

## Zusammenfassung

Die Integrität der Haut ist die Voraussetzung für ihre Funktion als Barriere zur Umwelt, Schutz vor mechanischer Belastung, Regulator des Wasserhaushaltes und der Körpertemperatur sowie für Immunabwehr und Reizaufnahme. Eine Gruppe von Proteinen welche diese Funktionen ermöglichen sind die Kollagene. Die fibrillären Kollagene in der Dermis bilden zusammen mit assoziierten Molekülen supramolekulare Strukturen, welche die mechanischen Eigenschaften der Haut vermitteln und als Bindungsstellen für zelluläre Komponenten dienen. In der Epidermis ist das Aufrechterhalten von Zell-Zell-Kontakten, Strukturen bei deren Aufbau neben zahlreichen anderen Molekülen auch transmembrane Kollagen beteiligt sind, eine Voraussetzung für den Erhalt der Barrierefunktion. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Identifikation sowie biochemische und funktionelle Charakterisierung unkonventioneller Kollagene in der Haut. In diesem Zusammenhang wurde für das transmembrane Kollagen XXIII, neben dem Expressionsmuster in Geweben, die neugefundene Interaktion zu  $\alpha_2\beta_1$  Integrin und der proteolytische Prozessierungsmechanismus analysiert. Ein neues Kollagen - Kollagen XXVIII - mit einem begrenzten Expressionsmuster in Haarfollikeln und peripheren Nerven wurde identifiziert. Darüber hinaus erfolgte die Identifikation eines neuen Interaktionspartner von Kollagen XII - einem Mitglied der klassischen FACIT Kollagene - und die Etablierung einer Kollagen XII defizienten Mauslinie.

Kollagen XXIII gehört zur Gruppe der Typ II orientierten transmembranen Kollagene. Diese Proteine kommen in zwei Formen, als Transmembranproteine und als proteolytisch freigesetzte lösliche Ektodomäne, vor. Kollagen XXIII ist in der Haut (Epidermis und Haarfollikel), Lunge, Darm, Gehirn und Niere exprimiert. Die Volllängenform von Kollagen XXIII überwiegt in der Haut, während die Ektodomäne die Hauptform im Gehirn darstellt. Dies weist auf eine gewebespezifische proteolytische Prozessierung von Kollagen XXIII hin. Mutationsanalyse zweier potentieller Furinschnittstellen in der nichtkollagene Domäne eins (NC1) zeigten, dass durch Mutation der zweiten Furinkonsensussequenz ein Großteil der Prozessierung verhindert wird. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Furin für die proteolytische Prozessierung von Kollagen XXIII verantwortlich ist. Die Plasmamembran Mikrodomänenumgebung ist ein Regulator der proteolytischen Prozessierung. Neu synthetisiertes Kollagen XXIII wird entweder als transmembranes Protein zur Zelloberfläche transportiert oder bereits im Golgi / Trans-Golgi-Netzwerk proteolytisch prozessiert und als lösliche Ektodomäne sekretiert. Auf der Zelloberfläche ist Kollagen XXIII relativ geschützt vor proteolytischer Prozessierung, da das Volllängenprotein innerhalb von „Lipid-Rafts“ und das prozessierende Enzym Furin außerhalb dieser Mikrodomänen lokalisiert ist. Eine Veränderung der „Lipid-Raft“-Dynamik oder eine artifizielle Reduktion des zellulären Cholesterolllevels führt zu einer Prozessierung auf der Zelloberfläche. Zelluläre Rezeptoren für Kollagene gehören zur Gruppe der  $\beta_1$ -Integrine. Bei der Suche nach möglichen Bindungspartnern wurde eine Interaktion mit  $\alpha_2\beta_1$  Integrin nachgewiesen, Interaktionen mit den anderen kollagenbindenden Integrinen hingegen ausgeschlossen.

Zellkulturexperimente mit HaCat Keratinozyten sowie mit primären Keratinozyten von wildtyp und  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin defizienten Mäusen zeigten, dass die Interaktion mit  $\alpha_2\beta_1$  Integrin für die Zellbindung ausreicht. Im Gegensatz dazu wird für die Zellausbreitung und Fokalkontaktbildung auf einem Kollagen XXIII Substrat eine zusätzliche Interaktion mit zelloberflächen Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) benötigt. Im Gewebe und in der Zellkultur ist das transmembrane Kollagen XXIII an Zell-Zell Kontakten konzentriert, was auf eine Rolle von Kollagen XXIII zusammen mit  $\alpha_2\beta_1$  Integrin bei der Zell-Zell Adhäsion von Keratinozyten hinweist.

Kollagen XXVIII ist ein neues, zur Klasse der von Willebrand Faktor A (VWA) Domänen enthaltenden Proteine gehörendes, Kollagen. In seiner Domänenstruktur ähnelt dieses Protein Kollagen VI, und wie auch andere unkonventionelle Kollagene besitzt es ein begrenztes Expressionsmuster in der Maus. Außer in den Haarfollikeln der Haut ist dieses Kollagen in den dorsalen Rückenmarksganglien und in peripheren Nerven exprimiert. In letzteren ist Kollagen XXVIII in den Basalmembranen um eine Untergruppe der Schwanzzellen lokalisiert.

Kollagen XII, ein Multidomänenprotein mit einem kleinen Kollagenabschnitt, interagiert mit fibrillären Kollagenen durch seine C-terminale Region. Bislang wurden aber keine Protein-Protein Interaktionen für die NC3 Domäne von Kollagen XII beschrieben. Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen fibrillenassoziierten Proteinen wurde die Bindung verschiedener Matrixproteine an Kollagen XII getestet. Tenascin-X, welches für eine Form von humanem Ehlers-Danlos Syndrom (EDS) verantwortlich ist, wurde als Interaktionspartner für die NC3 Domäne von Kollagen XII identifiziert. Mittels rekombinanter Proteinfragmente konnte die Interaktion auf die Thrombospondin N-terminale Domäne von Kollagen XII und das 29. Fibronektin Typ III Motiv von Tenascin-X eingegrenzt werden. Durch Kollagenlokalisationsuntersuchungen der beiden Proteine in immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde diese Interaktion bestätigt. Tenascin-X Defizienz in Mäusen führt zu einem Hyperelastizitätsphänotyp der Haut, welcher durch Mutationen im *tenascin-X* Gen ausgelöstem EDS im Menschen ähnelt. In der Haut und im Muskel Tenascin-X defizienter Mäuse ist deutlich weniger Kollagen XII präsent. Um die Funktion von Kollagen XII *in vivo* und den möglichen Einfluss einer Abwesenheit von Kollagen XII auf den EDS-ähnlichen Phänotyp zu untersuchen, wurde eine Kollagen XII defiziente Mauslinie etabliert. Erste Untersuchungen der Mäuse zeigen, dass ein Teil der Tiere nach der Geburt nicht überlebt, und die überlebenden Tiere eine Kyphose sowie in einigen Fällen eine Parese der Hinterbeine entwickeln.

## Abstract

The integrity of the skin is crucial for the maintenance of its functions as barrier to the environment, protection against mechanical stress, regulator of the body's water balance and temperature as well as for host defence against pathogens and the somatosensory system. One group of molecules, which provide the skin with the capability to exert those functions, are the collagens. The fibrillar collagens in the dermis together with associated molecules form supramolecular structures, which provide the mechanical properties of the skin and serve as adhesion sites for the cellular components. In the epidermis the existence of impermeable cell-cell contacts, structures in which transmembrane collagens and numerous other molecules are involved, are crucial for the establishment of the barrier function. The present work focuses on the identification, as well as on the biochemical and functional characterization, of unconventional collagens in the skin. In this context a newly detected interaction with  $\alpha_2\beta_1$  integrin and the proteolytic processing mechanism of collagen XXIII, a molecule belonging to the group of transmembrane collagens, were analyzed. A novel collagen - collagen XXVIII - with a restricted expression pattern in hair follicles and peripheral nerves was identified. Furthermore a new interaction partner of collagen XII - a member of the FACIT collagen family - was discovered and a transgenic mouse model lacking collagen XII was established.

Collagen XXIII belongs to the class of type II orientated transmembrane collagens. A common feature of these proteins is the presence of two forms: a membrane bound and a shed form. Analysis of the spatial distribution of collagen XXIII in mouse revealed restricted expression in skin (epidermis and hair follicles), lung, gut, brain and kidney. Collagen XXIII occurs predominantly in skin as full-length protein, while the shed form is detected in brain, indicating that shedding is regulated in a tissue-specific fashion. Mutations introduced into the two putative furin cleavage sites in the NC1 domain of the molecule indicated that altering the second cleavage site inactivated most of the shedding. This supports the idea that furin, a major physiological protease, is responsible for shedding. The microenvironment in the plasma membrane is a further important regulator of the shedding process, as most collagen XXIII is present in lipid rafts, and the disruption of lipid rafts by partial removal of cholesterol clearly enhanced shedding. Moreover, newly synthesized collagen XXIII is either already cleaved inside the Golgi / trans-Golgi network or it reaches the cell surface and is then protected from processing due to the localization inside lipid rafts. Cellular receptors for collagens belong to the family of  $\beta_1$  integrins. In a biochemical screen for collagen XXIII interaction partners binding to  $\alpha_2\beta_1$  integrin was detected, whereas binding to the integrins  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ , and  $\alpha_{11}\beta_1$  was ruled out. Cell culture binding assays using immortalized cell lines as well as primary keratinocytes of wildtype and integrin  $\alpha_2$ -deficient mice demonstrated that  $\alpha_2\beta_1$  integrin is sufficient for the attachment. In contrast, cell spreading and focal contact formation on collagen XXIII substrate requires additional interaction with cell-surface heparan sulphate proteoglycans (HSPGs). In tissue and cell culture, plasma membrane-localized collagen XXIII is concentrated at sites of cell-cell contacts suggesting that

collagen XXIII is a component of cell-cell attachment complexes and together with  $\alpha_2\beta_1$  integrin mediates cell-cell interactions of keratinocytes.

Collagen XXVIII is a novel collagen belonging to the class of von Willebrand factor A (VWA) domain-containing proteins. In its domain structure this novel protein resembles the beaded filament-forming collagens and, as shown for other unconventional collagens, it exhibits a very restricted expression pattern in mouse. In addition to small amounts in skin the major sites of expression are dorsal root ganglia and peripheral nerves where it is integrated into a subset of the Schwann cell surrounding basement membranes. Even though the protein is present in the adult sciatic nerve, collagen XXVIII mRNA was only detected in sciatic nerve of newborn mice, indicating that the protein persists for an extended period after synthesis.

Collagen XII, a multi-domain protein with a small collagenous region, interacts with fibrillar collagens through its C-terminal region. However, no interactions to other extracellular proteins have been identified involving the non-collagenous N-terminal domain (NC3 domain). To further elucidate the components of protein complexes present close to interstitial fibrils, different extracellular matrix proteins were tested for interaction. Binding to the NC3 domain of collagen XII was found for tenascin-X that in humans is linked to Ehlers-Danlos disease (EDS). The binding was supported by immunohistochemical as well as ultrastructural co-localization in chick and mouse tissues. Using recombinant collagen XII and tenascin-X fragments the interacting domains could be localized to the thrombospondin N-terminal domain of collagen XII and the 29<sup>th</sup> fibronectin type III motif of tenascin-X. Mice lacking tenascin-X exhibit a hyperelasticity phenotype of the skin mimicking tenascin-X deficiency in humans. In skin and muscle of tenascin-X deficient mice a remarkably reduced expression of collagen XII was observed. Therefore, to study the function of collagen XII *in vivo* and to elucidate the possible contribution of collagen XII deficiency to an EDS like phenotype, a collagen XII deficient mouse line was established. Preliminary analysis of collagen XII deficient animals indicated that a part of those mice do not survive after birth, while the surviving animals acquire a kyphosis and in some cases paresis of their hind legs.