproteine hauptsächlich eine wichtige Rolle bei der Struktur von Bindegeweben.

Die wichtige Rolle der Kollagene für den Organismus wird auch durch ein großes Spektrum von Krankheiten, die durch Mutationen in den verschiedenen Kollagengenen ausgelöst werden, verdeutlicht. Bis heute sind in nur 27 der 42 bekannten Kollagengene mehr als 1300 Mutationen bekannt, die zum Teil für verschiedene Krankheiten verantwortlich, z. B. sind für Kollagen (Kol) I über 50 Mutationen bekannt, die zu verschiedenen milden oder starken Formen der Osteogenesis imperfecta (Glasknochenkrankheit) führen. Hierdurch wird das Interesse und die Wichtigkeit der Forschung, auch an den bisher weniger untersuchten Kollagenen verdeutlicht (Myllyharju and Kivirikko, 2001, 2004).

Mitglieder dieser Proteinfamilie werden alle über ein gemeinsames Strukturmerkmal definiert: Die trimere Struktur aus drei strukturell ähnlichen α -Ketten, entweder als Homo- oder als Heterotrimer, aus zwei oder drei verschiedenen Ketten; und das Vorhandensein mindestens einer Domäne mit aufeinander folgenden Gly-X-Y Wiederholungen in der Aminosäurekette, das heißt ein Glycin gefolgt von zwei variablen Aminosäuren.

Eine einzelne α -Kette nimmt eine linksgängige Helixkonformation an und bildet mit zwei α -Helices eine sehr eng gewundene, schnurähnliche rechtsgängige Tripelhelix aus. Diese enge Struktur ist verantwortlich für die Zugfestigkeit des Kollagens.

Um die enge Struktur der Kollagenhelix auszubilden, ist es notwendig, dass ein Glycin an jeder dritten Stelle vorkommt, während die Positionen X und Y des Gly-X-Y Triplets variabel sind. X wird jedoch sehr häufig von Prolin und Y von 4-Hydroxyprolin eingenommen, wodurch die Rotation der Polypeptidkette limitiert wird.

Bisher sind 28 verschiedene Kollagene bekannt. Jedoch besitzen auch andere Proteine Kollagenmotive, sind aber nicht als solche benannt, da sie über andere Strukturmerkmale oder Domänen anderen Proteinfamilien zugeordnet werden (Myllyharju and Kivirikko, 2001, 2004; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005). Außer den rein fibrillären Kollagenen besitzen alle anderen Mitglieder der Kollagenfamilie zusätzliche Domänen, wie z. B. transmembrane Domänen, (Kol XIII, XXIII, u.a.), Bindungsdomänen (Kol IV, VI, u.a.) oder Domänen, die freigesetzt werden können („shedded-domains“ in

Kol XVIII, u.a.) (van der Rest and Garrone, 1991; Brown and Timpl, 1995; Rehn and Pihlajaniemi, 1995; Peltonen et al., 1999). Diese Domänen machen es möglich, dass Kollagenmoleküle - neben der Rolle als Strukturproteine – auch regulatorische Aufgaben im Organismus wie z.B. bei Verankerung, Chemotaxis und Migration von Zellen übernehmen. Des Weiteren sind Mitglieder der Proteinfamilie an Geweberestrukturierungen während der Entwicklung, Differenzierung, Morphogenese, Wundheilung und vielen pathologischen Zuständen (Myllyharju and Kivirikko, 2001, 2004; Ricard-Blum and Ruggiero, 2005) beteiligt.

Aufgrund ihrer Domänenorganisation oder der Strukturen die sie ausbilden, können die Kollagene in verschiedene Unterfamilien eingeordnet werden.

Seit dem Abschluss des „Human Genome Projects“ und Genomprojekte anderer Spezies, wurden in den letzten Jahren bei Suchen innerhalb der Genome neun weitere Kollagene aus verschiedenen Unterfamilien identifiziert und erstmalig beschrieben (Kol XX-XXVIII) (Fitzgerald and Bateman, 2001; Koch et al., 2001; Hashimoto et al., 2002; Sato et al., 2002; Tuckwell, 2002; Banyard et al., 2003; Boot-Handford et al., 2003; Koch et al., 2003; Osada et al., 2005).

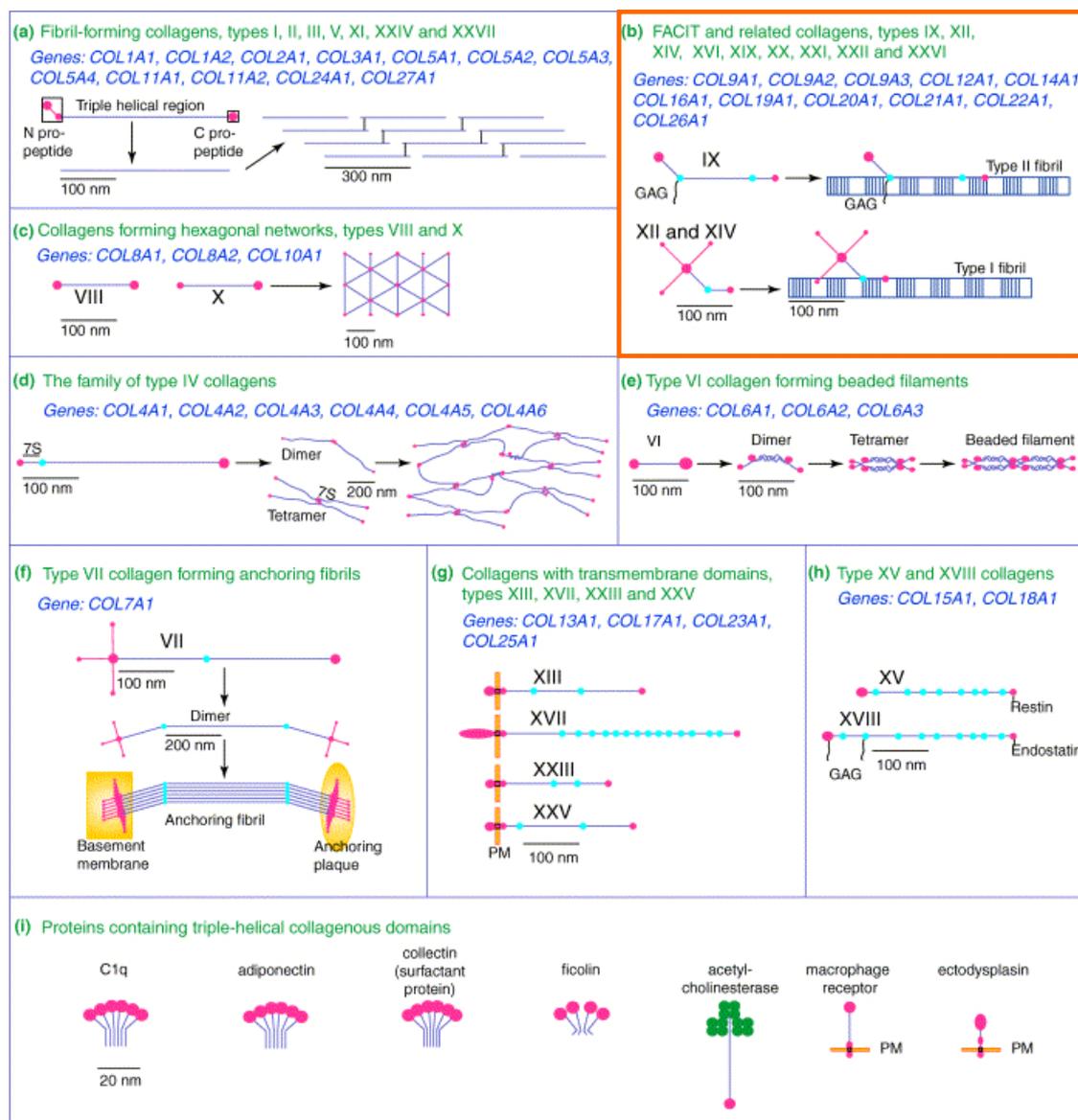


Fig. 1.1: Die Proteinfamilie der Kollagene

Anhand der Strukturen die von ihnen gebildet werden und anderer Merkmale können die Kollagene in neun verschiedene Unterfamilien unterteilt werden: (a) Fibrillen-bildende Kollagene, (b) Fibrillen-assoziierte Kollagene mit unterbrochenen Tripelhelices (FACIT Kollagene) und mit ihnen strukturell verwandte Kollagene (hervorgehoben in Orange), (c) Kollagene, die hexagonale Netzwerke bilden, (d) die Familie der Kol IV und verwandten Kollagene der Basalmembranen, (e) Kol VI, ein perlenkettenartige Filamente bildendes Kollagen, (f) Kol VII, Verankerungsfibrillen der Basalmembranen in der Haut bildende Kollagene, (g) transmembrane Kollagene und (h) Kol XV und Kol XVIII, die Vorläufer der Angiogenese Faktoren Restin und Endostatin sind. - Die Genfamilie umfasst 42 Gene (blaue Schrift). (i) Des Weiteren findet man zusätzliche Proteine, welche Kollagendomänen besitzen aber nicht als Kollagene definiert werden (Abbildung verändert aus (Myllyharju and Kivirikko, 2004)).

1.1.1 FACIT Kollagene

Unter den in letzter Zeit beschriebenen Kollagenen finden sich auch drei neue Mitglieder der FACIT (Fibril Associated Collagens With Interrupted Triple Helices) oder FACIT verwandten Kollagene: Kol XIX, XX und XXI (Fitzgerald and Bateman, 2001; Koch et al., 2001; Koch et al., 2004).

Die FACIT Familie bildet innerhalb der Kollagene mit bisher neun Mitgliedern die zahlenmäßig größte Unterfamilie (Kollagene IX, XII, XIV, XVI; XIX, XX, XXI und jetzt Kol XXII). Diese Kollagene bilden selber keine Polymere aus, sondern sind zum Teil mit Kollagenfibrillen assoziiert, wobei das bisher nur für die drei „klassischen“ FACIT Kollagene gezeigt werden konnte, Kol IX, XII und XIV (Keene et al., 1991; Brown et al., 1993; Ruggiero et al., 1993). Von den bislang publizierten Daten über die „neuen“ FACIT Kollagene konnte keine Fibrillenassoziiierung gezeigt werden. Trotzdem werden diese Kollagene wegen ihrer strukturellen Verwandtschaft dieser Proteinfamilie zugeordnet.

1.1.1.1 Struktur der FACIT Kollagene

Eine typische Eigenschaft der FACIT Kollagene ist ihr modularer Aufbau aus alternierenden nicht-tripelhelikalen Regionen (non-collagenous, NC) und tripelhelikalen (collagenous, COL) Domänen. Alle haben eine kurze, ca 100 Aminosäuren lange COL1 Domäne mit zwei Unregelmäßigkeiten der *Gly-X-Y* Triplets, welche auch ein Definitionsmerkmal für neue FACIT Kollagene ist, gemeinsam. Sequenzvergleiche zwischen den einzelnen Mitgliedern der Proteinfamilie zeigen, dass die COL Domänen typischerweise von kleineren NC-Abschnitten oder Fehlern in einzelnen *Gly-X-Y* Triplets unterbrochen sind (Shaw and Olsen, 1991; van der Rest et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass diese Unterbrechungen in den COL Domänen für die Flexibilität der FACIT Moleküle verantwortlich sind (Myers et al., 2003).

Am Übergang der letzten NC Domäne vor dem C-Terminus in die COL Domäne finden sich immer zwei Cysteinreste, einer innerhalb der NC-, der andere innerhalb der COL Domäne. Diese Cysteinreste sind für intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken zuständig und stabilisieren die tripelhelikale Struktur (Mayne et al., 1985; Gordon et al., 1989; Dublet and van der Rest, 1991).

Vor allem die NC Domänen sind in ihrer Anzahl und Größe sehr variabel, so dass die FACIT Kollagene ein breites Größenspektrum besitzen; das kleinste ist Kol IX mit 921 Aminosäureresten, während die größte Splicevariante von Kol XII 3061 Reste aufweist.

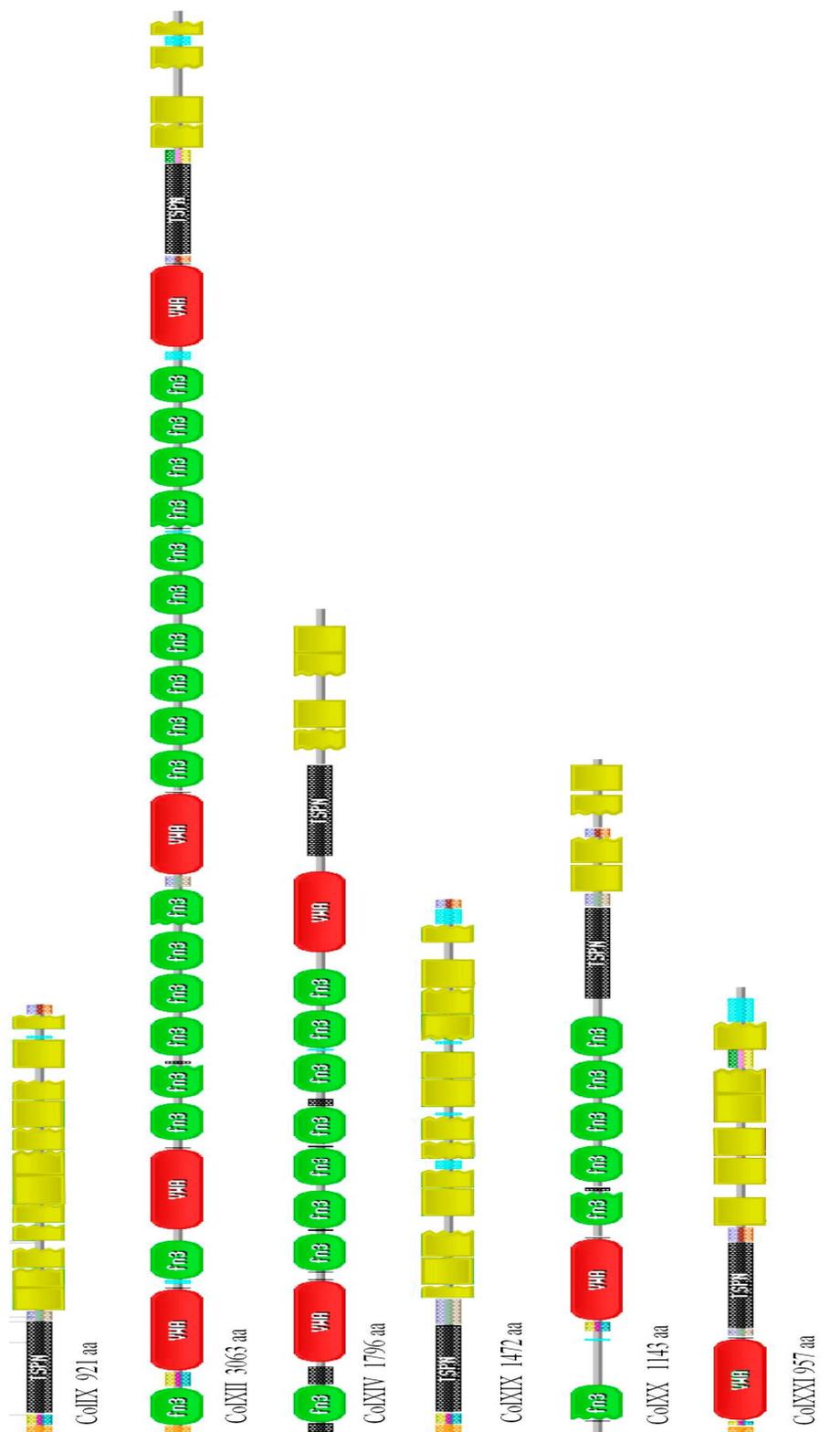


Fig. 1.2: Domänenvergleich der FACIT Kollagene. Typische Motive sind die von Willebrand Faktor-A Domäne (VWA, rot) und Fibronectin Typ III Motive (fn3, grün). Eine Thrombospondin-Domäne (TSPN, schwarz) findet sich in allen FACIT Kollagenen in Nachbarschaft der Kollagenomänen (gelb).

1.1.1.2 Nicht-Kollagen Domänen in FACIT Kollagenen

Neben den vorher erwähnten obligatorischen und charakteristischen Kollagendomänen kommen vier weitere Domänen in den FACIT Kollagenen vor. Diese Motive sind hierbei nicht auf die Mitglieder dieser Proteinfamilie beschränkt, sondern kommen auch in anderen extra- sowie intrazellulären Proteinen vor: 1.) Die Thrombospondin (TSPN) Domäne; 2.) Fibronectin Typ III (fn3) Motive; 3.) die von Willebrand Faktor A (VWA) ähnliche Domäne und 4.) das „Coiled-Coil“ Motiv.

1.1.1.2.1 Thrombospondindomäne und seine Lokalisation

Eine charakteristische strukturelle Gemeinsamkeit aller FACIT Kollagene ist eine Thrombospondindomäne von rund 200 Aminosäuren in direkter Nachbarschaft der COL Domäne. Dieses Motiv ist homolog zur N-terminalen Heparin Bindungsstelle in Thrombospondin. Es wird vermutet, dass diese Glycoproteindomäne innerhalb von Thrombospondin für Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen dient (Moradi-Ameli et al., 1994).

Über die genaue Funktion der Thrombospondindomänen in FACIT Kollagenen ist, trotz der ubiquitären Verbreitung innerhalb der Familie, bisher nichts bekannt.

1.1.1.2.2 Fibronectin Typ III Motiv

Fibronectin-Typ-III (fn3)- Repeats kommen ebenfalls häufig in FACIT Kollagenen vor. Ursprünglich wurden Fibronectine (Multidomänen–Glykoproteine) in löslicher Form in Plasma und unlöslich in Bindegewebe und Basalmembranen gefunden (Skorstengaard et al., 1986). Diese Proteine besitzen drei sich wiederholende Domänen (Typ I, II und III) in mehreren Kopien, welche mit einer Reihe von anderen Moleküle interagieren, darunter Heparin, Kollagen und Fibrin, sowie spezielle auf Zelloberflächen lokalisierte Fibronectinrezeptoren, darunter auch eine Subfamilie der Integrine (Gulcher et al., 1989). Das fn3 Motiv ist eine rund 100 Aminosäurereste große Region mit immunglobulinähnlicher Faltung (Skorstengaard et al., 1986). fn3-ähnliche Module findet man in verschiedenen Proteinfamilien wie z.B. anderen ECM Proteinen, Rezeptoren auf Zelloberflächen, Enzymen und Proteinen im Muskel.

1.1.1.2.3 Von-Willebrand-Faktor-A ähnliche Domänen

Der ursprüngliche von Willebrand Faktor ist als ein großes multimeres Glykoprotein beschrieben, welches im Blutplasma und der ECM vorkommt und die Adhäsion der Thrombozyten mit Kollagenen vermittelt.

Die innerhalb dieses Proteins gefundene A-Domäne von ca. 200 Aminosäuren kommt auch in vielen anderen Proteinen, so z.B. in einer Reihe von verschiedenen Plasmaproteinen, Integrinen (hier die „I Domäne“ genannt) und anderen ECM Proteinen wie z.B. Matrilinen oder WARP (Bork, 1991; Colombatti et al., 1993; Perkins et al., 1994; Fitzgerald et al., 2002; Whittaker and Hynes, 2002), vor.

VWA Domänen sind auch innerhalb der Kollagenfamilie weitverbreitet, 16 der 28 bekannten Kollagene enthalten eine oder mehrere VWA Domänen, z.B. enthält Kollagen VI zwölf VWA Domänen.

Auch viele der FACIT Kollagene besitzen eine (Kol XX) oder mehrere (zwei in Kol XIV oder vier in der langen Splice Variante von Kol XII) VWA Motive. Innerhalb der FACIT Familie sind diese Domänen hoch konserviert, z.B. beträgt die Homologie zwischen der dritten VWA in Kol XII und der ersten VWA in Kol XIV 60%. Da diese beiden Proteine Kollagenfibrillen über ihre Kollagendomänen binden wird deshalb angenommen, dass die VWA Domänen in Bindung zu Zellen oder Interaktion mit anderen ECM Proteinen involviert sind. Dies konnte aber bisher nicht gezeigt werden.

Wie oben erwähnt, besteht eine hohe Ähnlichkeit der VWA Domänen zu den α_1 I and α_2 I Domänen der Integrine, hier konnte die Rezeptorfunktion eindeutig mit der VWA Domäne in Verbindung gebracht werden (Briesewitz et al., 1993; Emsley et al., 1997; Huizinga et al., 1997; Rich et al., 1999; Romijn et al., 2003). Auch werden fibrilläre Kollagene über die I-Domäne gebunden, hierauf wird später noch detailliert eingegangen.

Die typische Erkennungssequenz der VWA Domänen ist die sogenannte Metallionen-Bindungsstelle (Metall Ion Depending Adhesion Site: MIDAS). Hier können über eine Konsensussequenz (DXSXSX_nTX_nD) zweiwertige Metallionen gebunden werden, welche zum Teil für die Bindung zu anderen Molekülen verantwortlich sind (Colombatti et al., 1993; Whittaker and Hynes, 2002).

Die typische Sekundärstruktur der VWA Domänen, bzw. I-Domäne wird als Rossman-Faltung bezeichnet (Fig. 1.2), bestehend aus vier β -Faltblättern, die von vier α -Helices umgeben sind. Darüber hinaus wird die Sekundärstruktur über zwei Cysteine stabilisiert.

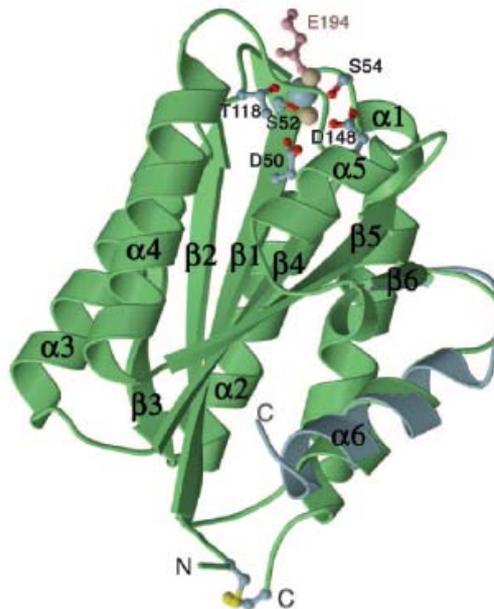


Fig.3: Die von-Willebrand-Faktor-A Struktur. Die Struktur nimmt eine sogenannte „Rossmann“-Faltung an: α -Helices (α 1-6) umgeben von β -Faltblättern (β 1-6). Seitenreste, welche an der MIDAS beteiligt sind, sind nummeriert. Das gebundene zweiwertige Metallion ist als blaue Kugel dargestellt. Am N- und C-Terminus findet man je ein Cystein, welche miteinander eine Disulfidbrücke ausbilden. (Lacy et al., 2004) Das zweite C-terminale Ende (α 6, blau) stellt eine andere Konformation dar, welche in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt.

1.1.1.2.4 „Coiled-Coil“ Domänen

α -helikale „Coiled-Coil“ Domänen dienen als Oligomerisierungsdomänen in Proteinen. Die Aminosäuresequenz der „Coiled-Coil“ Motive besteht aus einer charakteristischen, sich bis zu vier mal wiederholenden Konsensussequenz: eine Aminosäuren-Siebenergruppe (sogennante „Heptad“ Region) *a-b-c-d-e-f-g*, mit hydrophoben Aminosäurenresten an den Positionen *a* und *d* (Kammerer, 1997). Über diese Region können zwei (wie z.B. in Keratin) oder mehrere (z.B. fünf in COMP) Proteinuntereinheiten miteinander über rechtsgängige Helices miteinander oligomerisieren (Steinert, 1990; Guo et al., 2000). Es ist gezeigt worden, dass die meisten Kollagene mindestens eine „Coiled-Coil“ Region besitzen, die sich an variablen Stellen innerhalb des Moleküls oder in der Prokollagenregion befindet.

„Coiled-Coils“ wurden auch für alle FACIT Kollagene, wo sie sich immer innerhalb der NC2 Domäne zwischen zwei KOL Domänen befinden, vorhergesagt. In den FACIT Kollagenen wird aber eine Abweichung von der normalen Struktur beschrieben, die Heptad Regionen unterbrochen und überlappen. Es konnte aber bisher für keines der FACIT Kollagene eine Beteiligung des „Coiled-Coil“ Motivs an der Faltung *in vivo* oder *in vitro* gezeigt werden (McAlinden et al., 2003), während dies für die Kollagene XIII und XVII gezeigt werden konnte (Snellman, 2000; Areida et al., 2001; Latvanlehto et al., 2003).

1.1.1.3 Verteilung der FACIT Kollagene im Organismus

Die Rolle der erst kürzlich entdeckten Mitglieder dieser Familie (Kol XIX, XX und XXI) ist bisher wenig untersucht, aber auch die Funktion der „klassischen“ FACIT Kollagene (Kol IX, XII, XIV und XVI) ist nicht aufgeklärt.

Die Bindung an Kollagenfibrillen konnte bisher nur für Kol IX, XII und XIV gezeigt werden, die Funktion dieser Assoziation, z.B. bei Kol XIV, ist die Veränderung der Dicke von Fibrillen (Brown et al., 1993). Kol XII kann auf Fibrillen, welche hohem mechanischen Stress ausgesetzt sind, wie z.B. Knorpel, Knochen und hauptsächlich Haut gefunden werden, was eine Rolle bei der Verstärkung der Fibrillen zum Widerstehen mechanischer Kräfte nahe legt (Oh et al., 1993).

Die neuentdeckten FACIT Kollagene sind eher strukturell mit den klassischen FACIT Kollagenen verwandt als selbst fibrillenassoziiert, es konnte bisher für keines der neuen FACIT's eine solche Anlagerung gezeigt werden. Man findet eine weite Verbreitung dieser neuen Kollagene in den Bindegeweben: Kol XVI in der Haut - hier co-lokalisiert mit Kol VII - und im Knorpel; Kol XIX kann in verschiedenen Basalmembranen gefunden werden; Kol XX in Epithelien der Cornea und Kol XXI in inneren Organen und Muskelgeweben (Myers et al., 1997; Akagi et al., 1999; Grassel et al., 1999; Kassner et al., 2003; Fitzgerald and Bateman, 2001).

Über die genauen Aufgaben dieser Proteine ist bisher nichts bekannt, die weite Expression lässt aber vermuten, dass die neuen FACIT Kollagene sehr verschiedene Aufgaben im Organismus besitzen, welche in Zukunft genauer zu untersuchen sind.

1.1.1.4 Involvierung von FACIT Kollagenen in pathologische

Zustände

Wie eingangs erwähnt spielen die Kollagene eine wichtige Rolle in pathologischen Prozessen. Hier ist bis heute vor allem die Rolle der fibrillären Kollagene untersucht. Für die klassischen FACIT Kollagene ist hierüber wenig bekannt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kol XII in der Wundheilung hochreguliert ist. Intensivere Untersuchungen zur Beteiligung an pathologischen Zuständen sind bisher nur für Kol IX durchgeführt worden (Zhan et al., 1995). Kol IX bindet kovalent an Kol II Fibrillen im Knorpel und es wird vermutet, dass Kol IX hier für die Integrität des Gewebes mitverantwortlich ist (Smith and Brandt, 1992).

Natürlich auftretende Mutationen im COL9A2 Gen führen zu einer milden Form einer „multiplen epiphysialen Displasie“, während ein gestörter Ablauf der Kol IX Degradation an der Entstehung von rheumatischen Erkrankungen beteiligt ist (Nemeth-Csoka and Meszaros, 1983; Muragaki et al., 1996). In Patienten mit degenerativen Erkrankungen kann auch teilweise eine Reaktion der humoralen Immunantwort gegen körpereigenes

natives sowie denaturiertes Kol IX beobachtet werden (Holmdahl et al., 1993). Zudem konnte eine Beteiligung von Kol IX an Krankheiten des Innenohrs und der Knochenheilung gezeigt werden (Bujia et al., 1994; Hiltunen et al., 1995).

Für die anderen FACIT Kollagene bleiben ihre Rolle und die Bedeutung für die Stabilität und Integrität der beteiligten Gewebe bisher unklar. Geninaktivierungs-Experimente sind bisher nur für Kol IX durchgeführt und publiziert worden, wobei der Verlust des Proteins zu einer Osteoarthritis und Verlust des Gehörs führt (Hagg et al., 1997; Suzuki et al., 2005) und es zu einem Verlust der Integration von Matrilin-3 in die Matrix kommt (Bastian Budde, 2005). Für zwei weitere FACIT Kollagene, Kol XII und XIV, sind „Knockout“-Mäuse in Arbeit, bzw. werden gerade analysiert. Hierbei scheint beim Kol XIV „Knockout“ eine Veränderung der Kollagenfibrillen stattgefunden zu haben (nicht veröffentlichte Ergebnisse).

1.1.1.5 Interaktion der FACIT Kollagene mit anderen Proteinen

1.1.1.5.1 Integrine als Kollagenrezeptoren

Die Bindungsfähigkeit der einzelnen NC-Module der FACIT Kollagen legt ihre Rolle als Bindemotiv zu anderen Molekülen nahe (Font et al., 1996; Balbin et al., 2001; Boot-Handford et al., 2003; Myers et al., 2003; Pace et al., 2003). Diese Interaktionen konnten, z.B. für Kol XIV mit Heparin oder Kol XII mit Fibromodulin, gezeigt werden (Imhof and Trueb, 2001; Kapyla et al., 2004; Kassner et al., 2004).

Aber auch die Kollagentripelhelices können als Bindungspartner zu anderen Molekülen fungieren. Die wichtigsten Bindungspartner hierbei sind die Integrine. Integrine sind eine Familie heterodimerer Zelladhäsions-Rezeptoren, die an Zell-Zell-Interaktionen sowie Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind (Hynes, 1992). Sie setzen sich aus nicht kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten zusammen. Dabei ist die $\beta 1$ -Untereinheit fast ubiquitär exprimiert und kann mit zwölf verschiedenen α -Untereinheiten interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass die $\beta 1$ Untereinheit zusammen mit $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ oder $\alpha 11$ als Zellrezeptor für native Kollagene fungiert (Kramer and Marks, 1989; Belkin et al., 1990; DiPersio et al., 1995; Gullberg et al., 1995; Camper et al., 1998; Velling et al., 1999). Vor allem Integrin $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ sind weit verbreitete Kollagen-Interaktionspartner. $\alpha 1\beta 1$ kann auf Zellen der glatten Muskulatur gefunden werden, $\alpha 2\beta 1$ ist der typische Kollagenrezeptor auf Blutkörperchen und Epithelzellen (Belkin et al., 1990; Zutter and Santoro, 1990). Verschiedene Zelltypen wie z.B. Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Lymphozyten exprimieren sowohl $\alpha 1\beta 1$ als auch $\alpha 2\beta 1$ Integrin. $\alpha 10\beta 1$ und $\alpha 11\beta 1$ Integrin zeigen ein eingegrenzteres Expressionsmuster, sie

konnten bisher nur in Chondrozyten bzw. Muskelzellen lokalisiert werden (Camper et al., 1998; Velling et al., 1999).

Für Integrin-bindende Kollagene, wie die fibrillären Kol I und II, das Netzwerkbildende Kol IV und das filamentöse Kol VI konnte demonstriert werden, dass die Integrine nicht die Tripelhelix als solches binden, sondern eine bestimmte Peptid-Konsensussequenz wie z.B. GFOGER oder ähnlich, erkennen (Knight et al., 2000; Zhang et al., 2003d). Während die Bindung der meisten FACIT Kollagene zu Integrinen nicht untersucht ist, konnte für Kol IX eine Bindung zu allen Kollagen-bindenden Integrinen über ihre I Domänen gezeigt werden (Kapyla et al., 2004). Interessanterweise ist die Interaktion sehr stark, obwohl innerhalb der Kol IX Sequenz keine GFOGER ähnliche Sequenz zu finden ist. Die Integrine besitzen als Kollagenerkennungsdomäne eine VWA-ähnliche Domäne, die I Domäne, die essentiell für die Erkennung und Bindung der jeweiligen Kollagene ist (Kamata and Takada, 1994; Kern et al., 1994; Whittaker and Hynes, 2002).

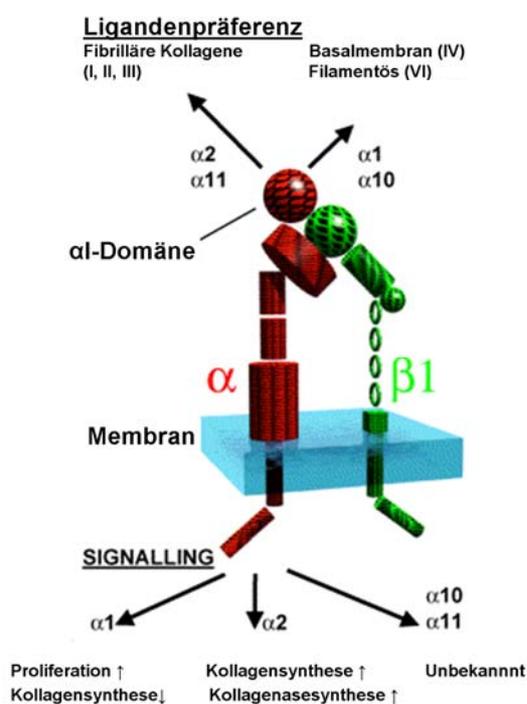


Fig. 1.3: Integrin α und β Untereinheiten und ihre Bindung zu verschiedenen Kollagenen
Die verschiedenen Integrine erkennen unterschiedliche Kollagenmotive. Damit werden unterschiedliche Kollagene bei der Bindung bevorzugt. Die verschiedenen α-β Kombinationen übermitteln auch jeweils andere Signale in die Zelle.

Die verschiedenen Kollagenrezeptor-Integrine haben unterschiedliche biologische Funktionen. α1β1 Integrin ist in vivo und in vitro ein negativer Feedbackregulator der Kollagensynthese (Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995; Gardner et al., 1999). α2β1 fördert sowohl die Kollagensynthese als auch die Synthese von Kollagenasen und

Matrix-Metalloproteinase-1 und -13 (Langholz et al., 1995; Riikonen et al., 1995; Ivaska et al., 1999; Ravanti et al., 1999b). In Fibroblasten und Knochenzelllinien ist $\alpha 2\beta 1$ zudem essentiell für die Migration auf Kollagenen und die Reorganisation von Kollagenfibrillen (Riikonen et al., 1995; Vihinen et al., 1996; Ravanti et al., 1999a). $\alpha 1\beta 1$ besitzt vermutlich ähnliche Funktionen, dies aber in anderen Zelltypen (Gotwals et al., 1996; Racine-Samson et al., 1997). Die Effekte der Signaltransduktion von $\alpha 10\beta 1$ und $\alpha 11\beta 1$ Integrin sind dahingegen bisher unbekannt.

1.1.1.5.2 Weitere Kollagenrezeptoren

Außer den Integrinen sind noch weitere, weniger gut untersuchte zelluläre Rezeptoren für Kollagene bekannt. Da auf diese Rezeptoren im Folgenden experimentell nicht eingegangen wird, werden sie nur der Vollständigkeit halber kurz beschrieben.

1.1.1.5.2.1 Thrombozyten-Glykoprotein VI und Ib als Kollagenrezeptoren

Eine effiziente Zusammenlagerung der Blutplättchen während der Blutgerinnung ist notwendig, um offene Wunden und Gewebsrisse schnell zu verschließen.

Hierbei dienen die Kollagene als Modulatoren der Blutkörperchenaktivierung. Die Aktivierung wird erreicht durch die Bindung, der durch die Ruptur zum Blut exponierten Kollagene, an mindestens drei verschiedene Rezeptoren. Hauptsächlich zwei Rezeptoren, einmal das schon vorher erwähnte $\alpha 2\beta 1$ Integrin und das thrombozytenspezifische Rezeptor-Glykoprotein VI, spielen dabei eine Rolle. Eine schwächere Interaktion konnte auch mit dem Rezeptor-Glykoprotein Ib Komplex demonstriert werden (Kunicki, 2002).

Eine Interaktion von FACIT Kollagenen mit einem der oben genannten Glykoproteine wurde bisher nicht beschrieben.

1.1.1.5.2.2 Discoidin Domänen-Rezeptoren

Die dritte Gruppe der Kollagenrezeptoren auf Zelloberflächen ist die Familie der Discoidin Domänen Rezeptoren (DDR). Die DDR's gehören einer Familie von Transmembranproteinen, welche Signale von außen durch Tyrosinkinasen vermitteln, an.

Bisher konnte gezeigt werden, dass DDR1 Kol I-V bindet, während für DDR2 eine Bindung an die fibrillären Kollagene I-III demonstriert werden konnte (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 1997; Vogel, 1999). Die DDR's sind weit verbreitet, DDR1 konnte in Keratinozyten, den Epithelzellen in Darm, Nieren, Lunge und der Schilddrüse nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu findet man DDR2 im Herz, Skelettmuskel, inneren Organen und Bindegewebe.

Wie auch für die Glycoproteinrezeptoren wurde bisher keine Interaktion zwischen FACIT Kollagenen und DDR's publiziert.

1.2 Der Muskel-Sehnen-Ansatz

Um Kräfte von der Muskulatur auf ein Skelettelement zu übertragen, sind die einzelnen Muskeln über die Sehnen mit den Knochen verbunden. Der Muskel-Sehnen-Ansatz ist die Verbindung der beiden Elemente. Ähnliche Strukturen, welche zwei verschiedene Muskeln die über schmale, sehnenartige Bänder verbinden, werden Aponeurosen oder Sehnenplatten, genannt.



Fig. 1.4. Transmissions Elektronenmikroskop Aufnahme des *M. semitendinosus* vom Frosch. Das Ende des Muskels (unten) insertiert in die Sehne (oben). Die Myofibrillen enden unregelmäßig, so dass es zu Finger-ähnlichen Enden der Muskelzelle, in welche dann die Kollagenfibrillen münden, kommt (Pfeile). Die Vergrößerung der Kontaktfläche ist offensichtlich. Balken = 2.0 μm (aus (Tidball, 1991))

Der Muskel-Sehnen Ansatz besteht aus den Muskelfaserenden, welche von einer als Sarkolemma bezeichneten Plasmamembran umschlossen sind. Das Sarkolemma ist mit einer Basalmembran, in welche die Fibrillen (hauptsächlich Kol I) der Sehnen enden, verbunden. Auf EM-Ebene (Fig 1.4) wird deutlich wie die fingerartigen Verzahnungen der Muskelenden in die Sehne einmünden. Diese Struktur vergrößert die Kontaktfläche im Gegensatz zu einer flachen Oberfläche um das 20-50 fache und erniedrigt so die Kraft pro Flächeneinheit, welche auf diese Struktur wirkt. Zudem ändert

sich die Kraft von reiner Zugkraft hin zu Scherkraft und hilft so, den Muskel-Sehnen Ansatz zu stabilisieren (Moore, 1992).

Der Muskel-Sehnen Ansatz ist auf EM Ebene ausführlich beschrieben; die Proteinzusammensetzung und die Interaktion der einzelnen Moleküle ist aber relativ unbekannt (Trotter et al., 1985; Tidball and Daniel, 1986; Trotter and Baca, 1987a, 1987b; Trotter et al., 1987; Trotter, 1993).

Hauptsächlich zwei transmembrane Rezeptoren, der Dystrophin-assozierte Proteinkomplex (DPC) und $\alpha 7\beta 1$ Integrin (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Bao et al., 1993), sind in diesem Bereich stark exprimiert. Der DPC bindet zu Dystrophin und Laminin und fungiert als Verknüpfung vom Zytoskelett zur Basalmembran (Ervasti and Campbell, 1993; Cohn and Campbell, 2000). Mutationen führen hier zu verschiedenen Muskeldystrophien (Bushby, 1999; Blake et al., 2002). Die *mdx* Maus, eine natürliche Mutante und Modell für Muskeldystrophien, welche kein Dystrophin mehr besitzt, zeigt strukturelle Veränderungen des Muskel-Sehnen Ansatzes; die Anzahl der fingerartigen Protrusionen scheint erniedrigt zu sein (Sicinski et al., 1989; Law and Tidball, 1993; Law et al., 1995). Tenascin-C ist ein weiteres typisches Protein, welches am Muskel-Sehnen Ansatz angereichert ist (Chiquet and Fambrough, 1984; Pedrosa-Domellof et al., 2000). Lange Zeit konnte hier keine Funktion am Muskel-Sehnen Ansatz gezeigt werden. Neueste Ergebnisse aus Tenascin-C „Knockout“-Mäusen deuten auf eine erniedrigte Elastizität der Sehnen, bzw des Muskel-Sehnen Ansatzes in den Mutanten hin (nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Über die Entwicklung des Muskel-Sehnen Ansatzes ist wenig bekannt. Die Region wird vermutlich entweder von Muskel- oder Sehnenvorläufern gebildet, auch eine Beteiligung beider Kompartimente kann weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die Muskeln werden aus dem Myotom der Somiten in einem gut charakterisierten und durch verschiedenen Wachstumsfaktoren regulierten Prozess abgeleitet. Seit kurzem ist aufgrund der Entdeckung des Sehnenmarkers *Scleraxis*, auch die Entwicklung der Sehnen wenigstens teilweise bekannt (Brent and Tabin, 2002; Brent et al., 2005).

Der erste Schritt in der Entwicklung des Muskel-Sehnen Ansatzes ist die Bildung einer Basalmembran. Dieser Prozess ist ab Tag 11 (E11) beim Mausembryo initiiert. Diese Entwicklung verläuft parallel mit der Expression von Laminin 2 ($\alpha 1\beta 2\gamma 1$). Andere Laminine werden in späteren Stadien an dem Muskel-Sehnen Ansatz Vorläufer gebildet (Gullberg et al., 1999). Hierzu passt die Co-Expression der Laminin-bindenden Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 7\beta 1$ in diesem Bereich. $\alpha 7\beta 1$ Integrin ist auch in dem reifen Muskel-Sehnen Ansatz zu finden, während $\alpha 5\beta 1$ postnatal herunterreguliert wird (Burkin and Kaufman, 1999; Xiao et al., 2003). Speziell $\alpha 7\beta 1$ scheint – obwohl nicht exklusiv hier exprimiert -

eine wichtige Rolle bei der Stabilität der Muskel-Sehnen Ansätze zu spielen (Burkin and Kaufman, 1999).

Die spezifische Expression der Kollagenrezeptor-Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ und $\alpha 11\beta 1$ ist bisher in diesem Bereich nicht untersucht worden. Auch über die Rolle einzelner FACIT-Kollagene in Bezug auf Integrität oder Stabilität des Muskel-Sehnen Ansatzes ist bisher nichts bekannt, allerdings konnte eine Expression von Kol XII in diesem Bereich gezeigt werden (Daten nicht publiziert).

1.3 Knorpel

Der Gelenkknorpel wird von Chondrozyten gebildet, die aber nur 1-3% seiner Gesamtmasse ausmachen. Diese Zellen sind in eine ECM aus verschiedenen Kollagenen und Proteoglykanen eingebettet. Der Knorpel ist strukturell in drei Zonen unterteilt, die alle hauptsächlich Kol II Fasern enthalten. Diese bilden ein hochvernetztes und komplexes Netzwerk aus Kollagenfibrillen. Damit verbunden sind die FACIT-Kollagene IX und XII und andere Proteinen wie z.B. COMP und vor allem Agrikan (Ulrich-Vinther et al., 2003). Durch einen hohen Anteil an verschiedenen anderen kleinen Proteoglykane, wie z.B. Dekorin, Biglykan und Fibromodulin, die an die Kollagenfasern binden, wird diese Matrix stabilisiert. Durch den hohen Anteil an Proteoglykanen besitzt Knorpel zudem eine hohe osmotische Aktivität, wobei die vernetzte Kollagenmatrix hierbei dann ein Anschwellen des Knorpels verhindert. Die starke Wassereinlagerung ist verantwortlich für die Elastizität des Knorpels, der bei übermäßigem Druck ein Teil des Wassers verliert und danach wieder einlagert (Hagg et al., 1998).

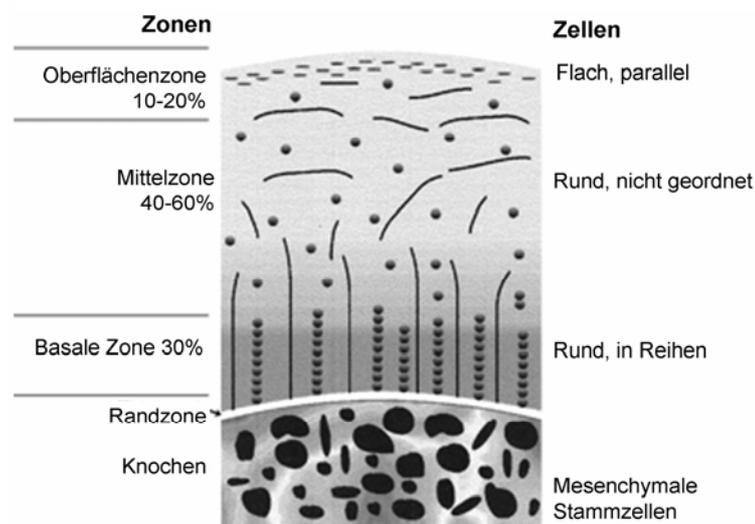


Fig. 1.5: Morphologie des Gelenkknorpels (verändert aus (Ulrich-Vinther et al., 2003))

1.4 Modellorganismen – Maus und Zebrafisch

Verschiedene Organismen werden benutzt um die Funktion eines Proteins *in vivo* zu untersuchen. Hierbei ist die Maus einer der am besten untersuchten und beschriebenen Modellorganismen. Die ECM der Mäuse ist intensiv erforscht, auch die meisten funktionellen Daten über die FACIT-Kollagene wurden im Modellorganismus Maus gewonnen. Es können - bis auf Kol XXI - alle FACIT Kollagene in Mäusen gefunden werden.

Die Sequenzierung des Mausgenoms wurde 2002 abgeschlossen. Die Sequenzdaten machen die Analyse und Manipulation des Genoms einfacher als zuvor und die Veränderung des Mausgenoms hin zu transgenen- oder „Knockout“ Tieren ist für viele Proteine publiziert worden. Mäuse sind hochentwickelte Säugetiere mit einer Verwandtschaft von 97.5% auf Genebene (Celera Genomics) zum Menschen, was zulässt, dass die Resultate aus Experimenten zum Großteil auf den Menschen übertragen werden können. Hierbei zeigt die hohe Entwicklung der Mäuse für die Untersuchung von Genmutationen und -manipulationen nicht nur Vorteile, es kommt häufig zu kompensatorischen Effekten durch andere Mitglieder einer Proteinfamilie, so dass Manipulationen am Genom sich nicht immer in einem veränderten Phänotyp zeigen.

Aus diesem Grund sind primitivere Organismen eine Alternative zu solchen Experimenten, sie unterliegen einer weniger subtilen Regulation und kompensatorische Effekte sind weniger ausgeprägt.

Der Zebrafisch *Danio rerio* ist ein ebenfalls gut beschriebener und untersuchter Modellorganismus. Aufzucht und Haltung sind einfach und in großer Zahl möglich, da die Fische nur drei Zentimeter groß werden. Die Generationszeit beträgt drei Monate und die hohe Nachkommenzahl (Weibchen legen 100-200 Eier) macht größere Durchmusterungen und Mutationsanalysen relativ einfach. Die Entwicklung der Tiere erfolgt extern, was einen Zugang zu den Embryonen für Manipulationen und Beobachtungen leicht ermöglicht. Darüber hinaus sind die Embryonen durchsichtig, so dass die Entwicklung innerer Organe unter dem Mikroskop beobachtet werden kann. Die embryonale Entwicklung benötigt nur 2-4 Tage und innere Organe sind schon nach 24 Stunden sichtbar (Mullins et al., 1994; Patton and Zon, 2001). Fast das gesamte Genom des Zebrafisches ist sequenziert, aber noch nicht vollständig annotiert. Deshalb können Sequenzen aus DNA-Datenbanken bisher nicht als verlässliche Quelle dienen.

Obwohl der Zebrafisch als Modellorganismus für verschiedene Krankheiten herangezogen wird, wurde bisher über Rolle der ECM-Proteine in Zebrafischen wenig publiziert. Die wenigen Veröffentlichungen beziehen sich meistens auf Degradation der

ECM (Zhang et al., 2003b; Zhang et al., 2003a, 2003c; Bai et al., 2005). Die Rolle von FACIT-Kollagenen im Zebrafisch ist bisher nicht untersucht, wenngleich bei Datenbankanalysen verschiedene FACIT-Kollagenfragmente entdeckt werden können.

1.4.1 Morpholino “Antisense” Oligonukleotide

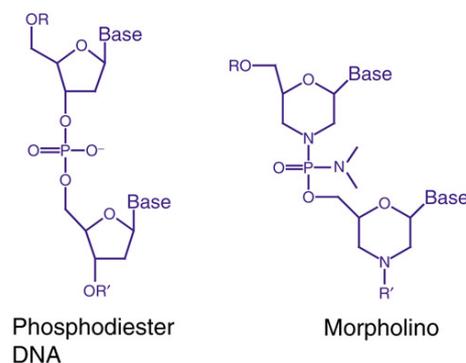


Fig. 1.6.: Struktur von DNA and Morpholino Oligonukleotiden (aus GeneTools)

Die externe Befruchtung und Entwicklung lässt eine Manipulation der Zebrafisch-Proteinexpression mittels Morpholino Oligonukleotiden zu.

Morpholinos sind nicht-ionische DNA-Analogs von ca. 25 Basen. Dabei wird ein „antisense“-Morpholino in das befruchtete Ei injiziert und bindet an die korrespondierende mRNA in einem definierten Bereich, meist um das erste ATG. Hierdurch wird das Binden der mRNA an das Ribosom und die Synthese des Zielproteins verhindert, da das Ribosom das Hybrid nicht auflösen kann.

Verschiedene Vorteile von Morpholinos als Werkzeuge um die Proteinexpression zu verändern sind beschrieben. Einer der größten Vorteile ist, dass der Phänotyp direkt in F0 Tieren beobachtet werden kann ohne auf weitere Kreuzungen warten zu müssen.

Ziele der Arbeit

Die FACIT- und FACIT-verwandten Kollagene besitzen ein weit gefächertes Expressions- und Funktionsspektrum im Organismus. Vergleicht man die bisher veröffentlichten Daten, so kann bisher kein direkter Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion der einzelnen FACIT Kollagene gesehen werden.

Kollagen XXII ist ein neues, bisher nicht beschriebenes Kollagen, das aufgrund seiner Aminosäuresequenz den FACIT Kollagenen zugeordnet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden eine erste Charakterisierung des Proteins durchzuführen, hierbei soll die Gen- und die Domänenstruktur von humanem Kol XXII untersucht werden. Zusätzlich soll nach Orthologen des Proteins in anderen (Modell-) Organismen gesucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass einige der FACIT Kollagene fibrillassoziert sind, während das für andere Mitglieder nicht der Fall ist. Die verschiedenen FACIT-Kollagene besitzen ein weites Verbreitungsmuster innerhalb des Organismus.

Deshalb soll in einem zweiten Schritt die Verteilung des Proteins untersucht werden. Hierbei soll die Lokalisation sowohl auf RNA Ebene, als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Dies wird sowohl im adulten Organismus, als auch im sich entwickelnden Embryo untersucht. Die Untersuchungen sollen als erstes an Mäusen durchgeführt, und anschließend im Zebrafisch bestätigt werden. Hierfür müssen verschieden Antikörper gegen rekombinant exprimierte Domänen von Kol XXII und RNA Sonden hergestellt werden.

Biochemische Interaktionen mit möglichen Bindungspartnern, co-lokalisiert in Kol XXII exprimierenden Geweben, können Hinweise auf die Funktion des neuen Kollagens im Organismus geben. Hierbei soll eine Interaktion zwischen kollagenbindenden Integrinen und Kollagen XXII untersucht werden.

Schließlich müssen die so gewonnenen Daten durch *in vivo* Untersuchungen belegt werden. Das Gen soll in Mäusen durch „Gene-Targeting“ Experimente ausgeschaltet werden und eine Kol XXII defiziente Mauslinie etabliert und wenn möglich untersucht werden.

Als zweiter Modellorganismus sollen Zebrafische untersucht werden. Hier soll die Genexpression durch einen Morpholino „Knockdown“ manipuliert werden.

2. Ergebnisse

2.1 Entdeckung, Domänenstruktur und genomische Organisation von Kol XXII

2.1.1 Kol XXII: Ein neues FACIT-Kollagen

Auf der Suche nach neuen Kollagenen wurden EST-Datenbanken („Expressed Sequence Tag Databases“) nach exprimierten Sequenzabschnitten von Proteinen, die Kollagen-typische, repetitive *Gly-X-Y* Sequenzen enthalten, durchsucht. Wegen der großen Anzahl von EST Klonen, welche ein Kollagenmotiv enthielten, war diese Suche nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse, um ausschließlich mögliche neue FACIT-Kollagene zu identifizieren, eingengt. Dafür wurde die EST-Datenbank mit dem C-terminalen Ende der Sequenz von FACIT-Kol XII durchmustert. Einer der gefundenen Klone konnte dabei als neues Kollagen identifiziert werden.

Das 1520 bp DNA-Stück des EST-Klons wurde komplett sequenziert. Der Klon kodiert für 167 Aminosäuren des C-terminalen Endes und enthält der 3' UTR eines neuen Kollagens, welches Kol XXII benannt wurde.

Aufgrund der Sequenzdaten konnten Primer für eine 5' RACE konstruiert werden. Als Matritze diente eine humane cDNA Bibliothek. Es wurden drei Runden von Amplifikationen durchgeführt; die Sequenz des Primers wurde jeweils aus den gewonnenen Sequenzierdaten abgeleitet. Die überlappenden Fragmente ergaben nach dem Überlagern der Sequenzen die voll-längen cDNA Sequenz von Kol XXII. Um die so erhaltenen DNA-Sequenzen zu verifizieren und PCR induzierte Nukleotid-Mutationen auszuschließen, wurden Gen-spezifische Primer hergestellt, um die DNA auf humaner Knochen- und Knorpel-cDNA zu re-amplifizieren. Die Sequenzierung von drei unabhängigen Klonen, amplifiziert auf den verschiedenen cDNA's, bestätigte die Nucleotidsequenz des humanen Kol XXII. Die komplette cDNA Sequenz wurde in der GenBank® Datenbank unter der Zugangsnummer [AF406780] abgelegt. Die Sequenz des murinen Orthologs von Kol XXII konnte anhand von Daten aus der „Mouse Genomic Database“ und der EST Datenbank identifiziert werden. Durch Abgleich der unterschiedlichen Daten (nicht gezeigt) konnte die Sequenz der Maus NC1 Domäne erhalten werden (Fig. 2.30). Die Maus- und Humansequenzen von Kol XXII waren hochkonserviert; ein Alignment der beiden NC1 Regionen zeigte eine Homologie von 71%. Die murine voll-längen cDNA Sequenz von Kol XXII wurde nicht in der GenBank® Datenbank abgelegt, da nicht die gesamte cDNA nochmals sequenziert wurde.

2.1.3 Domänenorganisation von Kol XXII

Das vorhergesagte offene Leseraster von Kol XXII kodiert für 1626 Aminosäuren (Fig. 2.1), wobei die ersten 54 Basen für ein 27 Aminosäuren langes Sekretionssignal (Signal Peptide Prediction Server, nicht gezeigte Ergebnisse) kodieren. Der von-Willebrand-Domäne (VWA, Position 28-220) folgt ein Thrombospondinmodul (TSPN, Pos. 221-440), daran angeschlossen findet sich eine Poly-Prolin Linker-Region (441-480), die nicht-Kollagendomäne mit der Kollagendomäne verbindet.

Auf diese NC1 Domäne von 480 Aminosäuren folgt die Kollagendomäne. Diese wird weiter unterteilt, da sie durch sechs kleine Unregelmäßigkeiten in den *Gly-X-Y* Triplets - bei denen jeweils die dritte Aminosäure fehlt - und größeren Unterbrechungen der Kollagenstruktur von 4 bis 38 Aminosäuren gekennzeichnet ist (COL1-COL5). Der letzte Kollagen-Stretch (COL5) von 105 Aminosäuren beinhaltet die Unterbrechungen und die Struktur, über die alle FACIT Kollagene definiert werden: d. h. zwei Unterbrechungen in den *Gly-X-Y* Triplets, die von zwei Cysteinresten gefolgt werden.

Obwohl Kol XXII im Allgemeinen die FACIT-typische Domänenstruktur besitzt, finden sich in der Sequenz keine Fibronectin Typ III-Motive, welche für andere Mitglieder dieser Proteinfamilie typisch sind.

Innerhalb der TSPN Domäne befinden sich zwei Konsensussequenzen für N-Glykosylierung an Position 375 (NVSL) und Position 475 (NCSC), die mit dem Net-N-Glykosylierungs Programm vorhergesagt werden konnten (Fig. 2.2 A). Mit Hilfe des O-Glykosylierungs Server konnten mehrere potentielle O-Glykosylierungsstellen gezeigt werden (Fig. 2.2 B).

Die Bildung der Tripelhelix in Kollagenen erfolgt meist ausgehend vom C-Terminus, wobei nicht-Kollagene Regionen als Oligomerisierungsdomänen dienen (Frank et al., 2003). Zwei mögliche „Coiled-Coil“ Regionen konnten mit Hilfe des „COILS“ Programmes (Lupas, 1997) vorhergesagt werden, wobei sich die erste Vorhersage auf die Region von Aminosäure 176-190 in der NC1 Region und die zweite auf Position 1458-1497 innerhalb der NC5 Domäne (Fig. 2.3) bezieht.

	1	MAGLRGNAVA	GLLWMLLLWS	GGGCQAQRA	GCKSVHYDLV	FLLDTSSSVG	50
	51	KEDFEKVRQW	VANLVDTFEV	GPDRTVRGVV	RYSDRPTTAF	ELGLFGSQEE	100
VWA	101	VKAAARRLAY	HGGTNTGDA	LRYITARSFS	PHAGGRPRDR	AYKQVAILLT	150
	151	DGRSQDLVLD	AAAAHRAGI	RIFAVGVGEA	LKEELEIAS	EPKSAHVHV	200
	201	SDFNAIDKIR	GKLRRLCEN	VLCPSVRVEG	DRFKHTNGGT	KEITGFDLMD	250
	251	LFSVKEILGK	RENGAQSSYV	RMGSFPVVQS	TEDVFPQGLP	DEYAFVTFR	300
TSPN	301	FRKTSRKEDW	YIWQVIDQYG	IPQVSIRLDG	ENKAVEYNAV	GAMKDAVRVV	350
	351	FRGSRVNDLF	DRDWHKMALS	IQACNVS LHI	DCALVQTLPI	EERENIDIQG	400
	401	KTIVIGKRLYD	SVPIDFDLQR	IVIYCDSRHA	ELETCCDIPS	GPCQVTVVTE	450
Linker	451	PPPPPPQRP	PTPGSEQIGF	LKTINCSCPA	GEKGMGVAG	PMGLPGPKGD	500
	501	IGAIGPVGAP	GPKGEKGDVG	IGPFGQGEKG	EKGSGLPLPGP	PGRDGSKGMR	550
	551	GEPGELGEPG	LPGEVGMGRP	QGPPGLPGPP	GRVGAPGLQG	ERGEKTRGE	600
	601	KGERGLDGF	GKPGDTGQQG	RPGPSGVAGP	QGEKGDVGP	GPPGVPGSVV	650
	651	QGGGLKGEQG	APGPRGHQGA	PGPPGARGPI	GPEGRDPPP	LQGLRGKKGD	700
Collagen region	701	MGPPGIPGLL	GLQPPGPPG	VPGPPGPGGS	PGLPEIGFP	GKPGPPGPTG	750
	751	PPKDGPNP	PGPPGKGE	GERGEDGLPG	KPGLRGEIGE	QGLAGRPGEK	800
	801	GEAGLPGAPG	FPGVRGEKGD	QGEKGEGLP	GLKDRGEKG	EAGPAGPPGL	850
	851	PGTSLFTPH	PRMGEQGP	GEKGDPLPG	EPGLQGRPGE	LGPQGPTGFP	900
	901	GAKGQEGAHG	APGAAGNPGA	PGHVAGP	GPPGVSAGP	LRGTPGKDGE	950
	951	RGEKGAAGEE	GSPGVPVPRG	DPGAPGLPG	HGKGDGEPG	LRGSPGLPGP	1000
	1001	LGTKAACGKV	RSENALGG	QCVRGDRGAP	GIPGSPGSRG	DHGLGAGFP	1050
	1051	GPSGPPGDKG	SPGSRGLPGF	PGPQGPAGRD	GAPGNPGERG	PPGKPLSL	1100
	1101	LSPGDINLLA	KDVCNDCPFG	PPGLPLPGF	KGDKGVPGK	GREGTEGKKG	1150
	1151	EAGPPGLPGP	PGIAGPQGSQ	GERGADGEVG	QKGDQGHPGV	PGFMGPPGNP	1200
	1201	GPPGADGIAG	AAGPPGIQGS	PGKEGPPGPQ	GPSGLPGIPG	EEGKEGRD	1250
	1251	PGPPGEPGKA	GEPGLPPEG	ARGPPGFKGH	TGDSGAPGR	GESGAMGLPG	1300
	1301	QEGLPKGDGD	TGPTGPQGPQ	GPRGPPGKNG	SPGSPGEPGP	SGTPGQKGSK	1350
	1351	GENGSPGLPG	FLGPRGPPGE	PGEKGVPGKE	GVPKGPGE	FKGERGDPGI	1400
	1401	KGDKGPPGK	GQPGDPGIPG	HKGHTGLMGP	QGLPGENGPV	GPPGPPGQPG	1450
	1451	FPGLRGESPS	METLRRLIQE	ELGKQLETRL	AYLLAQMPPA	YMKSSGRPG	1500
	1501	PPGPPGKDL	PGRAGPMGEP	GRPGQGLEG	PSGPIGPKGE	RGAKGDPGAP	1550
	1551	GVGLRGEMGP	PGIPGQPGEP	GYAKDGLPGI	PGPQGETGPA	GHPGLPGPPG	1600
	1601	PPGQCDPSQC	AYFASLAARP	GNVKG			1626

Fig. 2.1: Komplette Aminosäuresequenz von Kol XXII, abgeleitet von der cDNA Sequenz. Ein 27 Aminosäuren langes Signalpeptid geht der Proteinsequenz des reifen Proteins am N-Terminus voraus (unterstrichen). Die Domänengrenzen (dicke schwarze Linien) sind kenntlich gemacht. In der TSPN-, bzw. Linker-Region sind zwei potentielle N-Glykosylierungsseiten umrandet. Die Linker Region beinhaltet einen Polyprolinstretch. Die Kollagendomäne ist unterbrochen durch mehrere größere nicht-kollagene Abschnitte, sowie sechs kleineren Unregelmäßigkeiten in den *Gly-X-Y* Triplets.

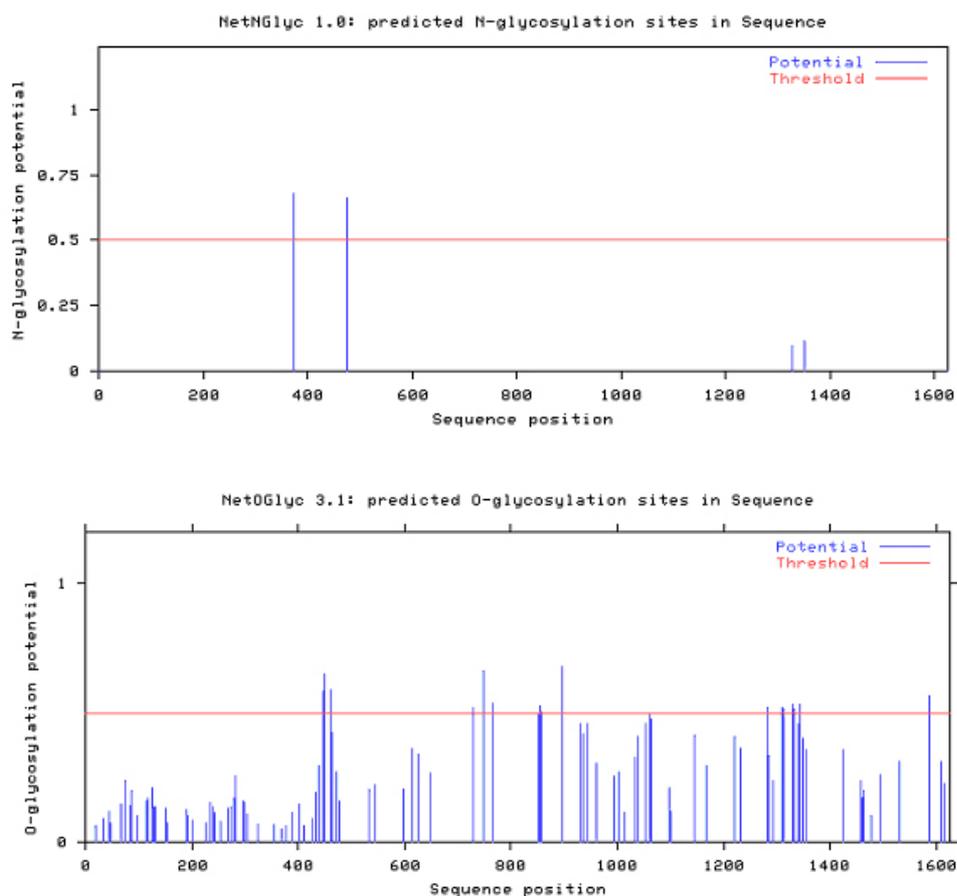


Fig. 2.2: Vorhersage möglicher N-Glykosylierungen (A) und O-Glykosylierungen (B): Anhand der Aminosäuresequenz konnten mit Hilfe von Vorhersageprogrammen zwei potenzielle N-Glykosylierungsstellen (A) an Position 375 (NVSL) und Position 475 (NCSC), und mehrere potenzielle O-Glykosylierungsstellen (B) vorausgesagt werden.

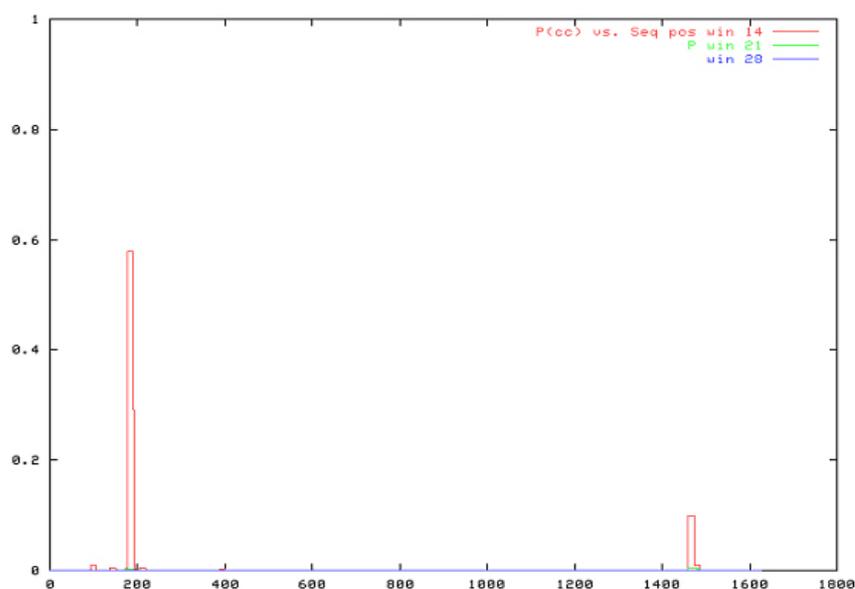


Fig. 2.3: Vorhergesagte „Coiled-Coil“ Domänen. Die erste „Coiled-Coil“ Region liegt innerhalb der NC1 Domäne. Der zweite „Coiled-Coil“ ist in der NC5 Region lokalisiert. Die Vorhersage wurde mit dem „COILS Prediction Server“ anhand der Aminosäuresequenz gemacht.

2.1.4 Organisation des COL22A1 Gens

Eine Analyse des humanen Genoms zeigte, dass es sich bei Kol XXII um ein Homotrimer handelt - nur eine α -Kette konnte im Genom identifiziert werden. Das Gen COL22A1 befindet sich auf Chromosom 8q24.2 und deckt eine Region von 326 kb ab ([NT_028251] GenBank®), während das Maus Ortholog *col22A1* auf Chromosom 15 D2-D3 identifiziert werden konnte. Die Intron-Exon Analyse („Ensembl Human ExonView“, Fig. 2.4 A) zeigte, dass das Gen 66 Exons umfasst, die von 65 Introns getrennt werden, wobei die größten Introns, eins und drei, mehr als 30 kb lang sind. Die Exon-Intron Grenzen stimmen mit der klassischen „Splice“ Donor- und Akzeptor- Konsensussequenz überein (nicht gezeigte Ergebnisse). Auf die 5'UTR folgt im Anschluss in Exon zwei die Sequenz, welche für das Signalpeptid kodiert. Die VWA Domäne ist von einem einzigen Exon kodiert, während die rund 200 Aminosäuren umfassende TSPN Domäne von den Exons vier bis zwölf kodiert wird. Die Exone, die die Kollagendomäne kodieren sind in der Regel nur 45-54 bp lang und umfassen, was typisch für Gene von Kollagenen ist, 5-6 *Gly-X-Y* Triplets.

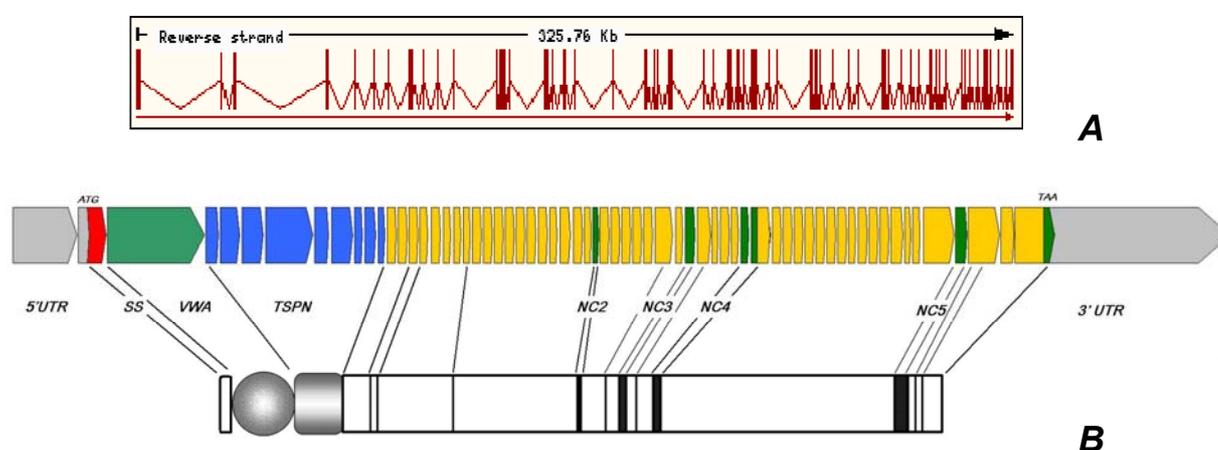


Fig. 2.4: Genorganisation von COL22A1: Das COL22A1 Gen ist 325,76 kb lang. Es befindet sich auf Chromosom 8q24.2 (A, B). Die VWA Domäne ist nur von einem der 66 Exons kodiert und wird von der TSPN Domäne (neun Exons) durch eine 30 kb große Intronsequenz getrennt. Die meisten Exons, die Kollagendomänen (gelb) kodieren, decken 5-6 *Gly-X-Y* Triplets ab. Die COL Domänen sind von Unterbrechungen (grün) gekennzeichnet.

2.1.6 Verwandtschaft der Kol XXII Domänen zu Domänen anderer Proteine

Die VWA Domäne ist ein weit verbreitetes Modul in Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und kann auch häufig innerhalb der FACIT Kollagene gefunden werden (Fig. 2.5 und 1.2). Die VWA Domänen verschiedener Proteine wurden anhand ihrer Primärstruktur miteinander verglichen.

Bei einem „Alignment“ der Sequenzen (ClustalW) zeigte sich eine Übereinstimmung der Kol XXII VWA Domäne von 43% zur VWA Domäne von Kol XXI, 40% zu Kol XIV, 37% zu Kol XII und 36% zu dem Modul in Matrilin-1 (Fig. 2.6).

Die Analyse eines phylogenetischen Baumes verschiedener VWA Faktoren zeigte, dass die VWA Faktoren der Matriline sich von den FACIT-Kollagenen als Gruppe abgespalten haben (Fig. 2.5 B). Innerhalb der FACIT Kollagene bilden die klassischen FACIT's, Kol XII und XIV, eine Gruppe. Hier fiel auf, dass die erste VWA Domäne von Kol XII eine engere Verwandtschaft zur ersten VWA von Kol XIV zeigte, als innerhalb des Proteins. Das gleiche kann auch für die zweite VWA von Kol XII und Kol XIV beobachtet werden. Eine unabhängige Gruppe innerhalb der FACIT Kollagene bilden Kol XXI und XXII, was die hohe Verwandtschaft zwischen beiden Proteinen weiter bestätigt.

Bei der Analyse des Sequenzalignments der VWA Faktoren konnte ein hochkonserviertes MIDAS Motiv, entsprechend der Konsensussequenz von (DXSXSX_nTX_nD) in Kol XXII entdeckt werden (Fig. 2.5 A).

An beiden Enden der VWA Domäne (Fig. 2.1, Pos. 31 und 217) findet sich je ein Cystein, welches möglicherweise zur Stabilität der VWA Faltung beiträgt; eine Expression der VWA Domäne ohne das letzte Cystein war nicht möglich (nicht gezeigte Ergebnisse).

Die TSPN Domäne in Nachbarschaft zur COL1 ist ein Definitionsmerkmal der FACIT Kollagene. Hierbei zeigte ein Vergleich der verschiedenen TSPN Sequenzen, eine hohe Übereinstimmung mit den Domänen aus Kol XII und Kol XXI. Die Homologien waren jedoch zu niedrig, um einen aussagekräftigen phylogenetischen Baum erstellen zu können (nicht gezeigte Ergebnisse).

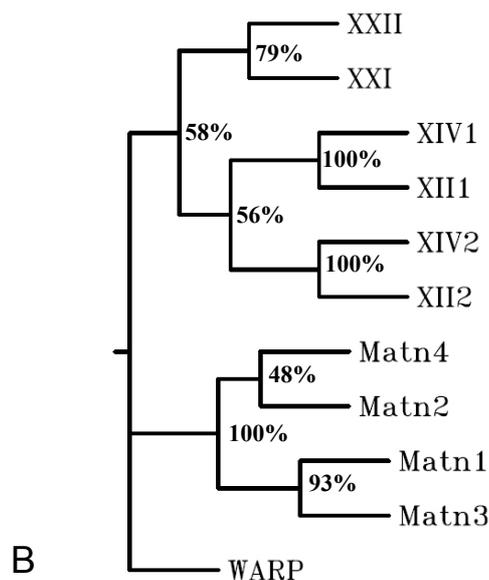
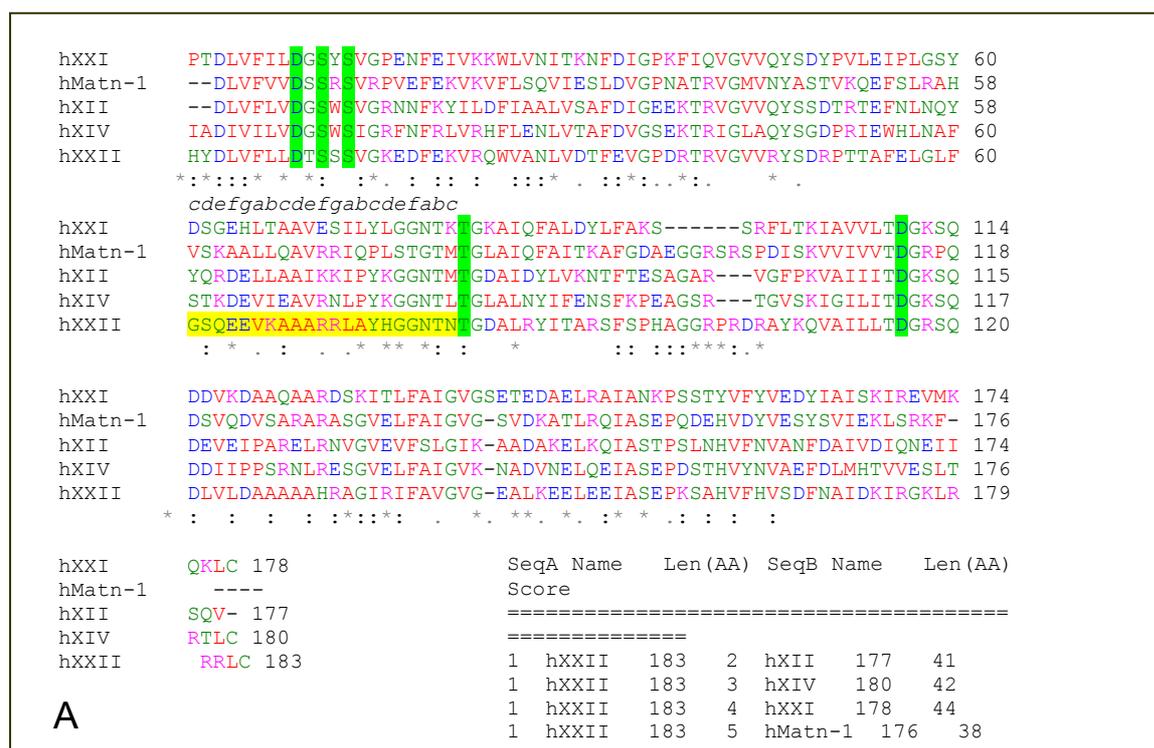


Fig. 2.6: Verwandtschaft zwischen den VWA Domänen verschiedener humaner ECM Proteine. (A) VWA Domänen von FACIT Kollagenen und Matrilin-1 wurden mit Hilfe des ClustalW Programms analysiert. Am nächsten verwandt ist Kol XXI, gefolgt von den „klassischen“ FACIT Kollagenen XII und XIV und Matrilin-1 mit noch 38% Übereinstimmung. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Asterisk markiert, das MIDAS Motiv ist in allen Proteinen konserviert (grün hervorgehoben). Die potentielle „Coiled-Coil“ Region ist gelb hervorgehoben. (B) Ein phylogenetischer Baum (auf einer „Distance Matrix“ beruhend, „Parsimony ergibt ein ähnliches Ergebnis) zeigt, dass die VWA Domänen der Matriline eine Gruppe darstellen, die noch weiter unterteilt werden kann. Die FACIT Kollagene bilden eine weitere Gruppe. Hier können die VWA's von XII und XIV, sowie die VWA Motive von Kol XXII und XXI zusammengefasst werden. Dieser Baum verdeutlicht die hohe Verwandtschaft von Kol XXI und zu Kol XXII (GrowTree Programm).

2.2 Verteilung von Kol XXII mRNA und Protein in Geweben

Für einige der FACIT Kollagene konnte gezeigt werden, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an fibrilläre Kollagene wie z. B. Kol I und II binden. Für andere, strukturell eng verwandte Proteine konnte das bisher nicht gezeigt, oder auch gänzlich ausgeschlossen werden. Diese werden deshalb als FACIT-verwandte oder FACIT-ähnliche Kollagene bezeichnet (Schuppan et al., 1990; Keene et al., 1991). Im Allgemeinen zeigen die FACIT- bzw. FACIT-verwandten Kollagene sehr begrenzte, gewebespezifische Expressionsmuster. Um die gewebetypische Expression der RNA und Verteilung von Kol XXII zu untersuchen, wurden Northern Blot Analysen, RT-PCR- und EM-Studien, sowie *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt.

2.2.1 Northern Blot Analyse von Kol XXII in humanen Geweben

Die Northern Blot Analyse von humanen Geweben ergab, dass nur in Herz- und Skelettmuskel größere Mengen von Kol XXII mRNA exprimiert werden (Fig. 2.7 A). Eine einzelne Bande von 6,4 kb wurde detektiert, was darauf schließen ließ, dass keine alternativen „Splice“ Varianten gebildet werden. Die Größe der mRNA stimmte sehr gut mit der Größe der klonierten cDNA überein. Bei weiteren semi-quantitativen RT-PCR's auf verschiedenen Mausgeweben zeigte sich, dass weitere Kol XXII mRNA in Knorpel, Haut und Keratinozyten gebildet wird (nicht gezeigte Ergebnisse). Fast oder überhaupt keine Signale zeigten sich bei der Analyse von neuronalen Geweben oder anderen inneren Organen, wie z.B. Knochen, Leber, Niere oder Lunge.

Allerdings konnte - im Gegensatz zum Northern Blot, in dem nur eine Variante der mRNA gefunden wurde - bei der PCR auf cDNA's aus verschiedenen Geweben eine zusätzliche Bande gezeigt werden (Fig. 2.7 B). Die Sequenzierung verschiedener Klone ergab eine mögliche Splice Variante von Kol XXII. Nach den Analyseergebnissen würde dabei das Überspringen des kompletten Exons 59 und Teilen von Exon 58 und 60 (cDNA Pos. 4494-4603), welche für die Kollagenregion kodieren, zu einem Shift im Leseraster und damit zu einer gekürzten Variante des Proteins führen. Hierbei folgt das Überspringen der Exonteile nicht der klassischen „Splice“ Donor-Akzeptor Sequenz. Eine kürzere Variante konnte jedoch nicht auf Proteinebene detektiert werden.

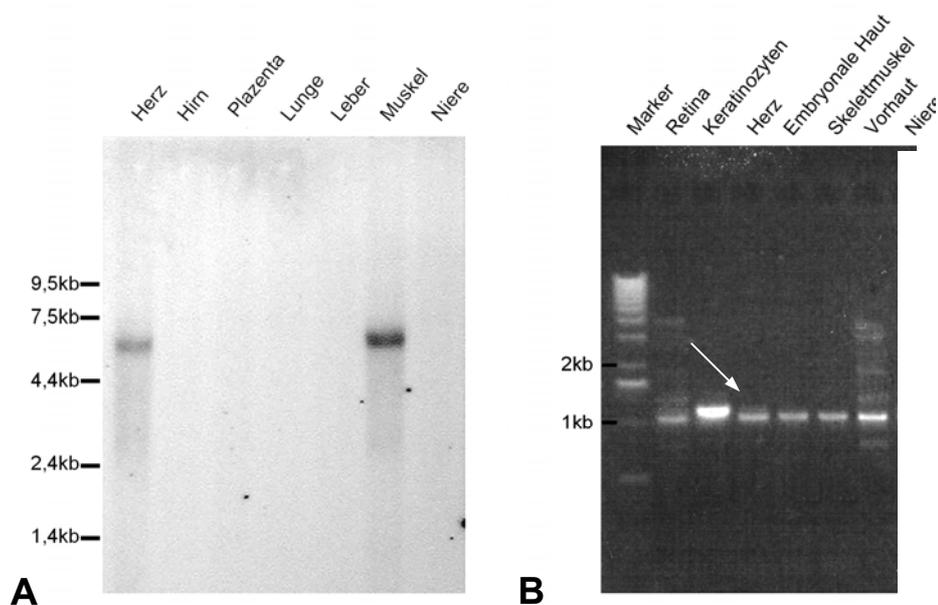


Fig. 2.7: Expression von Kol XXII in Geweben (A) und mögliche „Splice“ Varianten (B): (A) Northern Blot von Kol XXII RNA aus verschiedenen Geweben. Nur eine einzige Bande konnte in Blots auf Humangewebe detektiert werden. Starke Signale zeigten sich in Muskel und Herz, während in anderen untersuchten Organen, wie Hirn, Plazenta, Lunge, Leber und Niere kein Signal detektiert wurde. (B) Mögliche „Splice“ Varianten von Kol XXII. PCR auf verschiedenen cDNA's zeigte eine zweite Bande. Hierdurch fehlt ein Exon und es würde zu einem „Frameshift“ kommen.

2.2.2 Herstellung von Antikörpern

Um die Proteinverteilung von Kol XXII in der Maus zu studieren, wurden spezifische Antikörper gegen das Protein hergestellt. Mit Hilfe dieser Antikörper wurden Western Blot Analysen von Gewebeextrakten und immunhistochemische Studien auf Gewebeschnitten von Mäusen in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien und Neugeborenen durchgeführt.

2.2.2.1 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen die NC1

Region

Um einen spezifischen Antikörper gegen Kol XXII herzustellen, war das voll-längen Protein - aufgrund der hohen Homologie der *Gly-X-Y* Regionen innerhalb der Kollagenfamilie - ungeeignet. Um eine mögliche Kreuzreaktivität zu verhindern, wurde nur die NC1 Region von Kol XXII ausgewählt. Die entsprechende Region wurde in einen episomalen, modifizierten pCEP-4 Expressionsvektor kloniert. Das erhaltene Fusionsprotein enthielt eine N-terminale BM40 Signalsequenz, einen 8-His-„Tag“ und eine nachfolgende Thrombinschnittstelle zur Entfernung des „Tag“.

Ampicillin resistente *E.coli* Klone wurden mittels PCR durchmustert und die Plasmide von positiven Klonen durch Restriktionsmusteranalyse und Sequenzierung verifiziert. HEK293 EBNA Zellen wurden mit dem Konstrukt, welches die NC1 Domäne enthielt transfiziert und die transiente Expression wurde im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen den His-„Tag“ getestet. Nach Selektion auf Puromycinresistenz wurden die Zellen subkloniert. Zellklone, die eine normale Wachstumsrate einhergehend mit hoher Proteinexpression zeigten, wurden für Proteinherstellung unter serumfreien Bedingungen in Kultur gehalten. Das Medium wurde gesammelt und die mit einem His-„Tag“ exprimierte NC1 Domäne wurde über eine Kobaltsäule aus dem konditionierten Medium aufgereinigt. Der His-„Tag“ wurde anschließend mit Thrombin abgeschnitten und in einem zweiten Reinigungsschritt entfernt.

Das aufgereinigte Protein wurde verwendet um ein Kaninchen zu immunisieren. Das Immuserum wurde mit Western Blot Analysen auf Gewebeextrakten, rekombinantem Protein und konditioniertem Zellkulturüberstand auf seine Spezifität hin getestet. Die rekombinante NC1 Domäne wurde an CNBr-Sepharose gekoppelt und der Antikörper affinitätsgereinigt. Der so gewonnene polyklonale Antikörper, als R34 bezeichnet, wurde in Immunfluoreszenzexperimenten sowohl auf Gefrier- als auch auf Paraffinschnitten getestet, wobei der Antikörper nur auf Gefrierschnitten funktionierte.

2.2.3 Kol XXII in Gewebextrakten

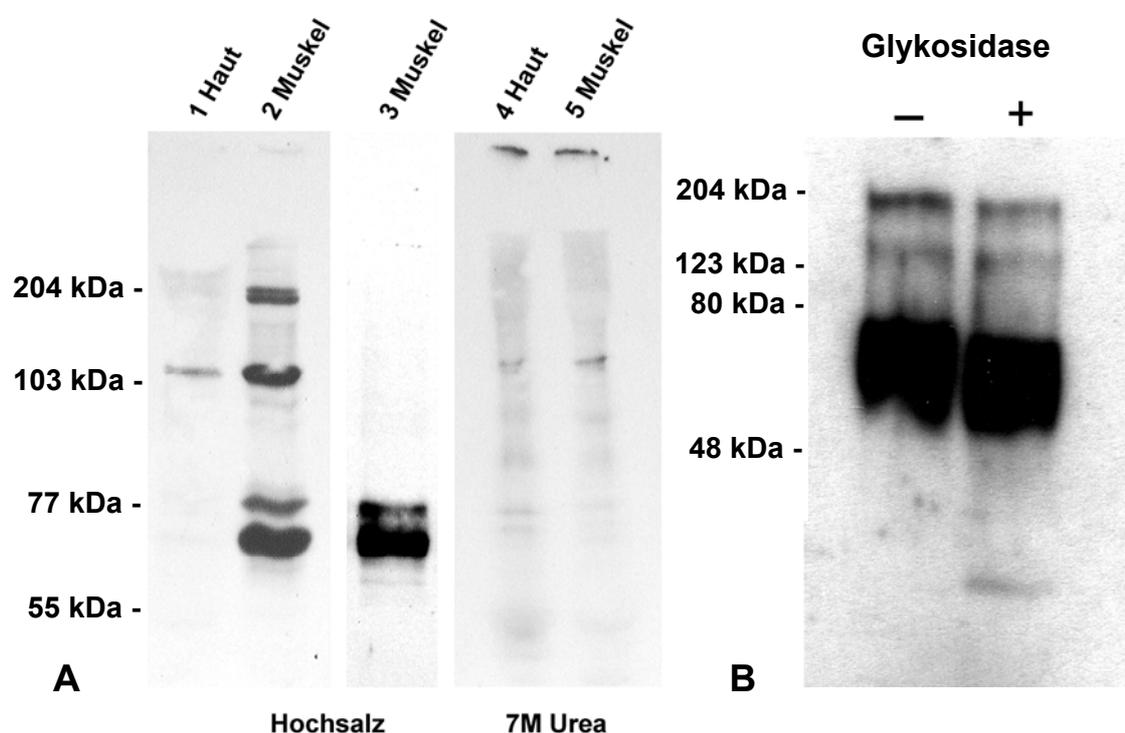


Fig. 2.8: Expression von Kol XXII in Geweben. Immunoblot mit Antikörper R34 auf Gewebeextrakten von muriner Haut und Muskel mit Hochsalz (Spuren 1-3) und Urea (Spuren 4-5). Während in den Hautextrakten nur geringe Mengen Kol XXII gefunden werden konnten (1), konnte aus Muskelgewebe größere Mengen des Proteins extrahiert werden, welches sehr anfällig für Degradierung war (2). Kollagenase verdaute die COL Domäne, so dass nur noch die NC1 Domäne alleine vorlag und detektiert werden konnte (3). Die NC1 Domäne zeigte eine Doppelbande, die auf unterschiedliche Glykosylierung hindeutete. Weitere Extraktionen mit Urea ergaben keine größeren Mengen an extrahiertem Protein (4,5). Ein Verdau von rekombinatem voll-längen Kol XXII mit Glykosidase ergab einen kleinen Unterschied in der Laufgeschwindigkeit im Gel. Hieraus konnte man schließen, dass die vorhergesagten N-Glykosylierungsstellen genutzt werden. Die noch unscharfen Banden deuteten auf eine immer noch vorhandene O-Glykosylierung hin. Die Hauptbande läuft bei 80 kDa, was auf eine starke Degradierung des Proteins zurückzuführen ist, nur wenig des voll-längen Proteins ist vorhanden (204 kDa).

Kol XXII konnte relativ einfach mit Hilfe eines Hochsalzpuffers aus Muskelgewebe und, allerdings weniger effizient, aus Haut isoliert und in Western Blot Analysen mit dem Antikörper R34 detektiert werden (Fig. 2.8 A). Zusätzlich konnten noch geringe Mengen des Proteins mit einer nachfolgenden Urea Extraktion freigesetzt werden (2.8 A). Dabei wurde nicht nur die 200 kDa Bande, die dem voll-längen Protein entspricht gefunden, sondern auch kleinere Fragmente von 110-120 und 70-80 kDa konnten im Immunoblot detektiert werden, was die hohe Anfälligkeit von Kol XXII für Proteolyse demonstriert. Trotz zugesetzter Proteaseinhibitoren und schneller Proteinextraktionsmethoden konnte in keinem Fall nur eine einzelne Bande in Gewebeextrakten gefunden werden. Das

konnte auch anhand des Musters von rekombinanten voll-längen Protein, das nach Lagerung bei 4°C auch sehr stark degradierte, gezeigt werden (Fig. 2.8 A, Fig. 2.20 B). Die an zwei potentiellen Stellen im Molekül vorhergesagte N-Glykosylierung (Fig. 2.2 A) konnte auch experimentell bestätigt werden (Fig. 2.8 B). Dafür wurde das voll-längen Protein mit N-Glykosidase-F inkubiert und in einem Western Blot mit dem Antikörper R34 analysiert. Der „Größenunterschied der Banden demonstrierte, dass eine Glykosylierung vorlag. Ob beide oder nur eine der Stellen posttranslational modifiziert wurden, war hieraus nicht zu erkennen. Versuche zur experimentellen Bestätigung der O-Glykosylierung wurden innerhalb des zeitlich begrenzten Rahmens dieser Arbeit nicht durchgeführt.

2.2.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Gewebeverteilung von Kol XXII wurde mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz (IF) auf Gefrierschnitten neonataler BL/6 Mäuse gezeigt. Hierbei war die auffälligste Beobachtung die sehr spezifische und beschränkte Lokalisation von Kol XXII im Organismus.

Kol XXII konnte nur an Gewebegrenzen in Muskel, Knorpel und Herz lokalisiert werden (Fig. 2.9). Auch hier konnte wiederum kein Kol XXII in neuronalen Geweben und anderen inneren Organen detektiert werden, was die Ergebnisse aus der Northern Blot Analyse bestätigte. Sowohl in axialen Muskeln als auch in der Muskulatur der Extremitäten wurde Kol XXII nur angrenzend an die Aponeurose (Sehnenplatte), sowie am Muskel-Sehnen Ansatz und den Muskelansätzen an den Rippen gefunden (Fig. 2.9, A-C). Die Lokalisation beschränkte sich hier auf den unmittelbaren Bereich des Muskel-Sehnen Ansatzes, weder konnte ein Signal innerhalb der Sehne noch innerhalb des Muskels detektiert werden.

Weitere Signale konnten in Knorpel entdeckt werden. Besonders der Knorpel der Rippen im Bereich des *Sternums*, sowie die der *Synovia* zugewandte oberste Schicht des Gelenkknorpels zeigte eine deutliche Lokalisation von Kol XXII. Auch hier zeigte nicht der gesamte Knorpel eine Deposition von Kol XXII sondern nur in der Oberfläche des Gewebes konnte das Protein gesehen werden.

Im Herz konnte Kol XXII an den Ansätzen der *Chordae tendinae* in den Herzmuskel gefunden werden (2.9, D). Auch hier war die Lokalisation, ähnlich des Muskel-Sehnenansatzes der Skelettmuskulatur, wieder auf eine schmale Zone beschränkt.

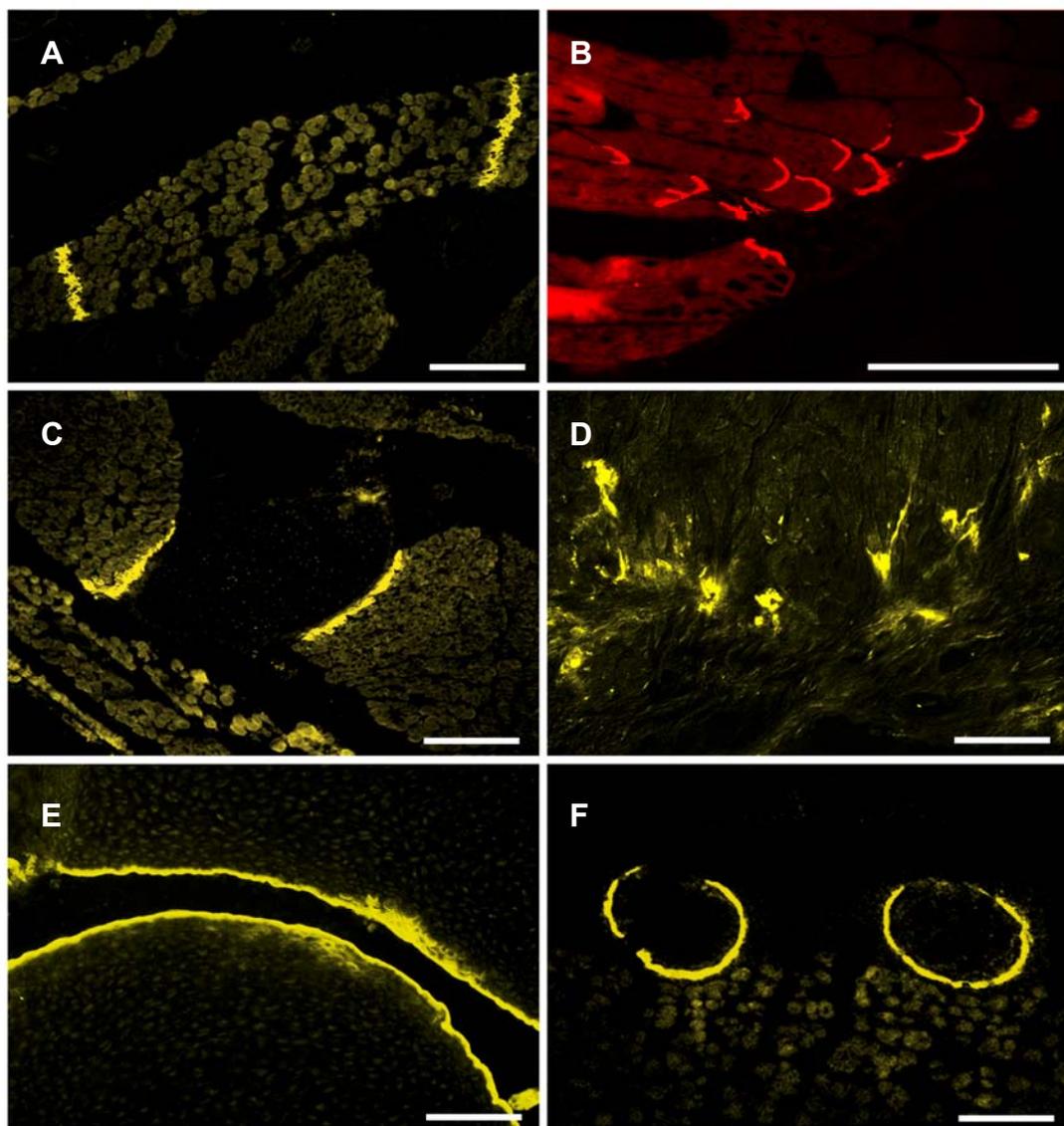


Fig. 2.9: Kol XXII ist an Gewebegrenzen lokalisiert. (A) im Muskel von neugeborenen Mäusen kann eine Lokalisation von Kol XXII an den Aponeurosen, welche die Muskeln miteinander verbinden, detektiert werden. (B) Auch am Muskel-Sehnen Ansatz ist Kol XXII zu finden; es kann weder im weiteren Muskel noch der Sehne gefunden werden. (C) Kol XXII kann auch in Muskelansätzen, welche die Rippen miteinander verbinden, detektiert werden. (D) Im Herz, an der *Chordae tendineae* Insertion des rechten Ventrikels. (E und F) Kol XXII kann auch im Knorpel gefunden werden. Hier ist jeweils die oberste Zone positiv, sowohl im Gelenkknorpel (E) als auch in den Rippen nahe des *Sternums* (F). (Balken=100 μ m)

2.2.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Immunfluoreszenzbilder zeigten die begrenzte Lokalisation der Kol XXII Moleküle an Gewebegrenzen. Um die Verteilung auf ultrastruktureller Ebene zu studieren, wurden elektronenmikroskopische Studien an den Kol XXII positiven Geweben durchgeführt. Hier zeigte sich eine räumlich sehr begrenzte Lokalisation des Proteins im Bereich der Basalmembran, welche die Muskelzelle umschließt und von den Kollagenfasern des Muskel-Sehnen Ansatzes trennt (Fig. 2.10 A und B). Auch hier konnten nur vereinzelt Kol XXII Moleküle innerhalb des Muskels detektiert werden - überhaupt keine Lokalisation konnte innerhalb der Sehne gesehen werden. Bei höherer Auflösung konnte die Lokalisation in der Nähe der *Lamina densa* gezeigt werden.

Übereinstimmend mit den IF Bildern zeigten die EM Studien zudem eine Lokalisation des Proteins an der Oberfläche des Gelenkknorpels in der unmittelbaren Nähe der *Synovia*, aber wiederum keine Deposition in tieferen Schichten des Knorpels (Fig. 2.10 D).

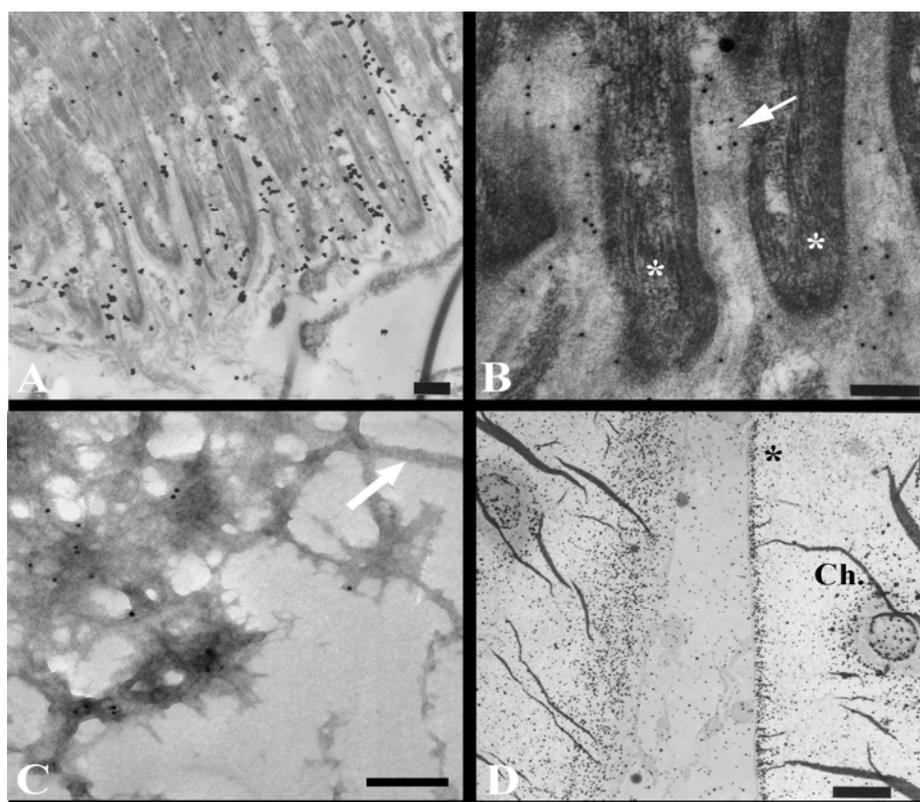


Fig. 2.10: *In situ* Lokalisation von Kol XXII auf ultrastruktureller Ebene. Ultra-dünne Maus-Gewebeschnitte wurden mit dem polyklonalen Antikörper R34 inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem Goldpartikel-markierten zweiten Antikörper sichtbar gemacht. (A, B) Die Zone um die Basalmembran am Muskel-Sehnenansatz enthält Kol XXII. In (A) sieht man die fingerartigen Intrusionen in die Sehne (Asterisk), die von einer Basalmembran umgeben sind. Diese ist positiv für Kol XXII (Pfeil). In (B) kann man, bei höherer Vergrößerung, eine Markierung der *Lamina densa* der Basalmembran im Muskel-Sehnen Ansatz erkennen. (D) Native Fibrillen wurden aus dem Gelenkknorpel extrahiert. Hier kann man erkennen, dass Kol XXII nicht direkt mit den Kollagenfibrillen assoziiert ist (F, weißer Pfeil), eine Lokalisation kann im extrafibrillärem Material gezeigt werden (D). Im Gelenkknorpel ist die oberste Schicht der Knorpeloberfläche gefärbt. (Größenbalken: A,B,D, 200 nm; C, 250 nm; *in Kooperation mit Doug Keene*)

Aufgrund der Lokalisation von Kol XXII im Knorpel und seiner strukturellen Verwandtschaft zu anderen FACIT Kollagenen wurde die Co-Lokalisation von Kol XXII und nativen Kol II Fasern untersucht.

Goldpartikel-markierte Kol XXII Moleküle sind hierbei nicht in den Kollagenfasern zu detektieren. Stattdessen findet man das Protein in filamentösem Material, welches die Fibrillen umgibt (Fig. 2.10 E und F). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei Kol XXII nicht um ein Fibrillen-assoziiertes Kollagen, sondern um ein FACIT-verwandtes Kollagen handelt.

2.2.6 Herstellung eines zweiten Antikörpers gegen die NC1 Domäne

Um Doppel-Immunfärbungen durchführen zu können, wurde ein zweiter Antikörper gegen die NC1 Domäne in Meerschweinchen hergestellt, mit dem die Ergebnisse bestätigt werden sollten, die durch Versuche mit dem polyklonalen Antikörper R34 gewonnen wurden.

Hierfür wurden zwei Meerschweinchen mit der rekombinanten NC1 Domäne, welche auch schon für den ersten Antikörper R34 verwendet wurde, immunisiert. Die gewonnenen Antiseren wurden mit Western Blots auf Gewebeextrakt, rekombinantem Protein und Zellkulturüberstand getestet. Hierbei zeigten beide Tiere eine starke Immunreaktion auf das Protein (nicht gezeigte Ergebnisse).

Die Seren wurden gegen die an CNBr-Sepharose gekoppelte NC1 Domäne affinitätsgereinigt. Die aufgereinigten Antikörper wurden auf Gefrierschnitten getestet und in weiteren Experimenten als polyklonaler Antikörper NC1GP verwendet.

Um die Spezifität der beiden Antikörper NC1GP und R34 zu vergleichen, wurden Doppel-Immunfärbungen durchgeführt. 7,5 µm Gefrierschnitte von neugeborenen BL/6 Mäusen wurden mit beiden Antikörpern parallel inkubiert und mit verschiedenen Sekundärantikörpern detektiert. Die Signale zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung (Fig. 2.11 A-F). Da der Hintergrund des NC1GP Antikörper augenscheinlich geringer war, als der des Antikörpers R34, wurden die folgenden Experimente mit diesem Antikörper durchgeführt und die Ergebnisse mit dem Antikörper R34 bestätigt.

2.2.7 Generierung eines Antikörpers gegen die NC5 Domäne

IF- und EM-Studien zeigten eine Lokalisation von Kol XXII in enger Nachbarschaft zu Muskelzellen und der Basalmembran des Muskel-Sehnenansatzes. Dies legte die Vermutung nahe, dass Kol XXII in Zell-Basalmembran Interaktionen beteiligt ist. Mögliche Bindungsstellen für derartige Interaktionen finden sich an beiden Enden des Kol XXII Moleküls: Die VWA bzw. TSPN Domäne der NC1 Region sind typische Bindungsmotive, die aus anderen Proteinen bekannt sind; die tripelhelikale Kollagendomäne könnte möglicherweise mit Integrinen oder anderen Kollagenhelix-erkennenden Proteinen interagieren. Es stellte sich des Weiteren die Frage wie Kol XXII in der Basalmembran orientiert ist. Die polyklonalen Antikörper R34 und NC1GP waren beide gegen die N-terminale NC1 Domäne gerichtet, deshalb wurde ein zusätzlicher Antikörper gegen die C-terminale NC5 Domäne (Fig. 2.5) von Kol XXII generiert.

Um das rekombinante Antigen herzustellen wurde ein bakterielles Expressionssystem gewählt. Die 40 Aminosäuren lange NC5 Region wurde amplifiziert und in einen modifizierten pGST-Vektor kloniert, so dass das erhaltene Fusionsprotein einen His „Tag“ enthielt. Ampicillinresistente Klone wurden durchmustert, die Plasmid DNA anschließend sequenziert und die Vektoren in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 transformiert. Der Klon mit der besten Expressionsrate wurde für die Proteinexpression verwendet und das Fusionsprotein über eine Ni²⁺-Säule aus dem Bakterienlysat aufgereinigt. Um ein zunächst nach der Reinigung aufgetretenes Ausfallen des Proteins zu verhindern, wurde dem Protein Urea in einer Endkonzentration von 2 M zugegeben. Zwei Kaninchen wurden mit dem Protein immunisiert. Die Antisera wurden wie vorher beschrieben getestet, dabei zeigte nur eines der beiden Tiere eine entsprechende Immunreaktion (nicht gezeigte Ergebnisse).

Das Serum wurde affinitätsgereingt und auf Gefrierschnitten getestet. Der Antikörper zeigte hierbei unspezifische Färbungen. Aus diesem Grund wurde der Antikörper ein zweites Mal gegen das rekombinante voll längen Protein affinitätsgereingt. Der Antikörper wurde auf Gefrierschnitten eingesetzt. Die Färbungen in der Doppel IF zeigten ein weitestgehend übereinstimmendes Muster mit dem NC1GP Antikörper (2.11 G-M), wenngleich der Antikörper gegen die NC5 Region etwas weniger spezifisch zu sein scheint. Dies liegt vermutlich an dem sehr kleinen Epitop, lässt aber trotzdem eine adäquate Detektion des Proteins zu.

Aufgrund der zeitlichen Beschränkungen während dieser Arbeit konnten die Versuche zur Basalmembranorientierung von Kol XXII nicht mehr durchgeführt werden.

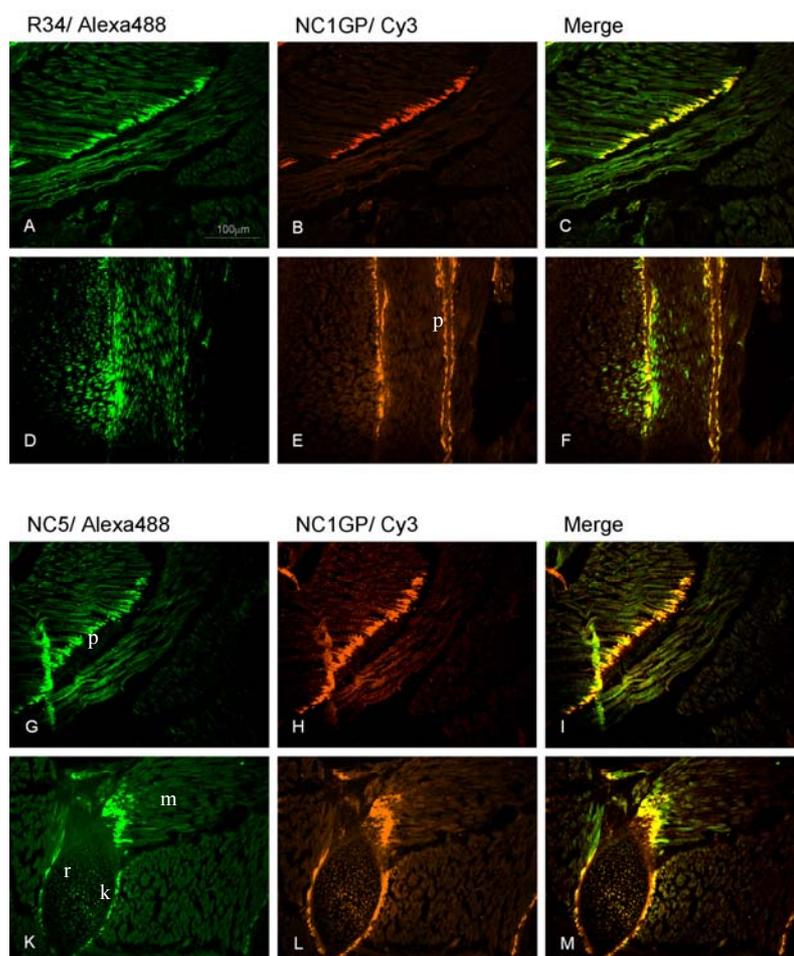


Fig. 2.11: Vergleich der Kol XXII Antikörper in der Doppel-IF auf Gewebeschnitten. Die verschiedenen affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper gegen Kol XXII wurden auf Gefrierschnitten von neugeborenen Mäusen getestet. (A-F) Muskel-Sehnenansätze in der Doppel-IF mit den Antikörpern gegen die NC1 Domäne R34 (A, D) und NC6GP (B, E) und überlagert (C, F). Beide Antikörper zeigen eine hohe Übereinstimmung und färben beide den Muskel-Sehnen Ansatz, aber nicht die Aponeurose an sich. (G-M) Doppel-IF der pAK NC5 (gegen die NC5 Domäne G, K) und NC1GP (H, L). Auch hier kann gezeigt werden, dass beide Antikörper spezifisch sind und Kol XXII v.a. im Muskel-Sehnenansatz zu finden ist (G-I), außerdem noch im Knorpel um die Rippen. Der NC5 Antikörper zeigt einen höheren Hintergrund innerhalb des Muskels (K-M). (Rippe: „r“, Aponeurose „p“, Muskel „m“, Knorpel „k“)

2.2.8. Verteilung von Kol XXII während der Embryonalentwicklung

Die sehr beschränkte Expression von Kol XXII in der neugeborenen Maus konnte gezeigt werden. Es ergab sich die Fragestellung, ab wann Kol XXII in der Entwicklung exprimiert wird und ob die beschränkte Lokalisation auch während der Entwicklung zu sehen ist.

Gefrierschnitte von Mausembryonen der Stadien E5,5 - E18,5 sowie neugeborener Mäuse wurden mit dem NC1GP Antikörper inkubiert. Für die sehr frühen Stadien E5,5-E7,5 konnte keine Lokalisation von Kol XXII gezeigt werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Von E8,5 an konnte das Protein permanent in der Maus detektiert werden. Die

Lokalisation war zu diesen frühen Zeitpunkten in den sich entwickelnden Somiten zu finden, aber das Expressionsmuster ist noch sehr diffus (nicht gezeigte Ergebnisse). Ab E12,5 konnte man eine Kondensation an den sich formenden Somiten feststellen, (Fig. 2.12/ E12,5 und 2.13 A). Hierbei konnte eine starke Konzentration entlang der Längsachse dorsal der *Chorda dorsalis*, die allerdings entlang der Achse in regelmäßigen Abständen unterbrochen war, gesehen werden. Ob hierbei die Somiten selbst oder die Somitengrenzen die Zonen mit der stärksten Kol XXII Lokalisation darstellten konnte nicht unterschieden werden.

Innerhalb des Somiten oder der Somitengrenzen konnte auch eine unterschiedliche Deposition von Kol XXII festgestellt werden: dorsal war Kol XXII stärker konzentriert als im ventralen Teil; sporadische Anhäufungen von Kol XXII konnte auch in anderen sich entwickelnden axialen Muskeln gesehen werden (Fig. 2.13). Ab E14,5 beginnen sich Muskeln aus den Muskelvorläufern zu entwickeln und auch die Sehnenentwicklung läuft parallel dazu. Kol XXII konnte ab diesem Zeitpunkt im ganzen Embryo an möglichen Muskel-Sehnenverbindungen detektiert werden. (Fig. 2.12/ E14,5 und 2.14 A-D). Eine Färbung konnte jetzt zusätzlich an den sich entwickelnden Rippen, wobei hier der Knorpel gefärbt ist, wahrgenommen werden. (Fig. 2.12/ E14,5 und 2.15). Von Tag E16,5 an wurde die Kol XXII Lokalisation immer schärfer abgegrenzt; das Muster zeigte aber keine grundsätzlichen Veränderungen mehr zu den vorherigen Stadien. Es können weitere Muskel-Sehnen Ansätze detektiert werden. Parallel dazu wird auch das Kol XXII Muster an den sich formenden Wirbeln definierter und abgegrenzter. (Fig. 2.12/ E16,5- E18,5 und 2.15). Interessanterweise kann das Kollagen während der Embryonalentwicklung – im Gegensatz zur neugeborenen Maus - nicht im Herz festgestellt werden.

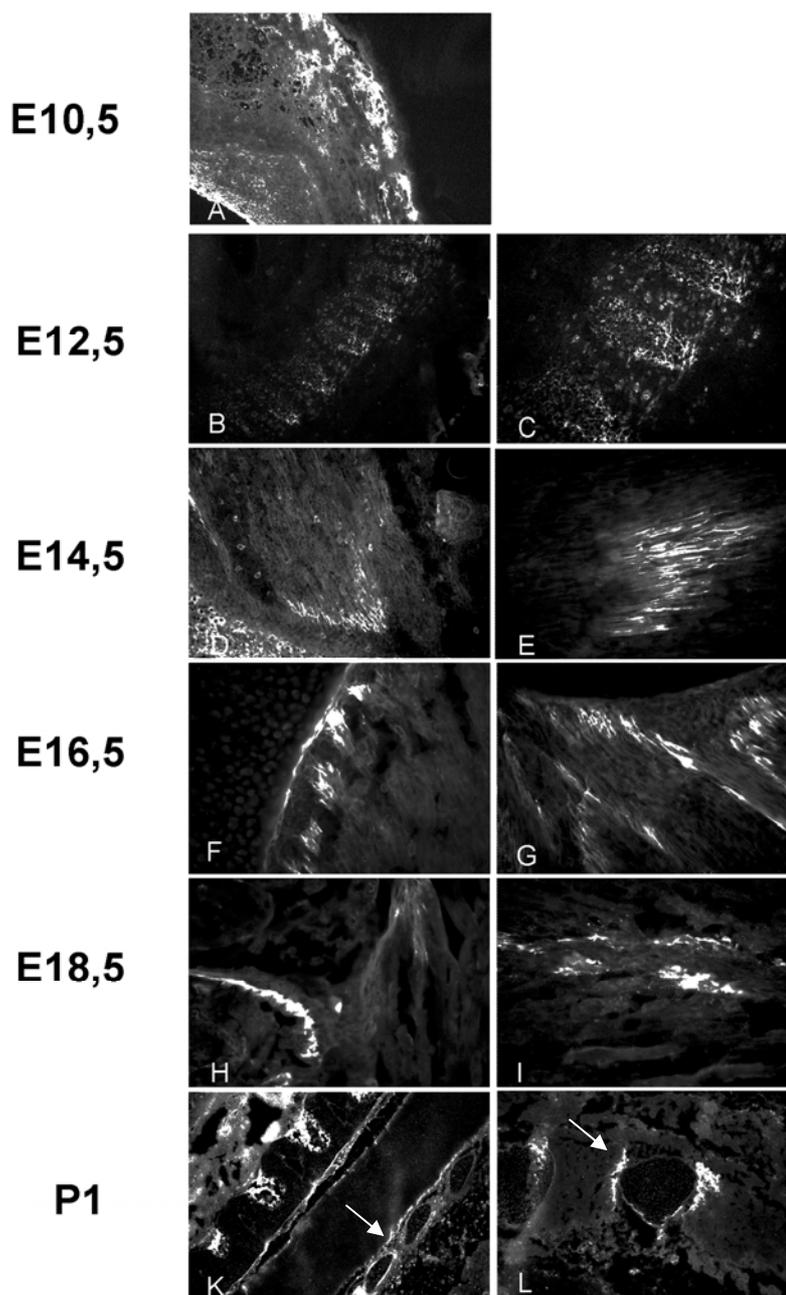


Fig. 2.12: Überblick über die Kol XXII Lokalisation im sich entwickelnden Embryo. Die Färbung ist noch diffus (A). Kol XXII kann im Bereich der Somiten detektiert werden, ist dort aber auf keine bestimmte Zone beschränkt (B, C). Kol XXII kann entlang der Somiten detektiert werden. Es kann eine dorsale Kondensation, sowie eine Konzentration der Kol XXII positiven Zone entlang der Somitengrenzen oder innerhalb der Somiten, gesehen werden (Pfeil) (D, E). Die sich formenden Muskelenden zeigen eine Lokalisation von Kol XXII, welche aber noch nicht scharf von den umliegenden Geweben abgegrenzt ist. (F) Die Färbung an den Somiten hat sich noch weiter abgegrenzt von den umliegenden Geweben und die positive Zone ist noch weiter nach ventral verschoben. Man kann sehen, dass die Wirbel an sich nicht gefärbt sind, sondern nur das umliegende Gewebe. (G) Der sich formende Muskel-Sehnen Ansatz wird immer stärker abgegrenzt von den umliegenden Geweben. (H, I) Diese Beobachtung kann auch in der weiteren Entwicklung gemacht werden. (K) in P1 ist der Muskel-Sehnenansatz schließlich voll entwickelt und verbindet die Muskeln mit den Bändern in axialen (K, Pfeil) und costalen (L, Pfeil) Muskeln.

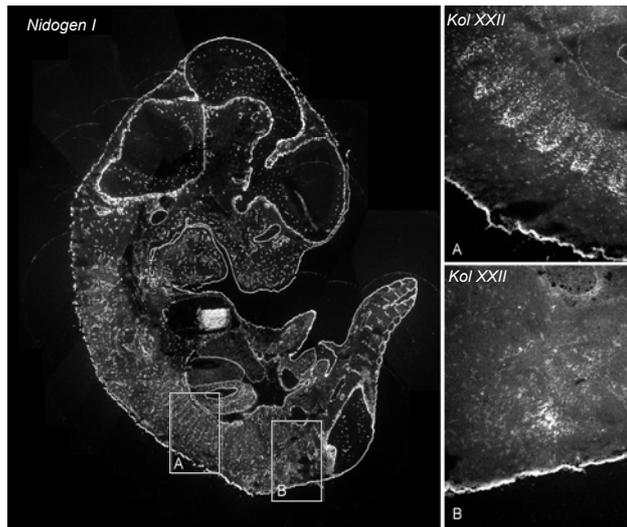


Fig. 2.13: E12,5: (Übersicht: gefärbt mit einem polyklonalen Nidogen 1 Antikörper, welcher die Basalmembranen darstellt) (A) Dorsale Kondensation von Kol XXII im Bereich der Somiten. (B) Ein Vorläufer des Muskel-Sehnen Ansatzes ist positiv für Kol XXII in der Region eines axialen Muskels.

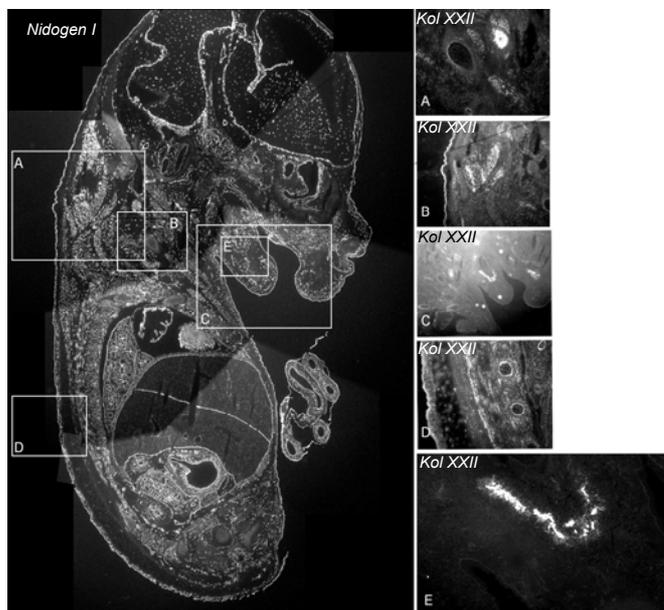


Fig. 2.14: E14,5: (Übersicht: Nidogen 1) (A) Longitudinaler Schnitt durch eine sich entwickelnden Muskel-Sehnen-Ansatz. (B) kleinere, sich bildende Aponeurosen zwischen Muskelstrangvorläufern; die Muskeln an sich zeigen kein Kol XXII positives Signal, (C und E) was ebenfalls im Bereich des sich entwickelnden Unterkiefers gesehen werden kann. Hier beginnt sich der Meckel'sche Knorpel zu entwickeln und in einer XXII positiven Zone zu kondensieren. (D) Die sich formenden Wirbel sind von Knorpel umgeben. Dieser ist positiv für Kol XXII. Zusätzlich zeigt der sich formende *m. longissimus dorsi* Kol XXII Färbung.

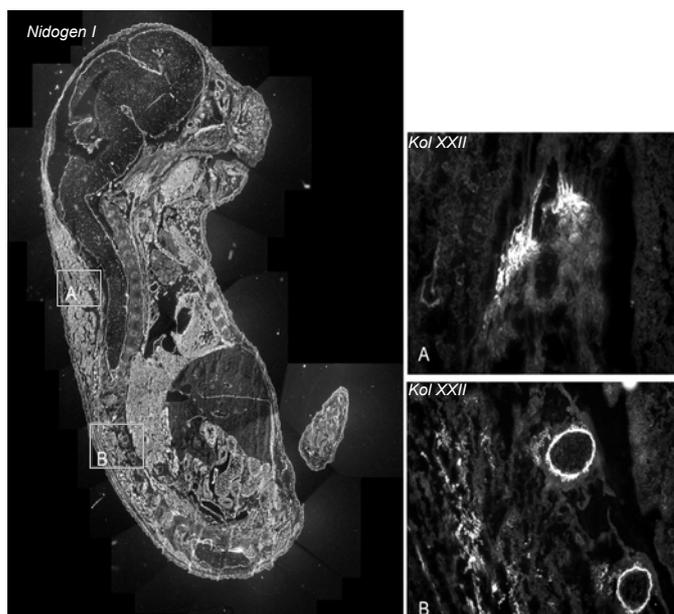


Fig. 2.15: E16,5: (Übersicht: Nidogen 1) Kol XXII positive Zonen sind mittlerweile streng abgegrenzt von den sie umgebenden Geweben. (A) Der Muskel-Sehnen Ansatz ist klar zu erkennen, weder die Sehne an sich, noch der komplette Muskel sind positiv für Kol XXII. (B) Die Wirbel sind in diesem Ausschnitt von einer Kol XXII pos. Zone umgeben, die den Knorpel repräsentiert. Auch der *m. longissimus dorsi* ist teilweise Kol XXII positiv was andeutet, dass er noch nicht voll entwickelt ist.

2.2.9 *In situ* Detektion von Kol XXII mRNA

Die Lokalisation von Kol XXII an Gewebegrenzen im Muskel-Sehnen Ansatz konnte gezeigt werden. Um die Frage zu beantworten welche Zellen hier Kol XXII exprimieren, wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. 7,5 µm Paraffinschnitte neugeborener BL/6 Mäuse wurden dafür mit Sonden für Kol XXII und Kol I, als Marker für Fibroblasten, hybridisiert.

Kol XXII mRNA konnte nur innerhalb der Muskelzellen gefunden werden - die Fibroblasten zeigten kein Kol XXII positives Signal (Fig. 2.16). Innerhalb der Muskelzellen beschränkte sich die Lokalisation der mRNA auf den Bereich in unmittelbarer Nähe des Muskel-Sehnen Ansatzes, der Aponeurose und den Bereich des Muskel-Ansatzes an den intercostalen Muskeln der Rippen.

Kol I ist ein typischer Fibroblastenmarker und wird nicht von Muskelzellen gebildet. Wie gezeigt werden konnte, fand sich Kol XXII mRNA nur in Bereichen die negativ für Kol I mRNA Signale sind (Fig. 2.16 C, D), womit ausgeschlossen werden konnte, dass Kol XXII hier von Fibroblasten exprimiert wurde.

Diese Resultate stimmen mit denen, aus den IF gewonnenen überein und zeigen, dass Kol XXII von Muskelzellen im Bereich des Muskel-Sehnen Ansatzes gebildet wird.

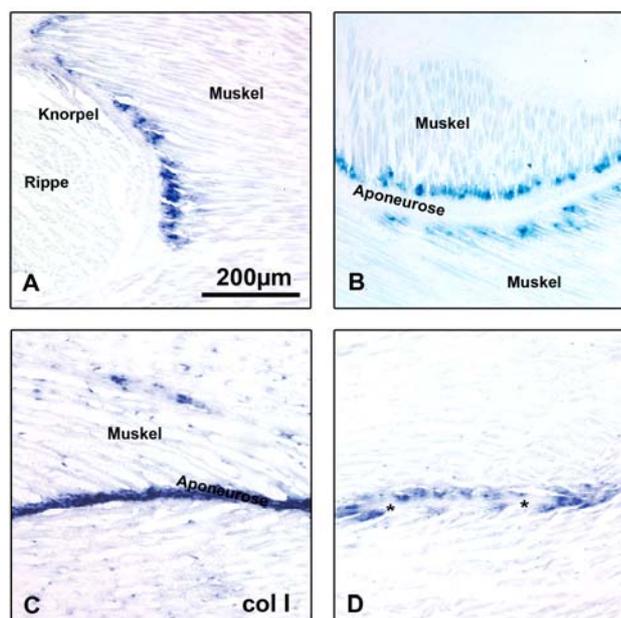


Fig. 2.16: *In situ* Hybridisierung: (A) Kol XXII mRNA wurde in den intercostalen Muskeln der Rippen detektiert. Die Färbung ist beschränkt auf eine enge Zone nahe der Rippen. Keine Signale konnten innerhalb der Knochen und in Muskelzellen, die nicht unmittelbar an den Muskel-Sehnen Ansatz anschließen, detektiert werden. (B) Auch an Aponeurosen kann, wie aus (C) ersichtlich ist, innerhalb des Bindegewebes keine Kol XXII mRNA detektiert werden; hier ist die Aponeurose für Kol I gefärbt. (D) Fibroblasten (Asterisken) besitzen keine Kol XXII mRNA, gefärbt sind nur die Muskelzellen.

2.3. Biochemische Charakterisierung von Kol XXII

Vergleiche der Aminosäuresequenzen von Kol XXII mit anderen FACIT Kollagenen zeigten die strukturelle Übereinstimmung mit diesen Proteinen. Aussagen zur vorhergesagten Struktur des Moleküls sollten experimentell bestätigt werden. Die Lokalisation von Kol XXII konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden. Unklar blieb dabei, mit welchen Molekülen Kol XXII in diesen Geweben mögliche Bindungen eingehen könnte. Hierfür sollten Interaktionsstudien mit Kollagenrezeptor-exprimierenden Zelllinien durchgeführt werden. Diese Ergebnisse sollten in weiteren Experimenten mit rekombinanten Rezeptoren verifiziert werden.

2.3.1 Expression von rekombinantem humanen Kol XXII

Um Kol XXII auch biochemisch charakterisieren zu können, wurde das voll-längen Protein rekombinant hergestellt.

Dafür wurde die cDNA von 1599 Aminosäuren - ohne eigene Signalsequenz - auf cDNA von humanem Knorpel via PCR amplifiziert und in einen modifizierten PCEP-4 Expressionsvektor inkloniert. Ampicillin resistente *E.coli* Klone wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. HEK293 EBNA Zellen wurden transfiziert und die transiente Expression wurde mit einem monoklonalen His-„Tag“ Antikörper im Western Blot getestet. Nach der Selektion mit Puromycin wurden die Zellen subkloniert, um Klone mit normalem Wachstum und hoher Protein Expressionsrate zu identifizieren. Um die Hydroxylierung von Prolin und Lysin zu gewährleisten, wurde dem Medium Ascorbat und Ascorbat-Phosphat zugegeben (Chepda et al., 2001).

Es war nicht möglich das Protein in einem Schritt über seinen His-„Tag“ aufzureinigen, da keine Bedingungen gefunden werden konnten bei denen das Protein in ausreichender Menge an eine der verschiedenen getesteten Metallionensäulen gebunden hatte. Um dieses Problem zu umgehen, sollte das Protein mit 2M Urea denaturiert werden, um den His-Tag zugänglicher zu machen. Dafür wurde das Protein zunächst mit Ammoniumsulfat (45% Sättigung) aus dem Medium ausgefällt und in Bindepuffer resuspendiert. Wie schon gezeigt wurde, ist Kol XXII sehr anfällig für Degradierung. Um im Voraus degradierte Kol XXII Fragmente und andere unerwünschte Proteine abzutrennen, wurde das präzipitierte Protein über eine Molekularsiebsäule aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Fig. 2.17). Die Fraktionen, welche nur voll-längen Protein enthielten, wurden zusammengefasst und Urea zu einer Endkonzentration von 2M zugegeben. Im

Anschluss daran wurde das Protein über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt (Fig. 2.18). Die Bindung war auch unter diesen Bedingungen schwach, so dass der größte Teil des Proteins nicht an die Säule gebunden hatte. Trotzdem konnte mit dieser Methode rekombinantes Kol XII gewonnen werden. In einem letzten Schritt wurde dann der His-„Tag“ abverdaut und entfernt.

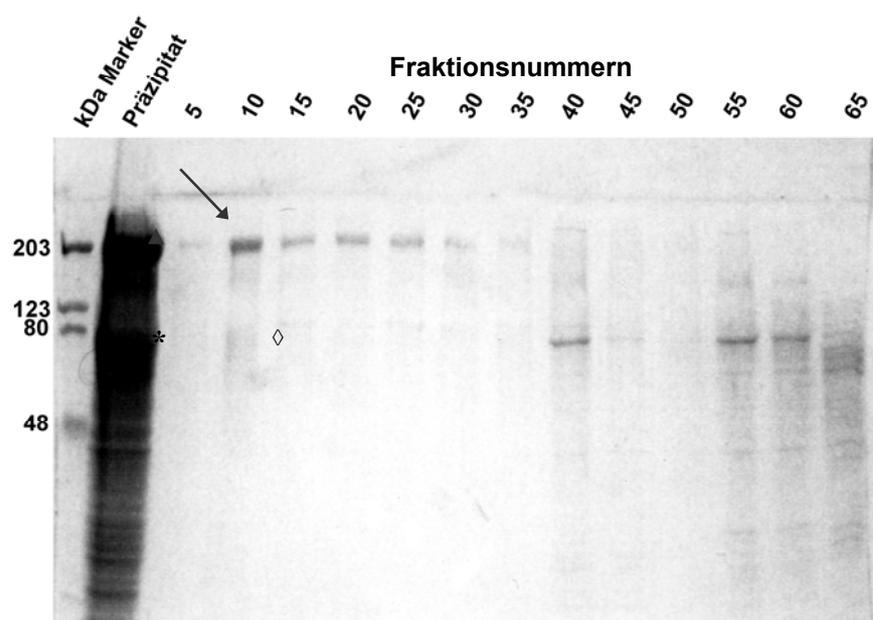


Fig. 2.17: Gelfiltration von rekombinantem Kol XXII: Als erster Schritt zur Aufreinigung von Kol XXII aus konditioniertem Medium wurde das ausgefällte Protein über eine Molekularsiebsäule aufgetrennt (CL4-B Sepharose). Die gewonnenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAGE analysiert. Die ungereinigte Proteinfraction zeigt neben der Kol XXII Bande (Pfeilspitze) noch andere Proteine und auch eine starke Bande bei ~75 kDa bei der es sich vermutlich um die NC1 Domäne handelt. (Asterisk) (5-35) Relativ reine Kol XXII Fraktionen (Pfeil) wurden für eine weitere Reinigung gepoolt. Auch hier sieht man eine dünne Abbaubande (◊). (35-65) Die weiteren Fraktionen wurden verworfen.

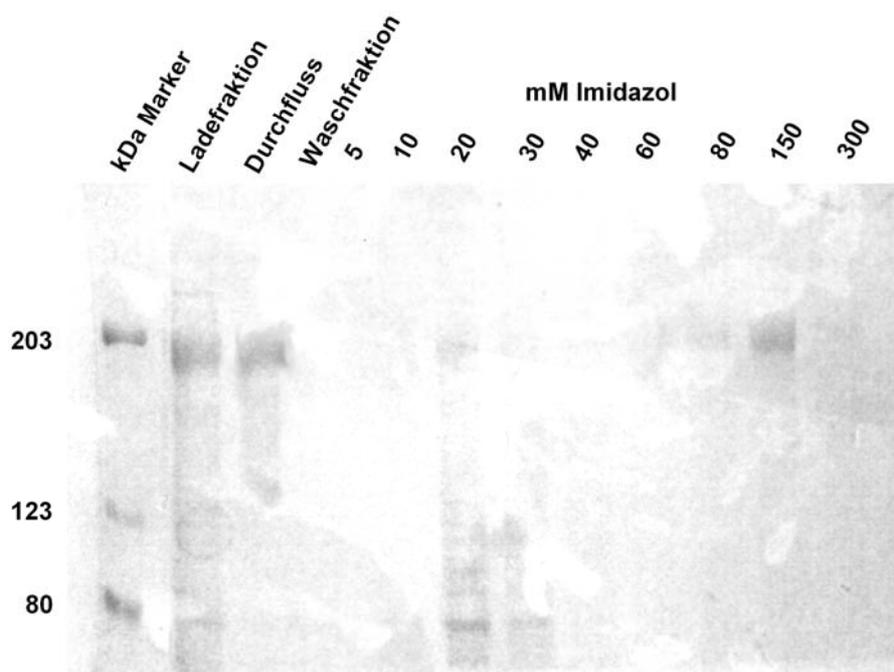


Fig. 2.18: Aufreinigung von Kol XXII über eine Ni²⁺-NTA Säule. Die Kol XXII Proteinfractionen, welche über das Molekularsieb vorgereinigt wurden, wurden anschließend über den His-Tag an eine Metallionensäule gebunden und aufgereinigt. Das geladene Protein, das mit 2M Urea versetzt war, zeigt nur schwache Bindung an die Säule. Trotzdem konnte aus der 150 und 300 mM Imidazolfraktion genügend Protein isoliert werden.

2.3.2 Elektronenmikrooptische Analyse

Rekombinante voll-längen Kol XXII Moleküle konnten mit Hilfe von „Rotary Shadowing“ im Transmissions-Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass Kol XXII eine flexible Struktur besitzt, die anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt wurde (Fig. 2.5 und 2.19 A-D). Das Protein war in zwei hauptsächliche Regionen unterteilt, wobei eine Domäne eine stab-ähnliche Struktur zeigte, die mit einer Länge von ca. 301 ± 15 nm der Kollagenomäne entsprach. Hier zeigten sich einige Knicke und Biegungen, die vermutlich durch die nicht-kollagenen Domänen ermöglicht wurden und die flexible Struktur des Kol XXII Moleküls verdeutlichen.

Des Weiteren konnten globuläre Strukturen, die vermutlich der N-terminalen NC1 Domäne entsprachen, gesehen werden (Pfeile). Die allein untersuchte rekombinante NC1 Domäne nimmt eine globuläre Struktur an (2.19. D), die von der Größe mit den globulären Struktur des voll-längen Proteins übereinstimmte.

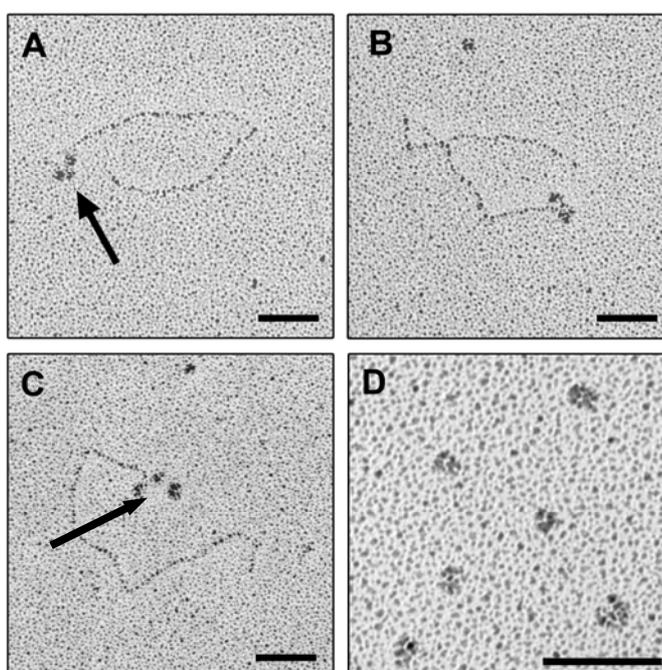


Fig. 2.19: „Rotary shadowing“ Aufnahmen von aufgereinigtem Kol XXII. (A-C) Drei voll-längen Moleküle sind zu sehen. Bei der dünnen, Stab-ähnlichen Struktur handelt es sich vermutlich um die Kollagenregion, wobei Knicke und Biegungen die nicht-Kollagen Regionen darstellen. Zusätzlich enthält das Protein drei globuläre Domänen, die möglicherweise den NC1 Regionen entsprechen (Pfeile). (D) Die rekombinante NC1 Domäne alleine bildet einzelne Kugeln. (Balken=50 nm, *in Kooperation mit Doug Keene*)

2.3.3 Interaktion von Kol XXII mit Integrinen

Wie eingangs erwähnt, konnte demonstriert werden, dass ein Teil der Proteinfamilie der Integrine tripelhelikale Kollagenmotive binden. Die Bindung von Kol XXII zu verschiedenen Integrinen wurde untersucht. Hierfür wurde die Interaktion sowohl zu speziellen Integrin-exprimierenden Zellen in Zell-Adhäsions-Assays als auch die Bindung zu rekombinanten Integrinen im „Solid Phase Ligand Binding Assay“ gemessen.

Um die Bindungsstelle innerhalb des Proteins eingrenzen zu können, wurden zusätzlich noch verschiedene Fragmente der C-terminalen Region von Kol XXII rekombinant exprimiert. Das größte dieser Fragmente überspannte den gesamten C-Terminus ab der NC4 Region, die anderen waren kleinere Fragmente davon (Fig. 2.20). Diese Proteine wurden auch in Zell-Adhäsions-Assays und „Solid Phase Ligand Binding Assays“ auf ihre Interaktion zu den Kollagen-bindenden Integrinen untersucht.

2.3.3.1 Integrin Bindungsstudien

Die Bindung von voll-längen Kol XXII, sowie verschiedener rekombinanter Fragmente zu Integrin $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ wurde zuerst in „Solid Phase Ligand Binding Assays“ ermittelt. In verschiedenen Konzentrationen an eine Platte gekoppeltes Kol XXII Protein wurde hierfür mit den beiden Integrinen inkubiert, und danach die Menge des gebundenen Integrins detektiert.

Eine Bindung von Kol XXII zu beiden Integrinen konnte gezeigt werden. Zusätzlich zum voll-längen Protein zeigten sowohl das größte C-terminale Fragment KV305 sowie die etwas kürzere Variante KV317 eine Interaktion mit den getesteten Integrinen (Fig. 2.20). Die halbmaximale Bindung war hierbei mit 23 nM für $\alpha 2\beta 1$ und schon bei 5,3 nM für $\alpha 1\beta 1$ erreicht (Fig. 2.21 und 2.23). Die Bindungen waren Metallionen abhängig, nach Zugabe von EDTA konnte keine Interaktion mehr festgestellt werden (Fig. 2.21).

Um zu zeigen, dass sowohl Kol XXII als auch die C-terminalen Fragmente eine stabile Tripelhelix ausbilden, wurden sie mit Trypsin verdaut (exemplarisch dafür KV305 Fig. 2.20 C). Die nicht Hitze-denaturierten Fragmente waren hierbei resistent gegen das Trypsin, während die bei 100°C denaturierten Fragmente effizient degradiert wurden.

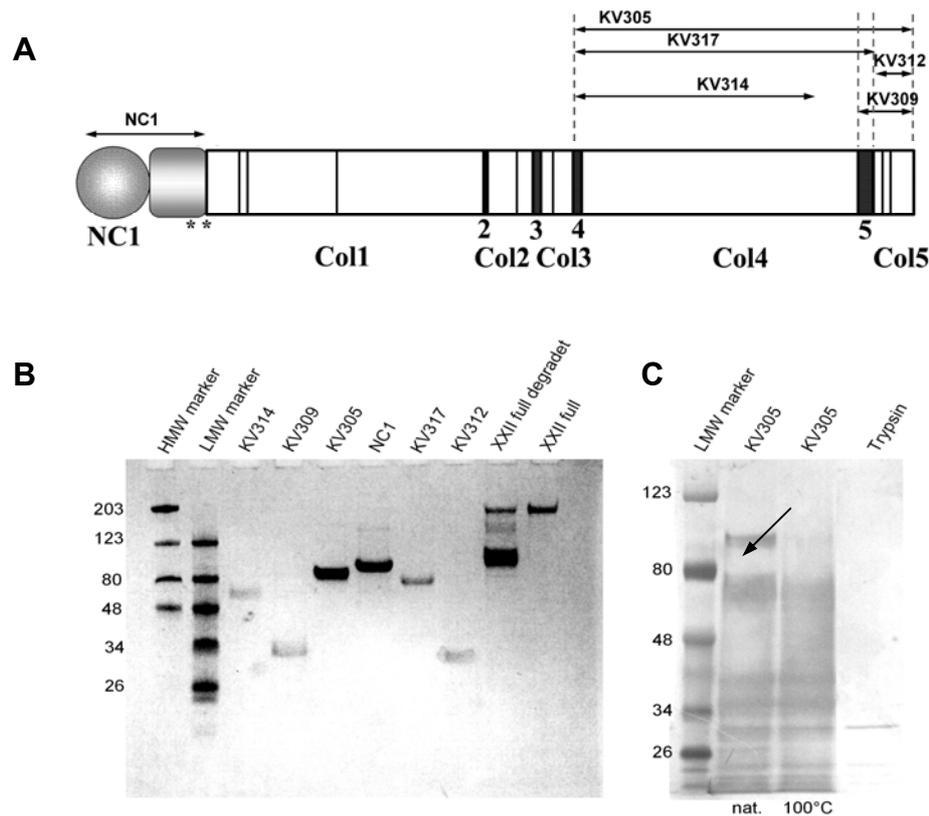


Fig. 2.20: A,B,C Expression rekombinanter Kol XXII Fragmente: Um die Interaktion von Kol XXII mit Integrinen messen und auch die Integrin Bindungsstelle innerhalb des Moleküls identifizieren zu können, wurde das voll-längeren Protein sowie kleinere Fragmente davon hergestellt. (A) schematische Übersicht über die Verteilung der einzelnen Fragmente. (B) Die Fragmente wurden rekombinant hergestellt und über ihren His-Tag aufgereinigt. SDS-PAGE zeigt die rekombinanten Fragmente im Vergleich zum voll-längeren Protein. (C) Um testen zu können, ob die rekombinanten Proteine eine stabile Tripelhelix aufweisen, wurden Hitze-denaturierte und native Fragmente im Vergleich mit Trypsin verdaut und auf einem SDS-PAGE mit Silberfärbung verglichen. Es zeigt sich, dass die Bande von KV305 (Pfeil) unter nativen Bedingungen dem Trypsin widersteht, während das denaturierte Fragment nicht resistent ist.

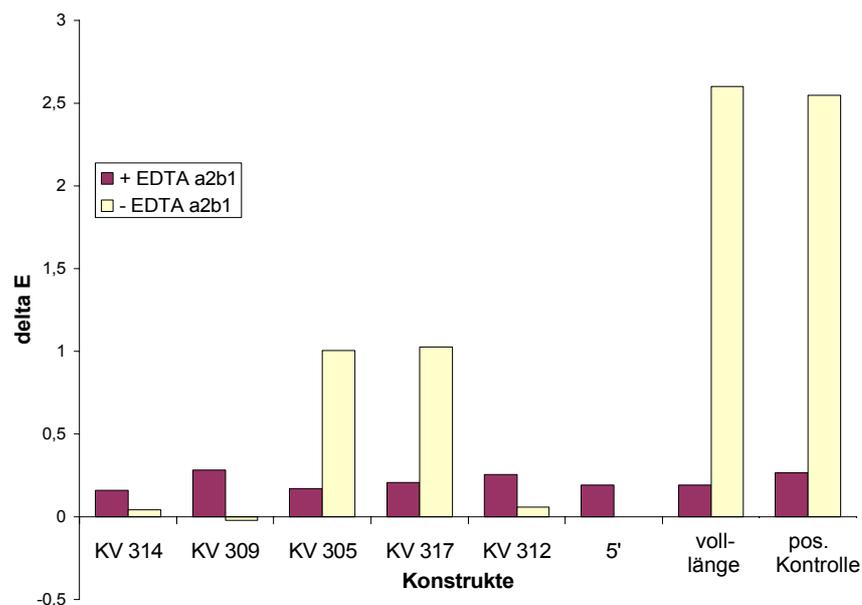


Fig. 2.21: Bindung von Kol XXII zu $\alpha 2\beta 1$ Integrin. Die Bindung von voll-längeren Protein und rekombinanten Protein wurde getestet. Das voll-längeren Protein ebenso wie die beiden sich überlappenden Fragmente KV305 (kompletter C-Terminus) und KV317 (NC4 bis inkl. NC5) binden das Integrin. Die anderen Fragmente zeigen keine Interaktion. Die Bindung ist Metallionen abhängig; nach Zugabe von EDTA kann keine Interaktion mehr festgestellt werden. (Pos. Kontrolle: Fibronectin)

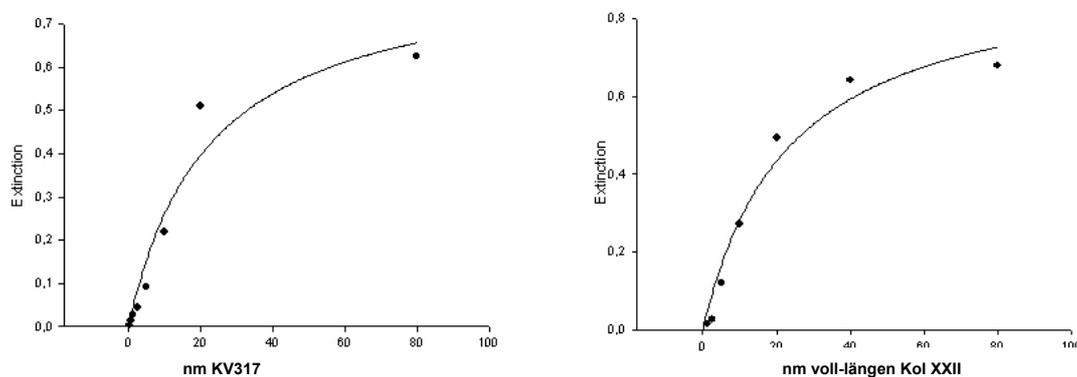


Fig. 2.22: Bindungskurve von Kol XXII zu Integrin $\alpha 2\beta 1$. Die Bindungskurven für das voll-längen Protein und das Fragment KV317 wurden ermittelt. Beide Kurven zeigen einen gleichen Verlauf. Hieraus konnte eine halbmaximale Bindungsstärke von 23 nM ermittelt werden.

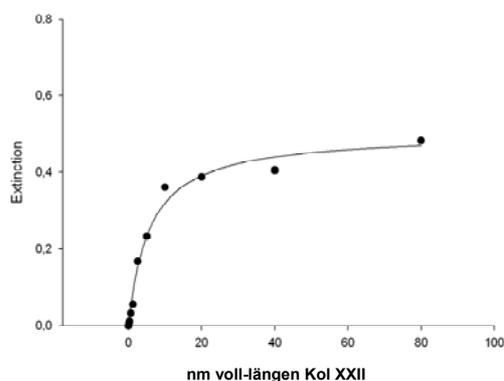


Fig. 2.23: Bindung von Kol XXII zu Integrin $\alpha 1\beta 1$: Das voll-längen Protein bindet sehr effizient an $\alpha 1\beta 1$ Integrin. Die halbmaximale Bindung ist schon bei 5 nM erreicht.

2.3.3.2 Interaktion von Kol XXII mit Integrin-exprimierenden Zellen

Um die Ergebnisse aus den „Solid Phase Ligand Binding Assay“ zu bestätigen und noch zusätzlich $\alpha 10\beta 1$ Integrin, welches dafür nicht zur Verfügung stand testen zu können, wurde die Affinität von voll-längen Kol XXII und den rekombinanten Fragmenten zu Integrinen in „Cell Attachment Assays“ untersucht.

Zwei gut charakterisierte Zelllinien wurden für diese Experimente ausgewählt. Wi26, eine humane Lungen Fibroblasten Zelllinie, welche $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin exprimiert, und HACAT Zellen, welche als Kollagen Bindepartner nur $\alpha 2\beta 1$ Integrin produzieren.

Zusätzliche Bindungsstudien wurden mit CHO Zellen (Chinese Hamster Ovary) durchgeführt. Diese Zellen besitzen keine natürlich exprimierten Integrine (CHO wt). Mutanten dieser Zelllinie exprimieren $\alpha 2\beta 1$ oder $\alpha 10\beta 1$ Integrin (Kapyla et al., 2004).

Alle Integrin exprimierenden Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Interaktion mit Kol XXII, während die CHO wt Zellen nicht gebunden wurden (Fig. 2.24). Das

Bindungsmaximum wurde bei Konzentrationen von 5-10 $\mu\text{g/ml}$ erreicht (Fig.2.25 A, B). Diese Versuche bestätigten die Interaktionen von Kol XXII zu $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin, die zuvor in den „Solid Phase Ligand Binding Assay“ gemessen wurden.

Die Bindung der Fragmente von Kol XXII zu den Integrinen war schwächer als zum voll-längen Protein. Trotzdem lassen die Messungen einen Schluss auf die Integrin Bindungsstelle im Kol XXII Molekül zu. Eine Interaktion konnte wiederum nur für die Fragmente KV305 und KV317 gemessen werden. Somit kann die Integrinbindungsstelle auf eine 110 Aminosäuren große Region in der COL4 Domäne, oberhalb der NC5 Region eingegrenzt werden.

Es ist gezeigt worden, dass die Interaktion zwischen Integrinen und Kollagenen nicht direkt über die Tripelhelix als Erkennungsmotiv abläuft, sondern eine spezielle Erkennungssequenz (z. B. *GFOGER* oder ähnlich) notwendig ist.

Bei der Analyse der Aminosäuresequenz von Kol XXII konnte kein klassisches Integrin-Bindungsmotiv gefunden werden. Dies lässt auf eine unkonventionelle, möglicherweise neue Art der Bindung zwischen Kol XXII und Integrinen schließen.

2.3.3.3 Abhängigkeit der Integrinbindung von tripelhelikaler

Konformation

Um zu testen, ob die Integrine für die Erkennung des Kol XXII eine stabile Tripelhelix benötigen, oder ob schon eine monomere α -Kette genügt, wurde sowohl das voll-längen Protein als auch die rekombinanten Fragmente Hitze-denaturiert (80°C, 5 Min.) und in „Cell Attachment Assays“ mit den nicht-denaturierten Fragmenten getestet. Die Bindung fiel daraufhin stark ab, nur noch eine sehr schwache Interaktion konnte beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass die tripelhelikale Konformation obligatorisch für die Integrininteraktion *in vitro* ist (Fig. 2.23).

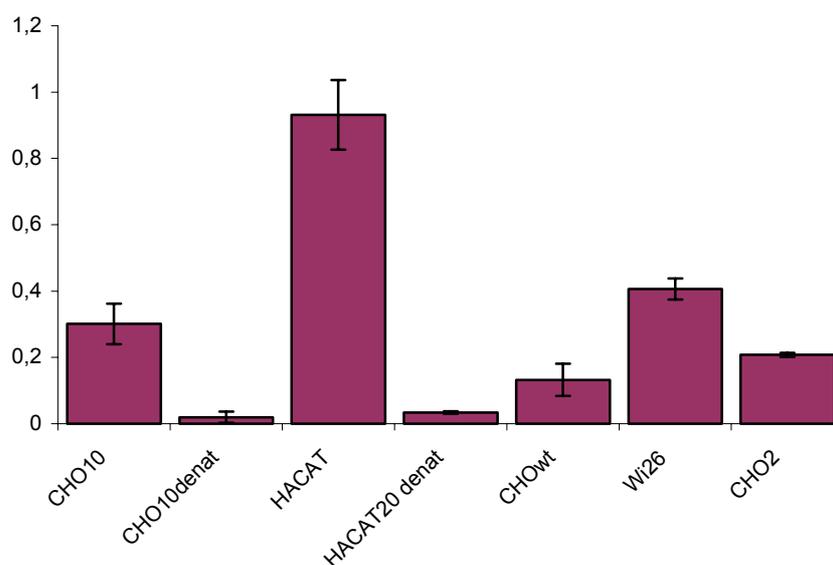


Fig. 2.23: Cell Attachment Assays mit verschiedenen Integrin exprimierenden Zellen. Alle getesteten Zellen binden an Kol XXII in nativem Zustand. Die Bindung ist Tripelhelix abhängig; bei denaturiertem Protein zeigten die Integrinexprimierenden Zellen keine Anheftung mehr.

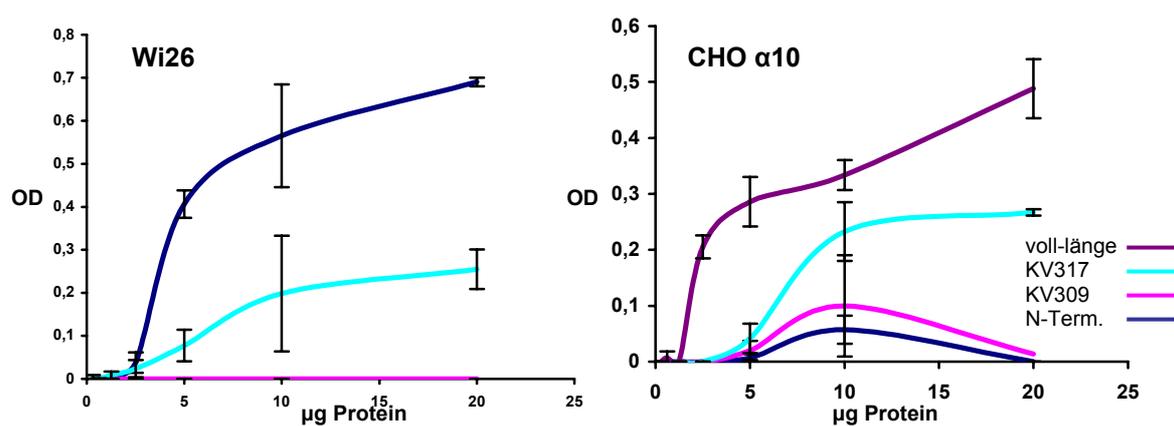


Fig. 2.24 A,B: Bindungskurven für (A) Wi26 ($\alpha 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin) und (B) CHO $\alpha 10\beta 1$ Integrin. Beide Zelltypen binden Kol XXII voll-längen Protein und auch Fragmente. Das voll-längen Protein zeigt die stärkste Bindung, die kleineren Fragmente KV305 (NC4 bis Ende) und KV317 (NC4 bis NC5) zeigen schwächere Bindung. KV309 (NC5 bis Ende) zeigt keine Bindung.

2.3.3.4 Blockierung des Zell-Attachments durch einen β 1-Integrin inhibierenden Antikörper

Während die Integrin-exprimierenden Zellen eine starke Interaktion zu Kol XXII zeigten, konnte bei CHO wt Zellen fast keine Bindung gesehen werden. Um nachweisen zu können, dass die Bindung der Zellen tatsächlich über Integrine abläuft und keine anderen Rezeptoren auf den Zellen hierbei mit Kol XXII interagieren, wurde die β 1 Integrinbindungsstelle mit einem monoklonalen Antikörper inhibiert. Hierfür wurden die Zellen, direkt bevor sie auf die Kol XXII beschichteten Platten gegeben wurden mit dem Antikörper in einer Konzentration von 20 μ g/ml inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung schwächer wurde, was nachweist, dass die Bindung von Kol XXII integrin-exprimierender Zellen (Fig. 2.26) auch über die Integrine stattfindet.

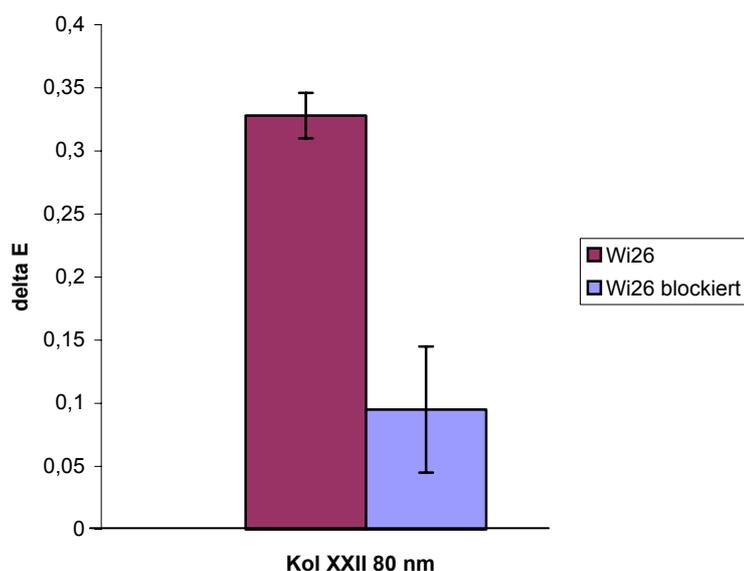


Fig: 2.25: Blockierung der Integrin Bindung durch einen β 1 Antikörper. Die α 1 β 1 und α 2 β 1 exprimierenden Wi26 Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Integrin β Untereinheit inkubiert. Die Zahl der gebundenen Zellen ist dadurch signifikant gesenkt worden, was die Integrin Abhängigkeit der Bindung zeigt.

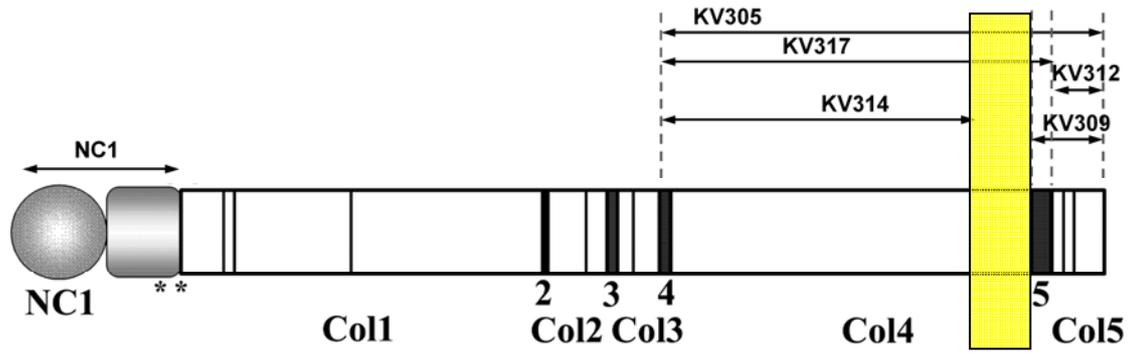


Fig. 2.26: Integrin Bindungsstelle im Col XXII Molekül. Die Bindungsstelle für $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 10\beta 1$ Integrin konnte experimentell auf eine 110 Aminosäuren große Region (gelbes Quadrat) oberhalb der NC5 Region eingeschränkt werden.

2.4 In vivo Studien zu Kol XXI

2.4.1 Kol XXII defiziente Mauslinie

Geninaktivierungen durch "Gene-Targeting" Experimente liefern oftmals aussagekräftige Ergebnisse über die Funktion eines Proteins *in vivo*. Außer für Kol IX, das als erstes entdeckte und am besten charakterisierte FACIT Kollagen, wurde bisher für kein Mitglied dieser Proteinfamilie ein Gen-„Knockout“ in Mäusen publiziert (van der Rest et al., 1985; Suzuki et al., 2005). Die „Knockouts“ für Kol XII und XIV werden zurzeit generiert (nicht gezeigte Ergebnisse). Auch für Kol XXII sollte eine „Knockout“ Maus generiert werden, um eine *in vivo* Charakterisierung des Proteins durchführen zu können.

Ein bekanntes Problem beim „Gene Targeting“ in Mäusen ist die Kompensation des Verlusts des Proteins durch andere Mitglieder der Proteinfamilie, wie z.B in Matrilineen der Fall (Ko, 2005). Ein Kol XXII Knockout in Mäusen wäre vermutlich auch aus dem Grund erfolgreich, weil kompensatorische Effekte durch eng verwandte Proteine vermutlich reduziert wären - oder gar nicht auftreten würden - da keine Kopie des *col21A1* Gens in Nagern vorhanden ist.

2.4.1.1 Klonierung des "Gene-Targeting" Konstrukts

Um das *col22A1* Gen in Maus per homologer Rekombination zu unterbrechen, wurde ein Knockout Konstrukt, welches die Intronsequenz „upstream“ von Exon 2 und Intronsequenz direkt „downstream“ von Exon 3 enthält, kloniert. Dadurch werden rund 30 kb des 326 kb großen Gens durch eine *hrGFP lox pgkNEO lox* Kasette ersetzt. Die den homologen Armen entsprechenden genomischen Sequenzen wurden aus verschiedenen Datenbanken entnommen. Basierend auf den Daten der humanen *COL22A1* Organisation, wurde die Organisation der ersten fünf Exone des Maus *col22A1* in Maus bestimmt. Als Vektor für das Konstrukt wurde das Plasmid pILLN38 gewählt. Dieser Vektor enthält zusätzlich zur Selektionskasette noch ein - im Knockout unter der Kontrolle des endogenen *col22A1* Promotors stehendes - humanisiertes „Green Fluourescent Protein“ (hrGFP) Gen als Reporter. Die ausgesuchte genomische Region wurde analysiert. Nur wenig repetitive Sequenzen waren enthalten und Sequenzhomologien zu dem zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten Teil des Mausgenoms konnten nicht gefunden werden.

Folgende Klonierungsstrategie wurde angewendet:

Ein 3,8 kb Fragment unterhalb von Exon 3 wurde durch PCR amplifiziert. Die Primer waren mit *AvrII* Schnittstellen versehen und das Fragment wurde in die *AvrII*

Schnittstellen des pILLN38 Vectors kloniert. Die richtige Integration wurde durch Restriktionsmusteranalyse und Sequenzierung der Enden verifiziert. Für den 5' flankierenden Arm wurde ein 5.05 kb großes Fragment von Intron 1 ebenfalls mit PCR amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde mit *AvrII* verdaut und in die *NheI* Schnittstelle des Vektors kloniert. Die korrekte Integration wurde wiederum mit Restriktionsanalyse und Ansequenzierung der Enden bestätigt.

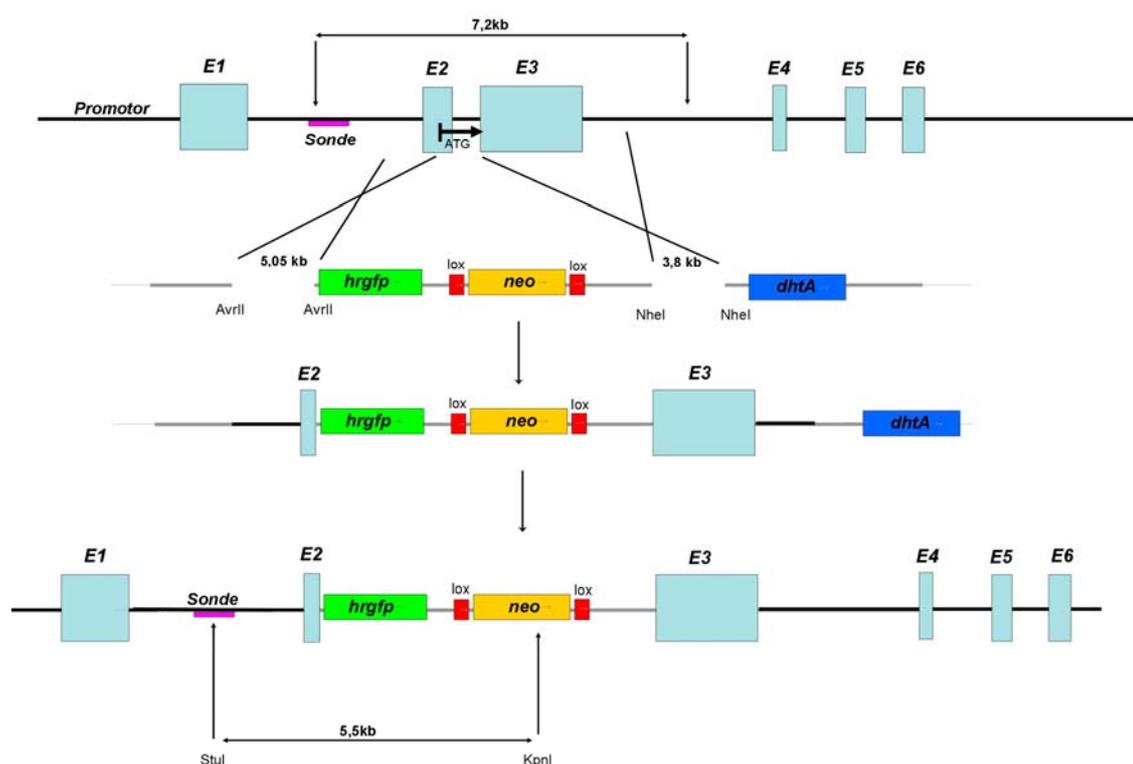


Fig. 2.27: Strategie für den *col22A1* Knockout: Ein Teil von E2 und E3 wird ersetzt durch die hrGFP lox neo lox Kasse. Das Diphtheria A-Toxin Gen dient als Gegenselektion.

2.4.1.2 ES Zellarbeiten

Der erhaltene Vektor wurde mit *NotI* linearisiert und für die Transformation von IB10 ES Zellen verwendet. Neomycin resistente Klone wurden kultiviert und davon isolierte genomische DNA wurde mittels PCR auf korrekte Integration durchmustert. Ein positiver Klon, welcher in BL/6 Blastocysten injiziert wurde, konnte identifiziert werden. Fünf chimäre Mäuse wurden geboren und gekreuzt, es konnte in keinem Fall eine Keimbahngängigkeit der +/- Zellen erhalten werden.

Um die Häufigkeit korrekter homologer Rekombination zu erhöhen, wurden die klonierten Arme des Konstrukts nochmals mit Sequenzen muriner DNA Datenbanken verglichen, welche vorher - aufgrund der bis *dato* nicht abgeschlossenen Sequenzierung

des Genoms - noch nicht zur Verfügung standen. Dabei wurde eine kleinere repetitive Sequenz im 3' Arm des Konstrukts entdeckt.

Um ausschließen zu können, dass das klonierte Konstrukt über diesen „Repeat“ an mehreren Stellen in das Genom integriert, wurde der 3' Arm durch ein um 0,2 kb gekürztes Fragment, welches weniger von der „downstream“ Sequenz ohne repetitive Sequenz enthielt, ersetzt.

Des Weiteren wurde eine Gegenselektion in Form des Diphtheria A-Toxin Gens in das Konstrukt eingefügt. Falls bei der homologen Rekombination eine falsche Integration des Vektors stattgefunden hätte, sollte das Toxin exprimiert werden und den ES Zellklon abtöten.

In mehreren Durchgängen von ES-Zell Transformationen, in denen über 2000 Zellen durchmusterung wurden, konnte nur ein positiver Klon, welcher durch PCR und anschließender Southern Hybridisierung verifiziert wurde (Fig. 2.29 B), identifiziert werden (Fig. 2.29 A).

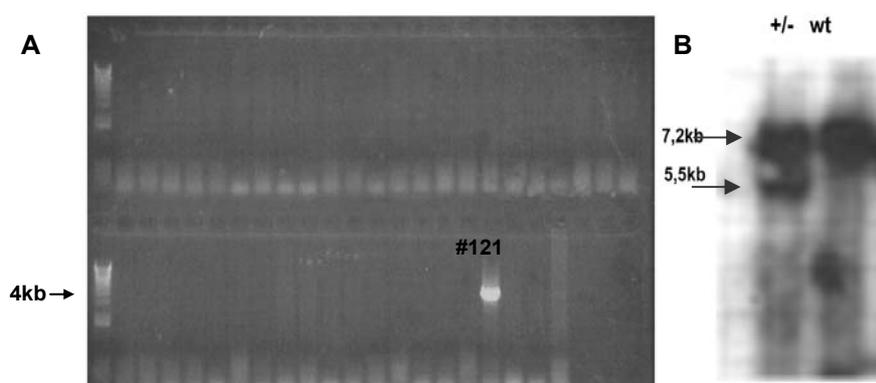


Fig. 2.28: ES Zell-Durchmusterung: Die aus den transformierten und selektionierten ES Zellen gewonnene DNA wurde mit PCR auf richtige Integration des Konstrukts durchmusterung. Klon Nr. 121 zeigte als einziger ein positives Signal, welches auf der richtigen Höhe von 3,96 kb liegt. Der positive Klon wurde mit Southern Blot verifiziert. Die 250bp Sonde bindet, nach Verdau mit *StuI* und *KpnI*, wie vorhergesagt an die DNA. Die Bande bei 7,2 kb repräsentiert die wt DNA, die Bande bei 5,5 kb zeigt in der heterozygoten Zelle zusätzlich den Knockout.

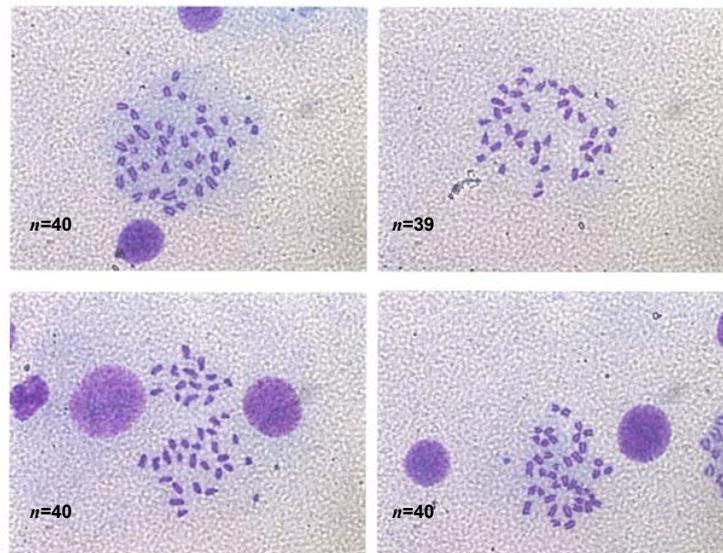


Fig. 2.29: Karyotypisierung der ES Zellklone: Subklone der Kol XXII knockout ES Zelllinie wurden auf Abweichungen in der Chromosomenzahl getestet. Die in der Metaphase fixierten Chromosomen wurden mit Giemsa gefärbt und gezählt. Mindestens $\frac{3}{4}$ aller ausgezählten Klone sollten die richtige Anzahl von 40 Chromosomen pro Zelle besitzen.

Wiederum wurden keine chimären Tiere, bei denen die Kol XXII ES Zellen in die Keimbahn integrierten, geboren. Aus diesem Grund wurde der Klon subkloniert und die Subklone auf Abberationen in der Chromosomenzahl mittels Karyotypisierung untersucht. Die ES Zellklone wurden, um die Chromosomen während der Teilung in der Metaphase zu fixieren, dafür mit Kolchicin inkubiert.

Die Klone wurden anschließend auf Objektträger aufgetropft, die Chromosomen gefärbt und jeweils 50 Zellen ausgezählt (Fig. 2.29). Mindestens 75% der analysierten Klone sollten, um für eine ES-Zell Injektion in Frage zu kommen, die richtige Anzahl von 40 Chromosomen aufweisen. Zwei von fünf analysierten Klonen wurden daraufhin für eine Blastocysteninjektion benutzt, wobei wiederum keine *col22A1* heterozygoten Mäuse erhalten werden konnten.

Um die Anzahl der Klone zu erhöhen, wurde eine neue effizientere ES Zelllinie (Whitehead Institute, Cambridge U.S.) für ein neues Transformationsexperiment herangezogen.

Über 800 V6.5 ES-Zellen wurden durchmustert, ein positiver Klon erhalten und dieser in Blastocysten injiziert. Chimäre Mäuse wurden geboren und werden zurzeit noch gekreuzt, so dass ein Ergebnis bis zum Ende der Arbeit nicht feststand.

2.4.2 Kollagen XXII im Zebrafisch

2.4.2.1 Zebrafisch als Modellorganismus für Kol XXII *in vivo*

Studien

Wie in den vorangegangenen IF- und *in-situ* Hybridisierungsstudien gezeigt werden konnte, besitzt Kol XXII ein sehr restriktives Expressionsmuster.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der unerwartet frühen Expression des Proteins im sich entwickelnden Organismus, liegt ein Beitrag von Kol XXII zur Entwicklung und/ oder der Stabilisierung des Muskel-Sehnen Ansatzes nahe. Um Daten über die Funktion des Proteins im Organismus zu erhalten, sollten auch *in vivo* Experimente durchgeführt werden. Da mit einem Maus-„Knockout“ bis *dato* kein Erfolg erzielt werden konnte, wurde der Zebrafisch als Modellorganismus herangezogen und analysiert.

Zebrafische sind gut untersuchte und beschriebene Modellorganismen: Die Vorteile sind die geringe Größe, die kurze Generationszeit von drei Monaten und die große Anzahl der Nachkommen. Die externe Befruchtung der Eier und die nur wenige Tage dauernde Entwicklung machen die Embryonen daher leicht zugänglich für Untersuchungen und Manipulationen und hat zusätzlich den Vorteil, dass sich die Proteinexpression des Zebrafisches mit Morpholino Oligonukleotiden manipulieren lässt.

2.4.2.2 Identifikation von Kol XXII im Zebrafisch

Um das Ortholog von Kol XXII im Zebrafisch zu identifizieren, wurde die humane NC1 Region mit den Sequenzen in der „Sanger *Danio rerio* Sequencing“ Datenbank verglichen. Da die Sequenzierung des Zebrafischgenoms nicht abgeschlossen war, konnten keine homologen Fragmente in den Datenbanken gefunden werden. Bei Suchen in verwandten Spezies konnte in genomischen Datenbanken des Kugelfisches (*Fugu rubripes*) ein Fragment der N-Terminalen NC1 Region von Kol XXII gefunden werden. Die Sequenz dieses Fragmentes wurde mit der Sequenz von Maus und Mensch „aligned“ (ClustalW, Fig. 2.31) und mit der erhaltenen Konsensussequenz konnten so zwei Paar degenierte Primer hergestellt werden. Bei PCR mit diesen Primern auf cDNA von Zebrafisch (ABTü-Stamm) unter nicht-stringenten Bedingungen konnte ein 480 bp großes PCR Produkt erhalten werden (2.31, A,B). Das aufgereinigte Fragment wurde als Template, für eine PCR unter stringenten Bedingungen mit dem inneren Primerpaar, benutzt. Die erhaltene Bande wurde aufgereinigt und sequenziert und die Analyse bestätigte, dass die erhaltene Bande von Zebrafisch stammte, wobei es sich um einen Teil des VWA Moduls handelte. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die NC1 Region stark konserviert ist (Fig. 2.32). Zur gleichen Zeit wurde eine neue Datenbank mit nicht abgeglichenen Fragmenten des Zebrafischgenoms veröffentlicht.

Eine „BLAST“ Suche in dieser Datenbank bestätigte die Existenz des Kol XXII Gens in Zebrafisch und somit auch die Daten der Sequenzierung.

```

fugu      TGCAAGAACGTCCAATATGACCTGGCCTTTATCCTGGACACCTCATCCAGTGTGGGAAA 151
human    TGCAAAAGTGTCCACTACGATCTGGTCTTCCCTGGACACCTCCTCCAGCGTGGGCAAG 600
mouse    TGCAAAAGTGTCCAGTATGATCTGGTCTTCCCTGGACACGTCTTCTAGTGTGGGCAAG 62
          *****
          GATYCTGGYCTTYMTCCTGGACACN fw1
fugu      GAGAACTTTGAGAAGATCAGGCAATGGGTGGCCAACCTGGTTCGACTCTTTCGACGTGGCG 211
human    GAGGACTTTGAGAAGGTCCGGCAGTGGGTGGCCAACCTGGTGGACACCTTCGAGGTGGGC 660
mouse    GAGGACTTTGAGAAGATCCGCCAGTGGGTAGCCAACCTGGTAGACACCTTTGAGGTGGGC 122
          *****
          CMGNCAITGGGTNGCCAACCTTGGT fw2
fugu      TCGGACAAGACGAGAGTGGCTGTTGTTTCGCTACAGTGACAGACCCACCACCGAGTTCAAC 271
human    CCCGACCGCACCCGTTGGGGGTCTGTGCGCTACAGCGACCCGCCACCACCGCCTTCGAG 720
mouse    CCTGGCCACACCCGTTGGGGGTGTGCGCTACAGTGACCCGCCACTACAGCCTTTGAA 182
          *****
fugu      CTGGCCCGGTACAGGACGCTGGAGGAGTGAAGCGCGCGCTCGCAACATACGCTACCTG 331
human    TTGGGACTCTTTGGCTCGCAGGAGGAGGTCAAGGGCGGTGCCGGCGCTCTGCCCTACCAC 780
mouse    CTGGGCACTTCAACTCTCCGAGGAGGTGAAGCGAGCTGCCGGCGCATCACTACCATT 242
          *****
fugu      GGAGGGAATACAATGACGGGGATGCTATCAGCTACACCACGCAACATCTTACAGAG 391
human    GGGGGCAACACCAACACGGGAGACGCGCTCCGCTACATCACGGCCGCGAGCTTCCOCCA 840
mouse    GCGGTAACACGAACACGGGTGACGCCCTGCGTTATATCACAGCCGCGAGCTTCCCGCC 302
          *****
fugu      CGGAACGGCGCAGGCCACGGCCAGAGGCATTCAGAGGGTGGCTATCCTTCTGACCGAT 451
human    CACGCCGGCGGCCGCCACGGGACCCGCTACAAGCAGGTGGCCATCCTGCTCACCGAC 900
mouse    CAGGCCGGCGCAGACCTGGGAATCGTGCTTCAAGCAGGTGGCCATCCTGTTGACTGAT 362
          *****
fugu      GGGCGGAGTCAGGATTACGTCTGGAGCCCTCAAAGCAGCCGCCAAGGCCGGCATCAGG 511
human    GGCCGAGCCAGGACCTGGTCTGGACCGCGGGCGGCGAGCCACCGCGCTGCCATCCGC 960
mouse    GGTCTGAGCAAGACCTGGTCTGGATGCTGCAGCAGCTGCCCATGCAGCCGGCATCCGC 422
          *****
fugu      ATGTTGCTGTGCGCATCGCGAGGCGCTGAAGGTGGAGCTGGAGGAGATCGCTGCCGAG 571
human    ATCTTTGCGGTGGCGTGGGCGAGGCACCTCAAGGAGGAGCTGGAGGAGATCGCTCAGAG 1020
mouse    ATTTTGTGTTGGTGGGTGCAGCATGAAGGAGGAACCTGGATGAGATTGCCTCAGAA 482
          *****
fugu      CCAAAGAGCGCGCACGTCTTCCACGTGACC GACTTTAATGCCATTGACAAGATCAGGGGG 631
human    CCCAAGTCCGCCACGTCTTCCACGTGTC GACTTCAATGCCATCGACAAGATCAGGGGC 1080
mouse    CCCAAGTCTCGCATGTCTTCCATGTTTC GACTTCAATGCCATTGACAAGATCAGTGGC 542
          *****
          rev1 NITCWSNCGNTRCAGAAGGTRCA CTGAANTACGGTADCTGTTCTAG rev2
fugu      AGACTGAGGAAGAGGCTGTGTGAGAGTGAG-TCTGCCGACGCGCCTCT----- 678
human    AAGCTGCGGCGCGTCTTTGTGAAAATGTGCTCTGTCTAGCGTTCTGTGTAGAAGGAGAT 1140
mouse    AAGCTGAGGCGTCGGCTTTGTGAAAATGTTCTGTGATGAGTATGCCTTTGTCAAACTTTC 602
          *****
fugu      TGCTCT--GCACACCTTCAG----TTTGAAGCGGCACGTGCTCAAACGTG-----CA 724
human    CGCTTTAAGCACACCAATGGAGGAACCAAGGAAATCACAGTTTGTGACCTGATGGATTG 1200
mouse    CGGTTCCGGAAAACATCACG--GAAAAGAGATTGGTACATCTGGCAAGTCATTGA--CCA 658

```

Fig. 2.30: „Alignment“ der DNA Sequenzen der NC1 Region von Kol XXII in verschiedenen Spezies. Um das Kol XXII Gen in Zebrafisch identifizieren zu können, wurden die NC1 Regionen verglichen. Möglichst ähnliche Bereiche wurden ausgewählt, um zwei Paare degenerierte Primer herzustellen, die für „nested PCR“ benutzt wurden.

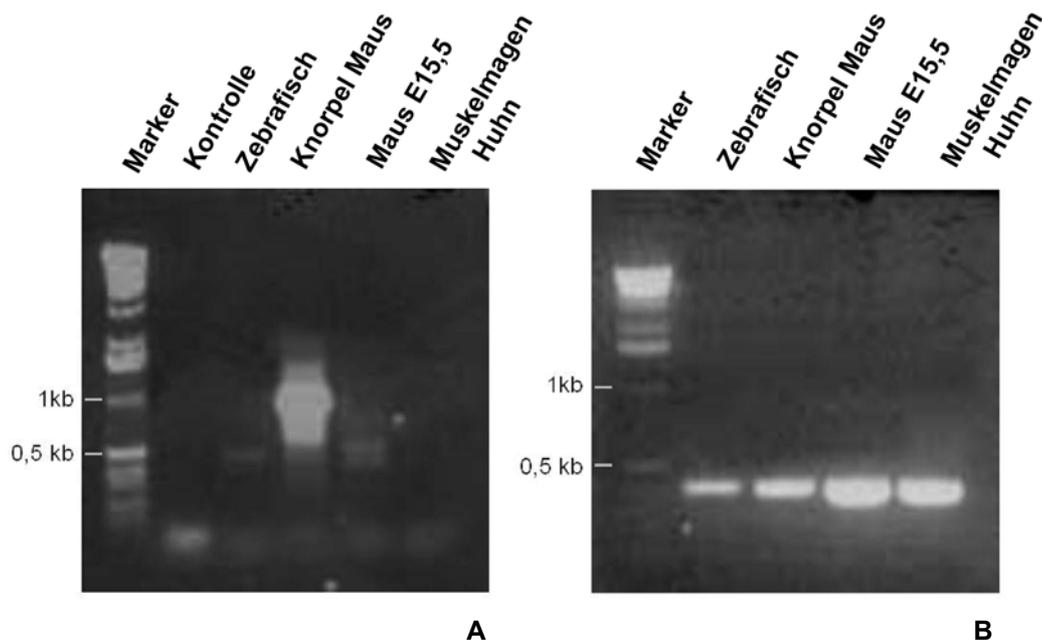


Fig. 2.31 A, B: Genidentifikation im Zebrafisch: (A) Um das *col22A1* in Zebrafisch zu identifizieren, wurde eine „nested PCR“ mit degenerierten Primern auf cDNA's von (2) Zebrafisch (3) Maus Knorpel (4) Maus E15,5 und (4) Muskelmagen vom Huhn durchgeführt. (Kontrolle ist ohne Template cDNA). (B) Die aufgereinigten Banden bei rund 0,5 kb wurden als Template benutzt, um eine zweite Runde PCR mit inneren degenerierten Primern durchzuführen. Die Banden wurden aufgereinigt und sequenziert. Gleichzeitig mit dem Zebrafisch Ortholog konnte die Kol XXII cDNA auch in Huhn gefunden werden.

```

Zebra      -----GCKNVHYDLVFI LDTSSSVGKENFEKIRQW 30
Fugu      MEYRLGFRLSLVVVILVLTLSR--VEAQRAGCKNVQYDLAFILDTSSSVGKENFEKIRQW 58
human     MAGLRGNAVAGLLWMLLLWGGGGCQAQRAGCKSVHYDLVFLDTSSSVGKEDFEKVRQW 60
mouse     -----CKSVQYDLVFLDTSSSVGKEDFEKVRQW 29
          **.*:***.*:*****:***:***

Zebra      VANLVESFDVGVDKTRVAVVRYSDRPTVEFNLARYKTL EEVKRAAGNIRYLGNTKTGDA 90
Fugu      VANLVDSFDVASDKTRVAVVRYSDRPTTEFNLARYRTLEEVKRAARNIRYLGNTMTGDA 118
human     VANLVDTFEVGPDRTRVGVVRYSDRPTTAFELGLFGSQEEVKAAARRLAYHGGNTNTGDA 120
mouse     VANLVDTFEVGPGRTRVGVVRYSDRPTTAFELGHFNSREEVKAAARRITYHGGNTNTGDA 89
          *****:*. .:***.*****. *.*. : : **** * .: * **** **

Zebra      ISFTTNI FTERAGARPAAKGIQKVAILLTDGQSQDFVLEPSVAAAAAGIRLFAVGIGEA 150
Fugu      ISYTTSNIFTERNGARPTARGIQRVAILLTDGRSQDYVLEPSKAAAKAGIRMFVAVGIGEA 178
human     LRYITARSFSPHAGGRPRDRAYKQVAILLTDGRSQDLVLDAAAAAHRAGIRIFAVGVGEEA 180
mouse     LRYITRSFSAQAGGRPGNRAFQVAILLTDGRSQDLVLDAAAAAHAAGIRIFAVGVGAA 149
          : : *. . * : *.** . : *****:*** **.: * ****:****:* *

Zebra      LKEELEEEIAAEPKSAHVHVTFDFDAIDKIRGLRRLRLCESE----- 191
Fugu      LKVELEEIAAEPKSAHVHVTFDFNAIDKIRGLRRLRLCES----- 238
human     LKEELEEEIASPKSAHVHVSDFNDAIDKIRGLRRLRLCEN----- 220
mouse     LKEELDEIASPKSAHVHVSDFNDAIDKIRGLRRLRLCES----- 189
          ** **:****:*****:***:*****:***:****.

```

Fig. 2.32: Alignment der NC1 Regionen von Kol XXII. Die Proteinsequenzen wurden mit ClustalW aligned. Die hohe Homologie ist offensichtlich, allerdings zeigt die Fugu Sequenz in einigen Teilen starke Abweichungen. Das ist vermutlich auf fehlerhaftes Alignment in der Kugelfisch Datenbank zurückzuführen.

2.4.2.3 Kol XXII in anderen Spezies

Bei der Suche von Kol XXII im Zebrafisch konnte das Ortholog auch in Huhn, was mittlerweile auch durch Sequenzen in Datenbanken bestätigt werden konnte, identifiziert werden.

Die Genome von vielen weiteren Arten sind mittlerweile komplett oder zumindest teilweise sequenziert und veröffentlicht. Beim Durchsuchen der verschiedenen Datenbanken konnte Kol XXII zumindest auf Genomebene in anderen Arten entdeckt werden, wie z.B. in Hund, Rind, Schimpanse und anderen. Eine Kopie des Gens konnte jedoch bisher in keinem nicht-Vertebraten, wie z.B. *C.elegans* entdeckt werden.

2.4.2.4 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Zebrafisch Kol XXII

Um die Gewebeverteilung von Kol XXII im Zebrafisch zu untersuchen und die Verteilung mit den Daten, die in Maus gewonnen wurden vergleichen zu können, wurden IF-Studien im Zebrafisch durchgeführt.

Trotz der hohen Homologie auf Primärstrukturebene, konnte keine Kreuzreaktivität des Maus Antikörpers auf Zebrafisch Gefrierschnitten festgestellt werden. (nicht gezeigte Ergebnisse). Aus diesem Grund wurde ein eigener Antikörper gegen die Zebrafisch NC1 Region generiert. Um eine sehr hohe Spezifität zu erreichen und das Risiko einer Kreuzreaktivität zu minimieren, wurde nur die VWA Domäne für die Immunisierung verwendet.

Die Zebrafisch VWA Domäne wurde im pPCEP Mod. 8 Vektor, unter den oben genannten Bedingungen wie die Maus NC1 Domäne, hergestellt. Das Protein wurde aufgereinigt und zwei Kaninchen wurden anschließend damit immunisiert. Die erhaltenen Seren wurde wie oben beschrieben mittels Western Blot Analysen getestet (nicht gezeigte Ergebnisse). Beide Tiere zeigten eine sehr starke und spezifische Immunantwort. Da das erhaltene Muster auf Gefrierschnitten hochspezifisch war, musste der Antikörper nicht weiter aufgereinigt werden.

2.4.2.5 Verteilung von Kol XXII im Zebrafisch

10 µm dicke Gefrierschnitte von 3 Monate alten Zebrafischen (ABTü Stamm) wurden für IF-Studien benutzt und dafür mit dem Zebrafisch Antikörper gefärbt. Das Protein konnte an den Myosepta (Kollagenreiche Gewebe, die die einzelnen Muskelfasern trennen und somit als Sehnen in Fischen gesehen werden können (Kudo et al., 2004)) nachgewiesen werden (Fig. 2.33 A-E, G, H). Hierbei waren alle untersuchten Myosepten positiv gefärbt. Es zeigte sich, dass vermutlich die Myosepten an sich gefärbt sind, es konnte keine Kol XXII freie Zone – wie bei der Aponeurose in Maus gesehen – die von Kol XXII Färbung umschlossen ist, detektiert werden.

In Knochen, sowie Rückgrat und Flossen konnte kein Kol XXII detektiert werden.

Zusätzlich konnte Kol XXII im Bindegewebe in Kiemen (2.33 L) und in einer Struktur im Schädel des Fisches, welche das Gehirn umschließt, nachgewiesen werden. Diese Kol XXII positive Zone setzte sich nach posterior entlang der Wirbelsäule fort (2. 34 I). Interessanterweise konnte Kol XXII in keinen anderen Schädelteilen oder Knochen nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, das nicht der Knochen selbst, sondern Bindegewebe in direkter Nachbarschaft gefärbt ist.

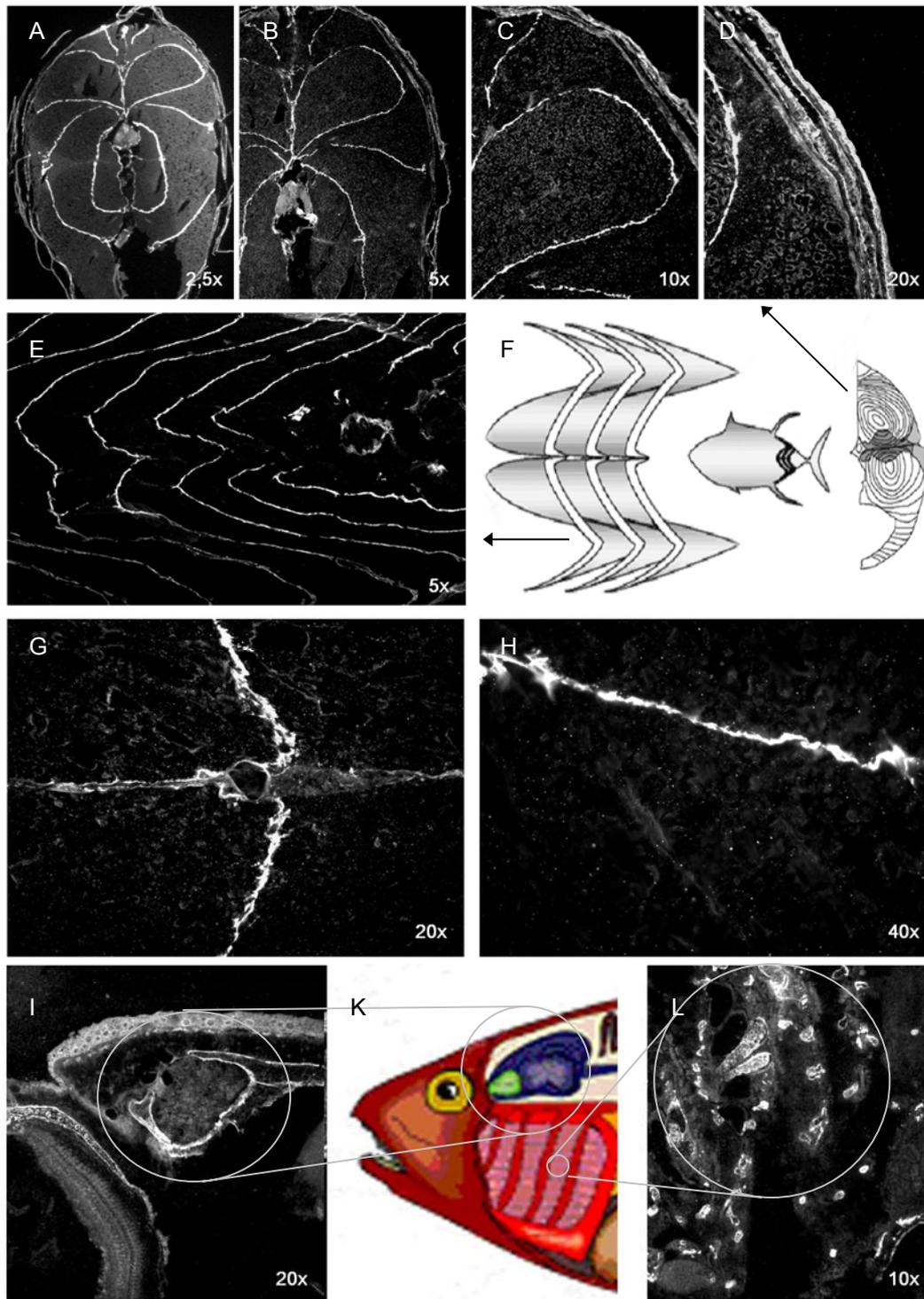


Fig. 2.33: Immunfluoreszenz-Färbungen beim adulten Zebrafisch. Gefrierschnitte von drei Monate alten Zebrafischen wurden mit dem Antikörper gegen die zVWA Domäne gefärbt. Die Struktur der Fischmuskulatur kann mit dem Antikörper, welcher spezifisch die Myosepten (umschließen Muskelsegmente) anfärbt, dargestellt werden, (A-D, F) In der Filet-Ansicht kann man die inneren Myosepten sehen, während das Rückgrat und umgebende Strukturen negativ sind. (E, F) Laterale Ansicht: das gleiche Muster ist zu sehen, die Gräten sind wiederum negativ. (H) Die Myosepten an sich scheinen gefärbt zu sein, keine zwei Banden außerhalb der Struktur scheinen vorhanden zu sein. (I, K) Im Inneren des Schädels ist eine Struktur positiv für Kol XXII, die das Hirn umrundet. Die Färbung setzt sich entlang der Wirbelsäule fort. (I) Kol XXII kann auch im Bindegewebe in den Kiemen gefunden werden (F aus (Katz, 2002), verändert; und K aus verändert).

2.4.2.6 Kol XXII Expression während der Zebrafiscentwicklung

Da die IF-Färbungen in Maus und Zebrafisch vergleichbare Ergebnisse lieferten, stellte sich die Frage, ob das auch für den sich entwickelnden Fisch zutrifft. Um Kol XXII mRNA im Fischembryo nachweisen zu können, wurden „Whole-Mount“ *in situ* Hybridisierungen in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt.

Die Verteilung der Zebrafisch mRNA von 24hpf (Stunden nach Fertilisation) deckt sich gut mit den Beobachtungen die in der Maus gemacht worden sind. In lateraler Ansicht kann eine Färbung entlang der sich entwickelnden Somiten detektiert werden (Fig. 2.34 A). Die ventrale Mittellinie und Rückenmark sind dabei nicht positiv für Kol XXII mRNA (Fig. 2.35 B). Eine weitere Kondensation von Kol XXII mRNA nahe des Rückenmarks findet man in 48 Stunden alten Embryonen (2.35 C,D). Im Kontrast zur Maus kann eine Färbung in allen Strukturen anterior des Cerebellums, in Mesencephalon und Augen entdeckt werden. In späteren Stadien wird das Expressionsmuster definierter und eine Färbung im ventralen Teil des Schädels sowie der Kiemenvorläufer kann, was mit den Daten, die in den IF-Studien gewonnen worden sind übereinstimmt, beobachtet werden. Ab diesem Zeitpunkt können auch die Myoseptae, die im adulten Fisch Kol XXII positiv sind, durch Kol XXII mRNA Signale sichtbar gemacht werden.



Fig. 2.34: In situ Hybridisierung von Zebrafisch Embryonen. (A, B) Ab 24 hpf zeigen fast alle Strukturen im Kopf und Körper eine mehr oder weniger starke Expression von Kol XXII mRNA, ausgenommen davon sind nur Eisack und *Chorda dorsalis*. Die Somitenstruktur kann anhand der mRNA sichtbar gemacht werden. (C,D) Auch nach 48 Stunden kann das gleiche Muster beobachtet werden, allerdings können jetzt deutlich die Grenzen der Somiten gesehen werden, die die sich formenden Myosepten zeigen. Auch zeigen alle Strukturen des sich entwickelnden Schädels ein Kol XXII mRNA Signal. (E-F) Nach 72 Stunden sind die Myosepten geformt und zeigen eine Anreicherung von Kol XXII mRNA. Teile des Schädels und der Kiemenvorläufer zeigen ebenfalls eine Färbung. (In Zusammenarbeit mit Hannah Baader, AG Florence Ruggiero, Lyon)

2.4.2.7 Morpholino „Knockdown“ Experimente

Zebrafisch Embryonen entwickeln sich extern. Aus diesem Grund ist dieser Modellorganismus gut geeignet für Gen „Knockdown“ Experimente mit Morpholino Oligonukleotiden. Diese binden ihre korrespondierende mRNA und inhibieren damit die weitere Translation. Die 5' nicht-translatierte Region wurde aus einer Zebrafisch Datenbank ermittelt. Die vorhergesagte Sequenz wurde auf cDNA Level durch RT-PCR bestätigt (Fig. 2.35 C). Der vorliegende Morpholino wurde mit Hilfe dieser Daten von einer Firma ausgewählt und produziert.

Das erhaltene Oligo wurde in befruchtete Eier injiziert und der Phänotyp der sich entwickelnden Fische studiert. Als Kontrolle wurde ein Morpholino injiziert, der um fünf Basen abgewandelt wurde und damit die RNA nicht blockieren sollte. Die Kontrolle zeigte, wie erwartet keinen Phänotyp.

Der Effekt durch den Kol XXII Morpholino auf die Zebrafischembryos war dosisabhängig. Bei einer Konzentration von 1,5-2 mM zeigten die Fische drastische Änderungen in Ihrem Phänotyp (Fig. 2.35 A,B, D-G). Diese Embryonen waren kleiner und zeigten eine langsamere Entwicklung als die Kontrollgruppe. Auffällig sind auch die Missbildungen der *Chorda dorsalis* und des Rumpfes, das gesamte Rückgrat zeigt eine Verdrehung. Außerdem war der Kopf relativ vergrößert und die Embryonen zeigten ein auffälliges Schwimmverhalten, schneller und nicht koordiniert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Einfluss auf die Fischentwicklung passt gut zur frühen Expression der mRNA in der Nachbarschaft der *Chorda dorsalis*. Hier zeigt sich eine wichtige Rolle des Proteins zur Entwicklung der Muskel-Myosepta Verbindung. Auch die Deformation des Kopfes und der Augen zeigen Übereinstimmung mit der Expression des Proteins in diesem Bereich während der Entwicklung.

Die Injektion des 5-Missense Oligos zeigte keine speziellen Änderungen des Phänotyps. Eine Injektion von weniger als 1,5 mM Morpholino zeigte keinen veränderten Phänotyp, während eine Dosis von mehr als 4 mM lethal war.

3. Diskussion

Die meisten Mitglieder der Kollagenfamilie, so auch Kol XXII, findet man ausschließlich in Vertebraten; ihre Entstehung ist eng mit der Evolution von Knochen, Sehnen, Gefäßen und Organen verknüpft.

Trotz der großen Gesamtmenge an Kollagen im Organismus, kommen einige Mitglieder der Familie nur in sehr geringem Maß vor und sind daher bisher unentdeckt geblieben. Mit Hilfe der Daten des „Human Genome Project“ und der „Expressed Sequence Tag Database“ wurden einige neue Kollagene in den letzten Jahren identifiziert (Sato et al., 2002; Boot-Handford et al., 2003).

Bei der Suche in der EST Datenbank wurde ein kurzer cDNA Klon, der eine neue, FACIT Kollagen ähnliche Sequenz enthielt, gefunden. Nach der Identifikation und Bestätigung der vollständigen Sequenz durch RACE, Klonierung und Sequenzierung konnte der Klon endgültig einem neuen FACIT Kollagen, genannt Kol XXII, zugeordnet werden. Das neue Gen - *COL22A1* - konnte zusätzlich noch mit Hilfe eines Gen-Vorhersageprogramms verifiziert werden (Whittaker and Hynes, 2002). Hierbei wurden noch andere, strukturell sehr ähnliche Kollagen-Gene im humanen Genom entdeckt (Koch et al., 2001; Koch et al., 2003). *COL22A1* besteht aus 66 Exons und deckt einen 326 kb großen Abschnitt auf Chromosom 8q24 ab. Die Struktur der Exons, die für Kollagendomänen kodieren, zeigt dabei ein für Kollagene typisches Muster: Exons von 45 bis 54 bp sind weit verbreitet innerhalb der Kollagenfamilie, sie kodieren jeweils für 5-6 *Gly-X-Y* Triplets (Sandell, 1991).

3.1 Kollagen XXII: Ein neues FACIT Kollagen

Basierend auf gemeinsamen strukturellen Merkmalen, welche die Mitglieder dieser Familie charakterisieren, konnten außer Kol XXII noch drei andere, der jüngst entdeckten Kollagene (Kol XIX (Myers et al., 1994), XX (Koch et al., 2001) und XXI (Fitzgerald and Bateman, 2001)) der FACIT Kollagen Proteinfamilie zugeordnet werden: 1.) das Vorkommen von zwei hochkonservierten Cysteinresten, am NC1-COL1 Übergang, welche von vier Aminosäuren getrennt werden; 2.) die Existenz von zwei konservierten Unregelmäßigkeiten in *Gly-X-Y* Triplets in der COL2 Domäne, 3.) tripelhelikale Domänen, die durch kleine NC Domänen unterbrochen sind und 4.) die Präsenz einer großen NC1 Domäne, welche ein Thrombospondin Motiv in direkter Nachbarschaft der ersten Kollagendomäne, enthält.

Auch bei Kol XXII, dem jüngsten Mitglied dieser Proteinfamilie sind alle dieser typischen FACIT Merkmale enthalten (Shaw and Olsen, 1991; van der Rest et al., 1991): In der

COL Domäne findet man die oben genannten unterbrochenen Tripelhelices und das TSPN Motiv der NC1 Region folgt direkt im Anschluss (Fig. 2.1). Die COL1 Domäne enthält die typischen Unregelmäßigkeiten in den *Gly-X-Y* Repeats (Fig.2.1 und 2.7). Auch findet man die zwei Cysteinreste an der Grenze zwischen NC6- und COL5 Domäne: Cys¹⁶⁰⁵ and Cys¹⁶⁰⁹, sie sind durch vier andere Aminosäuren getrennt. Diese konservierten Cysteine sind in anderen FACIT Kollagenen an intermolekularen Verknüpfungen zwischen den verschiedenen α -Ketten (Kol IX, XII, XIV and XVI (Vasios et al., 1988; Gordon et al., 1989; Aubert-Foucher et al., 1992; Pan et al., 1992)), oder intramolekularen Bindungen (Kol XIX (Myers et al., 1994)) beteiligt. Für Kol XXII wird eine intermolekulare Bindung vermutet: trimere Moleküle können in nicht-reduzierenden SDS-PAGE gesehen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Weiterhin wird eine Beteiligung dieser Cysteine bei der Trimerisierung von FACIT Molekülen vermutet (Gordon et al., 1989; Dublet and van der Rest, 1991; Gordon et al., 1991). Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit für Kol XXII nicht untersucht.

3.1.1 Untersuchung der „Coiled-Coil“ Region

C-Propeptide konnten weder in Kol XXII (Fig. 2.4) noch in anderen FACIT Kollagenen gefunden werden. Für die FACIT Kollagene IX und XII konnte eine Involvierung der NC5 Domäne in die Bildung der Tripelhelix gezeigt werden (Labourdette and van der Rest, 1993; Mazzorana et al., 1996; Snellman, 2000). Da hier eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit dieser Domänen zur NC5 Region von Kol XXII besteht (nicht gezeigte Ergebnisse), ist es möglich, dass die NC5 Domäne in die Bildung der Tripelhelix eingebunden ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache, dass eine „Coiled-Coil“ Domäne in der NC5 Region von Kol XXII gefunden werden konnte, unterstützt. „Coiled-Coil“ Regionen sind gut untersuchte Trimerisierungs Domänen (Beck and Brodsky, 1998; McAlinden et al., 2003). Zwei dieser „Heptad“ Regionen konnten für das Kol XXII Molekül mit dem „COILS Prediction Server“ vorhergesagt werden : Hierbei befindet sich der erste „Coiled-Coil“ in der VWA Domäne und der oben schon erwähnte „Coiled-Coil“ in der NC5 Region, in der Nähe des C-Terminus des Moleküls. Die „Coiled-Coil“ Region in der NC1 Domäne zeigt eine größere Übereinstimmung zur einleitend beschriebenen Konsensussequenz - *-a-b-c-d-e-f-g-*, mit *a* und *d* als hydrophobe Reste – als die Region in der NC5 Domäne. Da dieser „Coiled-Coil“ sich aber nicht nahe der tripelhelikalen Region befindet, wird eine Beteiligung an der Bildung nicht angenommen. Interessanterweise unterscheiden sich diese Ergebnisse, die hier mit dem Vorhersageprogramm „COILS“ gemacht wurden, von denen die von Hulmes et al. (McAlinden et al., 2003) publiziert wurden: Hulmes zeigte „Coiled-Coil“ Regionen für alle bekannten FACIT Kollagene - außer für Kol XXII. Die Vorhersagen wurden mit einem

unterschiedlichen Programm („SCORER“) dem ein anderer Algorithmus als „COILS“ zugrunde liegt, (Woolfson and Alber, 1995; Lupas, 1997) und „geübtem Auge“ („informed eye“ ((McAlinden et al., 2003), gemacht. Hulmes schlägt auch eine spezielle Konsensussequenz für die „Heptad“ Regionen in FACIT Kollagenen vor, welche sich von denen anderer Kollagene unterscheidet: eine überlappende Konsensussequenz aus zwei „Heptad“ Motiven: ...xxxxabcdeabcdefgxxxx...

Trotz der hohen Ähnlichkeit zwischen Kol XXI und Kol XXII sieht Hulmes diese Konsensussequenz nur in Kol XXI konserviert (McAlinden et al., 2003). Beim Untersuchen der Proteinsequenzen von Kol XXI und Kol XXII im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dem Programm „SCORER“ weder für das eine, noch das andere Protein eine „Heptad“ Region identifiziert werden (nicht gezeigte Ergebnisse).

Ob diese Region für die Oligomerisierung von Kol XXII, bzw. anderer FACIT Kollagene wichtig ist, sollte in der Zukunft noch experimentell untersucht werden.

3.1.2 Unterschiede zwischen Kol XXII und Kol XXI

Das auf Aminosäureebene am nächsten verwandte Protein von Kol XXII ist Kol XXI. Beide Proteine besitzen die oben erwähnten, typischen Merkmale der FACIT Kollagene. Die Domänenorganisation ist prinzipiell sehr ähnlich, allerdings kann bei Kol XXI ein rund 600 Aminosäuren großes Segment der Kollagendomäne nicht gefunden werden (Fig. 2.7) (Fitzgerald and Bateman, 2001).

Trotz der engen Verwandtschaft auf struktureller Ebene, zeigen beide Proteine sehr unterschiedliche Expressionsmuster. Während Kol XXII ein räumlich sehr distinktes Expressionsmuster an Gewebegrenzen - auch schon während der Entwicklung - aufweist, zeigt Kol XXI eine weit verbreitete Lokalisation im adulten und sich entwickelnden Organismus (Fitzgerald and Bateman, 2001). Hierbei decken sich die Gewebe an denen Kol XXII Expression gezeigt werden konnte, nur in einer schmalen Zone am Knorpel mit der Kol XXI Expression. Kol XXI ist hier vermutlich fibrillenassoziiert - auch wenn bisher eine direkte Interaktion nicht demonstriert wurde - während für Kol XXII eine Beteiligung an Fibrillen nicht gezeigt werden konnte. Kol XXI wird zum Teil in glatter Muskulatur gebildet und konnte auch in Gefäßwänden lokalisiert werden, so dass eine Beteiligung an der (Re-) Strukturierung der Matrix während der Blutgefäßangiogenese im Menschen angenommen wird (Chou and Li, 2002).

Aufgrund dieser räumlichen Trennung im Organismus kann eine Kompensation von Kol XXI für Kol XXII bisher nicht angenommen werden. Auch konnten trotz des Verlustes von Kol XXI in Nagern während der Evolution keine Hinweise für eine erweiterte Expression von Kol XXII und eine damit einhergehende Kompensation gefunden werden (Fitzgerald and Bateman, 2004).

3.1.3 Homologie zwischen VWA Domänen

Die NC1 Domäne von Kol XXII besteht aus typischen konservierten Bindemotiven (VWA und TSPN), welche in FACIT Kollagenen und auch bei anderen ECM Molekülen weit verbreitet sind (Fig. 2.5) (Patthy, 1996; Whittaker and Hynes, 2002). Hierbei konnte ein hohes Maß an Konservierung vor allem innerhalb der VWA Domäne festgestellt werden (Fig. 2.5.A), während die Thrombospondin Domäne weniger gut erhalten ist.

Ein Indiz für eine potentielle Bindung von Kol XXII zu anderen Molekülen über die VWA Domäne ist die Existenz eines hochkonservierten MIDAS Motivs innerhalb der Domäne (Whittaker and Hynes, 2002). Alle Aminosäuren, entsprechend der eingangs erläuterten Konsensussequenz (DXSXSX_nTX_nD), die kritisch für die Bindung zweiwertiger Metallionen sind (Asp⁴⁴, Ser⁴⁶, Ser⁴⁸ and Thr¹¹³), sind konserviert. Die Bindung über dieses Motiv zu anderen Proteinen wurde hier jedoch nicht untersucht, es konnte bisher auch für kein anderes FACIT Kollagen eine direkte Interaktion von VWA Domänen zur Bindung mit anderen Interaktionspartnern gezeigt werden.

Aufgrund der hohen Homologie zu anderen VWA Domänen, einschließlich der konservierten Cysteinreste am Anfang und Ende der Domäne, kann davon ausgegangen werden, dass die grundsätzliche Anordnung der α -Helices und β -Sheets (Rossmann-Faltung) ebenfalls konserviert ist (nicht gezeigte Ergebnisse).

3.1.4 Molekülstruktur von Kol XXII

Die klassischen FACIT Kollagene sind fibrillenassoziiert und ihre Struktur kann sehr einfach auf die Bindung der einzelnen Moleküle zu den Fibrillen zurückgeführt werden. Dies ist für das nicht-fibrillenassoziierte Kol XXII nicht offensichtlich.

„Rotary Shadowing“ Aufnahmen von rekombinantem Kol XXII zeigten stabähnliche Moleküle mit einer globulären Domäne am Ende. Diese beinhaltet vermutlich die aus 480 Aminosäuren bestehende N-terminale NC1 Region, welche für sich alleine exprimiert diese kugelförmige Konformation annahm. Das Molekül wies Knicke und Biegungen innerhalb der stabähnlichen Domäne auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese flexible Struktur durch die kleineren NC Domänen und Unregelmäßigkeiten in den Gly-X-Y Regionen, typisch für FACIT Kollagene, ermöglicht wird (van der Rest et al., 1985; Lunstrum et al., 1991; Myers et al., 2003).

Die Größe des rekombinant exprimierten Kol XXII stimmt sehr gut mit der vorausgerechneten Länge des Moleküls, wie anhand der „Rotary Shadowing“-Bilder zu sehen ist, überein. Aus der Zahl von 1045 Aminosäuren in der Kollagendomäne und einer 0,289 nm Steigung pro Seitenkette in der Tripelhelixkonformation, kann eine Länge von 302 nm vorhergesagt werden, was sehr gut mit der gemessenen Länge der stabähnlichen Region von 304 \pm 15-nm übereinstimmt.

3.2. Kol XXII Lokalisation im Organismus

Die Gewebeform von Kol XXII wurde mit Immunoblots von Mausegewebe-Proben nachgewiesen. Hiermit, und nach der Analyse von Northern Blots und RT-PCR's konnte demonstriert werden, dass *COL22A1* vor allem in Muskel und Herz (sowie schwächer in Knorpel, Haut und Auge) exprimiert, bzw. lokalisiert ist.

In Immunoblots auf Geweben, in denen auch Kol XXII mRNA gefunden wurde, konnte eine 200 kDa Bande, die vermutlich dem voll-längen Kol XXII Molekül entspricht, detektiert werden. Hierbei konnten noch zusätzlich kleinere Banden gesehen werden. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um proteolytisch fragmentiertes voll-längen Protein, welches physiologisch oder während der Extraktion und Analyse abgebaut wurde und nicht – aufgrund der zu geringen Größe der Fragmente – um mögliche „Splice“ Varianten.

Die nicht-Kollagen NC1 Domäne war hierbei stabil, der Abbau fand innerhalb der COL Domänen statt (nicht gezeigte Ergebnisse). Diese Sensitivität gegenüber Proteolyse scheint ein weitverbreitetes Merkmal großer, sekretierter Proteine zu sein und kann z. B. auch bei anderen Kollagenen und Lamininen gesehen werden (Amano et al., 2000; Marneros and Olsen, 2001).

Eine mögliche „Splice“ Variante wurde mit PCR auf verschiedenen cDNA's am 3' Ende identifiziert. Diese „Splice“ Variante enthält scheinbar eine „Missense“ Mutation, die damit zu einer verkürzten Version des Proteins führt. Diese mögliche Variante konnte allerdings bisher nicht in Gewebeextrakten im Western Blot detektiert werden und ist somit hypothetisch.

Ein Teil der FACIT Kollagene sind Glykoproteine, was bisher für verschiedene Mitglieder der Familie vorhergesagt wurde, aber bisher nur für COL XVI gezeigt werden konnte. N- und O-Glykosylierung wurden, mit Hilfe von verschiedenen Serverprogrammen für Kol XXII vorhergesagt. Auch die unscharfen und nicht distinkten Banden, die in Gewebeextrakten gezeigt werden konnten, ließen eine Glykosylierung vermuten, auch die berechnete Masse des Proteins von rund 160 kDa war kleiner als die im Western Blots detektierte Bande von 200 kDa.

Durch Verdau des rekombinanten voll-längen Proteins mit N-Glykosidase F konnte gezeigt werden, dass auch Kol XXII ein Glykoprotein ist (Fig. 2.8). Welche Zucker genau verwendet und ob beide potentiellen Bindungsstellen genutzt werden, muss in der Zukunft noch untersucht werden.

Die vorhergesagte O-Glykosylierung wurde experimentell nicht untersucht. Es scheint aber wenigstens ein Teil der vorhergesagten Bindungsstellen glykosyliert zu sein, was aus der Analyse des Western Blots nach N-Glykosidase-F Verdau geschlossen werden konnte. Das kann besonders gut an der NC1 Domäne gesehen werden (Fig. 2.8). Sie

besitzt am Ende des TSPN Motivs und Anfang der Linker Region drei eng zusammenliegende potentielle O-Glykosylierungsstellen. Die Banden der NC1 Region im Western Blot sind immer noch unscharf, nicht distinkt und größer als das berechnete (~75kDa statt 54 kDa) Molekulargewicht. Ob hier, wie in anderen FACIT Kollagenen evtl. Chondroitinsulfat-Ketten oder andere Zucker beteiligt sind muss in Zukunft untersucht werden (Watt et al., 1992; Brown et al., 1994).

3.2.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopische Untersuchungen

Um die Gewebeverteilung von Kol XXII zu untersuchen und die Ergebnisse durch Doppel-IF Färbungen zu bestätigen, wurden insgesamt drei polyklonale Antikörper generiert. Der Antikörper NC1GP wurde ebenfalls wie der Antikörper R34 gegen die rekombinant exprimierte NC1 Region hergestellt. Nach Affinitätsreinigung beider Antikörper konnte ein fast identisches Verteilungsmuster in Doppelimmun-fluoreszenzen von Kol XXII detektiert werden (Fig. 2.12).

Um die Orientierung von Kol XXII in Basalmembranen zu untersuchen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus generiert. Hier wurde als Antigen die in einem bakteriellen Expressionssystem exprimierte 40 Aminosäuren große NC5 Domäne verwendet. IF-Bilder des ungereinigten Antikörpers zeigten hier eine unspezifische Färbung im Muskelgewebe. Um die Spezifität zu erhöhen wurde der Antikörper ein zweites Mal gegen das rekombinant exprimierte voll-längen Protein aufgereinigt. Nach diesem Schritt konnte eine spezifische Färbung auch mit dem polyklonalen Antikörper NC5 erzielt werden (Fig. 2. 12.).

Aufgrund der zeitlichen Beschränkungen während dieser Arbeit, konnten keine Experimente bezüglich der Basalmembranorientierung von Kol XXII durchgeführt werden.

3.3.2. Kol XXII Expression in neonatalen Mäusen

Die Gewebeverteilung von Kol XXII ist einzigartig. Bei IF-Studien auf verschiedenen Geweben neugeborener Mäuse konnte Kol XXII nur an wenigen Stellen, beschränkt auf spezifische Gewebegrenzen, detektiert werden.

In den Gelenken war die Oberfläche des Gelenkknorpels, am Übergang zur Synovia, in einer schmalen Zone positiv für Kol XXII. Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene zeigten, dass diese Zone dünne, hochorganisierte Kollagenfibrillen und andere strukturgebende Moleküle enthält. Es konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen COL Domänen mancher FACIT Kollagene eine direkte oder indirekte Interaktion mit Kollagenfibrillen in Geweben eingehen (Wu et al., 1992). Im Gegensatz dazu konnte hier in EM Studien demonstriert werden, dass COL XXII nicht direkt mit Kollagenfibrillen

assoziiert ist. Ein möglicher Interaktionspartner könnten, hauptsächlich aus Fibrillin und Kol VI aufgebaute Mikrofibrillen sein. Eine ähnliche Interaktion - eine direkte Assoziation mit Fibrillin - konnte für ein anderes FACIT Kollagen, Kol XVI gezeigt werden (Kassner et al., 2003),(Grassel et al., 1999; Kassner et al., 2004), wobei für Kol XVI außerdem eine Assoziation mit Kollagenfasern demonstriert werden konnte.

In Gelenken von Arthrosepatienten konnte Kol XXII immer noch in IF-Studien nachgewiesen werden, allerdings ist die Kol XXII Zone nicht mehr eng umgrenzt und diffus (Mathias Chiquet, persönliche Mitteilung). Neueste Ergebnisse deuten auf eine zusätzliche Deposition von Kol XXII in der Synovia hin, wobei die Menge des gefundenen Proteins im arthritischen Gelenk erhöht zu sein scheint. Der Grund hierfür ist bisher nicht bekannt (nicht gezeigte Ergebnisse, Johann Stubendorff).

In Muskel und Herz konnte Kol XXII an den Insertionsstellen von Sehnen oder Fibrillen nachgewiesen werden. Von den Zonen, an denen Kol XXII detektiert wurde, ist der Muskel-Sehnen Ansatz wohl der am besten untersuchte. Muskel-Sehnen Ansätze sind wichtige Elemente bei der Übertragung von mechanischen Kräften vom Muskel über die Sehnen auf Skelettelemente. An diesen Stellen werden Membranen von polymeren Proteinstrukturen, die notwendig sind für die Integrität von Geweben und Übertragung von Kräften, gebildet. Kollagene spielen hierbei eine wesentliche Rolle (Chiquet et al., 2003). Verschiedene Moleküle sind an den Membranen des Muskel-Sehnen Ansatzes angereichert und wurden untersucht. Tenascin-C, ein oligomeres ECM-Protein, war einer der ersten Marker die hier beschrieben wurden (Chiquet and Fambrough, 1984). Die Funktion dieses Proteins war bislang unklar, jedoch zeigen neueste Experimente an „Knockout“-Mäusen eine verminderte Dehnbarkeit und reduzierte Steifheit der Sehne (nicht publizierte Ergebnisse). Andere Proteine, wie $\alpha 7\beta 1$ Integrin, Laminin 2 und der Dystrophin-Glycoprotein-Komplex scheinen obligatorisch für die Integrität des Muskel-Sehnen Ansatzes zu sein. Ihre Abwesenheit führt zu pathologischen Veränderungen im Menschen und, sowohl in natürlichen Mutanten (*mdx*-Maus), als auch gentechnisch veränderten Mäusen (Vainzof et al., 1995; Mayer et al., 1997; Chiquet et al., 2003). $\alpha 7\beta 1$ -Integrin defiziente Mäuse zeigen eine Form der Muskel Dystrophie und aus diesem Grund ist eine Untersuchung einer möglichen Interaktion von Kol XXII zu $\alpha 7\beta 1$ Integrin von Interesse. $\alpha 7\beta 1$ Integrin ist angereichert am Muskel-Sehnen Ansatz und konnte als Interaktionspartner für Laminine (Burkin and Kaufman, 1999), über ein RGD Motiv und $\beta 1G$ -h3 (Ferguson et al., 2003), ein exklusives Protein am Muskel-Sehnen Ansatz, gezeigt werden. Trotzdem wurde die Affinität zu $\alpha 7\beta 1$ Integrin getestet, es konnte aber keine Interaktion zwischen beiden Proteinen gemessen werden - obwohl interessanterweise auch ein RGD Motiv in Kol XXII gefunden werden konnte (nicht gezeigte Ergebnisse).

In-situ Experimente zeigten, dass Kol XXII von den Muskelzellen nahe des Muskel-Sehnen Ansatzes exprimiert und anschließend in den Verzahnungen des Muskel-Sehnen Ansatzes, in der Nähe der Basalmembran deponiert wird (Miosge et al., 1999; Chiquet et al., 2003). Da gezeigt werden konnte, dass VWA Domänen in Protein-Protein Interaktionen involviert sind (Paulsson et al., 1999) und Kol XXII mit kollagenbindenden Integrinen interagiert, ist es möglich, dass Kol XXII zu Komponenten der Basalmembran bindet, wie z.B. Kollagenen, Proteoglykanen oder Lamininen. Auch das Vorhandensein des konservierten MIDAS Motivs deutet auf eine derartige mögliche Interaktion hin. Ein Modell wäre hier, eine Expression und Sekretion von Kol XXII durch die am Muskel-Sehnen Ansatz beteiligten Muskelzellen und eine anschließend folgende Bindung über die NC1 Domäne zu Komponenten der Lamina densa. Die Zell-Basalmembran Interaktion würde über eines der kollagenbindenden Integrine geschehen und damit dieser Komplex ein weiterer Baustein zur Stabilisierung des Muskel-Sehnen Ansatzes darstellen.

3.2.3 Kollagen XXII Verteilung im Mausembryo

Kol XXII konnte ab E8,5 permanent im Mausembryo nachgewiesen werden. Betrachtet man die sehr distinkte Expression im erwachsenen Tier, ist diese frühe Expression im Bereich der Somiten, vor Anlage der Muskelvorläufer und Muskel-Sehnen Ansätze eher überraschend (Fig.3.1).

Die Entwicklung der axialen Muskulatur in der Maus beginnt ab ca. E10,5 und verläuft synchron mit der Entwicklung von Sehnen und Knorpel. Die Signalwege die hierbei eine Rolle spielen, sind gut untersucht und beschrieben:

Muskel und Sehnen werden von den Somiten abgeleitet, welche sich wiederum zuvor aus dem Mesoderm entwickelt haben. In Resonanz zu *Shh* Signalen von umliegenden Geweben, teilt sich der gebildete epitheliale Somit in das epitheliale dorsal gelegene Dermomyotom und das ventral gelegene Sklerotom. Anschließend differenziert sich das Dermomyotom weiter in Myotom (Muskulaturvorläufer) darüberliegendes Dermotom (Hautvorläufer), welches dorsal verbleibt. Dieser Prozess wird initiiert von *Shh* aus der ventralen Mittellinie und einem dorsalen *Wnt* Signal. Hierdurch wird die Expression von *MyoF* und *MyoD* angestellt, was zu weiterer Differenzierung und Induktion von *FGF4* und *FGF8* führt. Schließlich wird durch *FGF4* und *FGF8* Signale des Myotoms das Sklerotom weiter unterteilt in das ventrale Sklerotom (Vorläufer axialer Muskulatur) und das dorsale Syndetom (Sehnenvorläufer), hier erfolgt die weitere Differenzierung durch verschiedene Mitglieder der *Pax* und *Sox*-Genfamilie (Fig. 3.3) (Brand-Saberi and Christ, 2000; Schweitzer et al., 2001; Brent and Tabin, 2002; Brent et al., 2003) und dem bHLH Transkriptionsfaktor *Scleraxis* (*Scx*).

Mit kleinen Unterschieden, die hier nicht näher diskutiert werden, geht die Entwicklung des Muskel-Skelettsystems der Extremitäten in einem sehr ähnlich regulierten Prozess vonstatten.

Vergleicht man die Expression dieser verschiedenen Marker mit der Expression von Kol XXII kann man eine teilweise Co-Lokalisation finden (Fig. 3.1 A, B). In frühen Stadien sieht man eine Expression von Kol XXII in den gleichen Zonen wie *MyoD* und *MyoF5*, was eine Expression von Kol XXII durch das Myotom vermuten lässt; die Expression von Kol XXII in der erwachsenen Maus durch Muskelzellen konnte gezeigt werden. Trotzdem bleibt die Expression nicht auf das Myotom beschränkt, eine geringe Lokalisation kann auch in der Zone dazwischen gesehen werden, was hier eine Involvierung des Sklerotoms, bzw. Syndetoms vermuten lässt (Brent et al., 2005). Da die Bildung des Myotoms in frühen Stadien der Entwicklung erst durch *MyoD* und *Myof5* reguliert wird und anschließend durch *FGF4/ FGF8* (Brand-Saberi and Christ, 2000), ist eine Involvierung dieser Faktoren in die Regulation von Kol XXII wahrscheinlich. Eine Beteiligung der Wachstumsfaktoren, welche die Entwicklung von Sklerotom bzw. Syndetom regulieren (*Pax* und *Sox*) kann in frühen Stadien nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Kol XXII Expression in den späteren Stadien auf die Muskelvorläufer beschränkt zu sein scheint.

Die Kol XXII Signale in den sich entwickelnden Muskel-Sehnen Ansatz der Extremitäten scheinen enger abgegrenzt zu sein als die Signale aus den Somiten. Die Kondensation von Kol XXII an bestimmten Zonen kann während der Entwicklung verfolgt werden und endet in der Bildung eines funktionellen Muskel-Sehnen Ansatz. (Fig. 2.13, 14, 15, 16). Die Signalwege, welche die Entwicklung hier steuern sind vergleichbar zu denen, die auch in der axialen Muskulatur die Entwicklung regulieren. Die *FGF4* und *FGF8* Signale, aber auch die *Scx*-Signale, konnten in den gleichen sich entwickelnden Geweben, die auch Kol XXII Expression zeigen, detektiert werden (Fig. 3.1 B,C). Speziell *FGF4* scheint ein sehr guter Kandidat für die Regulation der Kol XXII-Expression im Muskel zu sein, die Signale beider Moleküle überdecken sich sehr gut und legt eine Beteiligung an der Regulation von Kol XXII nah (Brand-Saberi and Christ, 2000; Edom-Vovard and Duprez, 2004). Diese Ergebnisse konnten durch neue *in-situ* Hybridisierungen an Mausembryoschnitten bestätigt werden (persönliche Mitteilung Manuel Koch)

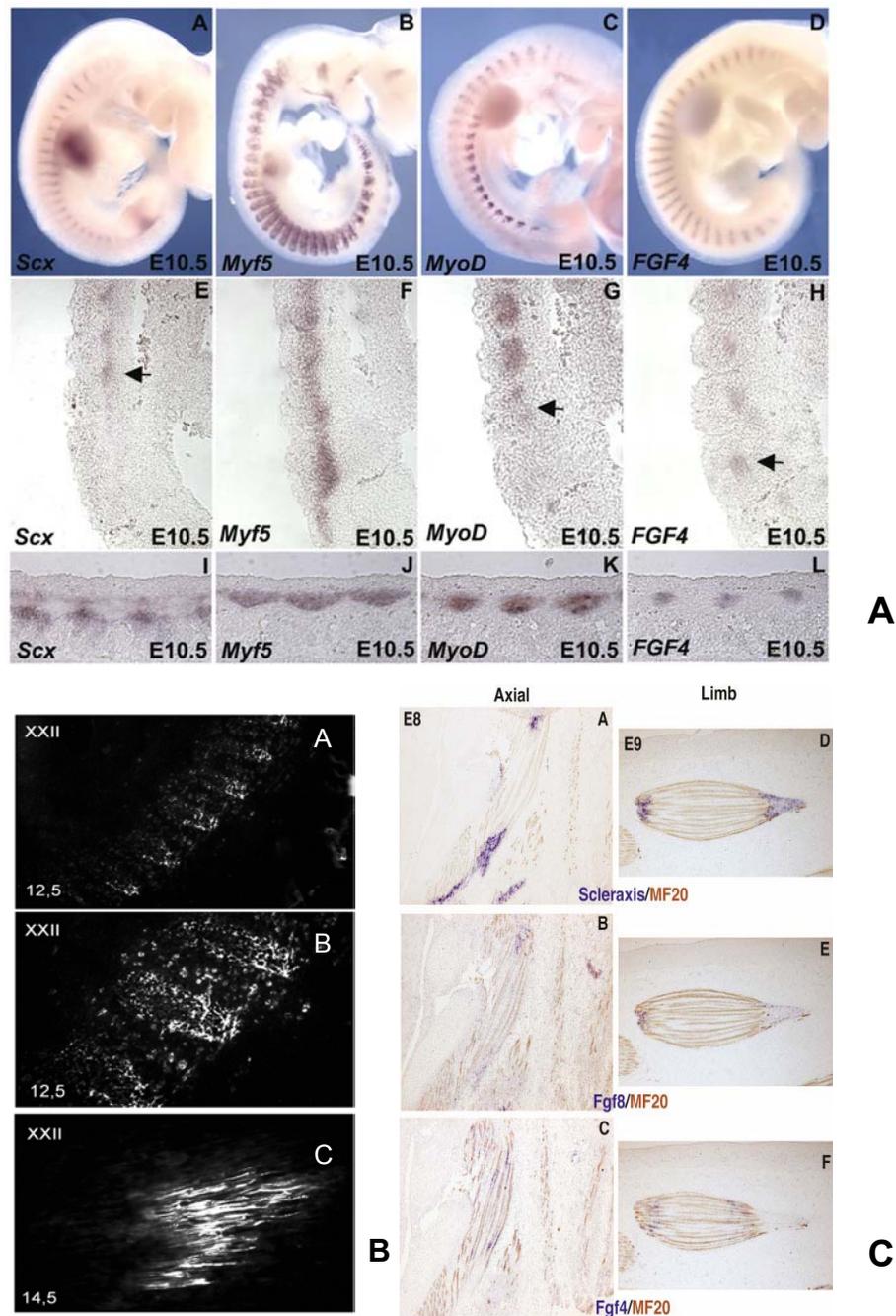


Fig: 3.1 Expression von Wachstumsfaktoren im Vergleich mit Kol XXII: In Geweben, in denen eine Kol XXII Expression gezeigt werden konnte, sind auch verschiedene Wachstumsfaktoren exprimiert. Die Expression von Kol XXII ist sehr stark innerhalb der Somiten, eine Expression an den Somitengrenzen kann aber auch detektiert werden. (B-A, B-B). Diese Expression ist zeitlich und räumlich verknüpft mit der Expression von MyoF, MyoD und FGF4 (AB-AD). Eine schwächere Expression findet man in Sehnervorläufern (Scx) oder dem Sklerotom (AA/ BA, BB) die Entwicklung in den Extremitäten folg einem ähnlichen Muster (AC/ CA-CF). (A verändert aus (Brent et al., 2005), C aus (Edom-Vovard and Duprez, 2004))

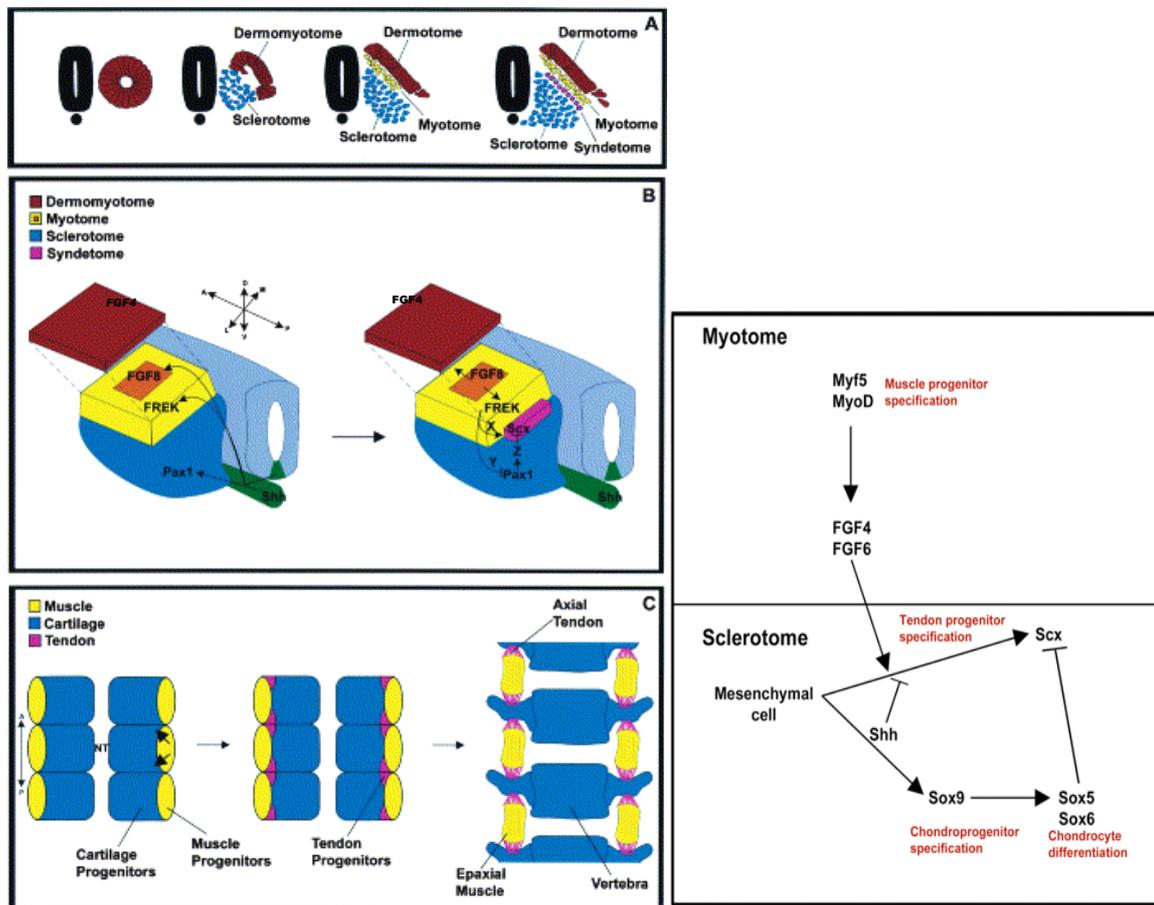


Fig 3.2: Modell für die Entwicklung axialer Muskulatur und Skelettelemente. (A) Entwicklung der Somiten. Dargestellt ist die Kompartimentierung. Der Somit wird unterteilt in Dermomyotom und Sklerotom. Das Dermomyotom wird weiter unterteilt in Myotom und Dermatome. Vom Sklerotom wird noch das Syndetome abgespalten. (B) Übersicht über die Signalwege die hierbei eine Rolle spielen. Zu beachten ist v.a. die zentrale Expression von FGF4 und FGF8 (C) hier ist die Entwicklung von drei Somiten noch mal in dorsaler Ansicht dargestellt (modifiziert aus (Brent et al., 2003; Brent et al., 2005)). (B) Zusammenfassung der Interaktionen in den verschiedenen Linien der Somiten. Die FGF's regulieren auch die Entwicklung der Chondrozyten, die im weiteren Verlauf durch Mitglieder der Sox-Genfamilie gesteuert werden.

3.3 Interaktion von Kollagen XXII mit Integrinen

Eine Unterfamilie der Integrin-Zellrezeptoren ist als Bindungspartner für Kollagene bekannt: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ and $\alpha 11\beta 1$ -Integrin (Eble et al., 1993; Calderwood et al., 1997; Emsley et al., 2000; Tiger et al., 2001; Zhang et al., 2003d). Die Bindungsfähigkeit und Affinität von verschiedenen Kollagenen zu diesen Integrinen ist unterschiedlich - nicht alle Kollagene binden an diese Rezeptoren. Eine direkte Interaktion von FACIT Kollagenen mit Integrinen konnte bisher nur für Kol IX gezeigt werden (Kapyla et al., 2004).

$\alpha 11\beta 1$ Integrin konnte in allen Geweben die auch Kol XXII exprimieren nachgewiesen werden; das gleiche gilt für $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$. $\alpha 10\beta 1$ Integrin wird nur im Knorpel exprimiert. Diese Verteilung macht die kollagenbindenden Integrine zu möglichen Interaktionspartnern für Kol XXII *in vitro* und *in vivo*, wenn auch wie oben erwähnt, keine spezielle Anreicherung von kollagenbindenden Integrinen am Muskel-Sehnen Ansatz gezeigt werden konnte.

Verschiedene Nachweise über eine Bindung von Kol XXII zu $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 10\beta 1$ Integrin wurden durchgeführt. Hierfür wurde die Affinität von Fibroblasten (Wi26/ $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrin), Epithelzellen (HACAT/ $\alpha 2\beta 1$ Integrin) und transfizierten CHO Zellen ($\alpha 2\beta 1$ oder $\alpha 10\beta 1$ Integrin) sowie untransfizierten CHO wt Zellen (keine Integrinexpression) zu Kol XXII untersucht. Zusätzlich wurde die Bindung zu rekombinantem Integrin $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ in „Solid Phase Ligand Binding Assays“ gemessen.

Es wurde nicht nur die Bindungseigenschaft des voll-längen Proteins getestet, sondern Versuche auch mit rekombinant exprimierten Fragmenten von Kol XXII durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass das voll-längen Protein, sowie die beiden Fragmente KV305 (NC4 Domäne bis C-Terminus) und KV317 (NC4 Domäne bis inklusive NC5 Region) eine starke Bindung zu allen Integrinen, sowohl im Zell-Adhäsionsassay als auch im „Solid Phase Ligand Binding Assay“, aufwiesen.

Zusätzlich konnte im „Solid Phase Ligand Binding Assay“ die Bindungsstärke zu den Integrinen $\alpha 1\beta 1$ sowie $\alpha 2\beta 1$ ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass Kollagen XXII ein außergewöhnlich guter Ligand für die Bindung zu Integrinen ist (Tab. 3.1) (Calderwood et al., 1997).

Integrin	Kollagen	halbmax. Bindung [nM]
$\alpha 1$	I	~23
$\alpha 1$	IV	~34
$\alpha 1$	XXII	~5
$\alpha 2$	I	~54
$\alpha 2$	IV	~115
$\alpha 2$	XXII	~23

Tab. 3.1 Bindung verschiedener Kollagene zu Integrinen im Vergleich.

Es zeigt sich, dass Kol XXII die höchste Affinität zu den Integrinen zeigt

Da $\alpha 1\beta 1$ Integrin nicht für „Solid Phase Ligand Binding“ Experimente zu Verfügung stand, konnte hierfür kein Wert für die halbmaximale Bindung bestimmt werden.

Da die Bindung von Kol XXII zu Zellen über Integrine und nicht über andere Zelloberflächenproteine vermittelt wird, konnte mit einem, die $\beta 1$ -Untereinheit inhibierenden Antikörper, demonstriert werden; nach Zugabe des Antikörpers zu den Zellen konnte keine Bindung mehr festgestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht die tripelhelikalen Regionen als solches (Tuckwell et al., 1996), sondern das Proteinmotiv GFOGER (und GLOGER) (Knight et al., 2000; Zhang et al., 2003d) in fibrillären Kollagenen, sowie im basalmembranbildenden Kol IV, von Integrinen erkannt wird (Emsley et al., 2000; Siljander et al., 2004). Bei Sequenzanalysen kann kein GFOGER ähnliches Motiv, weder innerhalb der integrinbindenden Region noch an anderer Stelle innerhalb des voll-längten Proteins gefunden werden (Fig. 2.1). Trotzdem zeigten, wie oben erwähnt, auch kleinere rekombinante Fragmente des voll-längten Proteins eine Bindung zu den untersuchten Integrinen und Integrin exprimierenden Zellen. Dadurch konnte die Integrinbindungsstelle innerhalb des Kol XXII Moleküls auf eine 110 Aminosäuren große Region innerhalb der COL4 Region, oberhalb der NC5 Domäne, eingegrenzt werden (Fig. 2. 29).

Es konnte gezeigt werden, dass in FACIT Kol IX auch kein GFOGER ähnliches Motiv zu finden ist. Trotzdem konnte hier eine starke Bindung, welche die Affinität von Kol I, II oder IV zu den kollagenbindenden Integrinen übertrifft, demonstriert werden (Kapyla et al., 2004). Hier ist die Hypothese, dass das Integrin über die Konformation der Tripelhelix und der, mit in die Bindungsstelle involvierte, benachbarte NC Domäne erkannt wird. Bei einem Sequenzvergleich in allen drei α -Ketten von Kol IX zu Kol XXII konnte keine Homologie zwischen den beiden Proteinen an der Integrinbindungsstelle

entdeckt werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Natürlich schließt das eine mögliche Ähnlichkeit auf Sekundär-, Tertiär-, oder Quartärstruktur nicht aus (Kapyla et al., 2004). Eine endgültige Aussage darüber, ob es sich hier um eine neue Art der Integrinbindung zu Kol XXII handelt, kann aus diesem Grund nicht gemacht werden.

3.4. In-vivo Untersuchungen

3.4.1 Kollagen XXII defiziente ES-Zelllinie

Die sehr distinkte Lokalisation und frühe Expression von Kol XXII lässt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Integrität des Muskel-Sehnen Ansatzes vermuten.

Um diese Hypothese zu belegen und die Rolle von KolXXII *in vivo* zu studieren, sollte eine *col22A1* defiziente Mauslinie generiert werden.

Hierbei war die Anzahl der positiven *col22A1*^{+/-} ES-Zellklone, welche in den verschiedenen Experimenten identifiziert wurden, ungewöhnlich niedrig. Von mehr als 3500 getesteten ES-Zellklonen zeigten nur drei eine korrekte Integration des „Knockout“-Konstrukts. Hierbei konnte in keinem Fall eine Weitergabe der Zellen in die Keimbahn von F0 Mäusen erreicht werden.

Die Zahl der positiven Klone war mit weniger als 0,1% um den Faktor 10-100 niedriger als das normalerweise für „Gene-Targeting“ Experimente der Fall ist. Um vermeiden zu können, dass Klone schon während des Durchmusterens mit PCR verloren gehen, wurden allen Durchmusterungen Kontrollen mit *col22A1*^{+/-} ES Zell-DNA, die in der ersten Runde gewonnen wurde, zugefügt. Die Kontrolle ergab hierbei in jedem Fall ein positives Signal.

Als ein Grund für die niedrige Anzahl von Klonen wurde nicht-isogene DNA zwischen ES-Zelllinie und Plasmid-DNA vermutet, da gezeigt werden konnte, dass Isogenie einen großen Einfluss auf die homologe Rekombination hat (Zheng et al., 1991; te Riele et al., 1992). Aus diesem und anderen Gründen wurde die ES Zelllinie schon nach dem ersten Experiment ausgetauscht, so dass Isogenie zwischen Zellen und Vektor-DNA vorlag, was die Zahl der positiven Klone nicht beeinflusste (nicht gezeigte Ergebnisse).

Die weitere, bis *dato* nicht abgeschlossene Sequenzierung und Veröffentlichung des Mausgenoms in Datenbanken, zeigte eine repetitive Region im dritten Intron und damit im 3' Arm des „Gene-targeting“ Vektors. Aus diesem Grund wurde der 3' Arm gekürzt, zudem wurde noch das Diphtheria-A-Toxin Gen in das Konstrukt integriert. Dies wurde mit der Absicht durchgeführt, die Anzahl negativer Klone zu senken. Hierbei sollte zum einen eine falsche Integration über die repetitive Region in das Genom vermieden werden, zum anderen sollte die Expression des DHT-A-Toxins bei falscher Integration zum Absterben des Zellklons führen. Jedoch konnte auch mit diesen Veränderungen keine höhere Anzahl positiver Zellen gefunden werden. Für die geringe Anzahl von

positiven Klonen gibt es nur hypothetische Erklärungen. Untersucht man das Gen *col22A1*, zeigt sich, dass die genomische Region nach den ersten 12 Exons noch immer nicht sequenziert ist. Das deutet auf eine komplizierte, schwer zugängliche Struktur des Chromosoms hin, die den XXII Locus zu einer schlecht zugänglichen Region für homologe Rekombination machen könnte. Ein neues größeres BAC-Klon basierendes Konstrukt mit der „Rekombineering“-Technik (Testa et al., 2003) ist geplant, Ergebnisse dazu liegen aber bis *dato* nicht vor.

Im Moment hat eine neuerliche Blastocysteninjektion mit einer neuen ES Zelllinie vier 60% Chimäre ergeben. Die F1-Generation ist geboren und wird zurzeit auf *col22A1*^{+/-} Mäuse untersucht.

3.4.2.1 Kollagen XXII im Zebrafisch

Da die Strategie das *col22A1* in Mäusen zu unterbrechen bis *dato* keinen Erfolg erzielt hatte, bot sich durch die Entdeckung von Kol XXII im Zebrafischgenom eine weitere Möglichkeit, um die Funktion des Proteins *in vivo* zu untersuchen. Die aus der Sequenzierung gewonnenen Daten, zusammen mit den Informationen aus der *Danio rerio* Datenbank machten es möglich, *in situ* Sonden, einen spezifischen Antikörper sowie ein Morpholino Oligonukleotid gegen Kol XXII zu generieren.

3.4.2.2 Immunfluoreszenz-Untersuchungen im adulten Zebrafisch

Die Zebrafisch Myosepten-Muskel Verbindung besitzt eine ähnliche Proteinzusammensetzung wie der Muskel-Sehnen-Ansatz in Säugetieren, es konnte die Deposition von Tenascin-C, verschiedenen Lamininen und Kol I gezeigt werden (Weber et al., 1998; Dubois et al., 2002; Parsons et al., 2002; Kudo et al., 2004); zudem findet man den Dystroglycan-Komplex (Bassett et al., 2003) und Hinweise auf Integrine (Henry et al., 2001).

Das beobachtete Verteilungsmuster von Kol XXII an den Myosepten zeigte große Ähnlichkeit zu den Beobachtungen in Mäusen: Eine schmale Kol XXII positive Zone kann an den Flossen und sehnenartigen Strukturen der Myosepten gesehen werden. Auch hier scheint das Protein auf den unmittelbaren Bereich um, oder sogar in den Myosepten beschränkt zu sein. Offensichtlich findet sich kein Koll XXII in weiter entfernten Zonen des Muskels. Ob das Kol XXII in den Myosepten an sich enthalten ist, oder ob sich eine Kol XXII positive Zone um die Struktur herum befindet, ist noch unklar und muss in zukünftigen EM-Studien untersucht werden.

Zusätzlich findet man Kol XXII innerhalb des Schädels, wobei eine positive Zone in der unmittelbaren Umgebung des Hirns vorkommt, die sich weiter entlang der Wirbelsäule fortsetzt. Es handelt sich hierbei vermutlich nicht um Knochen, sondern um ein bisher

nicht genauer zu definierendes Bindegewebe. Kol XXII kann auch in den Kiemen gefunden werden; ob hier die Kiemenblättchen gefärbt sind, kann bisher nicht mit Sicherheit gesagt werden. Auch hier müssten zusätzlich EM-Studien durchgeführt werden, um zu klären, um welche Strukturen es sich innerhalb des Schädels bzw. des Rückgrates und der Kiemen handelt.

Die Muskelentwicklung in Zebrafisch ist bisher weniger intensiv studiert als die Entwicklung der axialen Muskulatur in Säugern. Die Muskeln werden jedoch auch von den Somiten abgeleitet und scheinen mit den gleichen Wachstumsfaktoren reguliert zu sein (Amacher and Kimmel, 1998; Coutelle et al., 2001; Groves et al., 2005). Hierbei stellen die sich entwickelnden Myosepten auch gleichzeitig die Grenzen der Somiten dar (Hijikata and Ishikawa, 1997).

Erste *in-situ* Hybridisierungen lassen eine Expression von Kol XXII mRNA ab 8hpf vermuten, die Daten müssen aber in weiteren Experimenten bestätigt werden und sind daher nicht gezeigt.

Ab 24hpf kann im Zebrafischembryo ein ähnliches Expressionsmuster wie schon in den Mausembryonen detektiert werden. Hier zeigte sich ab diesem Zeitpunkt eine Kol XXII positive Zone innerhalb der Somiten. Dies erfolgt parallel mit der Expression von *MyoD* and *Myo5*, die allerdings schon früher einsetzt (Coutelle et al., 2001). Von einer co-Lokalisation kann hier aber auch ausgegangen werden. Zudem findet man eine co-Lokalisation von *FGF8* in den Somiten ab diesem Stadium (Groves et al., 2005). Die Rolle und Verteilung von *FGF4*, welches in Maus die beste co-Lokalisation mit Kol XXII gezeigt hatte, ist - obwohl präsent in Zebrafisch - bisher nicht untersucht worden.

Kol XXII mRNA konnte außerdem während der Entwicklung des Zebrafisches durch „Whole Mount“ *in situ* Hybridisierungen im Mesencephalon, den Augen und den sich entwickelnden Kiemen gezeigt werden. Hierbei konnte eine Kondensation des mRNA-Signals im Laufe der Entwicklung beobachtet werden. Dies wird unterstützt durch die IF-Daten im erwachsenen Fisch, wobei eine Deposition von Kol XXII, wie oben erwähnt, in Strukturen des Schädels und den Kiemen gezeigt werden konnte.

3.4.2.3 Morpholino „Knockdown“-Experimente

„Morpholino Knockdown“ ist eine häufig verwendete Technik um die Translation einer spezifischen mRNA zu unterdrücken und damit zu einem Genprodukt „Knockdown“ zu führen. Ein spezifischer Antisense Oligo wurde auf der Basis der Sequenzdaten generiert. Trotz der großen Zahl von Polymorphismen im Zebrafischgenom, konnten keine Polymorphismen für das Zebrafisch Kol XXII Gen gefunden werden. Basierend auf diesen Daten wurde ein Zebrafisch Oligonukleotid generiert und injiziert.

Hierbei zeigten die Zebrafische einen drastisch veränderten Phänotyp. Der gesamte Embryo war kleiner und zeigte eine verzögerte Entwicklung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Kopf war verhältnismäßig vergrößert und die offensichtlichste Veränderung waren die Deformationen von Notochord und Torso. Hier konnte eine Verdrehung der Wirbelsäule gesehen werden.

Zusätzlich waren auch Veränderungen im Verhalten zu sehen. Die Embryonen schwammen schneller als die Wildtyp-Kontrollgruppe, zeigten dabei aber koordinative Probleme. Aus den Knockdown-, *in situ* und den IF-Daten geht hervor, dass Kol XXII schon zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung eine wichtige Rolle zur Stabilisierung des Rückgrates zu spielen scheint. Der Mechanismus muss hier allerdings noch genauer untersucht werden.

Ob Kol XXII eine ebenso wichtige Rolle am entwickelten Muskel-Sehnen Ansatz spielt, kann bisher nicht definitiv gesagt werden; die mutierten Tiere sterben bevor sie das Erwachsenenalter erreicht haben.

Ausblick

Kollagen XXII wurde bei einer Suche nach neuen Kollagenmotiv enthaltenden Proteinen entdeckt. Aufgrund seiner Domänenstruktur wurde es in die Familie der FACIT Kollagene eingeordnet. Eine erste Charakterisierung des Kollagens zeigt die einzigartige Expression dieses Proteins am Muskel-Sehnen Ansatz und im Knorpel.

In vivo Experimente zeigten eine Beteiligung des Proteins an der Stabilisierung des sich entwickelnden Muskel-Sehnen Ansatzes im Zebrafisch. Ob das Protein eine ebenso wichtige Rolle in Säugetieren spielt, müssen Experimente an Kol XXII defizienten Mäusen zeigen. Zusätzlich soll anhand des Maus „Knockouts“ die Rolle des Proteins im erwachsenen Tier untersucht werden. Der gleichzeitige “Knock-In” des GFP unter der Kontrolle des endogenen *col22A1* Promoters wird eine Analyse von Kol XXII-Expression regulierenden Faktoren in Zellkultur-Experimenten erlauben.

Eine Lokalisation der Kol XXII Moleküle im Bereich der Basalmembran des Muskel-Sehnen Ansatzes konnte demonstriert werden. Eine Bindung zu Komponenten der Basalmembran in diesem Bereich wird vermutet, muss aber experimentell bestätigt werden. Die Orientierung innerhalb dieser Membran kann mit den Antikörpern gegen die NC1 und NC5 Domänen auf ultrastruktureller Ebene untersucht werden.

Auch wenn *in vitro* Experimente auf eine Interaktion der COL Region mit Kollagen-bindenden Integrinen hindeuten, muss hier eine co-Lokalisation noch gezeigt werden. Die Interaktion fand hier nicht über ein klassisches Kollagen-Bindemotiv statt. Die genaue Art der Wechselwirkung muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Wenig wurde bisher experimentell auf mögliche Interaktionen des Proteins am Knorpel eingegangen. Über mögliche Interaktionen mit Fibrillin-haltigen Mikrofibrillen gibt es Hinweise, Versuche hierzu sind bisher nicht durchgeführt worden.

Weitere Arbeiten sollten zudem die mehr generelle Frage klären, ob es sich bei Kol XXII um ein rein strukturgebendes Protein handelt, oder ob das Molekül auch eine Rolle während der Morphogenese spielt.

4. Material und Methoden

4.1 Allgemeine Reagenzien

4.1.1 Protein und DNA Standards

„High Molecular Weight“ Protein Größenmarker (Bio-Rad Laboratories)

„Low Molecular Weight“ Protein Größenmarker (MBI-Fermentas)

1kb DNA Leiter (MBI-Fermentas)

4.1.2 Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Name	Markierung	Organismus	Verw. Konz.	Referenz/ Hersteller
His-6-tag	α His-6-Ab	HRP	Maus	1:1000 Blot	Dianova GmbH,
β 1-Integrin	AIIG2	-	Maus	20 μ g/ml Zelladhäsion	Hybridoma bank
Zebrafisch VWA	zVWA	-	Kaninchen	1:20000 (Serum)	Jörg Schulze 2004/ nicht publiziert Anjou Vasudevan 2002/ nicht publiziert
Nidogen I	Nidogen I	-	Kaninchen	1:5000	2002/ nicht publiziert
α -guinea pig Ig	goat anti-guinea pig IgG	Cy3	Ziege	1:1000	Invitrogen
α -rabbit Ig	goat anti-rabbit IgG	Alexa 488	Ziege	1:1000	Invitrogen
Rec. Kol XXII NC1 domain	NC1GP	-	Meerschweinchen	1:3000 Histo 1:5000 blot	Jörg Schulze 2004/ nicht publiziert
Rec. Kol XXII NC1 domain	R34	-	Kaninchen	1:1000 Histo 1:2000 blot	Koch and Schulze et. al. 2004
Rec Kol XXII NC5 domain	NC5	-	Kaninchen	1:1000 Histo	Jörg Schulze 2004/ nicht publiziert

4.1.3 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme wurden unter Standardbedingungen kultiviert und manipuliert (Sambrook), falls nicht vom Hersteller anders angegeben.

Stamm	Hersteller	Verwendung
TOP 10	Invitrogen	Standard-Klonierungen
XL-10 Gold	Stratagene	Klonierung großer Konstrukte
BL21	Invitrogen	Bakterielle Expression

4.1.4 Bakterientransformation

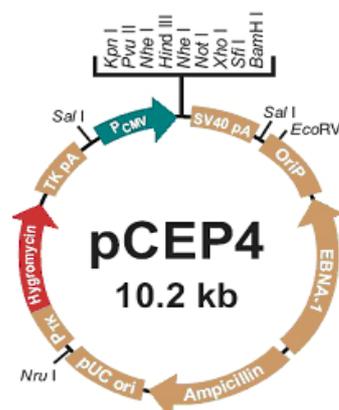
Die Bakterien wurden mit Hitzeschock nach Herstellerprotokoll oder (Sambrook) transformiert.

4.1.5 Säugerzellen

Zelllinie	Modifizierung	Hersteller	Verwendung
HEK 293 EBNA	EBNA Gen	Invitrogen	Rek. Protein Expression
CHO wt	-	Bereitgestellt von Jyrki Heino, Universität von Oulu, Finnland (Kapyla et al., 2004)	Zell-Adhäsionsassay
CHO $\alpha 2\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$ Integrin Expression	Heino, J.	Zell-Adhäsionsassay
CHO $\alpha 10\beta 1$	$\alpha 10\beta 1$ Integrin Expression	Heino, J.	Zell-Adhäsionsassay
Wi26		Bereitgestellt von Monique Aumailly, Uniklinik Köln	Zell-Adhäsionsassay
HACAT		Dr. Aumailly	Zell-Adhäsionsassay

4.1.6 Eukaryotischer Expressionsvektor

Für die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen wurde der PCEP Mod. 8 benutzt (modifizierter pCEP4- Vektor; Invitrogen).



Folgende Veränderungen wurden durchgeführt (Ernst Poeschel):

- 5' MCS: KpnI-AflIII-NarI-PvuII
- BM40 Signalpeptid (Sekretion)
- 8 Histidine-„Tag“ (Aufreinigung)
- Thrombin-Schnittst. (Entfernung des „His“-Tag) -
- 3' MCS: Acc65I-NheI-XhoI-BamHI
- Die Hygromycinkassette wurde durch eine Puromycinkassette ersetzt.

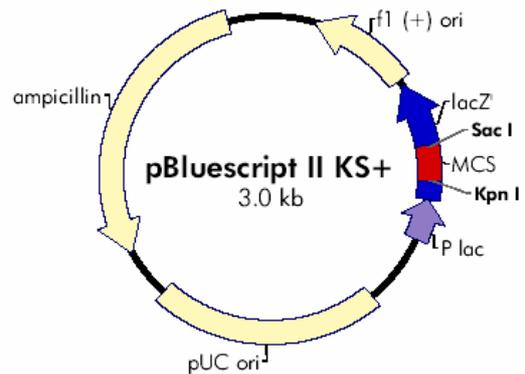
4.1.7 Vektor zur bakteriellen Proteinexpression

Hierfür wurde ein modifizierter pGST-Vektor (Chatton et al., 1995) benutzt.

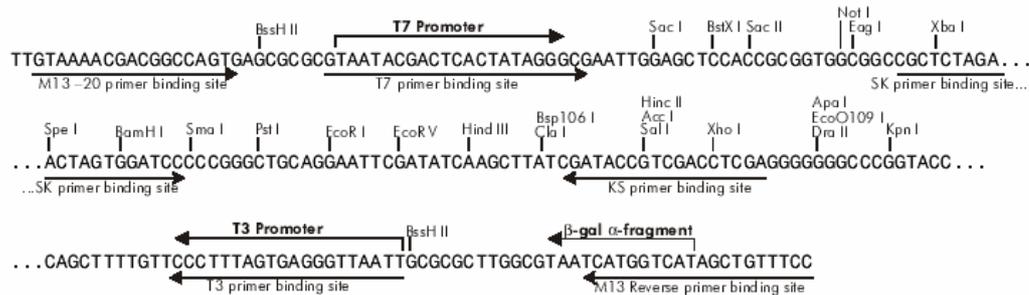
4.1.8 Sequenziervektor

Sequenzierungen wurden meistens im Expressionsvektor durchgeführt. Für schwierige Fragmente wurde gelegentliche der pBlueskript II verwendet.

- f1 (+) origin** 135–441
- β-galactosidase α-fragment** 460–816
- multiple cloning site** 653–760
- lac promoter** 817–938
- pUC origin** 1158–1825
- ampicillin resistance (bla) ORF** 1976–2833



pBluescript II KS (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598–826)



4.1.9 „Gene-Targeting“ Vektor

Hierfür wurde der pILLN38 (Genome Systems Inc., U.S.) verwendet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 cDNA Isolation

Eine BLAST (Altschul et al., 1990) Suche in der „Expressed Sequence Tag“ Datenbank (Boguski et al., 1993) nach Homologie mit dem C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz von humanem Kol XII (accession number, NM_004370 [GenBank]), ergab einen neuen Klon (GenBank™ accession number AA296964 [GenBank]) als möglicher Kandidat für ein neues Kollagen cDNA. Der rund 1520 Aminosäuren große cDNA Klon wurde sequenziert. Von der Sequenz wurden Primer für eine RACE auf einer cDNA Bibliothek hergestellt wie an anderer Stelle beschrieben (Koch et al., 2000). Nach drei Amplifikationsrunden RACE wurde die komplette cDNA erhalten. Mit genspezifischen Primern wurde die cDNA komplett amplifiziert und sequenziert.

4.2.2 Plasmid-DNA Isolierung

Abhängig von den jeweils benötigten Mengen, wurden die Mini-, Midi-, Maxi- oder EndoFree Plasmid DNA Isolationskits (Qiagen) nach Herstellerprotokoll benutzt.

4.2.3 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Hierfür wurde das Qiagen Gelextraktionskit nach Anleitung benutzt.

4.2.4 Messung von DNA and RNA Konzentrationen

Konzentrationen der Nukleinsäuren wurden photometrisch bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Ein Verhältnis von OD260/OD280 1.8 zeigt gute Qualität.

4.2.5 cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA aus mRNA wurde das „Advantage-RT-PCR Kit“ (Clontech) laut Herstellerprotokoll verwendet.

4.2.6 Polymerase chain reaction (PCR)

Für unterschiedliche Anwendungen wurden verschiedene Polymerasen verwendet:

Polymerase	Verwendungszweck
Roche Expand Long Template Polymerase	- Knockout-Konstrukt Arme/ Screens
Stratagene PiccoMax	- Durchmusterung von ES Zellen
Stratagene Pfu Ultra	- Durchmusterung von ES Zellen - Amplifizierung von Fragmenten und voll-längen Protein für Expression
Taq polymerase (MBI)	- PCR Screen von <i>E.coli</i> Kulturen
Herculase Stratagene	- Amplifizierung von Fragmenten und voll-längen Protein für Expression

Die Polymerasen wurden routinemäßig nach Herstellerprotokoll verwendet.

Standart Programm für "Touchdown-PCR"

	Temp. °C	Zeit [min]	Schritt
	95	3	Denaturierung
10x	95	0.5	Denaturierung
	62 -0.5/ Zyklus	0.5	Anlagerung
	72/ 68	~1/kb	Verlängerung
20-30x	95	0.5	Denaturierung
	57	0.5	Anlagerung
	72/ 68	~1/kb	Verlängerung
	72/ 68	kB Template x 3	Auffüllreaktion
	4°C	∞	

Um die Ausbeute zu erhöhen wurde z. T. 1-8 % DMSO zugegeben, oder die Verlängerungszeit auf das Doppelte erhöht.

4.2.6 Isolation von Zebrafisch mRNA

3- Monate alte AB/Tü Zebrafische wurden geköpft und die inneren Organe entfernt. Rund 1 mg Gewebe wurde mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators in 5 ml GIT Puffer homogenisiert (4 M Guanidinisothiocyanat, 25 mM Na⁺-Citrat, 0,5% Sarcosyl und 0,1 M β-Mercaptoethanol). 340 µl Na-Acetat pH4,8 und 5 ml Phenol und 1 ml

Chloroform:Isoamylalkohol 1:24 wurden dazugegeben und gevortext (10sek.). Nach 10' Inkubation auf Eis wurden die Proben abzentrifugiert ((4°C, 10k rpm, 20'). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wieder in GIT Puffer und 2 ml Isopropanol gelöst. Nach 1 Std. bei -20°C wurde die Probe abzentrifugiert (4°C, 10k rpm, 20'), das Pellet anschließend in RNase freiem 75% EtOH gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet wurde in H₂O gelöst und unlösliche Kontaminationen durch zentrifugation entfernt.

4.2.7 Isolation der Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Hierfür wurde Routinemäßig das „Fibrous-Tissue mRNA Isolation Kit“ (Qiagen) nach Herstellerprotokoll verwendet.

4.2.8. Northern Blot Analyse

Ein 1368-bp PCR Produkt (AF406780 [GenBank], Nukleotide 529-1896) wurde mit [³³P] dCTP (PerkinElmer Life Sciences) mit dem „rediprime DNA-labeling System“ (Amersham Biosciences) markiert. Der Northern Blot (Clontech) wurde in 50% Formamide, 5x Natrium Phosphate/EDTA, 1x Denhardt's, 1% SDS, 10% Dextransulfat, and 0.1 mg/ml Lachs Sperma DNA (Invitrogen) bei 42 °C für 2 Std. prähybridisiert. Die Sonde wurde in dem gleichen Puffer unter Zugabe 1:10 (v/v) humaner Cot-1 DNA (Roche Applied Science) und 1:10 (v/v) gescherter Lachshoden-DNA (Invitrogen) bei 94 °C for 5 min. denaturiert, auf Eis inkubiert, zu den Bloots zugegeben, und für 20 Std. hybridisiert. Nach drei Waschschritten in 2x SSC (1x SSC = 0.15 M NaCl und 0.015 M Natrium-Citrat), 1% SDS bei 42 °C, und zweimal in 0.1x SSC, 1% SDS bei 42 °C. Die Bloots wurden für 20 Std. bei -70 °C entwickelt.

4.2.9 Nested PCR

Zwei Sets degenerierter Primer wurden auf der Basis von Kugelfisch, Maus und humanen DNA Sequenzen generiert (M311-m314 and M312-M133). Die in der ersten Runde erhaltenen, unter nicht stringenten Bedingungen amplifizierten Fragmente (annealing 50°C/ 40 Zyklen PiccoMaxx, Stratagene), wurde aus dem Gel aufgereinigt und für eine zweite Runde unter stringenteren Bedingungen mit dem zweiten inneren Primerpaar verwendet (50°C /35 Zyklen). Das erhaltene Produkt wurde aufgereinigt und sequenziert.

4.1.10 Zebrafish Morpholino „Knockdown“

Die genomische Region um das erste ATG im Zebrafisch wurde sequenziert und auf dieser Basis von der Firma GeneTools ein passender Morpholino generiert. Die Morpholinoexperimente wurden in Kollaboration mit Dominique Baas (Labor von Florence Ruggiero, Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Protéines) wie an anderer Stelle beschrieben, durchgeführt (Ko, 2005).

4.3. Biochemische Methoden

4.3.1 Expression von rekombinantem Kol XXII

Die folgenden Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert, in einen episomalen Vektor inkloniert und sequenziert:

- voll-längen cDNA (Nukleotide 529-5328)
- NC1 Domäne (Nukleotide 529-1896)
- KV305 (Nukleotide 3774-5328)
- KV317 (Nukleotide 3774-4928)
- KV314 (Nukleotide 3774-4531)
- KV309 (Nukleotide 4815-5328)
- KV312 (Nukleotide 5328-4931).

Ein µg Gesamt-RNA von humanem Knorpel und Knochen wurde „revers“ transkribiert und auf der gewonnenen cDNA PCR mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Das Produkt wurde über ein Gel aufgereinigt und in den PCEP Mod. 8 Vektor kloniert. Die Plasmide wurden in TOP10 Zellen amplifiziert, isoliert und entweder von Hand oder im Servicelabor sequenziert. 293-EBNA Zellen wurden transformiert, die transiente Expression mittels Western Blot mit einem His-Tag Antikörper getestet und nach 48 Std. mit Puromycin selektioniert.

Stabile Klone wurden subkloniert und Klone mit den hohen Proteinexpressionsraten und gutem Zellwachstum wurden in mit 100µg/ml Kollagen I (Sigma) beschichteten Triple Flasks (Nunc) kultiviert. Ascorbat und Ascorbat-Phosphat wurden dem Medium, wie an anderer Stelle beschrieben (Chepda et al., 2001), zugegeben. Je nach Protein wurden 2-10 Liter Medium gesammelt und mit NEM und PMSF (Sigma) als Proteaseinhibitoren versetzt. Nach Fällung mit Ammoniumsulfat (45% Sättigung), wurde das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt, in Bindepuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert und gegen den Puffer dialysiert. Anschließend wurde die Lösung auf eine Ni²⁺ Säule geladen (Amersham Bioscience). Eluiert wurde mit Bindepuffer, der

ansteigende Konzentrationen (5-1000mM) Imidazol (Sigma) enthielt. In manchen Fällen wurde der „His“-Tag mit Thrombin abverdaut (Sigma) nach dem Protokoll von EMD Bioscience. Der His-„Tag“ wurde anschließend mit einer Ni²⁺ Sepharose entfernt. Da das Protein selbst eine schwache Interaktion mit der Säule zeigte, wurde nochmals mit Imidazol eluiert.

Das voll-längen Protein war sehr anfällig für Degradierung. Deshalb wurde es vor der Metallionensäule über eine Molekularsiebsäule (CL4B Sepharose/ Pharmacia, Flussrate 0,5ml/ min)) gereinigt. Das Ammoniumsulfat-Präzipitat wurde in PBS gelöst und über eine AMICON-B (Millipore) Apparatur aufkonzentriert und anschließend über die Säule geschickt (0.5 ml/ min). Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm gemessen. Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden auf SDS-PAGE und Western Blot auf ihren Gehalt an voll-längen Protein getestet.

4.3.2 Elektronenmikroskopische Studien

Für Immunoelektronenmikroskopie wurde voll-längen Kol XXII sowie die NC1 Domäne für „rotary shadowing“ wie schon beschrieben (Rousselle et al., 1997), benutzt. Native Fibrillen wurden aus Rinderknorpel isoliert, fixiert und mit Kol XXII Antörper markiert. Die Detektion fand wie schon beschrieben (Kassner et al., 2003) mit einem Gold-markierten Sekundärantikörper, statt. Immunoelektronenmikroskopie wurde wie schon beschrieben durchgeführt (Sakai and Keene, 1994).

4.3.3 Generierung des Antikörpers R34 gegen die NC1 Domäne

Hierfür wurde die Kol XXII NC1 Domäne intradermal, nach Standardprotokoll (Harlow, 1988), in ein Kaninchen injiziert. Das erhaltene Antiserum wurde auf eine Protein-G-Säule (Amersham Biosciences) geladen und mit Triethylamin (Sigma) eluiert. Das neutralisierte Eluat wurde affinitätsgereinigt gegen eine CNBr-Sepharose an welche die NC1 Region gekoppelt war. Die gebundenen Antikörper wurden mit Triethylamin eluiert und sofort neutralisiert (Koch et al., 2000).

4.3.4 Generierung des Antikörpers NC1GP gegen die NC1 Domäne

Die rekombinante NC1 Domäne wurde hierfür in ein Meerschweinchen injiziert nach Protokoll der Firma („Pineda Antikörper Service“). Die anschließende Prozedur wurde, wie oben beschrieben durchgeführt.

4.3.5 Generierung des Antikörpers NC5 gegen die NC5 Domäne

Hierbei wurde als Antigen die NC5 Domäne rekombinant in dem oben beschriebenen bakteriellen Expressionssystem exprimiert. Die Immunisierung und Aufreinigung fand wie oben beschrieben statt. Da der Antikörper unspezifische Signale zeigte, fand eine zweite Affinitätsreinigung gegen das voll-längen Protein, wie oben beschrieben, statt.

4.3.6 Generierung des Antikörpers zVWA gegen die Zebrafisch VWA-Domäne

Die rekombinante Zebrafisch VWA-Domäne wurde wie oben beschrieben für die Immunisierung verwendet. Das Antiserum zeigt eine sehr hohe Spezifität und wurde aus diesem Grund nicht weiter aufgereinigt und mit einer Verdünnung von 1:20000 für IF Studien verwendet.

4.3.7 Gewebeextrakte von Kol XXII

Um die Gewebeform von Kol XXII analysieren zu können, wurden Gewebe erwachsener BL/6 Mäuse zerkleinert und in TBS (1 g of tissue/ml) homogenisiert, und schrittweise in nachfolgenden Puffern extrahiert bei 4°C: 30 min. TBS; (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) ÜN, 2 M Urea, 0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, ÜN. Alle Puffer enthielten 10 mM EDTA, 1 mM *N*-Ethylmaleimid, und 1 mM Pefabloc (Merck) als Proteinaseinhibitoren. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gewebe jeweils bei 14k x g und 4 °C für 30 min. abzentrifugiert, 50-100 µl der Überstände wurden für Enzymverdaus und 10-50 µl für Immunoblots verwendet.

Zebrafisch Gewebeextrakte

Drei Monate alte ABTü Zebrafische wurden geköpft, die inneren Organe entfernt und anschließend in Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 1% Sucrose, 1% NP-40, 100 mM NaCl, 1,3 mM PMSF) auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer gekocht, abzentrifugiert (5' / 10k rpm) und für SDS-PAGE und Western Blot Analysen verwendet oder bei -70°C eingefroren.

4.3.8 „Solid Phase Ligand Binding Assay“

96-Loch Platten (Costar) wurden mit 1-2 µg Kol XXII (oder Fragmenten) / Loch übernacht beschichtet. Nach zwei Waschschrinen mit 2 mM MgCl₂ in TBS wurden die Platten mit 1% BSA/ TBS/ 2 mM MgCl₂ für 1-2 Std. blockiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und der Ligand (Integrin + 1mM MnCl₂ + 1%BSA in TBS with 2 mM MgCl₂ +/- 10mM EDTA) für 1-2 Std. zugegeben. Anschließend wurde 2x mit HEPES Puffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂) gewaschen und fixiert (2,5% Glutaraldehyd in HEPES buffer/ 10'). Nach dreimaligem waschen mit TBS 2mM MgCl₂

wurde der 1. Antikörper (anti Integrin $\beta 1$) 1:400 in 1% BSA/ TBS/ 2 mM $MgCl_2$ für 1,5 Std. zugegeben. Nach dreimaligem waschen mit TBS 2 mM $MgCl_2$ wurde mit dem 2. Antikörper (AP coupled, Sigma A9919) 1:600 in BSA/ TBS/ 2 mM $MgCl_2$ für 1.5 Std. inkubiert. Für die Entwicklung wurde zuerst 3x gewaschen (TBS 2 mM $MgCl_2$) und 100 μl Entwicklerlösung (5 mg Paranitrophenylphosphat (Tablette), 5 ml Glycinpuffer (0,1 M pH 10,8), 5 μl 1 M Zink Acetat, 5 μl 1 M $MgCl_2$) für 5' im dunklen zugegeben. Die Reaktion wurde mit 100 μl 1.5M NaOH gestoppt und OD_{450} gemessen.

4.3.9 Zell-Adhäsionsassay

Je drei Spalten pro verwendetes Protein wurden in Zellkultur 96-Lochplatten mit seriellen Verdünnungen von voll-längen Kol XXII und den exprimierten Fragmenten beschichtet (1-165 nM) und übernacht bei 4°C inkubiert. Die erste Reihe wurde als Negativkontrolle freigehalten. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1% BSA in H_2O für 4 Std. bei 37°C geblockt (Fraktion V, Sigma). Die entsprechenden Zellen wurden trypsinisiert und für Zellbindungs-Studien wie beschrieben verwendet (Aumailley et al., 1989). Nach 30' Inkubation wurden nicht anhaftende Zellen mit PBS gewaschen, die Zellen mit 1 % Glutaraldehyd in H_2O fixiert und anschließend mit Kristallviolett gefärbt. Die Menge der angehefteten Zellen wurde im ELISA Lesegerät bei 540 nm bestimmt.

Um die Bindung über die $\beta 1$ Site zu inhibieren, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Integrin gekauft. Die Zellen wurden für 5 min. mit dem Antikörper (25 $\mu g/ ml$) inkubiert und im Anschluss direkt auf den Kollagenbeschichteten Platten ausplattiert.

4.4 Immunhistochemie

4.4.1 Immunodetektion von Kol XXII in Mäusen

Routinemäßig wurde der pAB NC1GP für die IF in Embryonen verwendet, für erwachsene Tiere stand zunächst der Antikörper R34 zur Verfügung.

Embryonen der benötigten Stadien, oder Gewebe adulter bzw. neonataler Mäuse wurden isoliert und in PFA Lösung (Sigma, 4% in PBS) für 15-120 min. fixiert. Die Embryonen wurden in 20%-30% Saccharose in PBS übernacht entwässert. Die Proben wurden in Tissue-Tek (Sakura Finetek) eingebettet und auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. 7,5 μm Schnitte wurden in einem Lyca Kryostat angefertigt und auf Objektträgern (Shannon) aufgefangen.

Für die IF wurden die gefrorenen Schnitte luftgetrocknet und mit -20°C Methanol für 2' behandelt, bevor sie 3x mit PBS (5') gewaschen wurden. Anschließend wurden sie mit Blockierlösung (0,2% Tween; 5% Goat serum (Sigma) in PBS) für eine Std. inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem waschen wurde für 2 Stunden mit dem passenden

Zweitantikörper inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und danach mit Elvanol eingedeckelt.

Für Doppel-IF wurden die primären und sekundären Antikörper jeweils gemischt.

4.4.2 Immunodetektion von Kol XXII in Zebrafisch

Die drei Monate alten Fische wurden geköpft und wie oben beschrieben eingebettet. Um das Schneiden der Fische zu erleichtern wurden sie z.T. enthäutet. Es wurden 10 µm Schnitte angefertigt. Die Färbung fand wie oben beschrieben statt.

4.4.3 *In situ* Detektion of Kol XXII mRNA

In situ Hybridisierungen wurden wie beschrieben durchgeführt (Klatt et al., 2000). Hierfür wurden cRNA Sonden von PCR Produkten generiert. T7 Polymerase Erkennungssequenzen wurden an die „Revers“ Primer angehängt und die Sonden auf cDNA's amplifiziert.

4.4.4 Zebrafisch „Whole Mount“ *in situ*

Die Sonden wurden wie oben beschrieben hergestellt. Als Region wurde eine 380 bp Region in der NC1-Region ausgewählt (fw M570, rev M571). Die Hybridisierung wurde wie schon beschrieben in Kollaboration mit Hannah Baader (Labor von Florence Ruggiero) durchgeführt (Jowett and Lettice, 1994).

4.5 Bioinformatische Analysen

4.5.1 „Coiled-Coil“ Vorhersagen

„Coiled-Coils“ wurden mit dem „COILS“ Server Programm (Lupas, 1997) vorhergesagt und mit der „Heptad“ Region verglichen. Um die Daten mit schon publizierten Daten zu vergleichen (McAlinden et al., 2003), wurde ein zweiter Algorithmus (Wolf et al., 1997) auf dem MultiCoil Server verwendet.

4.5.2 Genomische Organisation des COL22A1 Gens

Die genomische Organisation des humanen COL22A1 human wurde mit Hilfe des „Ensembl Human Exonview“ bestimmt. Die genomische Struktur der ersten Exone in Maus wurde aus Datenbankdaten und eigenen Sequenzierdaten ermittelt.

Datenbanken und Homologiesuchen wurden mit NCBI BLAST 2.0, (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt. Zweipaarige „Alignments“ wurden mit dem NCBI

BLAST 2 Seq. durchgeführt. Multiple DNA oder Protein Alignments wurden mit CLUSTALW vom „European Bioinformatics Institute Toolbox“ durchgeführt.

4.2.3 Phylogenetische Bäume

Um eine genetische Verwandtschaftskarte mit verschiedenen VWA Domänen enthaltenden Proteinen durchführen zu können, wurden die VWA-Domänen mit dem GroTree Programm analysiert (GCG Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group Inc.). Folgende Sequenzen wurden verwendet: matrilin1 (NP_002370 [GenBank] , 35-221); matrilin2 (NP_085072 [GenBank] , 51-237); matrilin3 (NP_002372 [GenBank] , 77-263); matrilin4 (NP_003824 [GenBank] , 28-224); collagen XII 1 (NP_004361 [GenBank] , 1192-1376), collagen XII 2 (NP_004361 [GenBank] , 2317-2501); collagen XIV 1 (CAA72402 [GenBank] 1-185), collagen XIV 2 (XX, 151-335); collagen XXI (NP_110447 [GenBank] , 31-212); collagen XXII (AAN03620 [GenBank] 32-218). Die VWA Domänen wurden analysiert und mit einer „Distance Matrix“ und „Parsimony“ verglichen.

4.6 „Gene-Targeting“ Protokolle

4.6.1 Mitomycin-Behandlung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten dienen als Substrat, um darauf embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zu kultivieren. Damit die ES-Zellen nicht von den Fibroblasten überwachsen werden, wurde deren Mitose durch Behandlung mit Mitomycin inhibiert. Dazu wurde Mitomycin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml dem Medium einer konfluenten Zellkulturplatte zugesetzt. Die Zellen wurden für mindestens 2 Std. bei 37 °C inkubiert, 3 x mit PBS gründlich gewaschen, durch Trypsin (0,05 %) von der Platte abgelöst (5 min., 37 °C und in frischem EMFI-Medium aufgenommen. Anschließend wurden Zellen auf Gelatine (Bovine skin Typ-B 2 %-Stocklösung, Sigma) beschichteten Zellkulturschalen in derselben Dichte wieder ausplattiert. Für die Gelatinebeschichtung wurden die Platten mit PBS/ 0,1 % Gelatine für 15 bis 30' bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten ES-Zellen auf den Mitose-Inaktivierten Fibroblasten kultiviert werden.

4.6.2 Kultur von embryonalen Stammzellen

ES-Zellen der Linie IB10 wurden auf Neomycin-resistenten, Mitose-inaktivierten embryonalen Fibroblasten (Kulturschalen Ø 10 cm) in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37 °C mit ES-Zell-Medium (DMEM (*high glucose*), 20 % Serum Replacement, 1 mM β-Mercaptoethanol, 1 % 100 x MEM (non essential aminoacids), 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin, 1500 U/ml LIF, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die ES-Zellen mit 0,05 % Trypsin von der Platte abgelöst, durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vereinzelt, gesplittet und schließlich in frischem Medium auf neue embryonale Fibroblasten ausplattiert. Für die Präparation genomischer DNA wurden die ES-Zellen mit EMFI-Medium kultiviert.

4.6.3 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen

Vier Stunden vor der Elektroporation wurde ein Mediumwechsel der ES-Zellen durchgeführt. Für die Elektroporation wurden konfluente Zellen einer Zellkulturplatte Ø 10 cm verwendet. Die ES-Zellen wurden trypsiniert, 5 min. bei 200 x g abzentrifugiert und in 9 ml PBS/25 mM NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, in 750 µl PBS/25 mM NaCl aufgenommen und zusammen mit 30 µg linearisiertem „Targeting-Konstrukt“ 5' bei RT inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zusammen mit der DNA in eine Elektroporationsküvette überführt (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Bio-Rad). Die Elektroporation wurde mit 500 µF und 230 V in einem *GenePulser* (Bio-Rad) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf vier Zellkulturschalen mit embryonalen Fibroblasten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das ES-Zell-Medium durch Selektionsmedium (ES-Zell-Medium mit 350 µg/ml G418) ersetzt. Die Selektion von ES-Zellen mit integriertem *Targeting*-Konstrukt erfolgte über 7-9 Tage, wobei das Medium täglich gewechselt wurde. G418 resistente Zell-Klone wurden unter dem Mikroskop mit einer Eppendorf-Pipette isoliert, auf 96-Lochplatten überführt und 5' mit 50 µl Trypsinlösung (0,05 %) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Durch Zugabe von 25 µl Trypsininhibitor (10 mg/ml) wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden auf 24-Lochplatten überführt, die bereits 800 µl ES-Zell-Medium je Loch enthielten. Waren die ES-Zellen bis zur Konfluenz gewachsen, wurden 2/3 eines jeden ES-Zell-Klons eingefroren; das verbleibende Drittel wurde für die Präparation von DNA auf 48-Lochplatten überführt.

4.6.4 Einfrieren von embryonalen Stammzellen

Zum Einfrieren der konfluenten Zellen wurde zunächst das Medium der entsprechenden Vertiefung der 24-Lochplatten abgesaugt. Die Zellen wurden 5-10 min. mit 150 µl Trypsin 0,05 % inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Trypsinhibitor (10 mg/ml) und 700 µl ES-Zell-Medium zugegeben. Die Zellen wurden gut vereinzelt. Für die Präparation von DNA wurden 300 µl der resuspendierten Zellen auf 48-Lochplatten überführt. Die verbleibenden 600 µl wurden in Einfrierröhrchen (Greiner-Labortechnik) pipettiert und mit demselben Volumen 2 x Einfrier-Medium (33 ml ES-Zell-Medium, 10 ml DMSO, 7 ml Serum Replacement (Invitrogen) versetzt. Durch vorsichtiges Schütteln wurden die Zellen mit dem Einfrier-Medium gemischt, auf Trockeneis eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.6.5 Isolation genomischer ES Zell DNA

Die DNA wurde isoliert wie zuvor beschrieben (Floss et al., 1996).

4.6.7 Southern Blot

Southern Hybridisierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Southern, 1975).

4.6.8 Herstellung von Southern Blot Sonden

Das „Ladderman Labelling Kit“ (TAKARA Miro Bio) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Markierung der DNA wurde mit Chromatography getestet.

4.6.9 ES Zell karyotypisierung

Die Karyotypisierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Nagy).

4.6.10 Isolierung von DNA von Mausschwänzen

Die DNA wurde wie zuvor beschrieben isoliert (Laird et al., 1991).

Literaturverzeichnis

- Akagi, A., Tajima, S., Ishibashi, A., Yamaguchi, N., and Nagai, Y.** (1999). Expression of type XVI collagen in human skin fibroblasts: enhanced expression in fibrotic skin diseases. *J Invest Dermatol* **113**, 246-250.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amacher, S.L., and Kimmel, C.B.** (1998). Promoting notochord fate and repressing muscle development in zebrafish axial mesoderm. *Development* **125**, 1397-1406.
- Amano, S., Scott, I.C., Takahara, K., Koch, M., Champlaud, M.F., Gerecke, D.R., Keene, D.R., Hudson, D.L., Nishiyama, T., Lee, S., Greenspan, D.S., and Burgeson, R.E.** (2000). Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain. *J Biol Chem* **275**, 22728-22735.
- Areida, S.K., Reinhardt, D.P., Muller, P.K., Fietzek, P.P., Kowitz, J., Marinkovich, M.P., and Notbohm, H.** (2001). Properties of the collagen type XVII ectodomain. Evidence for n- to c-terminal triple helix folding. *J Biol Chem* **276**, 1594-1601.
- Aubert-Foucher, E., Font, B., Eichenberger, D., Goldschmidt, D., Lethias, C., and van der Rest, M.** (1992). Purification and characterization of native type XIV collagen. *J Biol Chem* **267**, 15759-15764.
- Aumailley, M., Mann, K., von der Mark, H., and Timpl, R.** (1989). Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its alpha 2(VI) and alpha 3(VI) chains. *Exp Cell Res* **181**, 463-474.
- Bai, S., Thummel, R., Godwin, A.R., Nagase, H., Itoh, Y., Li, L., Evans, R., McDermott, J., Seiki, M., and Sarras, M.P., Jr.** (2005). Matrix metalloproteinase expression and function during fin regeneration in zebrafish: analysis of MT1-MMP, MMP2 and TIMP2. *Matrix Biol* **24**, 247-260.
- Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Lopez, J.M., Alvarez, J., Sanchez, L.M., Quesada, V., Bordallo, J., Murphy, G., and Lopez-Otin, C.** (2001). Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP-1) expressed at sites of embryo implantation. *J Biol Chem* **276**, 10253-10262.
- Banyard, J., Bao, L., and Zetter, B.R.** (2003). Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *J Biol Chem* **278**, 20989-20994.
- Bao, Z.Z., Lakonishok, M., Kaufman, S., and Horwitz, A.F.** (1993). Alpha 7 beta 1 integrin is a component of the myotendinous junction on skeletal muscle. *J Cell Sci* **106 (Pt 2)**, 579-589.
- Bassett, D.I., Bryson-Richardson, R.J., Daggett, D.F., Gautier, P., Keenan, D.G., and Currie, P.D.** (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* **130**, 5851-5860.
- Bastian Budde, K.B., Joni Ylöstalo, Frank Zaucke, Harald W.A. Ehlen, Raimund Wagener, Leena Ala-Kokko, Mats Paulsson, Peter Bruckner, Susanne Grässel.** (2005). Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. in press.
- Beck, K., and Brodsky, B.** (1998). Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol* **122**, 17-29.
- Belkin, V.M., Belkin, A.M., and Koteliansky, V.E.** (1990). Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J Cell Biol* **111**, 2159-2170.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E.** (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* **82**, 291-329.
- Boguski, M.S., Lowe, T.M., and Tolstoshev, C.M.** (1993). dbEST--database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* **4**, 332-333.
- Boot-Handford, R.P., Tuckwell, D.S., Plumb, D.A., Rock, C.F., and Poulson, R.** (2003). A novel and highly conserved collagen (pro(alpha)1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem* **278**, 31067-31077.
- Bork, P.** (1991). Shuffled domains in extracellular proteins. *FEBS Lett* **286**, 47-54.
- Brand-Saberi, B., and Christ, B.** (2000). Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites. *Curr Top Dev Biol* **48**, 1-42.

- Brent, A.E., and Tabin, C.J.** (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 548-557.
- Brent, A.E., Schweitzer, R., and Tabin, C.J.** (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell* **113**, 235-248.
- Brent, A.E., Braun, T., and Tabin, C.J.** (2005). Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. *Development* **132**, 515-528.
- Briesewitz, R., Epstein, M.R., and Marcantonio, E.E.** (1993). Expression of native and truncated forms of the human integrin alpha 1 subunit. *J Biol Chem* **268**, 2989-2996.
- Brown, J.C., and Timpl, R.** (1995). The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol* **107**, 484-490.
- Brown, J.C., Mann, K., Wiedemann, H., and Timpl, R.** (1993). Structure and binding properties of collagen type XIV isolated from human placenta. *J Cell Biol* **120**, 557-567.
- Brown, J.C., Golbik, R., Mann, K., and Timpl, R.** (1994). Structure and stability of the triple-helical domains of human collagen XIV. *Matrix Biol* **14**, 287-295.
- Bujia, J., Alsalameh, S., Jerez, R., Sittinger, M., Wilmes, E., and Burmester, G.** (1994). Antibodies to the minor cartilage collagen type IX in otosclerosis. *Am J Otol* **15**, 222-224.
- Burkin, D.J., and Kaufman, S.J.** (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res* **296**, 183-190.
- Bushby, K.M.** (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* **8**, 1875-1882.
- Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., Eble, J., Kuhn, K., and Humphries, M.J.** (1997). The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem* **272**, 12311-12317.
- Camper, L., Hellman, U., and Lundgren-Akerlund, E.** (1998). Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* **273**, 20383-20389.
- Chatton, B., Bahr, A., Acker, J., and Keding, C.** (1995). Eukaryotic GST fusion vector for the study of protein-protein associations in vivo: application to interaction of ATFa with Jun and Fos. *Biotechniques* **18**, 142-145.
- Chepda, T., Cadau, M., Girin, P., Frey, J., and Chamson, A.** (2001). Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **37**, 26-30.
- Chiquet, M., and Fambrough, D.M.** (1984). Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J Cell Biol* **98**, 1937-1946.
- Chiquet, M., Renedo, A.S., Huber, F., and Fluck, M.** (2003). How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol* **22**, 73-80.
- Chou, M.Y., and Li, H.C.** (2002). Genomic organization and characterization of the human type XXI collagen (COL21A1) gene. *Genomics* **79**, 395-401.
- Cohn, R.D., and Campbell, K.P.** (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* **23**, 1456-1471.
- Colombatti, A., Bonaldo, P., and Doliana, R.** (1993). Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix* **13**, 297-306.
- Coutelle, O., Blagden, C.S., Hampson, R., Halai, C., Rigby, P.W., and Hughes, S.M.** (2001). Hedgehog signalling is required for maintenance of myf5 and myoD expression and timely terminal differentiation in zebrafish adaxial myogenesis. *Dev Biol* **236**, 136-150.
- DiPersio, C.M., Shah, S., and Hynes, R.O.** (1995). alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci* **108 (Pt 6)**, 2321-2336.
- Dublet, B., and van der Rest, M.** (1991). Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens. *J Biol Chem* **266**, 6853-6858.
- Dubois, G.M., Haftek, Z., Crozet, C., Garrone, R., and Le Guellec, D.** (2002). Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene* **294**, 55-65.
- Eble, J.A., Golbik, R., Mann, K., and Kuhn, K.** (1993). The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [alpha 1(IV)]₂ alpha 2(IV). *Embo J* **12**, 4795-4802.
- Edom-Vovard, F., and Duprez, D.** (2004). Signals regulating tendon formation during chick embryonic development. *Dev Dyn* **229**, 449-457.

- Emsley, J., King, S.L., Bergelson, J.M., and Liddington, R.C.** (1997). Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *J Biol Chem* **272**, 28512-28517.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., and Liddington, R.C.** (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* **101**, 47-56.
- Ervasti, J.M., and Campbell, K.P.** (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* **122**, 809-823.
- Ferguson, J.W., Thoma, B.S., Mikesch, M.F., Kramer, R.H., Bennett, K.L., Purchio, A., Bellard, B.J., and LeBaron, R.G.** (2003). The extracellular matrix protein beta1G-H3 is expressed at myotendinous junctions and supports muscle cell adhesion. *Cell Tissue Res* **313**, 93-105.
- Fitzgerald, J., and Bateman, J.F.** (2001). A new FACIT of the collagen family: COL21A1. *FEBS Lett* **505**, 275-280.
- Fitzgerald, J., and Bateman, J.F.** (2004). Why mice have lost genes for COL21A1, STK17A, GPR145 and AHRI: evidence for gene deletion at evolutionary breakpoints in the rodent lineage. *Trends Genet* **20**, 408-412.
- Fitzgerald, J., Tay Ting, S., and Bateman, J.F.** (2002). WARP is a new member of the von Willebrand factor A-domain superfamily of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* **517**, 61-66.
- Floss, T., Arnold, H.H., and Braun, T.** (1996). Myf-5(m1)/Myf-6(m1) compound heterozygous mouse mutants down-regulate Myf-5 expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on Myf-5 transcription. *Dev Biol* **174**, 140-147.
- Font, B., Eichenberger, D., Rosenberg, L.M., and van der Rest, M.** (1996). Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol* **15**, 341-348.
- Frank, S., Boudko, S., Mizuno, K., Schulthess, T., Engel, J., and Bachinger, H.P.** (2003). Collagen triple helix formation can be nucleated at either end. *J Biol Chem* **278**, 7747-7750.
- Gardner, H., Broberg, A., Pozzi, A., Laato, M., and Heino, J.** (1999). Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. *J Cell Sci* **112 (Pt 3)**, 263-272.
- Gordon, M.K., Gerecke, D.R., Dublet, B., van der Rest, M., and Olsen, B.R.** (1989). Type XII collagen. A large multidomain molecule with partial homology to type IX collagen. *J Biol Chem* **264**, 19772-19778.
- Gordon, M.K., Castagnola, P., Dublet, B., Linsenmayer, T.F., Van der Rest, M., Mayne, R., and Olsen, B.R.** (1991). Cloning of a cDNA for a new member of the class of fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *Eur J Biochem* **201**, 333-338.
- Gotwals, P.J., Chi-Rosso, G., Lindner, V., Yang, J., Ling, L., Fawell, S.E., and Koteliansky, V.E.** (1996). The alpha1beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *J Clin Invest* **97**, 2469-2477.
- Grassel, S., Unsold, C., Schacke, H., Bruckner-Tuderman, L., and Bruckner, P.** (1999). Collagen XVI is expressed by human dermal fibroblasts and keratinocytes and is associated with the microfibrillar apparatus in the upper papillary dermis. *Matrix Biol* **18**, 309-317.
- Groves, J.A., Hammond, C.L., and Hughes, S.M.** (2005). Fgf8 drives myogenic progression of a novel lateral fast muscle fibre population in zebrafish. *Development*.
- Gulcher, J.R., Nies, D.E., Marton, L.S., and Stefansson, K.** (1989). An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1588-1592.
- Gullberg, D., Tiger, C.F., and Velling, T.** (1999). Laminins during muscle development and in muscular dystrophies. *Cell Mol Life Sci* **56**, 442-460.
- Gullberg, D., Velling, T., Sjoberg, G., and Sejersen, T.** (1995). Up-regulation of a novel integrin alpha-chain (alpha mt) on human fetal myotubes. *Dev Dyn* **204**, 57-65.
- Guo, Y., Kammerer, R.A., and Engel, J.** (2000). The unusually stable coiled-coil domain of COMP exhibits cold and heat denaturation in 4-6 M guanidinium chloride. *Biophys Chem* **85**, 179-186.
- Hagg, R., Bruckner, P., and Hedbom, E.** (1998). Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J Cell Biol* **142**, 285-294.
- Hagg, R., Hedbom, E., Mollers, U., Aszodi, A., Fassler, R., and Bruckner, P.** (1997). Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice. *J Biol Chem* **272**, 20650-20654.

- Harlow, E., and Lane, D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* pp.92-119. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Watanabe, A., Kowa, H., Hosoda, R., Nakamura, A., Kanazawa, I., Arai, T., Takio, K., Mann, D.M., and Iwatsubo, T.** (2002). CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *Embo J* **21**, 1524-1534.
- Henry, C.A., Crawford, B.D., Yan, Y.L., Postlethwait, J., Cooper, M.S., and Hille, M.B.** (2001). Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev Biol* **240**, 474-487.
- Hijikata, T., and Ishikawa, H.** (1997). Functional morphology of serially linked skeletal muscle fibers. *Acta Anat (Basel)* **159**, 99-107.
- Hiltunen, A., Metsaranta, M., Perala, M., Saamanen, A.M., Aro, H.T., and Vuorio, E.** (1995). Expression of type VI, IX and XI collagen genes and alternative splicing of type II collagen transcripts in fracture callus tissue in mice. *FEBS Lett* **364**, 171-174.
- Holmdahl, R., Malmstrom, V., and Vuorio, E.** (1993). Autoimmune recognition of cartilage collagens. *Ann Med* **25**, 251-264.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J., and Gros, P.** (1997). Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure* **5**, 1147-1156.
- Hynes, R.O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W., and Campbell, K.P.** (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**, 696-702.
- Imhof, M., and Trueb, B.** (2001). Alternative splicing of the first F3 domain from chicken collagen XIV affects cell adhesion and heparin binding. *J Biol Chem* **276**, 9141-9148.
- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kahari, V.M., and Heino, J.** (1999). Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **147**, 401-416.
- Jowett, T., and Lettice, L.** (1994). Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. *Trends Genet* **10**, 73-74.
- Kamata, T., and Takada, Y.** (1994). Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J Biol Chem* **269**, 26006-26010.
- Kammerer, R.A.** (1997). Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains in extracellular proteins. *Matrix Biol* **15**, 555-565; discussion 567-558.
- Kapyla, J., Jaalinoja, J., Tulla, M., Ylostalo, J., Nissinen, L., Viitasalo, T., Vehvilainen, P., Marjomaki, V., Nykvist, P., Saamanen, A.M., Farndale, R.W., Birk, D.E., Ala-Kokko, L., and Heino, J.** (2004). The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix. *J Biol Chem* **279**, 51677-51687.
- Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D.P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., and Grassel, S.** (2003). Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol* **22**, 131-143.
- Kassner, A., Tiedemann, K., Notbohm, H., Ludwig, T., Morgelin, M., Reinhardt, D.P., Chu, M.L., Bruckner, P., and Grassel, S.** (2004). Molecular structure and interaction of recombinant human type XVI collagen. *J Mol Biol* **339**, 835-853.
- Katz, S.L.** (2002). Design of heterothermic muscle in fish. *J Exp Biol* **205**, 2251-2266.
- Keene, D.R., Lunstrum, G.P., Morris, N.P., Stoddard, D.W., and Burgeson, R.E.** (1991). Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol* **113**, 971-978.
- Kern, A., Briesewitz, R., Bank, I., and Marcantonio, E.E.** (1994). The role of the I domain in ligand binding of the human integrin alpha 1 beta 1. *J Biol Chem* **269**, 22811-22816.
- Klatt, A.R., Nitsche, D.P., Kobbe, B., Morgelin, M., Paulsson, M., and 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.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W., and Barnes, M.J.** (2000). The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J Biol Chem* **275**, 35-40.
- Ko, Y.-P.** (2005). Analysis of matrilin function in knockout mice and knockdown zebrafish. In *Inst. für Biochemie II (Universität Köln / Medical School)*.

- Koch, M., Foley, J.E., Hahn, R., Zhou, P., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R., and Gordon, M.K. (2001). alpha 1(Xx) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J Biol Chem* **276**, 23120-23126.
- Koch, M., Murrell, J.R., Hunter, D.D., Olson, P.F., Jin, W., Keene, D.R., Brunken, W.J., and Burgeson, R.E. (2000). A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol* **151**, 221-234.
- Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R.A., Tanaka, S., Burgeson, R.E., Gerecke, D.R., Ramirez, F., and Gordon, M.K. (2003). Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *J Biol Chem* **278**, 43236-43244.
- Koch, M., Schulze, J., Hansen, U., Ashwodd, T., Keene, D.R., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., Bruckner, P., and Bruckner-Tuderman, L. (2004). A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J Biol Chem* **279**, 22514-22521.
- Kramer, R.H., and Marks, N. (1989). Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem* **264**, 4684-4688.
- Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K., and Kudo, A. (2004). Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* **267**, 473-487.
- Kunicki, T.J. (2002). The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 14-20.
- Labourdette, L., and van der Rest, M. (1993). Analysis of the role of the COL1 domain and its adjacent cysteine-containing sequence in the chain assembly of type IX collagen. *FEBS Lett* **320**, 211-214.
- Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Scobie, H.M., Young, J.A., and Collier, R.J. (2004). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6367-6372.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293.
- Langholz, O., Rockel, D., Mauch, C., Kozłowska, E., Bank, I., Krieg, T., and Eckes, B. (1995). Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* **131**, 1903-1915.
- Latvanlehto, A., Snellman, A., Tu, H., and Pihlajaniemi, T. (2003). Type XIII collagen and some other transmembrane collagens contain two separate coiled-coil motifs, which may function as independent oligomerization domains. *J Biol Chem* **278**, 37590-37599.
- Law, D.J., and Tidball, J.G. (1993). Dystrophin deficiency is associated with myotendinous junction defects in pre-necrotic and fully regenerated skeletal muscle. *Am J Pathol* **142**, 1513-1523.
- Law, D.J., Caputo, A., and Tidball, J.G. (1995). Site and mechanics of failure in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Muscle Nerve* **18**, 216-223.
- Lunstrum, G.P., Morris, N.P., McDonough, A.M., Keene, D.R., and Burgeson, R.E. (1991). Identification and partial characterization of two type XII-like collagen molecules. *J Cell Biol* **113**, 963-969.
- Lupas, A. (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 388-393.
- Marneros, A.G., and Olsen, B.R. (2001). The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol* **20**, 337-345.
- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E., and von der Mark, K. (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 318-323.
- Mayne, R., van der Rest, M., Ninomiya, Y., and Olsen, B.R. (1985). The structure of type IX collagen. *Ann N Y Acad Sci* **460**, 38-46.
- Mazzorana, M., Snellman, A., Kivirikko, K.I., van der Rest, M., and Pihlajaniemi, T. (1996). Involvement of prolyl 4-hydroxylase in the assembly of trimeric minicollagen XII. Study in a baculovirus expression system. *J Biol Chem* **271**, 29003-29008.
- McAlinden, A., Smith, T.A., Sandell, L.J., Ficheux, D., Parry, D.A., and Hulmes, D.J. (2003). Alpha-helical coiled-coil oligomerization domains are almost ubiquitous in the collagen superfamily. *J Biol Chem* **278**, 42200-42207.
- Miosge, N., Klenczar, C., Herken, R., Willem, M., and Mayer, U. (1999). Organization of the myotendinous junction is dependent on the presence of alpha7beta1 integrin. *Lab Invest* **79**, 1591-1599.

- Moore, J.S.** (1992). Function, structure, and responses of components of the muscle-tendon unit. *Occup Med* **7**, 713-740.
- Moradi-Ameli, M., Deleage, G., Geourjon, C., and van der Rest, M.** (1994). Common topology within a non-collagenous domain of several different collagen types. *Matrix Biol* **14**, 233-239.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C.** (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* **4**, 189-202.
- Muragaki, Y., Mariman, E.C., van Beersum, S.E., Perala, M., van Mourik, J.B., Warman, M.L., Olsen, B.R., and Hamel, B.C.** (1996). A mutation in the gene encoding the alpha 2 chain of the fibril-associated collagen IX, COL9A2, causes multiple epiphyseal dysplasia (EDM2). *Nat Genet* **12**, 103-105.
- Myers, J.C., Yang, H., D'Ippolito, J.A., Presente, A., Miller, M.K., and Dion, A.S.** (1994). The triple-helical region of human type XIX collagen consists of multiple collagenous subdomains and exhibits limited sequence homology to alpha 1(XVI). *J Biol Chem* **269**, 18549-18557.
- Myers, J.C., Li, D., Bageris, A., Abraham, V., Dion, A.S., and Amenta, P.S.** (1997). Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *Am J Pathol* **151**, 1729-1740.
- Myers, J.C., Li, D., Amenta, P.S., Clark, C.C., Nagaswami, C., and Weisel, J.W.** (2003). Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *J Biol Chem* **278**, 32047-32057.
- Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I.** (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* **33**, 7-21.
- Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I.** (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* **20**, 33-43.
- Nagy, A.a.o.** *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 3rd edition. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Nemeth-Csoka, M., and Meszaros, T.** (1983). Minor collagens in arthrotic human cartilage. Change in content of 1 alpha, 2 alpha, 3 alpha and M-collagen with age and in osteoarthritis. *Acta Orthop Scand* **54**, 613-619.
- Oh, S.P., Griffith, C.M., Hay, E.D., and Olsen, B.R.** (1993). Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. *Dev Dyn* **196**, 37-46.
- Osada, Y., Hashimoto, T., Nishimura, A., Matsuo, Y., Wakabayashi, T., and Iwatsubo, T.** (2005). CLAC binds to amyloid beta peptides through the positively charged amino acid cluster within the collagenous domain 1 and inhibits formation of amyloid fibrils. *J Biol Chem* **280**, 8596-8605.
- Pace, J.M., Corrado, M., Missero, C., and Byers, P.H.** (2003). Identification, characterization and expression analysis of a new fibrillar collagen gene, COL27A1. *Matrix Biol* **22**, 3-14.
- Pan, T.C., Zhang, R.Z., Mattei, M.G., Timpl, R., and Chu, M.L.** (1992). Cloning and chromosomal location of human alpha 1(XVI) collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6565-6569.
- Parsons, M.J., Pollard, S.M., Saude, L., Feldman, B., Coutinho, P., Hirst, E.M., and Stemple, D.L.** (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* **129**, 3137-3146.
- Patthy, L.** (1996). Exon shuffling and other ways of module exchange. *Matrix Biol* **15**, 301-310; discussion 311-302.
- Patton, E.E., and Zon, L.I.** (2001). The art and design of genetic screens: zebrafish. *Nat Rev Genet* **2**, 956-966.
- Paulsson, M., Piecha, D., Segat, D., Smyth, N., and Wagener, R.** (1999). The matrilins: a growing family of A-domain-containing proteins. *Biochem Soc Trans* **27**, 824-826.
- Pedrosa-Domellof, F., Tiger, C.F., Virtanen, I., Thornell, L.E., and Gullberg, D.** (2000). Laminin chains in developing and adult human myotendinous junctions. *J Histochem Cytochem* **48**, 201-210.
- Peltonen, S., Hentula, M., Hagg, P., Yla-Outinen, H., Tuukkanen, J., Lakkakorpi, J., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., and Peltonen, J.** (1999). A novel component of epidermal cell-matrix and cell-cell contacts: transmembrane protein type XIII collagen. *J Invest Dermatol* **113**, 635-642.
- Perkins, S.J., Smith, K.F., Williams, S.C., Haris, P.I., Chapman, D., and Sim, R.B.** (1994). The secondary structure of the von Willebrand factor type A domain in factor B of human complement by Fourier transform infrared spectroscopy. Its occurrence in collagen types

- VI, VII, XII and XIV, the integrins and other proteins by averaged structure predictions. *J Mol Biol* **238**, 104-119.
- Racine-Samson, L., Rockey, D.C., and Bissell, D.M.** (1997). The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. *J Biol Chem* **272**, 30911-30917.
- Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C., and Kahari, V.M.** (1999a). Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 2446-2455.
- Ravanti, L., Hakkinen, L., Larjava, H., Saarialho-Kere, U., Foschi, M., Han, J., and Kahari, V.M.** (1999b). Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 37292-37300.
- Rehn, M., and Pihlajaniemi, T.** (1995). Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. The longest form contains a novel motif homologous to rat and *Drosophila* frizzled proteins. *J Biol Chem* **270**, 4705-4711.
- Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F.** (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* **53**, 430-442.
- Rich, R.L., Deivanayagam, C.C., Owens, R.T., Carson, M., Hook, A., Moore, D., Symersky, J., Yang, V.W., Narayana, S.V., and Hook, M.** (1999). Trench-shaped binding sites promote multiple classes of interactions between collagen and the adherence receptors, alpha(1)beta(1) integrin and *Staphylococcus aureus* cna MSCRAMM. *J Biol Chem* **274**, 24906-24913.
- Riikonen, T., Westermarck, J., Koivisto, L., Broberg, A., Kahari, V.M., and Heino, J.** (1995). Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *J Biol Chem* **270**, 13548-13552.
- Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J., and Huizinga, E.G.** (2003). Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem* **278**, 15035-15039.
- Rousselle, P., Keene, D.R., Ruggiero, F., Champlaud, M.F., Rest, M., and Burgeson, R.E.** (1997). Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* **138**, 719-728.
- Ruggiero, F., Petit, B., Ronziere, M.C., Farjanel, J., Hartmann, D.J., and Herbage, D.** (1993). Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density. *J Histochem Cytochem* **41**, 867-875.
- Sakai, L.Y., and Keene, D.R.** (1994). Fibrillin: monomers and microfibrils. *Methods Enzymol* **245**, 29-52.
- Sambrook, J.M., T.** Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandell, L.J.** (1991). ECM Genes.
- Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yorihuzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., and Nagata, K.** (2002). Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem* **277**, 37678-37684.
- Schuppan, D., Cantaluppi, M.C., Becker, J., Veit, A., Bunte, T., Troyer, D., Schuppan, F., Schmid, M., Ackermann, R., and Hahn, E.G.** (1990). Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem* **265**, 8823-8832.
- Schweitzer, R., Chyung, J.H., Murtaugh, L.C., Brent, A.E., Rosen, V., Olson, E.N., Lassar, A., and Tabin, C.J.** (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* **128**, 3855-3866.
- Shaw, L.M., and Olsen, B.R.** (1991). FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* **16**, 191-194.
- Shrivastava, A., Radziejewski, C., Campbell, E., Kovac, L., McGlynn, M., Ryan, T.E., Davis, S., Goldfarb, M.P., Glass, D.J., Lemke, G., and Yancopoulos, G.D.** (1997). An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* **1**, 25-34.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J.** (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**, 1578-1580.
- Siljander, P.R., Hamaia, S., Peachey, A.R., Slatter, D.A., Smethurst, P.A., Ouwehand, W.H., Knight, C.G., and Farndale, R.W.** (2004). Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. *J Biol Chem* **279**, 47763-47772.
- Skorstengaard, K., Jensen, M.S., Sahl, P., Petersen, T.E., and Magnusson, S.** (1986). Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* **161**, 441-453.

- Smith, G.N., Jr., and Brandt, K.D.** (1992). Hypothesis: can type IX collagen "glue" together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism. *J Rheumatol* **19**, 14-17.
- Snellman, A.** (2000). CHARACTERIZATION OF CHAIN ASSOCIATION IN COLLAGEN TYPES XII AND XIII AND OTHER BIOCHEMICAL FEATURES OF TYPE XIII COLLAGEN USING BACULOVIRUS-DIRECTED INSECT CELL EXPRESSION. In Department of Medical Biochemistry (Oulu).
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Steinert, P.M.** (1990). The two-chain coiled-coil molecule of native epidermal keratin intermediate filaments is a type I-type II heterodimer. *J Biol Chem* **265**, 8766-8774.
- Suzuki, N., Asamura, K., Kikuchi, Y., Takumi, Y., Abe, S., Imamura, Y., Hayashi, T., Aszodi, A., Fassler, R., and Usami, S.** (2005). Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss. *Neurosci Res* **51**, 293-298.
- te Riele, H., Maandag, E.R., and Berns, A.** (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5128-5132.
- Testa, G., Zhang, Y., Vintersten, K., Benes, V., Pijnappel, W.W., Chambers, I., Smith, A.J., Smith, A.G., and Stewart, A.F.** (2003). Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles. *Nat Biotechnol* **21**, 443-447.
- Tidball, J.G.** (1991). Force transmission across muscle cell membranes. *J Biomech* **24 Suppl 1**, 43-52.
- Tidball, J.G., and Daniel, T.L.** (1986). Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res* **245**, 315-322.
- Tiger, C.F., Fougousse, F., Grundstrom, G., Velling, T., and Gullberg, D.** (2001). alpha11beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev Biol* **237**, 116-129.
- Trotter, J.A.** (1993). Functional morphology of force transmission in skeletal muscle. A brief review. *Acta Anat (Basel)* **146**, 205-222.
- Trotter, J.A., and Baca, J.M.** (1987a). A stereological comparison of the muscle-tendon junctions of fast and slow fibers in the chicken. *Anat Rec* **218**, 256-266.
- Trotter, J.A., and Baca, J.M.** (1987b). The muscle-tendon junctions of fast and slow fibres in the garter snake: ultrastructural and stereological analysis and comparison with other species. *J Muscle Res Cell Motil* **8**, 517-526.
- Trotter, J.A., Samora, A., and Baca, J.** (1985). Three-dimensional structure of the murine muscle-tendon junction. *Anat Rec* **213**, 16-25.
- Trotter, J.A., Samora, A., Hsi, K., and Wofsy, C.** (1987). Stereological analysis of the muscle-tendon junction in the aging mouse. *Anat Rec* **218**, 288-293.
- Tuckwell, D.** (2002). Identification and analysis of collagen alpha 1(XXI), a novel member of the FACIT collagen family. *Matrix Biol* **21**, 63-66.
- Tuckwell, D.S., Reid, K.B., Barnes, M.J., and Humphries, M.J.** (1996). The A-domain of integrin alpha 2 binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif. *Eur J Biochem* **241**, 732-739.
- Ulrich-Vinther, M., Maloney, M.D., Schwarz, E.M., Rosier, R., and O'Keefe, R.J.** (2003). Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* **11**, 421-430.
- Vainzof, M., Marie, S.K., Reed, U.C., Schwartzman, J.S., Pavanello, R.C., Passos-Bueno, M.R., and Zatz, M.** (1995). Deficiency of merosin (laminin M or alpha 2) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics* **26**, 293-297.
- van der Rest, M., and Garrone, R.** (1991). Collagen family of proteins. *Faseb J* **5**, 2814-2823.
- van der Rest, M., Mayne, R., Ninomiya, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., and Olsen, B.R.** (1985). The structure of type IX collagen. *J Biol Chem* **260**, 220-225.
- van der Rest, M., Aubert-Foucher, E., Dublet, B., Eichenberger, D., Font, B., and Goldschmidt, D.** (1991). Structure and function of the fibril-associated collagens. *Biochem Soc Trans* **19**, 820-824.
- Vasios, G., Nishimura, I., Konomi, H., van der Rest, M., Ninomiya, Y., and Olsen, B.R.** (1988). Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J Biol Chem* **263**, 2324-2329.
- Velling, T., Kusche-Gullberg, M., Sejersen, T., and Gullberg, D.** (1999). cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J Biol Chem* **274**, 25735-25742.

- Vihinen, P., Riikonen, T., Laine, A., and Heino, J.** (1996). Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen. *Cell Growth Differ* **7**, 439-447.
- Vogel, W.** (1999). Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications. *Faseb J* **13 Suppl**, S77-82.
- Vogel, W., Gish, G.D., Alves, F., and Pawson, T.** (1997). The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* **1**, 13-23.
- Watt, S.L., Lunstrum, G.P., McDonough, A.M., Keene, D.R., Burgeson, R.E., and Morris, N.P.** (1992). Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol Chem* **267**, 20093-20099.
- Weber, P., Montag, D., Schachner, M., and Bernhardt, R.R.** (1998). Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J Neurobiol* **35**, 1-16.
- Whittaker, C.A., and Hynes, R.O.** (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13**, 3369-3387.
- Wolf, E., Kim, P.S., and Berger, B.** (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci* **6**, 1179-1189.
- Woolfson, D.N., and Alber, T.** (1995). Predicting oligomerization states of coiled coils. *Protein Sci* **4**, 1596-1607.
- Wu, J.J., Woods, P.E., and Eyre, D.R.** (1992). Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* **267**, 23007-23014.
- Xiao, J., Jethanandani, P., Ziober, B.L., and Kramer, R.H.** (2003). Regulation of alpha7 integrin expression during muscle differentiation. *J Biol Chem* **278**, 49780-49788.
- Zhan, Q., Burrows, R., and Cintron, C.** (1995). Localization of type XII collagen in normal and healing rabbit cornea by in situ hybridization. *Exp Eye Res* **60**, 551-561.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., and Sarras, M.P., Jr.** (2003a). The expression of novel membrane-type matrix metalloproteinase isoforms is required for normal development of zebrafish embryos. *Matrix Biol* **22**, 279-293.
- Zhang, J., Bai, S., Tanase, C., Nagase, H., and Sarras, M.P., Jr.** (2003b). The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol* **213**, 382-389.
- Zhang, J., Bai, S., Zhang, X., Nagase, H., and Sarras, M.P., Jr.** (2003c). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev Genes Evol* **213**, 456-463.
- Zhang, W.M., Kapyla, J., Puranen, J.S., Knight, C.G., Tiger, C.F., Pentikainen, O.T., Johnson, M.S., Farndale, R.W., Heino, J., and Gullberg, D.** (2003d). alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J Biol Chem* **278**, 7270-7277.
- Zheng, H., Hastay, P., Breneman, M.A., Grompe, M., Gibbs, R.A., Wilson, J.H., and Bradley, A.** (1991). Fidelity of targeted recombination in human fibroblasts and murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8067-8071.
- Zutter, M.M., and Santoro, S.A.** (1990). Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor. *Am J Pathol* **137**, 113-120.

Anhang

Verwendete Oligonukleotide

Primer Name	fw / rev	Sequenz	Gen	Restr.	Organ.	Zweck
G795	fw	CACGCTAGCCAGCGGGCAGGTTGCAAAAGTGTC	hXXII	NheI	human	klonier.
G796	rev	GGCAGATCTTTACTTCTCTCCAGCTGGGCAGGAGCAG	hXXII	BglIII	human	klonier.
G873	rev	T7..CTTCTCTCCAGCTGGGCAGGAGCAG	hXXII	-	human	Sonde
K616	rev	TATAGATCTTTAGGGACCTTCACATTACCCGGCC	hXXII	BglIII	human	cloning
M716	rev	CAACTCGAGTTACGAGTCACAATAGATCACAAT	hXXII	XhoI	human	klonier.
M967	rev	CAAGAATTC7TATTCACAAGACGGCGCCGAGCTT	hXXII	EcoRI	human	klonier.
M968	fw	CAAGCTAGCGCTGCTTGCGGAAAAGTCAGA	hXXII	NheI	human	klonier.
M969	fw	CAAGCTAGCTCACTACTGTCTCCAGGGGACA	hXXII	NheI	human	klonier.
M975	fw	CACGCTAGCACAGCGGGCAGGTTGCAAAAGTGTC	hXXII	NheI	human	klonier.
M994	fw	CAAGCTAGCGGCAGACCTGGGCCCCAGGG	hXXII	NheI	human	klonier.
M995	fw	AATGCTAGCCCATCCATGGAACCTGCG	hXXII	NheI	human	klonier.
M996	rev	CAAGGATCCTTATTGAGATGACTTCATGTACGC	hXXII	BamHI	human	klonier.
P37	fw	GAAGGCAAAGAGGGCAGAGATGG	hXXII	-	human	PCR
P98	rev	CAACTCGAGTTATTCACAAGACGGCGCCGAGCTT	hXXII	XhoI	human	klonier.
M311	fw	GAYCTGGYCTTYMTCCTGGACAC	zXXII	-	Zebrafis	gene detection
M312	fw	CMGNCARTGGGTNGCCAACCTGGT	zXXII	-	zebrafis	gene detection
M313	rev	GATCTTGTCDATGGCATTNAAGTC	zXXII	-	Zebra.	gene detection
M314	rev	ACRTGGAAGACRTGNGCNSWCTT	zXXII	-	Zebra.	gene detection
M352	fw	AACTCAATCCTTCAATATAACTC	zXXII	-	Zebra.	PCR
M353	fw	TCTGCACAATTCAGTGTATGAATT	zXXII	-	Zebra.	PCR
M354	rev	GTTCAAGGTCAAATCATCAATAC	zXXII	-	Zebra.	PCR
M456	rev	CCGTTCCCAGCAGGACAGGAGCAG	zXXII	-	Zebra.	seq
M457	rev	GGTTTCTTCTGCTCGGCGCTGTAG	zXXII	-	Zebra.	seq
M590	fw	TGTAAGAAGCTCCACTATGATC GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGTCTCGCACAGTCTCCTCCTC AG	zXXII		Zebra.	Sonde
M591	rev	AG	zXXII		Zebra.	Sonde
M597	fw	CACGCTAGCCAAAGAGCAGGTTGTAAGAAGCTCC	zXXII	NheI BamHI	Zebra.	PCR
M598	rev	GTGGGATCCTTACCTGATCTTGTGCGATGGCGTCAAAG GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGCCTGATCTTGTGCGATGGCGT CAAAG	zXXII		Zebra.	PCR
M601	rev	CAAAG	zXXII		Zebra.	Sonde
M707	fw	CCGTCGAATTC AACCTGG	zXXII	- BamHI	Zebra.	PCR
M789	rev	GTGGGATCCTTACTCGCACAGTCTCCTCCTCAG	zXXII		Maus	Cloning
K526	fw	GGCCTGTGTGACCCCTCCAGTG	mXXII	-	Maus	probe
K527	rev	T7..AATAATATTAATAATAACCTGAC	mXXII	-	Maus	probe
K610	rev	T7..GCTTCAAGTCTCTCTGGAGAGG	mXXII	-	Maus	probe
K683	rev	T7..CACAAAGCCGACGCCTCAGCTTGC	mXXII	-	-	probe
K684	fw	GCCACTTCAACTCTCGCGAGGAGG	mXXII	-	-	probe
K685	fw	AACACGAAACACGGGTGACGCC	mXXII	-	-	cloning

K720	fw	TATCTTAAGTAATGCAAAAGTGTGCAGTATGATCTGG	mXXII	AfIII	Maus	KO constr.
K720B	fw	CAACCTAGGTAATGCAAAAGTGTGCAGTATGATCTGG	mXXII	AvrII	Maus	KO constr.
K721	fw	TATCTTAAGTAATGAGAAAGTCCGCCAGTGGGTAGC	mXXII	AfIII	Maus	KO constr.
K722	rev	CTCCTTAAGCATGGAACAAGCCTTTCTCATGCC	mXXII	AfIII	Maus	KO constr.
K723	rev	CTGCTTAAGGCCTTGATGGTCAGAGGACCTTGG	mXXII	AfIII	Maus	KO constr.
K723B	rev	TATCCTAGGGCCTTGATGGTCAGAGGACCTTGG	mXXII	AvrII	Maus	KO constr.
K724	fw	ATCGGTCTAGGAATGTGACAGGA	mXXII	AvrII	Maus	KO constr.
K725	fw	CTGTCCTGGCATCTTATCAGAGCC	mXXII	AvrII	Maus	KO constr.
K726	rev	CACCCTAGGCCTGCTCGTGAAGACAGGGATATC	mXXII	AvrII	Maus	KO constr.
K727	rev	CACCCTAGGAAGACAGGTATATCTTGGTCAGG	mXXII	AvrII	Maus	constr.
M31	fw	CACAGGCCATTGCGGCCTAATGCAAAAGTGTGCAGTATGATCTGG	mXXII	SfiI	Maus	klonier.
M120	fw	TCTCCATCCCAGTCTCTTGC	mXXII	-	Maus	PCR
M121	rev	CTAGGACCGATAGGTAAGC	mXXII	-	Maus	PCR
M122	fw	GCAGGCCTAGCTGATCACTC	mXXII	-		PCR
M123	rev	CACCCACTCGTGCAGGCTGC	mXXII	-		PCR
M134	fw	TCTTCTGTGCTCACTGGACCC	mXXII	-	Maus	PCR
M147	fw	TCCTGTGCTCACTGGACCCTGCC	mXXII	-	Maus	PCR/seq
M148	fw	TATCAGAGCCCAGAAGTCAACG	mXXII	-	Maus	PCR/seq
M149	rev	GCACTGGGCATGGATGTGAGC	mXXII	-	Maus	PCR/seq
M150	rev	CTAGTCATAACGGCAAGTGAGAC	mXXII	-	Maus	PCR/seq
M317	rev	CAAGAATTCTTAGGGTCTGCCTTGAGAGGACTTCAT	mXXII	EcoRI		C-terminus pAB
M367	fw	GGAGGTGTACAGCATTGCTT	mXXII	-	Maus	PCR
M368	rev	GCAATGCTGTACACCTCC	mXXII	-	Maus	PCR
M369	fw	CTGCATAGCTCATGCACTTG	mXXII	-	Maus	PCR
M370	rev	CAAGTGCATGAGCTATGCA	mXXII	-	Maus	PCR
M371	fw	CTTGTATACATTTGTTTGTG	mXXII	-	Maus	PCR
M372	rev	CTGTTTGTTTACATATGTTC GTTAGGCCTCCCAGAGCAGTAGAATCCACAGAAGGCAGGCCAAAGG	mXXII	-	Maus	PCR
M629	rev	ATTCCCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA	mXXII	Stu I	Maus	recomb
M795	fw	GTCCCAGAGGGAATCCTTTGG	mXXII	-	Maus	Sonde
M796	fw	ATGGGCTGCCAGGTCGGACAGG	mXXII	-	Maus	Sonde
M797	rev	CTCCATGTACTCCTGGGAAGCC	mXXII	-	Maus	PCR
M798	rev	CCCGAGGTCTGGCATTCCAGG	mXXII	-	Maus	PCR
M965	fw	TTAGCTAGCCAACGTGCAGGTTGCAAAAGTGTGC	mXXII	NheI	Maus	klonier.
M966	rev	CAAGAATTCATTATCACAAAGCCGACGCCTCAGCTT	mXXII	EcoRI	Maus	klonier.
M973	rev	GATAGGAAAGCACTCCACTGAGCC	mXXII	-	Maus	klonier.
P38	fw	AGCCAGAGGTCCACCGGGCTTC	mXXII	-	Maus	PCR
P39	rev	GTAGGCAAGTTTAGCTTCTAGC	mXXII	-	Maus	PCR

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Manuel Koch für mein interessantes Thema - das ich ja als „erster Doktorand“ frei wählen konnte - und die Möglichkeit einen Teil meiner Arbeit an der Harvard Medical School durchführen zu können. Außerdem bedanke ich mich, für die kompetente Anleitung - auch wenn ich das „Koch'sche Multi Tasking“ gelegentlich etwas zu sehr verinnerlicht habe...Vielen Dank auch für den Besuch von Tagungen und natürlich das freundschaftliche Verhältnis zu Dir!

Ganz besonderer Dank natürlich auch an meinen Doktorvater, Prof. Mats Paulsson für die Unterstützung und Ratschläge wann immer es nötig war! Neben der fachlichen Kompetenz bedanke ich mich auch für die interessanten Gespräche „außerdienstlich“, und auch dafür etwas darüber gelernt zu haben, wie man wie man Menschen „führt“.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Krämer, für die Übernahme des Koreferats, die Möglichkeit einen Vortrag in seiner Arbeitsgruppe halten zu dürfen und für das Interesse an meiner Arbeit.

Auch Prof. Schmalz gilt mein Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ansonsten bedanke ich mich sehr bei „meiner“ Arbeitsgruppe und allen Anderen auch ganz besonders...es hat mir vier Jahre lang sehr viel Freude gemacht hier zu arbeiten!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kölnern (und v.a. Kölnerinnen), die sich hier - trotz meiner anfänglichen sprachlichen Defizite – um mich gekümmert haben und mir den Abschied aus „dem Wald“ in die große Stadt leichter gemacht haben. ☺

Erklärung

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

Köln, 9. März 2006

(Jörg Schulze)

Teilpublikation:

Koch M, **Schulze J**, Hansen U, Ashwodt T, Keene DR, Brunken WJ, Burgeson RE, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. „A novel marker of tissue junctions, collagen XXII” J Biol Chem. 2004 May 21;279(21):22514-21

Lebenslauf

JÖRG SCHULZE

MOLTKESTR. 31, 50674 KÖLN
 TEL. TAGSÜBER: 0221/ 478-6943
 TEL. ABENDS: 0177/ 3837170
 E-MAIL: JOERG.SCHULZE@UNI-KOELN.DE

PERSÖNLICHE DATEN

Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Geburtsdatum/ -ort: 12.2.1975 in Kaiserslautern

AUSBILDUNG

Seit 12/01- 11/05 Doktorarbeit
 Universitätsklinikum zu Köln, Institut für Biochemie II, Prof. Dr. Mats Paulsson, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Manuel Koch
 Thema: "Charakterisierung von Kollagen XXII – Ein neuer Marker an Gewebegrenzen"

12/01 - 6/02 Sechsmonatiger Forschungsaufenthalt an der Harvard Medical School/
 Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

10/01 Diplom, TU Kaiserslautern

9/01 - 10/01 Diplomarbeit
 Abteilung Genetik, TU Kaiserslautern, Prof. Dr. John A. Cullum
 Thema: „Identifikation und Knockout eines möglichen RecBCD homologen Systems in verschiedenen Streptomycesstämmen“

9/98 Vordiplom, TU Kaiserslautern

9/94 - 10/01 Biologiestudium, TU Kaiserslautern

9/85 - 6/94 Hohenstauffen-Gymnasium, Kaiserslautern, Abschluss Abitur

8/81 - 8/85 Grundschule, Kaiserslautern

Köln, 25.10.05

Jörg Schulze