

**STRUKTUR,
PROZESSIERUNG
UND
GEWEBEVERTEILUNG
VON
MATRILIN-3 UND MATRILIN-4**

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

**vorgelegt von
Dipl. Chem.
Andreas Ralf Rainer Klatt
aus Bergisch-Gladbach**

Mai 2001

Für meine Eltern!

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract.....	1
Zusammenfassung.....	3
A Einleitung.....	5
A 1 Extrazelluläre Matrix	5
A 1.1 Glykosaminoglykane und Proteoglykane	5
A 1.2 Kollagene	7
A 1.3 Nicht-Kollagene Proteine	8
A 1.4 Regulation der Genexpression durch die extrazelluläre Matrix	8
A 1.5 Zelloberflächen-Rezeptoren	9
A 2 Matrilin	10
A 2.1 vWFA-ähnliche Domäne	11
A 2.2 EGF-ähnliche Domäne	12
A 2.3 Coiled-Coil Domäne	12
A 2.4 Evolution der Matrilin	13
A 2.5 Matrilin-1	14
A 2.6 Matrilin-2	16
A 2.7 Matrilin-3	17
A 2.8 Matrilin-4	18
A 3 Aufgabenstellung	19
B Ergebnisse.....	20
B 1 Klonierungsstrategie und rekombinante Expression	20
B 2 Reinigung der rekombinanten Matrilin-4 Proteine	21
B 2.1 Reinigung von His ₆ -Myc-Matrilin-4 (HM4)	21
B 2.2 Reinigung von Matrilin-4 StrepII (M4S)	22
B 3 Herstellung polyklonaler Matrilin-Antikörper	23
B 3.1 Matrilin-4 Antikörper	23
B 3.2 Matrilin-3 Antikörper	24
B 3.3 Matrilin-1	25
B 3.4 Matrilin-2	26

B 3.5	Kreuzreaktivitäten der Matrilin-Antikörper	26
B 4	Proteolytische Prozessierung der Matriline	27
B 4.1	Proteolytische Prozessierung von Matrilin-4	28
B 4.2	Proteolytische Prozessierung von Matrilin-3	32
B 5	Untersuchung der Matriline aus Gewebe	35
B 5.1	Matrilin-4	36
B 5.2	Matrilin-3	37
B 5.3	Matrilin-1 und -3	38
B 5.4	Matrilin-1 bis -4	40
B 6	Gewebeverteilung der Mitglieder der Matrilin-Familie	42
B 6.1	Gewebeverteilung von Matrilin-3	42
B 6.2	Gewebeverteilung von Matrilin-4	46
B 6.3	Expression der Matriline während der Embryonalentwicklung	54
B 6.4	Skeletale Expression der Matrilin-Familie	58
B 6.5	Expression der Matriline im Gelenk	63
B 6.6	Expression der Matriline in humanen, gesundem und arthrotischem Gelenkknorpel	65
B 7	Supramolekulare Assemblierung der Matriline	67
B 7.1	Supramolekulare Assemblierung von Matrilin-1 und -3	67
B 7.2	Supramolekulare Assemblierung von Matrilin-2 und -4	70
B 8	Kolokalisationsstudien von Matrilin-1 und -3 im extrazellulären Netzwerk von RCS-Zellen	71
B 8.1	Kolokalisationsstudien von Matrilin-1 und Matrilin-3	71
B 8.2	Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit anderen Bestandteilen der ECM	73
B 8.2.1	Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronektin und COMP	73
B 8.2.2	Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit Aggrekan, Biglykan und Decorin	75
B 8.3	Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen, extrazellulären Netzwerk von RCS-Zellen	76

B 8.3.1	Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen Netzwerk von RCS-Zellen von Matrilin-3 mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronektin und Matrilin-1	76
B 8.3.2	Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen Netzwerk von RCS-Zellen von Matrilin-3 mit Aggrekan und Biglykan	78
C	Diskussion.....	79
C 1	Rekombinante Expression, Reinigung und Antikörpergeneration	79
C 2	Proteolytische Prozessierung der Matriline	79
C 3	Struktur der Matriline im Gewebe	81
C 4	Gewebeverteilung der Matriline	84
C 5	Supramolekulare Assemblierung der Matriline	86
C 6	Physiologische Bedeutung der Matriline	88
D	Methoden.....	90
D 1	Molekularbiologische Arbeiten	90
D 1.1	Klonierungsstrategie der Matrilin-4 cDNA-Konstrukte	90
D 1.2	RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)	91
D 1.3	PCR (Polymerasekettenreaktion)	91
D 1.4	Reinigung der PCR-Produkte	92
D 1.5	Restriktionsverdau	92
D 1.6	Ligation	93
D 1.7	DNA-Sequenzierung	93
D 1.8	Agarose-Gelelektrophorese	94
D 1.9	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	94
D 1.10	Transformation	95
D 1.11	Minipräparation	95
D 1.12	Midipräparation	95
D 1.13	Ethanol-fällung	95
D 2	Zellkulturarbeiten	96
D 2.1	Transfektion von 293-EBNA-Zellen	96
D 2.2	Kultivierung von 293-EBNA-Zellen	97
D 2.3	Kultivierung von RCS-Zellen und Mausfibroblasten	99
D 3	Proteinchemische Arbeiten	99
D 3.1	Protein-Präzipitationen	99
D 3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	100

D 3.3	Immunoblot (Western Blot)	102
D 3.4	Protein-Sequenzierung (Edman-Abbau)	104
D 3.5	Chromatographische Verfahren	104
D 3.5.1	Ni-NTA (Nitrilo-Triacetat)-Säule	105
D 3.5.2	Streptactin-Säule	105
D 3.6	Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper	106
D 3.7	Sequentielle Gewebeextraktion	106
D 4	Massenspektrometrie	107
D 4.1	MALDI-TOF	107
D 4.2	ESI Q-TOF	107
D 4.3	Trypsinverdau	108
D 5	Immunhistologische Arbeiten	108
D 5.1	Fixierung des Gewebes	108
D 5.2	Entmineralisierung	108
D 5.3	Paraffineinbettung (Infiltration)	109
D 5.4	Entparaffinierung	109
D 5.5	Immunhistologische Nachweismethoden	109
D 6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Zellen	110
Anhang.....		112
Verzeichnis der Abkürzungen.....		113
Literaturverzeichnis.....		115
Erklärung.....		120
Danksagung.....		121
Lebenslauf.....		122

ABSTRACT

The matrilins are a novel family of modular, extracellular matrix proteins. All matrilins consist of one or two vWFA-like domains, one, four or ten EGF-like domains and possess a C-terminal coiled-coil domain, that mediates the oligomerisation of the subunits. The matrilins are believed to connect different molecules of the extracellular matrix and thus play an adapter-like function. Four matrilins are known, out of which matrilin-1, also known as CMP (cartilage matrix protein), and matrilin-2, have been characterised with regard to structure and tissue distribution. In this work, the structures and tissue distributions of matrilin-3 and -4 were investigated and compared with those of matrilin-1 and -2.

For antibody generation, N- and C-terminally tagged matrilin-4 was recombinantly expressed in 293-EBNA cells. After purification by affinity chromatography, the N-terminally tagged matrilin-4 was used for immunisation. The resulting antiserum was affinity-purified with the C-terminally tagged matrilin-4.

In SDS-PAGE, different oligomeric forms of recombinant matrilin-4 were detected. Immunoblots with an antibody against the N-terminal tag gave first indications for a C-terminal processing. The proteolytic cleavage could be confirmed with MALDI-TOF and ESI Q-TOF mass spectrometry. By Edman sequencing a cleavage site between the second vWFA-like domain and the coiled-coil domain could be identified. The proteolytic cleavage occurs after two glutamic acid residues that are conserved in all four matrilins and it is likely that a similar processing occurs also in the other family members. Preliminary studies showed a C-terminal processing also of recombinant matrilin-3. Comparison of tissue extracts and recombinant matrilin-3 and -4 in immunoblots gave evidence that the cleavage also occurs in vivo. Comparison of normal and arthrotic articular cartilage showed a more pronounced proteolytic cleavage of matrilin-3 in the arthrotic tissue. Matrilin-2, that exhibits the strongest degradation, possesses two additional consecutive glutamic acid residues, which may represent a second cleavage site.

Additional fragments, in addition to those identified with mass spectrometry and Edman sequencing, could be demonstrated in immunoblots and are produced by a so far unknown form of proteolytic processing.

The tissue distributions of matrilin-3 and -4 were investigated by immunohistochemistry. Matrilin-3 could be detected exclusively in hyaline cartilage, perichondrium, and bone. Matrilin-4 was found in different forms of connective tissue, e.g. perichondrium, periosteum, cartilage, bone, tendon, ligaments, and dermis. In addition, matrilin-4 could be detected in muscle, nerve, and epithelial tissues. The expression of matrilin-3 resembles that of matrilin-1, whereas matrilin-4 shows a broader tissue distribution, similar to that of matrilin-2. In contrast to matrilin-2, matrilin-4 is strongly expressed in cartilage.

During mouse embryogenesis, matrilin-2 and -4 could be detected at day 7 p.c., while matrilin-1 and -3 were detected at day 10 p.c. At this time, all matrilins are expressed in the cranial mesenchyme, in the heart, and in the somites. At day 14 p.c. all matrilins are present in the anlagen of the cranial bones and in the axial skeleton.

Although matrilin-1 and -3 can form homo- and hetero-oligomers, by double-immunofluorescence microscopy areas could be detected where only matrilin-3 but not matrilin-1 was present. In costal cartilage of newborn mice, matrilin-1 and -3 could be detected with the same intensities, whereas in costal cartilage of six week old mice matrilin-3 was less abundant than matrilin-1. Apparently, the temporal and spatial expression of the matrilins is strictly regulated.

The supramolecular structure of matrilin-3 and -4 was investigated with immunofluorescence microscopy in cultures of rat chondrosarcoma (RCS) cells and primary embryonic fibroblasts. Both matrilins are present in a collagen II-dependent, extracellular, fibrillar network. Additionally, matrilin-3 participates in a collagen II-independent network.

With double-immunofluorescence microscopy a complete co-localisation of matrilin-1 and -3 was shown in the extracellular network of the RCS cells. Investigations of the cell culture supernatant of the RCS cells in immunoblots showed homo-oligomers of matrilin-1 and -3 as major components.

Double-immunofluorescence microscopy with antibodies against collagen II and VI, the proteoglycans aggrecan, biglycan and decorin, as well as fibronectin and COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mostly showed a co-localisation with matrilin-3 in the extracellular, fibrillar network.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Matriline bilden eine Familie von extrazellulären Proteinen mit modulärem Aufbau. Alle Matriline besitzen ein oder zwei vWFA (von Willebrand Faktor A)-ähnliche Domänen, eine, vier oder zehn EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domänen und eine C-terminale Coiled-Coil Domäne, die die Oligomerisierung einzelner Untereinheiten ermöglicht. Es wird angenommen, dass Matriline unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix miteinander verbinden, also eine Adapterfunktion übernehmen. Es sind vier Matriline bekannt, von denen Matrilin-1, früher auch als CMP (cartilage matrix protein) bezeichnet, und Matrilin-2 bezüglich Struktur und Gewebeverteilung bereits charakterisiert worden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Struktur und die Gewebeverteilung von Matrilin-3 und Matrilin-4 umfassend untersucht und mit der von Matrilin-1 und -2 verglichen.

Zur Generation spezifischer Antikörper wurden N- und C-terminal markiertes Matrilin-4 rekombinant in EBNA 293-Zellen exprimiert. Nach Reinigung der markierten Matrilin-4 Proteine über entsprechende Affinitätsäulen, wurde N-terminal markiertes Matrilin-4 zur Immunisierung verwendet und das daraus hervorgegangene Antiserum mit C-terminal markiertem Matrilin-4 affinitätsgereinigt.

In der SDS-PAGE konnten unterschiedliche multimere Formen von rekombinantem Matrilin-4 nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels Immunoblot mit einem Antikörper gegen die N-terminale Markierung gaben erste Hinweise auf eine C-terminale proteolytische Prozessierung von Matrilin-4. Massenspektrometrische Untersuchungen mittels MALDI-TOF und ESI Q-TOF bestätigten den Verdacht der proteolytischen Prozessierung. Mittels Edman-Sequenzierung konnte eine Schnittstelle zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne identifiziert werden. Die proteolytische Prozessierung findet direkt hinter zwei Glutaminsäureresten statt, die in allen vier Matrilinen konserviert sind, und legte die Vermutung nahe, dass diese Prozessierung auch in den anderen Familien-Mitgliedern vorkommt. Erste massenspektrometrische Untersuchungen an rekombinantem Matrilin-3 zeigten auch eine C-terminale Prozessierung von Matrilin-3. Im Immunoblot zeigte der Vergleich von Gewebeextrakten und rekombinanten Matrilin-3 und -4, dass die proteolytische Prozessierung auch in vivo vorkommt. Ein Vergleich der Gewebeextrakte von gesundem und arthrotischem artikulären Knorpel zeigte eine stärkere Prozessierung von Matrilin-3 im arthrotische Gewebe. Auch Matrilin-1 und -2 zeigten im Immunoblot von Gewebeextrakten Banden unterschiedlicher Höhe und eine proteolytische Prozessierung erscheint daher auch für Matrilin-1 und -2 als wahrscheinlich. Matrilin-2, welches die stärkste Fragmentierung aufweist, besitzt in dem zusätzlichen Bereich vor der Coiled-Coil

Domäne noch zwei weitere aufeinanderfolgende Glutaminsäurereste, welche eventuell eine zweite Spaltstelle darstellen.

Neben den mittels Massenspektrometrie und Edman-Sequenzierung identifizierten proteolytischen Fragmenten konnten im Immunoblot weitere Fragmente dargestellt werden, die eventuell durch eine zusätzliche, zur Zeit unbekannte, proteolytische Prozessierung entstanden sein könnten.

Die Gewebeverteilung von Matrilin-3 und -4 wurde immunhistologisch untersucht. Matrilin-3 wurde ausschließlich im hyalinen Knorpel, im Perichondrium und im Knochen detektiert. Matrilin-4 wurde in verschiedenen Bindegeweben, wie Perichondrium, Periost, Knorpel, Knochen, Bändern, Sehnen und Dermis nachgewiesen. Neben einer Expression im Bindegewebe konnte Matrilin-4 auch in Muskel-, Nerven- und Epithelgewebe detektiert werden. Die Expression von Matrilin-3 ähnelt der Expression von Matrilin-1, während Matrilin-4 eine ähnlich breite Gewebeverteilung wie Matrilin-2 aufweist. Im Unterschied zu Matrilin-2 wird Matrilin-4 aber zusätzlich stark im Knorpel exprimiert.

Während der Embryonalentwicklung der Maus konnten Matrilin-2 und -4 am siebten Tag, Matrilin-1 und -3 am zehnten Tag nach Befruchtung detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Matriline im kranialen Mesenchym, im Herzen und in den Somiten exprimiert. Am Tag 14 der Embryonalentwicklung konnten alle Matriline in den Anlagen der Schädelknochen und im axialen Skelett detektiert werden.

Obwohl Matrilin-1 und -3 im Gewebe Homo- und Hetero-Oligomere bilden, konnten mittels Doppelimmunfluoreszenz-Markierung Bereiche detektiert werden, in denen nur Matrilin-3, aber kein Matrilin-1 vorkam. Im Rippenknorpel von neugeborenen Mäusen konnten Matrilin-1 und -3 ähnlich stark nachgewiesen werden, während Matrilin-3 im Rippenknorpel von sechs Wochen alten Mäusen im Gegensatz zu Matrilin-1 kaum zu detektieren war. Offenbar unterliegt die räumliche und zeitliche Expression der Matriline einer strengen Kontrolle.

Die supramolekulare Struktur von Matrilin-3 und -4 wurde in Ratten-Chondrosarkomzellen (RCS) bzw. in primären, embryonalen Mausfibroblasten mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Beide Matriline partizipieren an einem Kollagen II-haltigen, extrazellulären, fibrillären Netzwerk. Zusätzlich konnte für Matrilin-3 auch eine Teilnahme an einem Kollagen II-unabhängigen Netzwerk gezeigt werden. In Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen konnte eine vollständige Kolokalisation von Matrilin-1 und -3 im extrazellulären Netzwerk der RCS-Zellen gezeigt werden. Untersuchungen des Überstandes der RCS-Zellen im Immunoblot zeigten eine Hauptpopulation an Homo-Oligomeren von Matrilin-1 und -3.

Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit Kollagen II und VI, den Proteoglykanen Aggrekan, Biglykan und Decorin, sowie Fibronectin und COMP (cartilage oligomeric matrix protein) zeigten größtenteils eine Kolokalisation mit Matrilin-3 im extrazellulären, fibrillären Netzwerk.

A EINLEITUNG

A 1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer Vielzahl an Molekülen, durch deren Variation sie den unterschiedlichen Ansprüchen des Bindegewebes gerecht wird. Primär besitzt die extrazelluläre Matrix mechanische Funktionen und bildet ein Grundgerüst zur Anheftung der Zellen. Obwohl die Makromoleküle der extrazellulären Matrix Informationen zur Assemblierung und zum Aufbau des extrazellulären Netzwerks besitzen, nehmen auch Bindegewebszellen durch Wechselwirkung von Zelloberflächenrezeptoren mit Komponenten der extrazellulären Matrix einen Einfluss auf die Morphologie. Umgekehrt bietet die Interaktion mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren die Möglichkeit einen Einfluss auf die Genexpression der Bindegewebszellen zu nehmen. Die extrazelluläre Matrix besitzt die Fähigkeit Prozesse wie zelluläre Proliferation und Differenzierung aktiv zu steuern (Adams und Watt, 1993; Hay, 1993; Lin und Bissell, 1993).

A 1.1 Glykosaminoglykane (GAGs) und Proteoglykane

Glykosaminoglykane (GAGs) sind unverzweigte Polysaccharidketten, bestehend aus repetitiven Disaccharid-Einheiten. Bei den Disaccharid-Einheiten handelt es sich meistens um eine Uronsäure gebunden an einen sulfatierten Aminozucker, durch deren geladene Gruppen die GAG-Ketten eine stark negative Ladung erhalten. Die negative Ladung ermöglicht es, große Mengen an Wasser zu binden und sie gibt dem Bindegewebe dadurch seine viskoelastischen Eigenschaften.

Hyaluronsäure ist ein sehr großes Glykosaminoglykan, bestehend aus bis zu 25000 Disaccharideinheiten eines Typs und ist nicht an ein Protein gebunden. Weiterhin werden andere Glykosaminoglykane durch Exozytose freigesetzt, während Hyaluronsäure von einem Enzymkomplex in der Zellmembran synthetisiert wird. Hyaluronsäure scheint bei der Zellwanderung, sowie der Morphogenese, speziell während der Embryonalentwicklung, eine wichtige Rolle zu spielen.

Im Gegensatz zur Hyaluronsäure sind andere Glykosaminoglykane kovalent an ein Protein gebunden. Die Glykosaminoglykaneinheiten werden intrazellulär sukzessiv am Protein synthetisiert. Die Anzahl und die Länge der Glykosaminoglykanketten variiert sehr stark zwischen den Proteoglykanen. Während Decorin nur eine Glykosaminoglykankette besitzt, macht der Kohlenhydratanteil im Falle des Knorpel-Proteoglykans Aggrecan 95% des Gewichts aus (Abb. A 1).

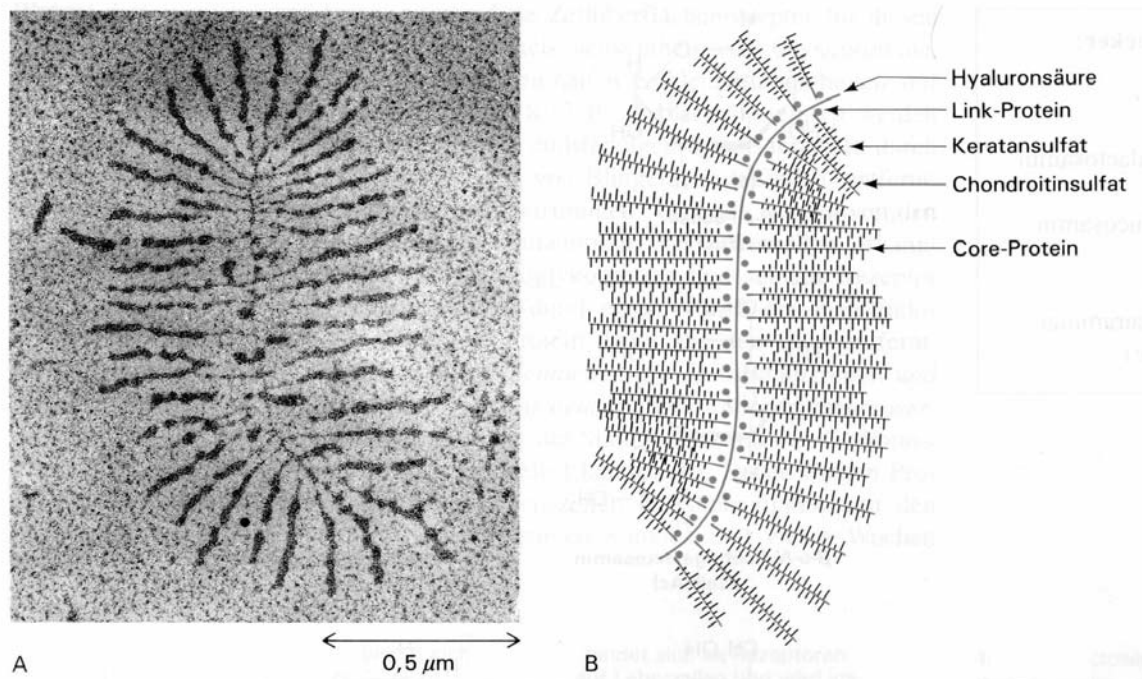


Abb. A 1 **Aggrekan** A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Proteoglykanaggregats. B) Schematische Darstellung (Übernommen aus L. Stryer, 1994).

Proteoglykane binden eine Vielzahl von Molekülen der extrazellulären Matrix und können dadurch deren lokale Konzentration und Wirkung beeinflussen. Weiterhin spielen sie eine Rolle bei der Signalübertragung, indem sie Signalmoleküle binden und damit deren Effekt modulieren. So hemmt die Bindung an Decorin die Aktivität des transformierenden Wachstumsfaktors- β (TGF- β).

Eine weitere wichtige Gruppe der Proteoglykane sind die Zellmembran-durchspannenden Heparansulfat-reichen Proteoglykane (HSPG), wie z.B. die Syndecane und Glypicane. In einigen Fällen agieren sie als Korezeptoren und binden z.B. den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und präsentieren ihn den entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren. Betaglykan, ein weiteres HSPG mit nur einer Heparansulfat-Kette, besitzt offenbar keine Signaltransduktionsfunktion, bindet aber den TGF- β und präsentiert ihn den TGF-Rezeptoren (Lopez-Casillas et al., 1994). Weiterhin gibt es eine HSPG-Variante des FGF-Rezeptors, der durch α FGF und den Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF) aktiviert wird (Fantl et al., 1993; Fernig und Gallagher, 1994). Die Fähigkeit der intrazellulären Signaltransduktion von HSPGs konnte erst vor wenigen Jahren gezeigt werden. Im Falle der cytoplasmatischen Domäne von Syndecan-4 konnte eine Wechselwirkung mit den intrazellulären Signalmolekülen Phosphatidyl-Inositol 4,5-Bisphosphat und der Proteinkinase Ca nachgewiesen werden (Oh et al., 1997a,b, 1998; Woods et al., 1998).

In einigen Fällen findet eine Wechselwirkung mit dem Proteinkern der Proteoglykane statt, wie z.B. im Falle von Decorin und TGF- β . Meist sind jedoch die GAG-Ketten, deren Zusammensetzung von der Zelle variiert werden kann, von entscheidender Bedeutung. Eine Selektivität bezüglich des Zuckers konnte für α FGF (Guimond et al., 1993), Interleukin-8

(Witt und Lander, 1994) und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Lyon et al., 1994) gezeigt werden.

A 1.2 Kollagene

Kollagene gehören zu den wichtigsten Strukturproteinen des Bindegewebes. Obwohl innerhalb der Kollagen-Familie eine große Strukturvielfalt besteht, besitzen alle Kollagene ein Grundmuster, bestehend aus drei linksgängigen α -Polypeptidketten, die in Form einer Tripelhelix umeinander gewunden sind. Derzeit sind 24 verschiedene Kollagene bekannt (M. Koch, persönliche Mitteilung). Am besten untersucht sind die fibrillären Kollagene, Kollagen I, II, III, V und IX, welche mit N- und C-terminalen globulären Domänen, den Propeptiden, sezerniert werden und sich nach proteolytischer Entfernung des Propeptids zu gestaffelten Fibrillen zusammenlagern. Eine weitere Gruppe sind FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices)-Kollagene, Kollagen XI, XII, XIV und XVI, welche eine kleine helikale Domäne besitzen, und nur in Kombination mit Kollagen I und II Fibrillen bilden können. Die aminoternale, globuläre Domäne ragt aus den Fibrillen heraus und verbindet eventuell Fibrillen untereinander oder vermittelt eine Wechselwirkung mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Olsen, 1989; Shaw und Olsen, 1991; van der Rest et al., 1991).

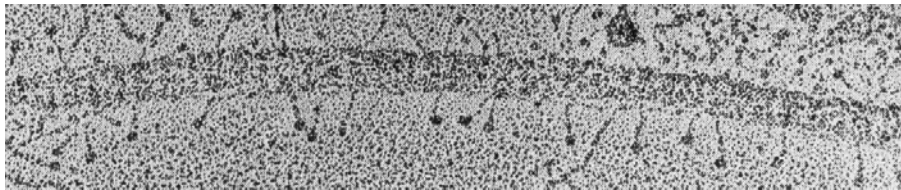


Abb. A 2 **Kollagen II-Fibrille assoziiert mit Kollagen IX-Molekülen.** Verändert übernommen aus Vaughan et al., 1988.

Eine weitere Gruppe der Kollagene bilden die nicht-fibrillären Kollagene (u.a. Kollagen IV und VI). Kollagen IV ist ein integraler Bestandteil der Basalmembran. In der Niere übernimmt die Basalmembran die Funktion eines Molekularsiebs. Kollagen VI bildet ein unabhängiges Netzwerk aus Mikrofilamenten, die offenbar mit Zellen und anderen Matrix-Molekülen interagieren (Chu et al., 1989; Saitta et al., 1990; Stokes et al., 1991). Es gibt einige Krankheiten, z.B. Osteogenesis imperfecta (OI), Ehlers-Danlos Syndrom (EDS) und spondyloepiphysäre Dysplasie (SED), welche durch Mutationen in den Genen der Kollagene ausgelöst werden. Meist handelt es sich um strukturelle Mutationen, durch die das betreffende Kollagen, bzw. dessen Untereinheit, nicht mehr fähig ist, den Anforderungen des Bindegewebes zu genügen.

Obwohl die Kollagene primär eine mechanische Funktion besitzen, haben sie offenbar einen Einfluss auf ihre eigene Biosynthese. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die abgetrennten, N-terminalen Propeptide der Kollagene. In-vitro konnte eine Inhibition der Kollagen-Synthese gezeigt werden, wenn die N-terminalen Propeptide von Kollagen I und III dem Medium zugesetzt wurden (Wiestner et al., 1979; Paglia et al., 1981). Dieser Effekt wirkte sich nur auf Fibroblasten und nicht auf Chondrozyten aus. Neueste Ergebnisse zeigten eine Rolle der Kollagene bei der Aktivierung der zellulären Signaltransduktion (s.u.).

A 1.3 Nicht-kollagene Proteine

Neben den Proteoglykanen und den Kollagenen kommen in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes noch viele weitere Glykoproteine vor. Viele extrazelluläre Proteine sind aus unabhängigen Domänen aufgebaut, die auch in anderen Proteinen vorkommen, jedoch nicht unbedingt die gleiche physiologische Funktion besitzen.

Offenbar haben sich viele dieser Proteine durch Duplikation, Mutation und Domänen-Austausch entwickelt. Die modular aufgebauteten Proteine haben sich, evolutionär betrachtet, erst vor kurzem entwickelt. Moduläre Proteine kommen ausschließlich in eukaryotischen Zellen und überwiegend extrazellulär vor. Deshalb wird vermutet, dass sich deren Gene parallel mit den Vielzellern entwickelt haben (Patthy, 1991). Fibronectin ist ein Prototyp für ein modular aufgebautes Protein. Es besitzt Domänen zur Bindung von Kollagen, Integrin und Heparin, eine Oligomerisierungsdomäne, sowie N- und C-terminale Domänen, die an Fibrin binden. Es kommt in vielen alternativen Spleißvarianten vor und spielt nachweislich bei Prozessen wie Zellwanderung, Differenzierung, Embryonalentwicklung, Wundheilung, Blutgerinnung und Metastasenbildung eine Rolle. Eine Fibronectin-defiziente Maus ist nicht lebensfähig. Dies beruht offenbar auf Abnormalitäten während der Zellproliferation, Differenzierung und Migration (George et al., 1993).

A 1.4 Regulation der Genexpression durch die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besitzt einen Einfluss auf die Genexpression. Wie Untersuchungen zeigten, besteht die Möglichkeit einer Rückkopplungs-Regulierung durch die extrazelluläre Matrix. Epithelzellen, die auf einer intakten Basalmembran wuchsen, exprimierten nur geringe Mengen der Komponenten der Basalmembran, wie z.B. Laminin, Fibronectin, Kollagen IV und Heparansulfat-reiche Proteoglykane, während Zellen, die auf Gewebekultur-Plastikschalen wuchsen, erhöhte mRNA- und Proteinspiegel aufwiesen, offenbar um extrazelluläre Matrix zu synthetisieren (Streuli und Bissel, 1991). Untersuchungen von Fibroblasten, die innerhalb eines Kollagen I-Gels wuchsen, zeigten die Unterdrückung der endogenen Kollagen I-Synthese (Eckes et al., 1993). Die Zugabe von proteolytischen Kollagen-Fragmenten induzierte die Expression der Kollagen-Gene (Katayama et al., 1993).

Neben einer positiven Regulation der Genexpression ist auch eine Unterdrückung der Expression bestimmter Genprodukte, z.B. extrazellulärer Proteasen, für den Erhalt der extrazellulären Matrix notwendig. Es gibt Hinweise, dass Zellen zwischen intakten und fragmentierten Bestandteilen der extrazellulären Matrix unterscheiden können und die Expression der Protease Stromelysin dementsprechend variieren (Werb et al., 1989; Tremble et al., 1994).

Die extrazelluläre Matrix besitzt einen Einfluss auf die Expression von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Transkriptionsfaktoren. Zellen, die ohne extrazelluläre Matrix kultiviert wurden, exprimierten andere Faktoren als Zellen, die in Gegenwart von extrazellulärer Matrix wuchsen. Untersuchungen zeigten, dass Osteoblasten, die zunehmend Fibronectin und Kollagen I synthetisierten, weniger TGF- β exprimierten (Owen et al., 1990). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine zerstörte extrazelluläre Matrix zu einer verstärkten Expression von TNF- α führte (Hershkovitz et al., 1993).

Die extrazelluläre Matrix ist für den Differenzierungszustand der Zelle und damit für die Expression von Bestandteilen der extrazellulären Matrix zuständig. Es konnten zwei Gene entdeckt werden, β -Casein in Epithelzellen (Emerman und Pitelka, 1977; Barcellos-Hoff et al., 1989) und Albumin in Hepatozyten (Bisell et al., 1990; Liu et al., 1991), deren Transkription in der Gegenwart von extrazellulärer Matrix stark erhöht ist. β -Casein und Albumin sind zwei von vielen Genen deren Transkription sich in Abhängigkeit des Differenzierungszustandes ändert. Dementsprechend braucht die Zelle kontinuierliche Signale um ihren Differenzierungszustand beizubehalten (Bissell, 1981; Blau, 1992).

A 1.5 Zelloberflächen-Rezeptoren

Die Regulation der Genexpression durch die extrazelluläre Matrix wird durch Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt, die spezifisch Proteine der extrazellulären Matrix binden und als Verbindungsglied zwischen extrazellulärer Matrix und Cytoplasma dienen. Eine wichtige Gruppe dieser Rezeptoren, neben den oben beschriebenen Zellmembran-Proteoglykanen, sind die Integrine, dimere, Membran-durchspannende Proteine, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit. Derzeit sind 17 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, deren Kombination zu spezifischen Rezeptoren führt (Humphries, 2000). Extrazellulär stehen die Integrine u.a. mit Lamininen, Kollagenen, Thrombospondinen, Tenascin und Fibronectin in Wechselwirkung. Intrazellulär werden einige Signaltransduktionswege durch Integrine ausgelöst (Clark und Brugge, 1995; Hynes, 1996; Howe et al., 1998).

Discoidin-Domänen-Rezeptoren (DDR), deren Bezeichnung aufgrund ihrer Homologie zu einem Protein aus *Dictyostelium discoideum* beruht, sind Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, welche durch Bindung von Kollagenen aktiviert werden. Die Aktivierung von DDR1 erfolgte durch eine Bindung von Kollagen I-VI, während DDR2 nur durch Kollagen I und III aktiviert wurde (Vogel et al., 1997). Die Aktivierung der DDRs folgt einer sehr langsamen Kinetik. Die

höchste Rezeptor-Aktivierung benötigt eine Zeitspanne von 18 Stunden (Vogel et al., 1997). Aktivierung des DDR2 führte zu einer verstärkten Expression der Matrix Metalloproteinase I (Vogel et al., 1997).

Dystroglycan, ein integraler Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein Komplexes (Ervasti et al., 1990), ist ein weiteres Verbindungsglied zwischen extrazellulärer Matrix und Cytosol. Dystroglycan besteht aus einer extrazellulären α - und einer Membran-durchspannenden β -Untereinheit. Obwohl beide Untereinheiten nicht kovalent miteinander verbunden sind, werden sie nur von einer mRNA kodiert (Evrasti et al., 1991). Der Mechanismus dieser Prozessierung ist noch nicht geklärt. Extrazellulär konnte eine Bindung an die G-Domäne der Laminin- α 1-Kette gezeigt werden (Andac et al., 1999). Perlecan, ein Heparansulfat-reiches Proteoglycan, das eine Laminin G-Domäne besitzt, bindet auch an Dystroglycan (Talts et al., 1999). Untersuchungen zeigten eine wichtige Rolle von Dystroglycan bei der Bildung der sub-endodermalen Basalmembran während der Embryonalentwicklung und es wird vermutet, dass Dystroglycan eine grundlegende Rolle bei der Bildung der Basalmembran spielt (Henry et al., 1998; Durbeej et al., 1995). Intrazellulär konnte eine Interaktion zwischen Dystroglykan und der SH3-Domäne des Signalmoleküls GRB2 ermittelt werden (Yang et al., 1995). Daher wird die Möglichkeit der Signaltransduktion durch Wechselwirkung extrazellulärer Moleküle mit Dystroglycan vermutet (Cavaldesi et al., 1999).

A 2 Matriline

Bei den Matrilinen handelt es sich um eine Familie von extrazellulären Proteinen, deren jüngste Mitglieder erst vor wenigen Jahren entdeckt wurden (Paulsson et al., 1979; Deak et al., 1997; Wagener et al., 1997; Wagener et al., 1998). Gegenwärtig sind vier Matriline in Maus und Mensch bekannt und aufgrund der fast vollständig ermittelten genomischen Sequenz der Menschen ist anzunehmen, dass keine weiteren Matriline existieren. Die Primärstruktur aller Matriline zeigt einen ähnlichen modulären Aufbau. Alle Matriline besitzen eine oder zwei vWFA (von Willebrand-Faktor A)-ähnliche Domänen, eine oder mehrere EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domänen und eine C-terminale Coiled-Coil Domäne.

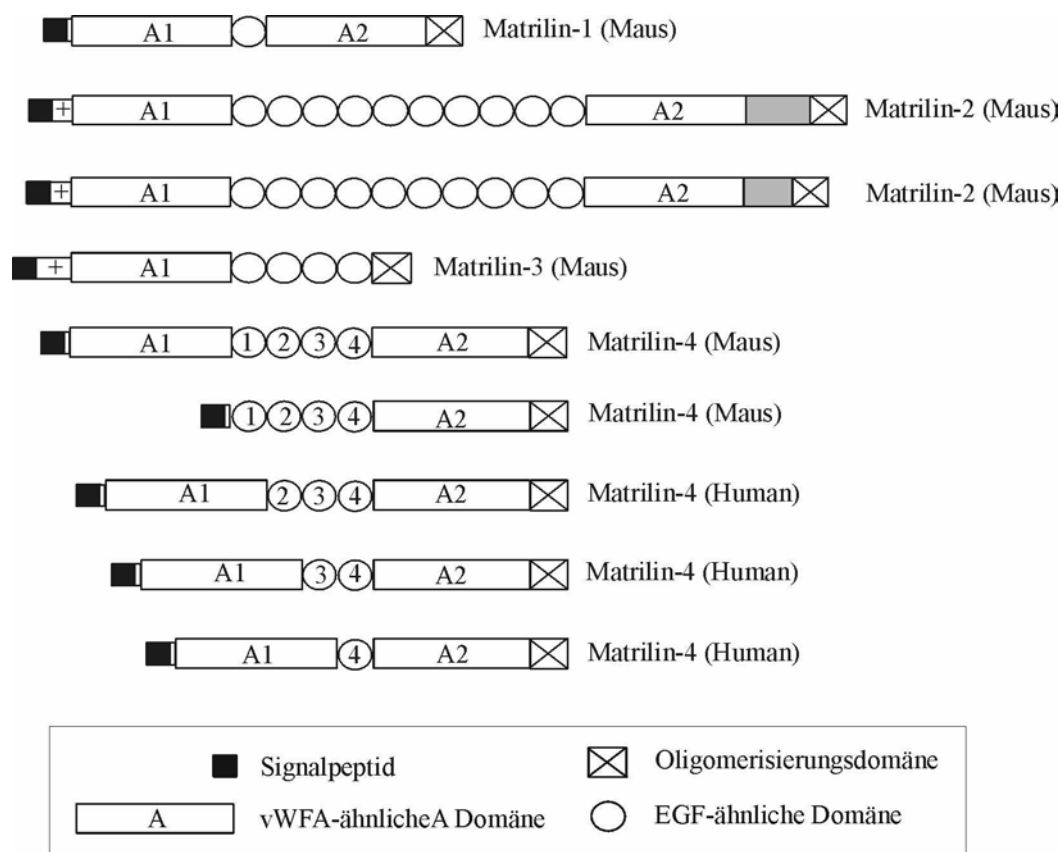


Abb. A.3 **Modulärer Aufbau der Matrilin.** Verändert übernommen aus Wagener et al., 1998.

A 2.1 vWFA (von Willebrand-Faktor A)-ähnliche Domäne

Der von Willebrand Faktor ist ein multimeres Glykoprotein, das aus ca. 80 Monomeren besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine von Willebrandt Faktor-Untereinheit besitzt drei A-Domänen, die bei unterschiedlichen physiologischen Funktionen eine Rolle spielen. Eine Bindung des vWF an das Glykoprotein GP Ib von Blutplättchen und an Heparin wird über die erste A-Domäne vermittelt (Cruz et al., 1993). Die zweite A-Domäne spielt offensichtlich bei der Regulation der Größe der Multimere eine Rolle und besitzt eine proteolytische Spaltstelle (Furlan et al., 1996). Die dritte A-Domäne vermittelt die Bindung an Kollagen I und III (Cruz et al., 1995). Röntgenstrukturanalysen der A3-Domäne weisen auf eine Wechselwirkung von negativen Aminosäureresten der A3-Domäne mit positiven Aminosäureresten des Kollagen-Moleküls hin (Sixma et al., 1997).

Eine vWFA-ähnliche Domäne umfasst ca. 200 Aminosäurereste und liegt meist in Form einer α/β Rossmann-Faltung vor, die aus mehreren zentralen, parallelen und anti-parallelen β -Faltblättern aufgebaut ist, welche von mehreren α -Helices umgeben sind. Untersuchungen von Lee et al. (1995) zeigten in der A-Domäne des Integrins CR3 ein MIDAS (metal ion dependent adhesion site)-Motiv, dessen Metallkoordination eine wichtige Rolle bei der Bindung von Proteinliganden spielt. Meistens liegen vWFA-ähnliche Domänen in mehreren

Kopien in intra- und extrazellulären Proteinen vor, wie z.B. in den Kollagenen VI, XII, XIV und XVI, im Faktor-B und -C2 des Komplementsystems und in Integrinen. Bei Prozessen wie z. B. der Morphogenese, der Zellwanderung und der Wundheilung wird die Adhäsion über die A-Domänen der daran teilnehmenden Proteine vermittelt (Lee et al., 1995). In einigen Proteinen besitzt die A-Domäne die Fähigkeit, Proteoglykane und Kollagen I bis VI zu binden (Colombatti et al., 1993).

Alle Matriline besitzen eine oder zwei vWFA-ähnliche Domänen und die für eine mögliche Metallkoordination notwendigen Aminosäurereste des MIDAS-Motivs.

A 2.2 EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein kleines extrazelluläres Polypeptid, welches durch Wechselwirkung mit geeigneten Zelloberflächenrezeptoren Prozesse wie die Mitose und Zellteilung stimulieren kann (Carpenter, 1990). Viele weitere Proteine der extrazellulären Matrix mit unterschiedlichen Funktionen besitzen Domänen aus ca. 45 Aminosäureresten, die dem EGF ähnlich sind. Untersuchungen der EGF-ähnlichen Domäne des humanen Gerinnungsfaktors IX zeigten eine Calciumbindungsstelle (Handford et al., 1991) deren Rolle noch unklar ist. Möglicherweise stabilisiert die Bindung von Calcium eine Konformation, welche für Proteinwechselwirkungen notwendig ist (Handford et al., 1991).

Alle Matriline der Maus besitzen eine, vier oder zehn EGF-ähnliche Domänen. Aufgrund einer Mutation in der Spleißakzeptorstelle des Introns, das hinter dem Exon liegt, welches die erste EGF-ähnliche Domäne kodiert, kommt humanes Matrilin-4 in drei verschiedenen Spleißvarianten vor, bei denen die erste, die ersten beiden, oder die ersten drei EGF-ähnlichen Domänen fehlen. Bei allen EGF-ähnlichen Domänen der Matriline fehlen die zur Ca^{2+} -Koordination wichtigen Aminosäurereste. Ob die EGF-ähnlichen Domänen weiterhin eine wachstums-stimulierende Wirkung haben oder z.B. für die räumliche Struktur des Proteins zuständig sind, ist derzeit nicht bekannt.

A 2.3 Coiled-Coil Domäne

Eine Coiled-Coil Domäne besteht aus zwei bis maximal fünf, zusammengelagerten α -Helices mit einer Ganghöhe von 3,6 Aminosäureresten. Jede der α -Helices besitzt eine repetitive Sequenz von sieben Aminosäureresten (abcdefg)_n, wobei die Reste „a“ und „d“ meist hydrophob, die Reste „e“ und „g“ meist hydrophil oder geladen sind (Abb. A 4). Bei Zusammenlagerung zweier oder mehrerer α -Helices kommen die Aminosäurereste der Positionen „a“ und „d“ in engen Kontakt und stabilisieren die Coiled-Coil Domäne durch hydrophobe Wechselwirkungen. Zusätzlich wird die Coiled-Coil Domäne durch intermolekulare, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten „e“ und „g“ stabilisiert. Diese Wechselwirkungen sind entscheidend für den Grad der

Oligomerisierung. Der Austausch eines Argininrestes gegen einen Glutaminrest in einem Coiled-Coil Peptid von Matrilin-1 führte zur Ausbildung einer tetrameren anstatt einer trimeren Coiled-Coil Domäne (Beck et al., 1997).

Coiled-Coil Domänen kommen in intra- und extrazellulären Proteinen vor und sind für die Oligomerisierung von Monomereinheiten zuständig. Bei der Bindung des Laminin E8-Fragmentes an Integrine ist die Coiled-Coil Domäne des Laminins essentiell für die Bindung, und es wurde ein Struktur-stabilisierender Einfluss der Coiled-Coil Domäne auf den Rest des Moleküls postuliert (Deutzmann et al., 1990).

Alle Matriline besitzen eine C-terminale Coiled-Coil Domäne, welche offenbar die Oligomerisierung der Untereinheiten zu Tri- und Tetrameren ermöglicht (s.u.).

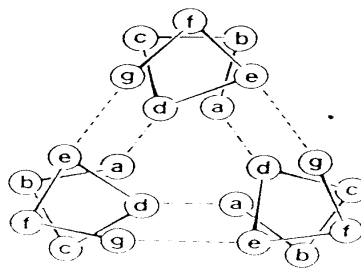


Abb. A 4 Schematische Darstellung einer dreisträngigen α -helikalen Coiled-Coil Domäne. Die Sequenzen lassen sich in ein „Heptad-Muster“ einordnen (abcdefg). Die Aminosäurereste in den Positionen „a“ und „d“ stabilisieren die Coiled-Coil Domäne durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Aminosäurereste in den Positionen „e“ und „g“ können interchenare, elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden (Übernommen aus Beck et al. (1996).

A 2.4 Evolution der Matriline

Der Vergleich der Matriline auf DNA- und Proteinebene gibt Anlass zur Vermutung, dass alle Matriline von einem Ur-Matrilin abstammen (Deak et al., 1999). Alle Matriline besitzen die Module in gleicher Reihenfolge und sind enger miteinander, als mit anderen Proteinen verwandt. Da die ersten vWFA-ähnlichen Domänen der Matriline sich ähnlicher sind, als die zweiten, kann davon ausgegangen werden, dass der Ur-Vorfahre der Matriline schon beide vWFA-ähnlichen Domänen besaß. Weiterhin scheinen die beiden vWFA-ähnlichen Domänen das Ergebnis einer Duplikation und nicht eines Domänen-Austauschs zu sein, da die Domänen der Matriline eine größere Ähnlichkeit miteinander als mit anderen A-Domänen aufweisen. Innerhalb der Matrilin-Familie besitzen die vWFA-ähnlichen Domänen von Matrilin-1 und -3 und von Matrilin-2 und -4 untereinander die größte Homologie. Das Fehlen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne im Falle von Matrilin-3 ist offenbar das Resultat einer Deletion nach der zweiten Duplikation des Ur-Gens.

Die Coiled-Coil Domäne der Matrilin zeigt eine sehr schwache Homologie. Nur Aminosäuren in den funktionellen Positionen sind weitestgehend konserviert. Da die Coiled-Coil Domänen von Matrilin-1 und -3 und Matrilin-2 und -4 sich untereinander am ähnlichsten sind, scheint es als wahrscheinlich, dass der Ur-Vorfahre der Matrilin schon eine Coiled-Coil Domäne besaß.

Die Homologie der EGF-ähnlichen Domänen von Matrilin-3 sowie einiger Domänen von Matrilin-2 weisen auf eine Duplikation nach Separation der vier Matrilin-Gene hin. Weiterhin gibt es keine Anzeichen für die gleichzeitige Duplikation von mehreren EGF-ähnlichen Domänen.

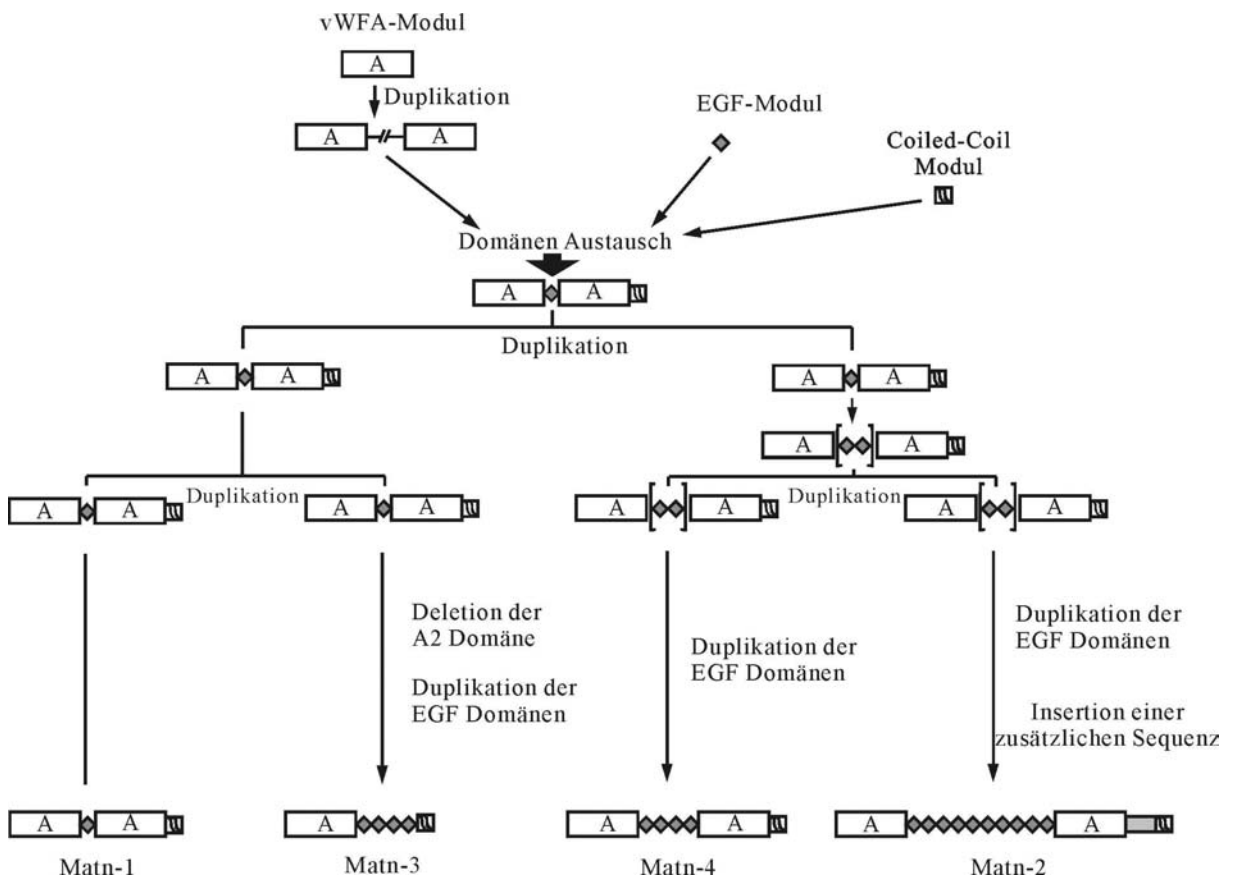


Abb. A 5 **Evolutionsmodell der Matrilin-Familie.** Verändert übernommen von Deak et al., 1999.

A 2.5 Matrilin-1

Matrilin-1 (theoretische Masse: 51,4 kDa), auch bekannt als CMP (cartilage matrix protein), wurde bei der Aufreinigung von Proteoglykanen aus Luftröhrenknorpel entdeckt und isoliert (Paulsson und Heinegard, 1979). Die Untereinheiten bestehen aus zwei vWFA-ähnlichen Domänen, die miteinander über eine EGF-ähnliche Domäne verbunden sind (Kiss et al., 1989). Am C-Terminus befindet sich eine Coiled-Coil Domäne, welche für die Oligomerisierung der Untereinheiten zuständig ist (Hauser und Paulsson, 1994). Vor der

Coiled-Coil Domäne befinden sich zwei Cysteinreste, welche einen intermolekularen Ring aus Disulfidbrücken bilden und die Untereinheiten kovalent miteinander verbinden. Jedoch bildet Matrilin-1 auch ohne die Cysteinreste thermodynamisch stabile Trimere (Beck et al., 1996; Pan und Beck, 1998). NMR-Untersuchungen der letzten 43 Aminosäurereste von Matrilin-1 zeigten, dass die α -Helix direkt hinter den beiden Disulfidbrücken beginnt (Wiltscheck et al., 1997). Nach Reduktion der Disulfidbrücken waren die ersten beiden Heptad-Wiederholungen flexibler als die restlichen.

Neben den Homooligomeren konnten auch Heterooligomere von Matrilin-1 und -3 in unterschiedlicher Stöchiometrie nachgewiesen werden (Wu und Eyre, 1998; Klatt et al., 2000).

Wie aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen hervor geht (Hauser und Paulsson, 1994), bildet Matrilin-1 drei identische, ellipsoide Untereinheiten aus (Abb. A 6). Messungen ergaben, dass die Untereinheiten kompakter sind, als es eine lineare Anordnung erwarten ließe. Als Erklärung wurde eine intramolekulare Wechselwirkung der beiden vWFA-ähnlichen Domänen angenommen.

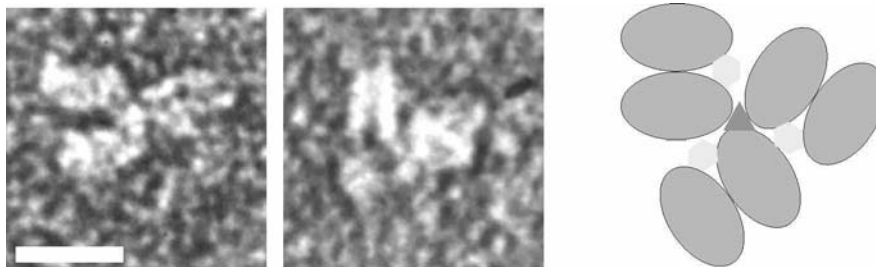


Abb. A 6 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Matrilin-1.** Übernommen aus Hauser und Paulsson, 1994. Das Dreieck repräsentiert die Coiled-Coil Domäne, die Kreise die EGF-ähnlichen Domänen und die Ellipsen die vWFA-ähnlichen Domänen. Modell freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Nitsche. Der Balken entspricht 10 nm.

Matrilin-1 wird in verschiedenen hyalinen Knorpelarten, wie der Trachealwand, Nasenknorpel, Ohren- und Epiphysen-Knorpel und Processus Xiphoideus exprimiert (Paulsson und Heinegard, 1982). Ausserhalb des Knorpels wurde Matrilin-1 im Auge (Aszodi et al., 1996; Tsonis und Goetinck, 1988), im Herzen, in Bändern und Sehnen und in der Dermis von Mausembryonen nachgewiesen (Segat et al., 2000). Die physiologische Bedeutung des Proteins ist noch weitgehend unbekannt. Die enge Assoziation mit Aggrekan führte zu weiteren Untersuchungen, in denen eine nicht-kovalente und eine kovalente Wechselwirkung mit Aggrekan nachgewiesen wurde (Hauser et al., 1996). Die kovalente Bindung von Matrilin-1, welche auch nach Reduktion bestehen bleibt, konnte mittels Elektronenmikroskopie distinkten Stellen im chondroitinsulfatreichen Teil des Aggrekans (Abb. A 2) zugeordnet werden. Der Anteil an kovalent-gebundenem Matrilin-1 nimmt im Alter zu. Weiterhin wurde Matrilin-1 im fibrillären Netzwerk von kultivierten Chondrozyten

nachgewiesen (Winterbottom et al., 1992; Chen et al., 1995b), und mittels Elektronenmikroskopie konnte eine Assoziation mit Kollagen II-Fibrillen gezeigt werden. Zusätzlich zeigten Untersuchungen in Festphasenimmunassays eine Bindung von denaturierend aufgereinigtem Matrilin-1 an Kollagen II (Winterbottom et al., 1992). Neben einer Teilnahme am Kollagen II-haltigen Netzwerk wurde Matrilin-1 auch in einem Kollagen II-unabhängigen Netzwerk nachgewiesen (Chen et al., 1995). Die Teilnahme an ausgedehnten Netzwerken, die Interaktion mit unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix sowie die potentielle Fähigkeit, aufgrund der Multivalenz, mit mehreren Molekülen gleichzeitig in Wechselwirkung zu treten, legt die Vermutung nahe, dass Matrilin-1 der Vernetzung der extrazelluläre Matrix dient und somit eine Art Adapterfunktion übernimmt (Hauser et al., 1996). Immunhistologische Untersuchungen einer Matrilin-1 defizienten Maus zeigten eine normale skeletale Entwicklung (Aszodi et al., 1999; Huang et al., 1999). Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben jedoch eine untypische Kollagen II-Fibrillogenese und Fibrillenorganisation (Huang et al., 1999).

A 2.6 Matrilin-2

Matrilin-2 (theoretische Masse: 104,3 kDa) wurde beim Durchmustern einer epiphysären cDNA-Bank mit einer Matrilin-1 Sonde entdeckt. Es besitzt am N-Terminus eine charakteristische, durch sechs Argininreste positiv geladene Aminosäure-Sequenz. Darauf folgend werden zwei vWFA-Domänen über zehn EGF-ähnliche Domänen miteinander verbunden. Im Anschluß daran besitzt Matrilin-2 eine spezifische, in den anderen Matrilinen nicht vorkommende Sequenz von 75 Aminosäureresten. Innerhalb dieser 75 Aminosäurereste befindet sich eine Sequenz von 19 Aminosäureresten, die in Maus und Mensch alternativ gespleißt werden. Der C-Terminus endet mit einer aus 38 Aminosäureresten bestehenden Coiled-Coil Domäne.

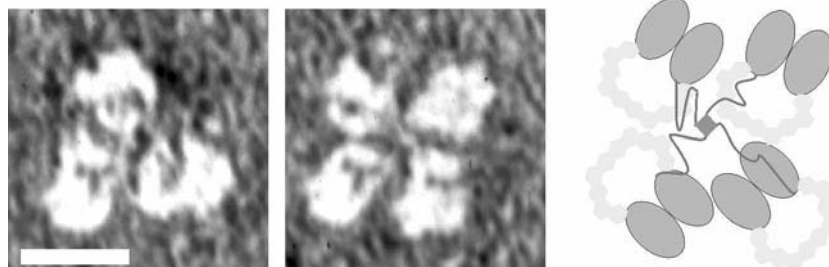


Abb. A 7 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Matrilin-2**. Zu erkennen ist trimeres (links) und tetrameres (rechts) Matrilin-2. Verändert übernommen aus Piecha et al., 1999. Das Dreieck repräsentiert die Coiled-Coil Domäne, die Kreise die EGF-ähnlichen Domänen und die Ellipsen die vWFA-ähnlichen Domänen. Die zusätzliche Sequenz in Matrilin-2 ist als dunkle Linie dargestellt. Modell freundlichst zur Verfügung gestellt von P. Nitsche. Der Balken entspricht 10 nm.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von rekombinantem Matrilin-2 zeigten Moleküle vom Monomer bis zum Tetramer (Piecha et al., 1999).

Alle Untereinheiten scheinen an einem Punkt verbunden zu sein, welcher wahrscheinlich die Coiled-Coil Domäne repräsentiert. Da die Untereinheiten häufig schleifenartige Strukturen ausbilden und ähnlich dem Matrilin-1 kleiner als erwartet vorkamen, wurde auch für Matrilin-2 eine Wechselwirkung zwischen den beiden vWFA-ähnlichen Domänen einer Untereinheit postuliert (Piecha et al., 1999).

Die Expression von Matrilin-2 erfolgt in allen Arten des Bindegewebes, wie z.B. dem Perichondrium, Periost, in Bändern und Sehnen, im proliferierenden und hypertrophen Knorpel und in der Dermis (Piecha et al., 1999). Weiterhin wurde es in verschiedenen Bindegeweben in und um einzelne Organe herum nachgewiesen, wie z.B. Herz oder Milz. Neben einer Expression im Bindegewebe konnte auch eine Transkription des Matrilin-2 Gens in Muskel- und Epithelzellen gezeigt werden (Piecha et al., 1999).

Die physiologische Funktion von Matrilin-2 ist derzeit unbekannt. Wechselwirkungsstudien in Festphasenassays zeigten eine Bindung an fibrilläre Kollagene, Laminin, Fibronectin und Fibrillin (Piecha, Dissertation 1999, Köln). Diese Interaktion wird offenbar durch die vWFA-ähnlichen Domänen vermittelt und steht in Konkurrenz mit der intramolekularen Interaktion der vWFA-ähnlichen Domänen. Auch Matrilin-2 konnte in einem extrazellulären, fibrillären Netzwerk nachgewiesen werden (Piecha et al., 1999).

A 2.7 Matrilin-3

In der EST (expressed sequence tag)-Datenbank wurde ein unvollständiger humaner Lungen-EST-Klon mit starker Homologie zu den vWFA-ähnlichen Domänen von Matrilin-1 und -2 gefunden. Daraufhin wurde eine murine Lungen cDNA-Bank mit dem humanen EST-Klon durchmustert. Ein Klon konnte isoliert werden, dessen Primärstruktur die Vermutung nahe legte, dass es sich um Matrilin-3, ein weiteres Mitglied der Matrilin-Familie, handelte (Wagener et al., 1997). Matrilin-3 (theoretische Masse: 48,9 kDa) besitzt N-terminal eine durch sieben Arginine positiv geladene Sequenz, gefolgt von einer vWFA-ähnlichen Domäne und vier EGF-ähnlichen Domänen. Im Gegensatz zu den anderen Matrilinen besitzt Matrilin-3 keine zweite vWFA-ähnliche Domäne. Auf die letzte EGF-ähnliche Domäne folgt direkt die Coiled-Coil Domäne. Sowohl im Matrilin-3 Gen der Maus (Wagener et al., 2000), als auch im humanen Matrilin-3 Gen ist keine Sequenz enthalten, die für eine zweite vWFA-ähnliche Domäne kodiert, sodass alternatives Spleißen als Grund für das Fehlen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne ausgeschlossen werden kann. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von rekombinantem Matrilin-3 zeigten Oligomere vom Monomer bis zum Tetramer, welche offensichtlich über die Coiled-Coil Domäne oligomerisieren (Klatt et al., 2000). Unterstützt wurde diese Aussage durch ein rekombinant hergestelltes Matrilin-3, dem die Coiled-Coil Domäne fehlt und welches nur als Monomer vorkommt (Diplomarbeit, Klatt 1997). Matrilin-

3 zeigte keine kompakte Struktur, wie sie für Matrilin-1 und -2 beschrieben wurde, da eine intramolekulare Wechselwirkung aufgrund der fehlenden zweiten vWFA-ähnlichen Domäne nicht stattfindet. Dieser Unterschied zwischen Matrilin-1 und -3 erlaubte es auch, die Untereinheiten aus Gewebe aufgereinigten Hetero-Trimeren und Hetero-Tetrameren anhand ihrer molekularen Ausdehnung zu unterscheiden (Klatt et al., 2000).

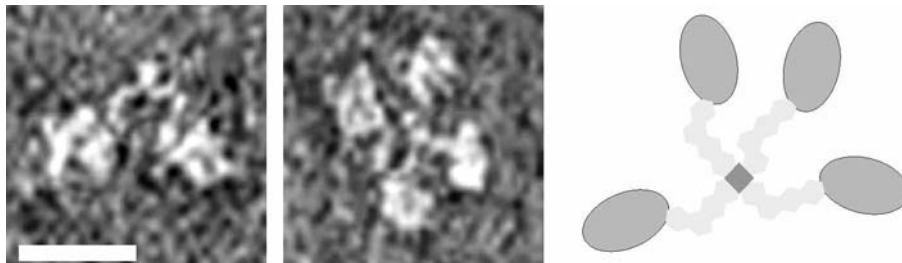


Abb. A 8 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Matrilin-3.** Zu erkennen ist dimeres (links) und tetrameres (rechts) Matrilin-3. Freundlichst zur Verfügung gestellt von P. Nitsche. Der Balken entspricht 10 nm.

Die Gewebeverteilung von Matrilin-3 wurde mittels Northern-Blot untersucht und es konnte eine Expression in Sternum, Femur und Trachea gezeigt werden (Wagener et al., 1998). Weitere Gewebe, wie z.B. Muskel, Herz, Niere und Hirn, waren negativ. Offensichtlich besitzt Matrilin-3 eine Knorpel-spezifische Gewebeverteilung, ähnlich wie Matrilin-1.

A 2.8 Matrilin-4

Die Suche in EST-Datenbanken nach Matrilin-Homologen lieferte mehrere Klone mit einer Sequenzidentität von ca. 50%, die nicht den anderen Matrilinen zugeordnet werden konnten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle gefundenen Klone das gleiche Protein kodierten. Aufgrund des für die Matriline charakteristischen modulären Aufbaus wurde davon ausgegangen, dass es sich um Matrilin-4, ein weiteres Mitglied der Matrilin-Familie, handelte (Wagener et al., 1998).

Matrilin-4 (theoretische Masse: 66,4 kDa) besitzt zwei vWFA-ähnliche Domänen, welche durch vier EGF-ähnliche Domänen miteinander verbunden sind. Entsprechend den anderen Matrilinen besitzt auch Matrilin-4 eine C-terminale Coiled-Coil Domäne. Eine Spleißvariante der die erste vWFA-ähnliche Domäne fehlt, wurde mittels RT-PCR in Lunge, Sternum, Hirn, Niere und Herz von sieben Wochen alten Mäusen gefunden (Wagener et al., 1998).

Northern-Blot Untersuchungen zeigten eine breite Gewebeverteilung ähnlich der von Matrilin-2. Es konnte eine starke Expression in Lunge, Hirn und Sternum, sowie schwache Signale in Niere und Herz nachgewiesen werden (Wagener et al., 1998).

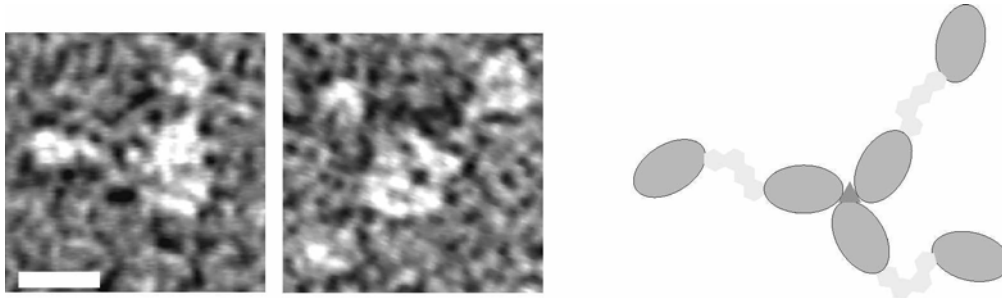


Abb. A 9 **Elektronenmikroskopische Aufnahme von Matrilin-4**. Zu erkennen ist dimeres (links) und trimeres (rechts) Matrilin-4. Freundlichst zur Verfügung gestellt von P. Nitsche. Der Balken entspricht 10 nm.

A 3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war eine umfangreiche Charakterisierung von Matrilin-3 und Matrilin-4 bezüglich der Struktur und Gewebeverteilung. Die erhaltenen Ergebnisse sollten mit den bereits bekannten Daten von Matrilin-1 und -2 verglichen und fehlende Daten ergänzt werden.

Die zur Generierung der Antikörper benötigten Antigene sollten rekombinant hergestellt werden, um eine aufwendige Aufreinigung aus Gewebe zu umgehen. Zur rekombinanten Expression sollten eukaryotische EBNA 293-Zellen verwendet werden, um postranslationale Modifikationen zu gewährleisten. Zur schnellen und effektiven Reinigung aus dem Zellüberstand der EBNA 293-Zellen sollten N- und C-terminal markierte, rekombinante Matrilin-4 Proteine generiert werden, welche nach Sekretion in das Medium mittels entsprechender Affinitätssäulen aufkonzentriert werden sollten.

Die erhaltenen Antiseren gegen das während meiner Diplomarbeit gereinigte rekombinant hergestellte Matrilin-3 und gegen rekombinantes Matrilin-4 sollten affinitätsgereinigt werden, um eine möglichst hohe Spezifität der Antikörper zu gewährleisten.

Eine strukturelle Analyse der rekombinanten Proteinkonstrukte von Matrilin-3 und -4 sollte massenspektrometrisch und durch SDS-PAGE mit anschließenden Immunoblots erfolgen. Die erhaltenen Daten sollten im Immunoblot mit Gewebeextrakten verglichen werden.

Die Gewebeverteilung von Matrilin-3 und -4 sollte immunhistologisch während der Embryonalentwicklung, in neugeborenen und sechs Wochen alten Mäusen ermittelt werden.

Die supramolekulare Struktur von Matrilin-3 und -4 sollte in Zellkultur dargestellt werden und mittels Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie sollte eine mögliche Kollokalisierung mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix untersucht werden.

B ERGEBNISSE

B 1 Klonierungsstrategie und rekombinante Expression

Zur rekombinanten Expression von murinem Matrilin-4 wurde die benötigte cDNA mittels RT-PCR aus muriner Lungen-mRNA generiert. Die entsprechende Matrilin-4 cDNA wurde durch geeignete Primer mittels PCR amplifiziert und in die multiple Klonierungsseite des Vektors pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997) insertiert. Bei dem Plasmid pCEP-Pu handelt es sich um einen für eukaryotische Zellen geeigneten Expressionsvektor, der unter anderem die extrachromosomale (episomale) Replikation des Plasmids und dessen stabile Verteilung auf sich teilende Zellen gewährleistet und ein Gen für Puromycinresistenz besitzt. Die multiple Klonierungsseite des Vektors befindet sich im Leseraster hinter dem Signalpeptid des BM-40 Proteins, wodurch eine Sekretion des Proteins ins Medium garantiert werden soll. Zur Vereinfachung der Reinigung aus Zellkulturüberständen wurde Matrilin-4 entweder N- oder C-terminal mit einer Markierung versehen (Abb. B.1). Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Markierungen am N- und C-Terminus sollte ihr möglicher Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins bestimmt werden.

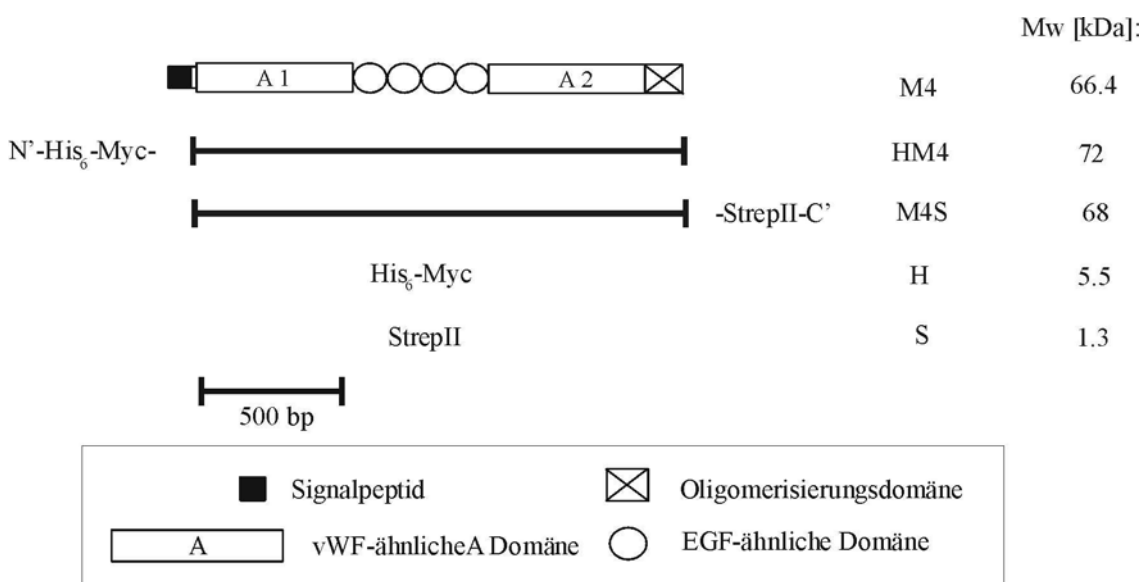


Abb. B 1 **Matrilin-4 Konstrukte**. Matrilin-4 wurde mit N- sowie C-terminaler Markierung generiert. Die N-terminale Markierung besitzt neben den für die Affinitätsreinigung wichtigen sechs Histidinresten noch eine Myc-Sequenz, zur Detektion mit einem entsprechenden Antikörper.

Die Klonierungen der rekombinanten Vektoren wurden durch Sequenzierung verifiziert und die DNA anschließend zur Transfektion von HEK (human embryonic kidney)-293 EBNA Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um eukaryotische Zellen, welche eine authentische Faltung und posttranslationale Modifikationen gewährleisten sollen. Nach zweitägiger Regeneration erfolgte die Selektion mittels Puromycin über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen auf Expression der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE bzw. Immunoblot analysiert. Beide Matrilin-4 Konstrukte zeigten eine starke Expression im Zellkulturüberstand der HEK-293 EBNA Zellen (Abb. B 2.1 und B 2.2).

B 2 Reinigung der rekombinanten Matrilin-4 Proteine

Zur Reinigung wurden ausreichende Mengen serumfreien Überstandes gesammelt und entsprechende Vorversuche durchgeführt. Im folgenden beschrieben sind jeweils die entsprechenden Affinitätsreinigungen und deren Resultate.

B 2.1 Reinigung von His₆-Myc-Matrilin-4 (HM4)

N-terminal markiertes Matrilin-4 (HM4) besitzt sechs Histidinreste, die durch koordinative Wechselwirkung an eine Ni-NTA Säule binden. Nach Zentrifugation und Filtration wurde der Zellkulturüberstand (900 ml, 10 µg/ml) über eine Ni-NTA Säule (10 ml) gegeben und das gebundene HM4 mit 250 mM Imidazol eluiert (Abb. B 2.1). Im Eluat sind zwei Banden im Molekulargewichtsbereich von 235 und 155 kDa, sowie drei Banden bei 87, 73 und 66 kDa zu erkennen, die alle eine Immunreaktivität mit dem Antikörper gegen die Myc-Markierung aufwiesen (Eine Reaktivität der 87 kDa Bande ist im Immunoblot bei längerer Exposition zu erkennen). Bei den oberen beiden Banden handelt es sich um trimeres und prozessiertes dimeres Matrilin-4 mit einem zusätzlichen Disulfid-gebundenem Coiled-Coil Fragment (D+CC) (Nomenklatur siehe Anhang I und Abb. B 4.3), bei den drei unteren Banden handelt es sich um monomeres Matrilin-4 mit zwei Coiled-Coil Fragmenten (M+2CC), sowie monomeres und prozessiertes monomeres Matrilin-4 ohne Coiled-Coil Fragment (M-CC).

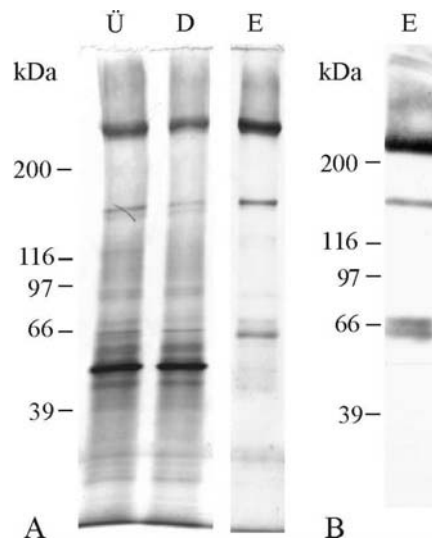


Abb. B 2.1 **HM4 Affinitätsreinigung.** A) Silber gefärbtes 4-16 %iges SDS-Polyacrylamid Gel des Zellüberstandes (Ü), des Durchlaufs (D) und des Eluates (E) der Ni-NTA Säule. Je 10 μ l des Zellüberstandes und des Durchlaufs, sowie 2 μ l des Eluats wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen auf das Gel aufgetragen. B) Immunoblot mit monoklonalem Maus α -Myc Antikörper.

B 2.2 Reinigung von Matrilin-4 StrepII (M4S)

Matrilin-4 wurde mit einem aus elf Aminosäuren bestehenden Peptid markiert, welches eine Affinität zu Avidin besitzt. Diese Affinität wurde ausgenutzt um Matrilin-4 über eine Streptactin Säule aufzureinigen.

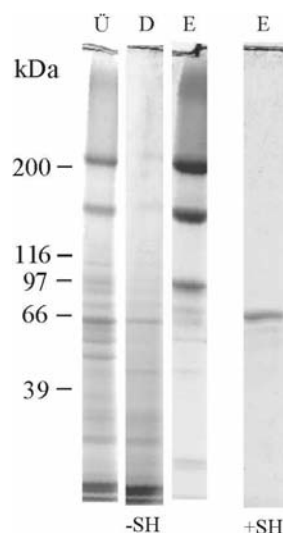


Abb. B 2.2 **M4S Affinitätsreinigung.** Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbtes 4-12 %iges SDS-Polyacrylamid Gel des Durchlaufs (D), des Zellüberstandes (Ü) und des Eluates (E) der Streptactin Säule. Es wurde je 1 ml Zellüberstand und Durchlauf mit TCA-gefällt, sowie 30 μ l des Eluats unter nicht reduzierenden Bedingungen (-SH), und im Falle des Eluats zusätzlich unter reduzierenden Bedingungen (+SH) auf das Gel aufgetragen.

250 ml M4S Zellkulturüberstand wurden nach Dialyse, auf eine 3 ml Streptactin-Säule geladen und mit 2.5 mM Desthiobiotin eluiert (Abb. B 2.2). Entsprechend dem N-terminal markierten Matrilin-4 sind im Eluat zwei Banden im Molekulargewichtsbereich von 215 und 155 kDa zu erkennen, die trimeres und prozessiertes dimeres (D+CC) Matrilin-4 repräsentieren (Nomenklatur siehe Anhang I und Abb. B 4.3). Weiterhin treten drei Banden bei 92, 75 und 67 kDa auf, bei denen es sich um monomeres Matrilin-4 mit zwei Coiled-Coil Fragmenten (M+CC), sowie monomeres und prozessiertes monomeres Matrilin-4 ohne Coiled-Coil Fragment (M-CC) handelt. Nach Reduktion zerfallen die Oligomere in die Untereinheiten und im SDS-PAGE war nur noch eine Bande zu erkennen (Abb. B 4.3).

B 3 Herstellung polyklonaler Matrilin-Antikörper

Im folgenden werden exemplarisch die Antikörpergeneration und Affinitätsreinigung des Matrilin-4 Antikörpers beschrieben und anschließend die Spezifität der Antikörper gegen Matrilin-1 bis -3 beschrieben.

B 3.1 Matrilin-4 Antikörper

Zur Herstellung polyklonaler Matrilin-4 Antikörper wurde ein Kaninchen mit 500 µg HM4 immunisiert. Nach dem 61. Immunisierungstag wurde eine Serumprobe entnommen und mittels Immunoblot auf eine Immunreaktivität mit dem verabreichten Antigen getestet. Da die Serumprobe eine starke Immunreaktivität aufwies, wurde das Ausbluten des Tieres veranlasst. Das erhaltene Rohserum wurde affinitätsgereinigt, um mögliche Nebenreaktivitäten zu verringern. Zur Affinitätsreinigung wurde gereinigtes StrepII-markiertes Matrilin-4 (M4S) an eine CNBr-Sepharose Matrix gekoppelt und die Säule mit verdünntem Rohserum beladen. Nach einigen Waschschritten erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper mit 100 mM Glycin, pH 2,5, in ein gleiches Volumen an 1 M Tris-HCl, pH 8.8, um eine irreversible Denaturierung zu vermeiden. Die Spezifität des eluierten Antikörpers wurde mittels Immunoblot überprüft (Abb. B 3.1).

Die eluierten Antikörper zeigt nur eine Immunreaktivität mit Matrilin-4. Im Zellüberstand der Kontrollkultur ist keine Reaktivität zu erkennen (Abb. B 3.1).

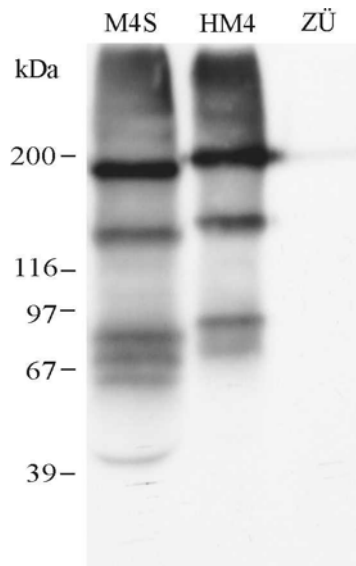


Abb. B 3.1 **Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-4.** Je 30 µl Zellüberstand von 293-EBNA-Zellkulturen die M4S, HM4 sowie eines nicht mit den Matrilinen verwandten Kontrollproteins (ZÜ) exprimieren, wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen auf einem 4-12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose überführt.

B 3.2 Matrilin-3 Antikörper

Zur Immunisierung eines Kaninchens sowie eines Huhns wurde aufgereinigtes, rekombinantes Matrilin-3 ohne coiled-coil Domäne (Matrilin-3 Δ CT) verwendet (Klatt, Diplomarbeit, Köln 1997).

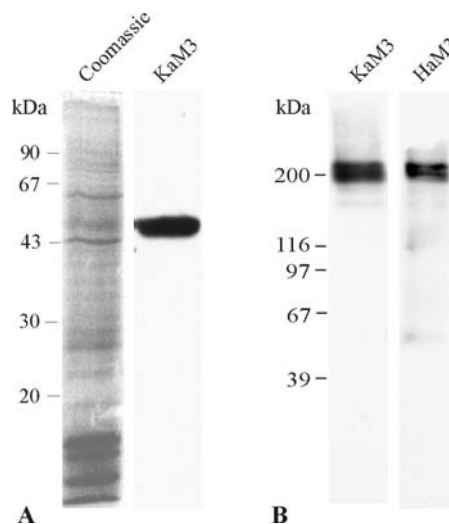


Abb. B 3.2 **Charakterisierung der Kaninchen und Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-3.** A) 200 µl Zellkulturüberstand des Matrilin-3 Δ CT Konstrukts wurden auf einem 15%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt sowie im Immunoblot mit

affinitätsgereinigtem Kaninchen (KaM3) Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert. B) 20 µl Calvariaextrakt einer neugeborenen Maus wurden auf einem 4-12%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Kaninchen (KaM3) und Hühnchen (HaM3) Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert.

Die Affinitätsreinigung der Antiseren erfolgte auf die oben beschriebene Art, mit dem gleichen Antigen welches zur Immunisierung verwendet wurde (Abb. B 3.2).

B 3.3 Matrilin-1

Im Institut vorhandenes Antiserum gegen Matrilin-1 aus Kaninchen sowie aus Huhn wurde affinitätsgereinigt. Als Antigen wurde Matrilin-1 aus Rind (Hauser and Paulsson, 1994) verwendet (Abb. B 3.3).

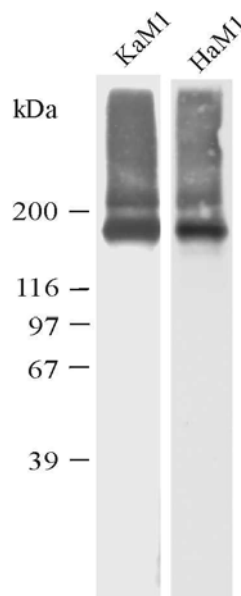


Abb. B 3.3 **Immunoblot mit Kaninchen und Hühnchen Antikörpern gegen Matrilin-1.** 20 µl Calvariaextrakt wurden auf einem 4-12%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Kaninchen (KaM1) und Hühnchen (HaM1) Antikörpern gegen Matrilin-3 inkubiert.

Affinitätsgereinigte Kaninchen und Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-1 zeigten im Calvariaextrakt ein übereinstimmendes Bandenmuster.

B 3.4 Matrilin-2

Affinitätsgereinigte Antikörper gegen Matrilin-2 waren bereits im Institut vorhanden (Piecha et al., 1999).

B 3.5 Kreuzreaktivitäten der Matrilin-Antikörper

Da die Antiseren zur weiteren strukturellen Analyse, sowie zur Untersuchung der Gewebeverteilung eingesetzt werden sollten, wurden die Antiseren auf mögliche Kreuzreaktivitäten getestet. Dies erfolgte u.a. mit rekombinanten Proteinen mittels Slot-Immunoblot (Abb. B 3.4).

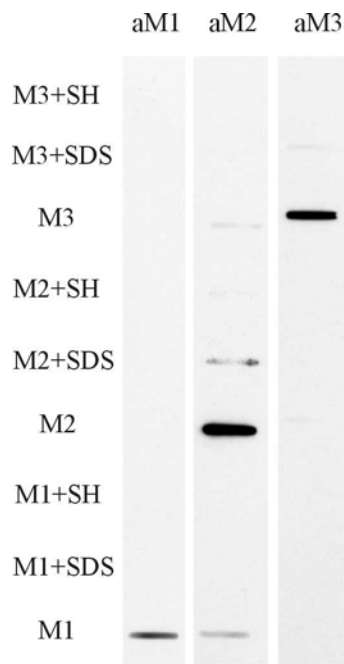


Abb. B 3.4 **Slot-Immunoblot.** Rekombinantes Matrilin-1, -2 und -3 wurde in TBS, in 1% SDS oder nach Reduktion mit β -Mercaptoethanol durch ein angelegtes Vakuum auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Je eine Membran wurde mit Kaninchen Antiserum gegen Matrilin-1, -2 und -3 inkubiert.

Alle Antiseren zeigten die stärkste Immunreaktivität mit dem eigenen, nicht-denaturierten Antigen. Weiterhin zeigte das Antiserum gegen Matrilin-2 eine schwache Reaktivität mit nativem, rekombinatem Matrilin-1 und -3.

Eine Kreuzreaktivität aller affinitätsgereinigter Matrilin-Antikörper aus Kaninchen konnte anhand eines Immunoblots mit Calvariaextrakt ausgeschlossen werden (s. Abb. B 5.6). In

diesem Experiment zeigte auch der erst später hergestellte Antikörper gegen Matrilin-4 eine vollständige Spezifität für Matrilin-4.

Weiterhin mußte speziell eine Kreuzreaktivität des affinitätsgereinigten Kaninchen-Antikörpers gegen Matrilin-1 mit dem affinitätsgereinigten Hühnchen-Antikörper gegen Matrilin-3 für die Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie von Matrilin-1 und -3 auf Swarm Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen (s. Kapitel B 7) ausgeschlossen werden.

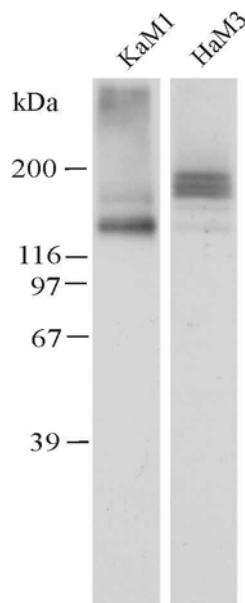


Abb. B 3.5 Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Kaninchen Antikörper gegen Matrilin-1 und affinitätsgereinigtem Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-3. 20 μ l Calvariaextrakt wurden auf einem 4-12%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Kaninchen (KaM1) und Hühnchen (HaM1) Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert.

Der affinitätsgereinigte Kaninchen Antikörper gegen Matrilin-1 und der affinitätsgereinigte Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-3 zeigten keine Kreuzreaktivität (Abb. B 5.3).

B 4 Proteolytische Prozessierung der Matriline

Wie schon im Kapitel B 2 beschrieben wurde, wird rekombinantes Matrilin-4 zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne proteolytisch prozessiert. Im folgenden Kapitel werden die biochemischen Untersuchungen an rekombinanten Matrilin-3 und -4 zur Charakterisierung der proteolytischen Schnittstelle dargestellt.

B 4.1 Proteolytische Prozessierung von Matrilin-4

Immunoblot Untersuchungen des Zellkulturüberstandes von N- und C-terminal markiertem Matrilin-4 zeigten Banden, bei denen es sich um trimeres, dimeres und monomeres Matrilin-4 handelte (Abb. B 4.1). Auch nach Reduktion waren im Monomerbereich zwei Banden zu erkennen, welche mit einem monoklonalem Antikörper gegen die Myc-Markierung eine Reaktivität zeigten. Folglich mußte von zwei unterschiedlichen monomeren Formen ausgegangen werden, die beide die Myc-Markierung und dementsprechend einen intakten N-Terminus besitzen.

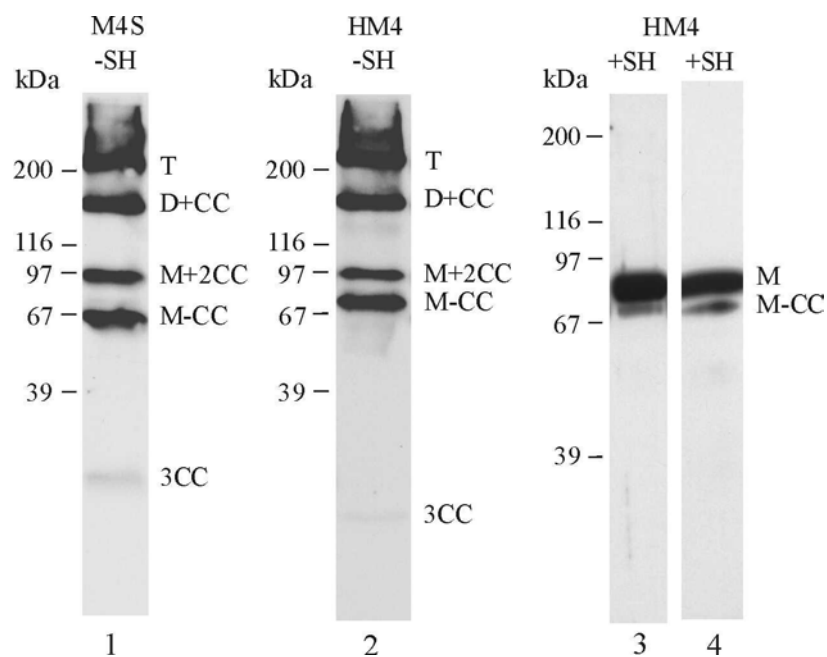


Abb. B 4.1 **Immunoblot von rekombinanten Matrilin-4.** Zellüberstand von C-terminal StrepII-markierten (M4S, Bahn 1) oder N-terminal His₆-Myc-markierten (HM4, Bahn 2) Matrilin-4 transfizierten HEK-293 EBNA-Zellen wurden elektrophoretisch auf einem 4-15%igem (Bahn 1 und 2) bzw. 4-8%igem (Bahn 3 und 4) SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Anschließend wurde entweder mit affinitätsgereinigtem Matrilin-4 Antikörper (Bahn 1-3) oder mit monoklonalem Maus Antikörper gegen Myc detektiert (Bahn 4). Die Proben der Bahnen 3 und 4 wurden vor der Elektrophorese reduziert. Weitere Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.3.

Gereinigtes, StrepII-markiertes Matrilin-4 wurde massenspektrometrisch mit einem Bruker Reflex III TOF-Massenspektrometer untersucht (Abb. B 4.1).

Unter nicht reduzierenden Bedingungen (A) erschienen drei Molekülonen mit den Massen 219000 (T) (Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.3), 153000 (D+CC) und 87000 (M+2CC). Unter reduzierenden Bedingungen erschien ein Molekülonensignal bei 72.9 kDa (M). Das anhand der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht von C-terminal

StrepII-markiertem Matrilin-4 beträgt 67.7 kDa. Im Vergleich mit dem Molekölion der reduzierten Probe bei 72.9 kDa wurde der Anteil an posttranslationalen Modifikationen auf 7% bestimmt.

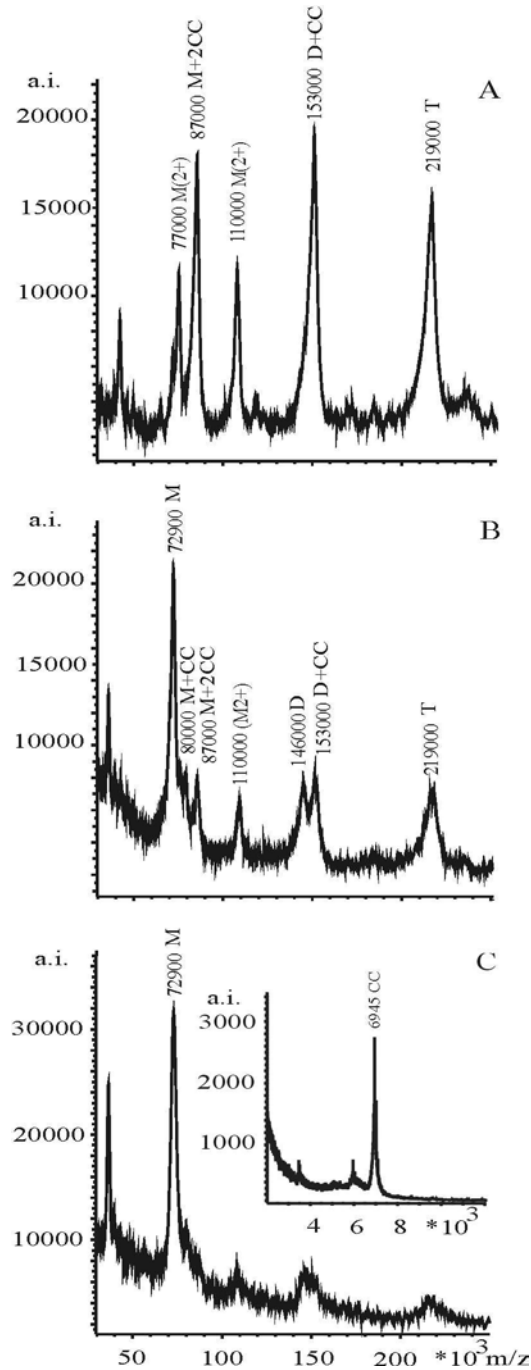


Abb. B 4.2 **Massenspektrometrie.** C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-4 wurde mittels MALDI-TOF unter nicht reduzierenden Bedingungen (A), partiell reduziert (B) und vollständig reduziert (C), massenspektrometrisch untersucht. Der Einsatz in C zeigt den Molekulargewichtsbereich von 2-10 kDa. M(2+) markiert zweifach protonierte Molekölionen $[M+2H]^{2+}$, m/z: Masse pro Ladung; a.i., relative Intensität, für weitere Nomenklatur s. Abb. B 4.2.

Zusätzlich konnte nach Reduktion ein Signal bei 6945 Da (CC) detektiert werden, das unter nicht reduzierenden Bedingungen fehlte. Die Masse des Fragmentes entsprach dem C-Terminus von StrepII-markiertem Matrilin-4, beginnend mit der Aminosäure G⁵⁷² jedoch ohne das C-terminale Lysin der StrepII Markierung.

Nach partieller Reduktion der Probe erschienen neben den Signalen, die auch in der nicht reduzierten Probe zu erkennen waren, drei zusätzliche Signale bei 146 (D), 80 (M+C) und 72.9 (M) kDa, die wahrscheinlich durch den Verlust des über Disulfidbrücken gebundenen Fragmentes (CC) aus den Molekülen bei 153 (D+CC) und 87 (M+2CC) kDa entstanden sind. Die Summierung des Molekulargewichts der reduzierten Probe von 72.9 kDa liefert Massen von 145800 und 218700. Dementsprechend handelt es sich bei den Molekülen bei 146 und 219 kDa um dimeres (D) bzw. trimeres (T) Matrilin-4.

Zur Bestätigung der massenspektrometrisch ermittelten C-terminalen Prozessierung wurde gereinigtes StrepII-markiertes Matrilin-4 per SDS-PAGE aufgetrennt und auf kleinere, vom C-Terminus stammende Fragmente, hin untersucht. Eine Proteinbande bei 21 kDa wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und im MALDI-TOF analysiert. Es konnte ein tryptisches Fragment mit einer Masse von 2552.2 Da detektiert werden, welches der Sequenz der Aminosäuren G⁵⁷² bis R⁵⁹⁴ entsprach und somit auf eine Prozessierung zwischen Aminosäure E⁵⁷¹ und G⁵⁷² hinwies (Abb. B 4.3). Da die mutmaßliche Schnittstelle zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne liegt, handelte es sich bei der aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Bande im Bereich von 21 kDa um die trimere Coiled-Coil Domäne. Unter reduzierenden Bedingungen konnte die 21 kDa Bande nicht mehr detektiert werden. Stattdessen wurde ein 7 kDa Fragment aus dem Polyacrylamidgel isoliert. Nachfolgender Trypsin und Endoprotease Glu-C Verdau und massenspektrometrische Analyse mittels ESI Q-TOF (electrospray ionisation quadropole-time of flight) ergaben folgende zwei Sequenzen: G⁵⁷²IGAGTE und AAWSHPQFE. Bei den ermittelten Sequenzen handelt es sich um das N-terminale und das C-terminale Ende des 6945 Da Fragmentes.

Zur eindeutigen Bestimmung der Sequenz der Schnittstelle wurde die Proteinbande im Bereich von 21 kDa der Edman-Sequenzierung unterworfen und es konnte folgende Sequenz ermittelt werden: G⁵⁷² IGAGTE(A/H)TELRS (Abb. B 4.3). Die resultierenden Matrilin-4 Fragmente bei einer Prozessierung an dieser Stelle sind schematisch in Abb. B 4.3 dargestellt.

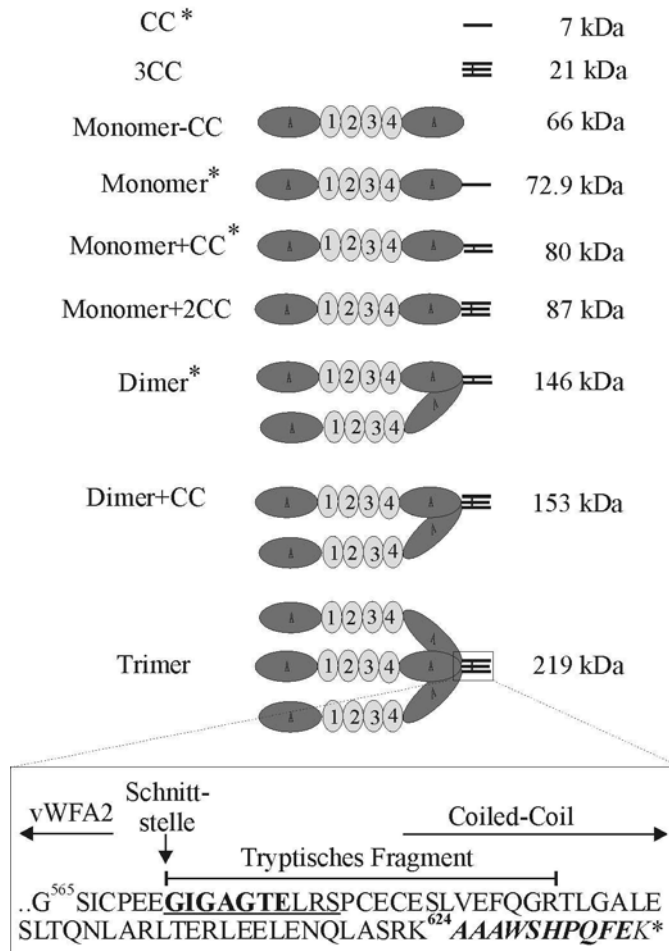


Abb. B 4.3 **Schematische Darstellung der massenspektrometrisch ermittelten Matrilin-4 Fragmente.** Das Matrilin-4 Fragment ohne Coiled-Coil Domäne konnte nicht detektiert werden, da es seine C-terminale Markierung verloren hat und daher nicht über die Affinitätsäule aufgereinigt wurde. Die trimere Coiled-Coil Domäne wurde nicht detektiert, da über diesen Massenbereich kein Spektrum aufgenommen wurde. Die mit Sternchen markierten Fragmente wurden nur nach partieller oder vollständiger Reduktion nachgewiesen. CC: Coiled-Coil Domäne. Im Kasten ist die Aminosäuresequenz des C-Terminus von StrepII-markiertem Matrilin-4 dargestellt. Fettgedruckt sind die Sequenzerggebnisse der ESI Q-TOF Analyse dargestellt. Die unterstrichene Sequenz gibt das Ergebnis der Edmansequenzierung wieder. Kursiv ist die Sequenz der StrepII-Markierung dargestellt.

Um einen Eindruck vom zeitlichen Verlauf der Prozessierung zu bekommen, wurde Zellkulturüberstand nach unterschiedlichen Zeitintervallen gesammelt und das Fragmentierungsmuster mittels Immunoblot bestimmt (Abb. B 4.4).

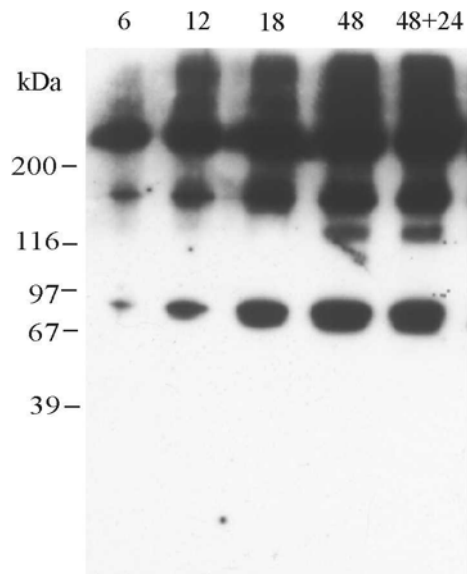


Abb. B 4.4 **Kinetik der Fragmentierung von N-terminal markiertem Matrilin-4.** Zellkulturüberstand wurde nach 6, 12, 18 sowie 48 h geerntet. Weiterhin wurde nach 48 h geernteter Zellkulturüberstand noch weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Je 32 µl wurden auf einem 4-15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-4 inkubiert.

Schon nach 6 h können Fragmentierungsbanden detektiert werden. Das Mengenverhältnis der Banden zueinander verändert sich im wesentlichen nicht. Eine Erklärung hierfür kann eine intrazelluläre Prozessierung sein. Ebenso kann die für die Prozessierung zuständige Protease sich auf der Zelloberfläche befinden und Matrilin-4 nur während der Sekretion und im Verlauf der Zellmigration prozessieren.

B 4.2 Proteolytische Prozessierung von Matrilin-3

Rekombinantes N-terminal His₆-markiertes Matrilin-3 zeigte im SDS-Polyacrylamidgel ein ähnliches Bandenmuster wie Matrilin-4.

Ohne Reduktion waren im SDS-Polyacrylamidgel Proteinbanden zu erkennen, die unter Annahme einer ähnlichen N-terminalen Prozessierung wie bei Matrilin-4, einem Tetramer (Q) (Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.6), einem prozessierten Trimer (T+CC), einem prozessierten Dimer (D+2CC), einem prozessierten Monomer (M+3CC) und einem prozessierten Monomer ohne Coiled-Coil Domäne (M-CC) entsprachen. Unter reduzierenden Bedingungen konnte neben der Bande des prozessierten Monomers (M-CC) die Bande des intakten Monomers detektiert werden. Weiterhin konnte eine sehr schwache Proteinbande im Molekulargewichtsbereich unter 14 kDa detektiert werden, die der nach Reduktion

freigesetzten Coiled-Coil Domäne (CC) entsprechen würde. Ohne Reduktion konnte die tetramere Coiled-Coil Domäne (4CC) nicht detektiert werden, da sie aufgrund der proteolytisch abgetrennten N-terminalen Markierung nicht über die Affinitätssäule aufgereinigt wurde.

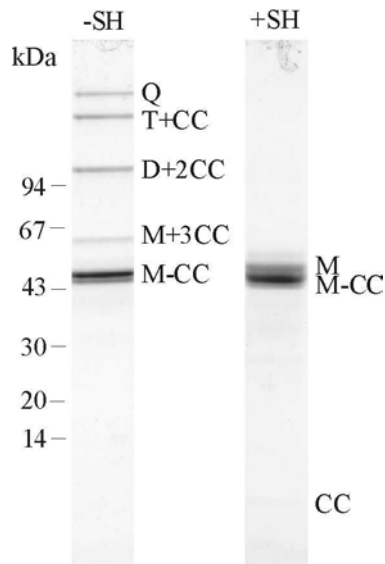


Abb. B 4.4 **SDS-PAGE mit rekombinanten Matrilin-3.** Zellüberstand von N-terminal His₆-markierten, Matrilin-3 transfizierten HEK-293 EBNA-Zellen wurde auf einem 4-15%igen SDS-Polyacrylamidgel mit und ohne Reduktion elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt. Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.6.

Zur weiteren Untersuchung der Prozessierung von Matrilin-3 wurde rekombinantes, N-terminal His₆-markiertes Matrilin-3 in ähnlicher Weise wie das rekombinante, C-terminal StrepII-markierte Matrilin-4 mittels MALDI-TOF untersucht (Abb. B 4.5).

Unter reduzierenden Bedingungen konnten im Spektrum zwei Molekülionenpeaks bei 45799 Da (M-CC) und bei 51190 Da (M) detektiert werden. Die theoretische Masse des unprozessierten N-terminal His₆-markierten Matrilin-3 beträgt nach Reduktion und Derivatisierung mit Iodacetamid 51008 Da. Nach Prozessierung hinter dem Glutaminsäurerest Glu²⁵⁹ errechnet sich eine theoretische Masse von 45256. Weiterhin konnten unter reduzierenden Bedingungen zwei Signale bei 5663 Da und bei 5508 Da detektiert werden, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen fehlten. Das errechnete Molekulargewicht des C-terminalen Coiled-Coil Fragments nach einer Prozessierung beträgt 5657 Da (CC), ohne die letzte Aminosäure Arginin ergibt sich ein Wert von 5500 Da (CC-R).

Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen theoretischer und ermittelter Masse kann davon ausgegangen werden, dass Matrilin-3 nicht glykosyliert ist.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erhält man als stärksten Molekülionenpeak ein Signal bei 45785 Da (M-CC). Ein Signal des intakten Monomers konnte nicht detektiert werden. Weiterhin konnte ein Signal bei 67867 Da detektiert werden. Addiert man zu der Masse des prozessierten Monomers (M-CC) viermal die Masse des Fragmentes welches nach Reduktion erscheint (CC-R), ergibt sich eine Masse von 67817 Da, welche dem intakten Monomer mit zusätzlichen drei Coiled-Coil Domänen (M+3CC) entsprechen würde. Addiert man zu dem Monomer mit zusätzlichen drei Coiled-Coil Domänen (M+3CC) sukzessiv das gemessene Molekulargewicht des Matrilin-3 Monomers ohne Coiled-Coil Domäne (M-CC), erhält man Molekulargewichte von 113602 Da (D+2CC), 159387 Da (T+CC) und 205172 Da (Q). Im Spektrum konnten Molekülionenpeaks bei 113194 Da (D+2CC), 158605 Da (T+CC) und 204735 (Q) detektiert werden.

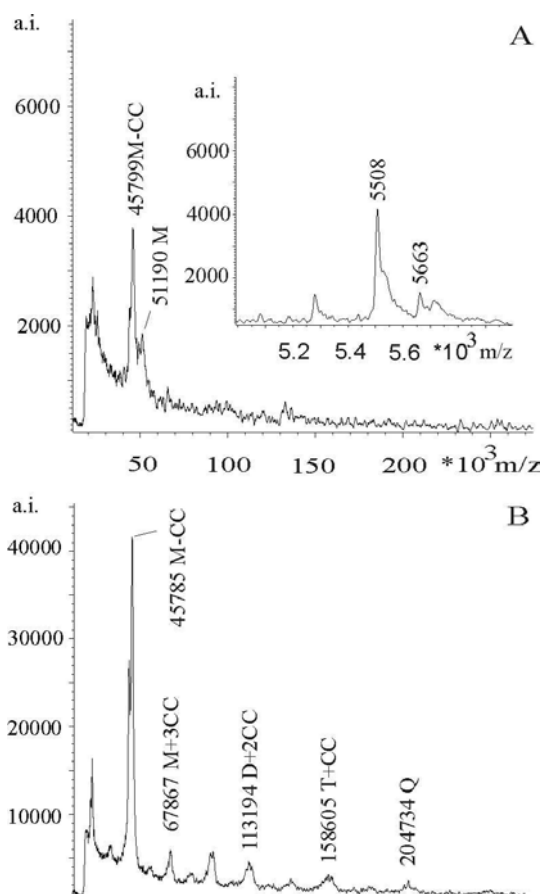


Abb. B 4.5 **Massenspektrometrie.** N-terminal-markiertes Matrilin-3 wurde mittels MALDI-TOF unter reduzierenden Bedingungen (A) und nicht reduzierenden Bedingungen (B) massenspektrometrisch untersucht. Der Einsatz in A zeigt den Molekulargewichtsbereich von 5-6 kDa. m/z: Masse pro Ladung; a.i., willkürlich Intensität, für weitere Nomenklatur s. Abb. B 4.6.

Die resultierenden Fragmente bei einer Prozessierung hinter den beiden Glutaminsäureresten im Bereich zwischen der vierten EGF-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne sind schematisch in Abbildung B 4.6 dargestellt.

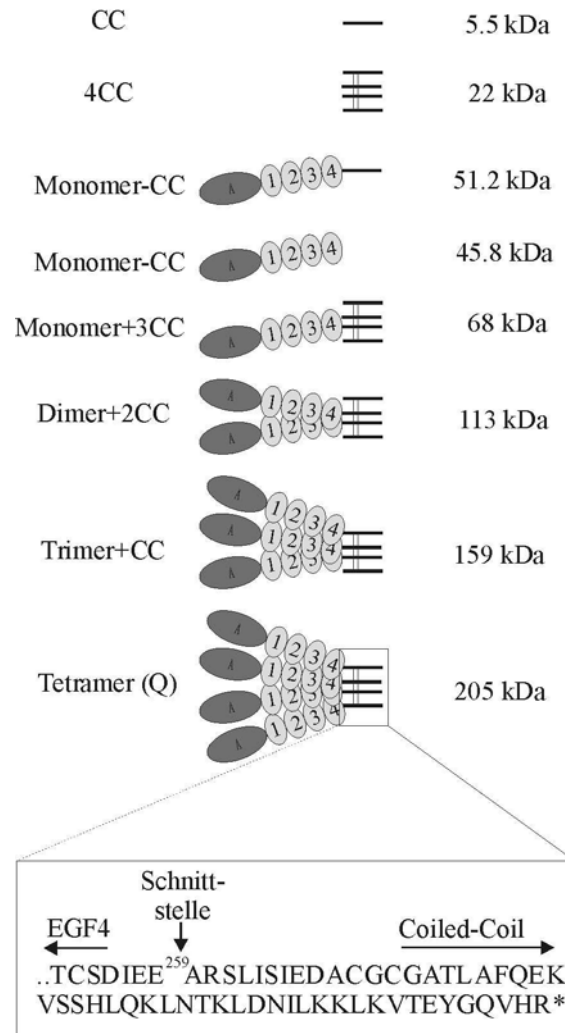


Abb. B 4.6 **Schema der potentiellen Matrilin-3 Fragmente.** Schematisch dargestellt sind die mittels MALDI-TOF ermittelten Matrilin-3 Molekülonen. Die C-terminale tetramere Coiled-Coil Domäne konnte nicht detektiert werden, da sie keine Markierung besaß und daher nicht über die Affinitätsäule aufgereinigt wurde. CC: Coiled-Coil Domäne. Die einzelne Coiled-Coil Domäne konnte nur nach vollständiger Reduktion nachgewiesen werden.

B 5 Untersuchung der Matriline aus Gewebe

Zur Untersuchung von Matrilin-3 und -4 im Gewebe und zur Identifizierung von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden mit den rekombinanten Proteinen wurden verschiedene Gewebeextrakte mittels Immunoblot analysiert. Weiterhin wurde das Bandenmuster von

Matrilin-1, -2 und -3 in Gewebsextrakten eines gesunden und eines arthrotischen, humanen Gelenks untersucht. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich des Bandenmusters aller Matriline in Gewebeextrakten muriner Calvaria.

B 5.1 Matrilin-4

In Extrakten vom Sternum, Calvaria, Cerebellum, Cortex, Medulla Oblongata, Rückenmark, Lunge und Muskel konnte Matrilin-4 mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Extrakte vom Herz, Testis, Darm und Nebenniere waren negativ (nicht dargestellt).

Im Immunoblot des Calvariaextraktes wurde mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-4 eine Hauptbande bei 200 kDa detektiert. Weiterhin wurden zwei zusätzliche Banden bei 180 und 170 kDa nachgewiesen (Abb. B 5.1 und B 5.6). Ein Vergleich zwischen Calvariaextrakt nach längerer Exposition und dem rekombinanten, StrepII-markierten Matrilin-4 zeigte Proteinbanden, welche vermutlich dem 150 kDa Dimer (D+CC) (Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.3), dem 95 kDa Monomer (M+2CC) und dem 68 kDa Monomer (M-CC) zuzuordnen sind (Abb. B 5.1).

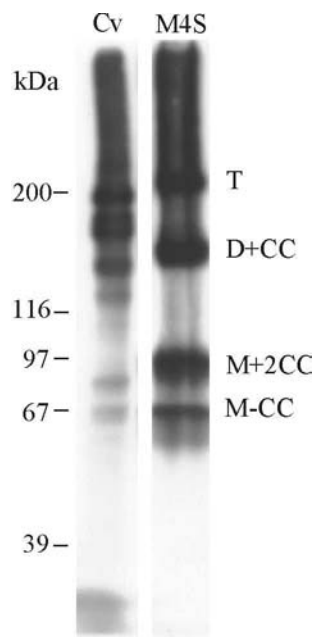


Abb. B 5.1 **Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-4.** 20 µl Calvariaextrakt und 1 µl StrepII-markiertes Matrilin-4 wurden auf einem 4-8%igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Weitere Nomenklatur s. Abb B 4.3.

Sequentielle Extrakte eines Mausgehirns zeigten eine unterschiedliche Löslichkeit der individuellen, oligomeren Formen von Matrilin-4 (Abb. B 5.2). Alle Formen lösten sich in

TBS mit 10 mM EDTA, jedoch nicht in TBS ohne EDTA, was auf eine Verankerung hindeutet, an der zweiwertige Kationen beteiligt sind. Diese Eigenschaft wurde auch schon für Matrilin-1 gezeigt (Hauser et al., 1994). Unter partiell denaturierenden Bedingungen mit 4 M Harnstoff wurden trimeres Matrilin-4 und die 180 kDa Form freigesetzt. Stärker denaturierende Bedingungen mit 4 M Guanidin-HCl setzten nur noch weiteres trimeres Matrilin-4 frei, was auf eine stärkere Bindung der unprozessierten Form im Gewebe hinweist. Weiterhin bemerkenswert ist eine Proteinbande in der EDTA-Fraktion, über der Trimerbande, welche wahrscheinlich eine höhere multimere Form von Matrilin-4 darstellt (Abb. B 5.2).

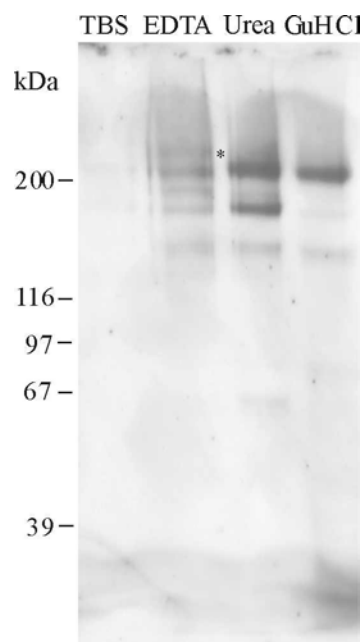


Abb. B 5.2 **Sequentielle Extraktion von einem Mausgehirn.** Das Gehirn einer neugeborenen Maus wurde sequentiell mit TBS, TBS mit 10 mM EDTA, TBS mit 10 mM EDTA und 4 M Harnstoff sowie mit 4 M Guanidin-HCl extrahiert, elektrophoretisch auf einem 4-8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-4 inkubiert. Das Sternchen markiert die höhere multimere Form von Matrilin-4.

B 5.2 Matrilin-3

In Extrakten von Sternum, Calvaria und Knochen der hinteren Extremität (Tibia, Knie und Femur) einer neugeborenen Maus konnten drei Hauptbanden detektiert werden. Während das Bandenmuster zwischen Sternum und Hinterbein übereinstimmt, läuft die untere der drei Banden des Calvariaextrakts ein wenig höher als die untere Bande aus Extrakten des Sternums und des Hinterbeins (Abb. B 5.3).

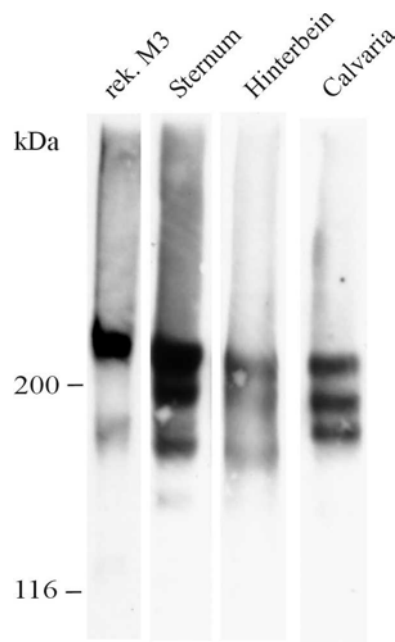


Abb. B 5.3 **Struktur von Matrilin-3**. Sternum- und Calvariaextrakt, Extrakt eines Hinterbeins sowie Zellkulturüberstand von rekombinanten Matrilin-3 wurde elektrophoretisch auf einem 4%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert.

B 5.3 Matrilin-1 und -3

Wie gezeigt wurde, existieren in Rind (Wu and Eyre, 1998; Klatt et al., 2000) und in Mensch (Kleemann-Fischer et al., 2001) Heterooligomere von Matrilin-1 und -3. Der Vergleich des Bandenmusters von Matrilin-1 und -3 in murinem Calvariaextrakt zeigte eine Hauptpopulation an Homooligomeren des jeweiligen Proteins (Abb. B 5.4). Ein Vergleich von Calvariaextrakt der Maus mit Knochenextrakt vom Rind zeigt, wenn auch bei unterschiedlichen Molekulargewichten, ein ähnliches Bandenmuster. Weiterhin konnten mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-1 bei längerer Exposition Banden im Calvariaextrakt detektiert werden, welche den für die Heterooligomere in Rind beschriebenen (Klatt et al., 2000) entsprechen (Abb. B 5.5). Daher scheint es wahrscheinlich, dass auch in der Maus Heterooligomere existieren, wenn auch in geringen Ausmaß.

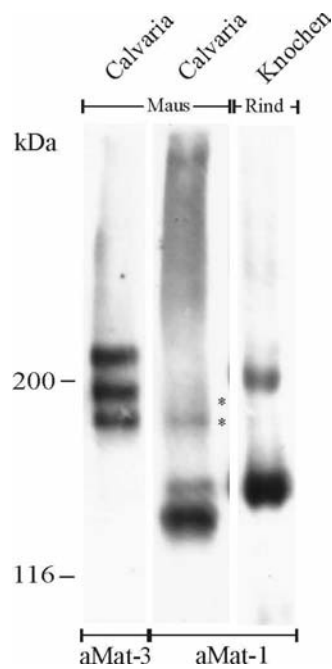


Abb. B 5.4 **Vergleich der Struktur von Matrilin-1 und -3.** Sternum- und Calvariaextrakt aus Maus sowie Knochenextrakt vom Rind wurde elektrophoretisch auf einem 4%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-1 und -3 inkubiert. Sternchen markieren die Banden der potentiellen Matrilin-1 und -3 Heterooligomere.

Bei längerer Exposition waren im Immunoblot von Calvariaextrakt mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-1 und -3 auch Signale zu erkennen, die im Falle von Matrilin-3 den mittels MALDI-TOF ermittelten prozessierten Fragmenten entsprachen (Abb. B 5.6).

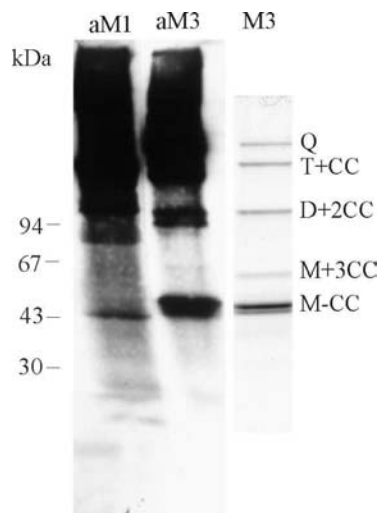


Abb. B 5.5 **Fragmentierung von Matrilin-1 und -3 in murinem Calvariaextrakt.** Calvariaextrakt wurde elektrophoretisch auf einem 4-8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-1 und -3 inkubiert. Nomenklatur siehe Anhang I und Abb. B 4.6.

B 5.4 Matrilin-1 bis -4

Der Vergleich des Bandenmusters aller Matriline in Calvariaextrakt der Maus zeigte, dass die Hauptpopulation jedes Matrilins im Gewebe als Homooligomer vorliegt (Abb. B 5.6). Eine Aussage über Heterooligomere, welche eventuell als Nebenpopulation vorkommen, ist allein anhand von Immunoblots der Gewebeextrakte ohne nähere Charakterisierung des Bandenmusters nicht eindeutig.

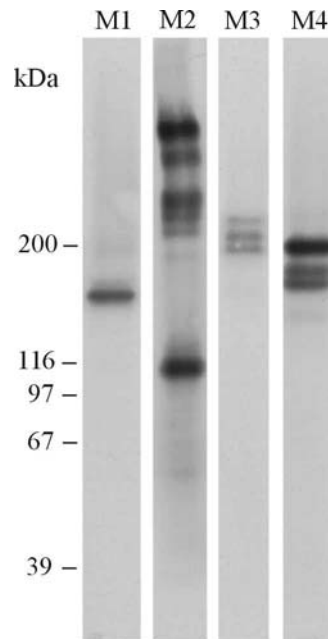


Abb. B 5.6 **Struktur aller Matriline in Calvariaextrakt.** Calvariaextrakt der Maus wurde elektrophoretisch auf einem 4-8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-1, -2, -3 und -4 inkubiert.

In Gewebeextrakten von humanem, gesunden und arthrotischen Gelenkknorpel, konnten Matrilin-1, -2 und -3 mittels Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. B 5.7).

Im Falle von Matrilin-3 waren Banden zu erkennen, die dem prozessierten Trimer (T+CC), Dimer (D+2CC) und Monomer (M+3CC) zuzuordnen waren. Das relative Intensitätsverhältnis der Tetramer-, Trimer- und Monomerbande ändert sich im Falle des arthrotischen Gelenkes zu den prozessierten Fragmenten hin. Im arthrotischen Knorpel waren weitere Banden zu detektieren, die eventuell durch eine andere Protease entstanden sind (Abb. B 5.7).

Auch Matrilin-1 und Matrilin-2 zeigten in Gewebeextrakten (Abb. B 5.6 und B 5.7) ein heterogenes Bandenmuster, welches auch hier auf Prozessierungen hindeutet.

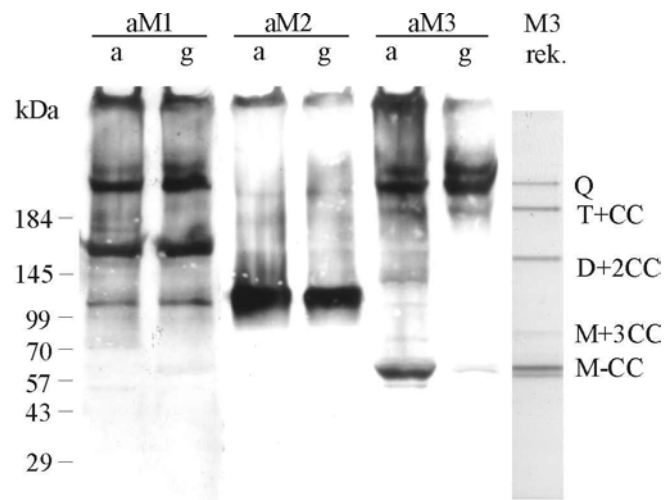


Abb. B 5.7 **Matrilin-1, -2 und -3 in humanem, gesunden und arthrotischen Gelenkknorpel.** Gewebextrakt aus einem gesunden (g) und einem arthrotischen (a) Gelenk sowie rekombinantes Matrilin-3 (M3 rek.) wurden elektrophoretisch auf einem 4-20%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt im Immunoblot mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-1, -2 und -3 inkubiert (aM1, aM2 und aM3) oder mit Coomassie Brillant Blue R250 (M3 rek) gefärbt. Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.6.

B 6 Gewebeverteilung der Mitglieder der Matrilin-Familie

Zu Beginn dieser Arbeit war nur die Gewebeverteilung von Matrilin-1, das überwiegend im Knorpel exprimiert wird (Paulsson and Heinegard, 1982) und Matrilin-2, das eine breitere Gewebeverteilung aufweist (Piecha et al., 1999), bekannt. In den folgenden Kapiteln wird die Gewebeverteilung von Matrilin-3 und Matrilin-4 in Mausgeweben beschrieben. Anschließend wird die Expression der Matriline während der Embryonalentwicklung, die skeletale Gewebeverteilung und die Verteilung im Gelenk verglichen. Weiterhin erfolgt der Vergleich der Matrilinexpression in humanen gesunden bzw. arthrotischen Gelenken, sowie eine kurze Zusammenfassung der gesamten Gewebeverteilung der Matrilin-Familie.

Die Untersuchungen der Gewebeverteilung der Matriline erfolgte immunhistologisch mit den entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörpern auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten oder auf Gefrierschnitten. Die Gewebe wurden mit Hyaluronidase und Proteinase K präinkubiert, um eine gute Penetration der Antikörper ins Gewebe zu gewährleisten. Die Detektion erfolgte entweder mit Peroxidase- bzw. Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern oder mit einem biotinylierten Zweitantikörper und alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin.

B 6.1 Gewebeverteilung von Matrilin-3

Matrilin-3 wurde am stärksten im hyalinen Knorpel detektiert (Abb. B 6.1). Hyaliner Knorpel ist der häufigste Knorpel in Vertebraten und bildet während der Embryonalentwicklung vorübergehend das Skelett (chondrale Ossifikation). Während der chondralen Ossifikation durchlaufen die Knorpelzellen (Chondroblasten, Chondrozyten) unterschiedliche Entwicklungsstadien, welche u.a. morphologisch erkennbar sind und eine Unterteilung in verschiedene Zonen zulassen. Man unterscheidet zwischen ruhendem, proliferierendem und hypertrophem Knorpel, dem die Verknöcherungszone folgt. Matrilin-3 konnte in allen Zonen des Knorpels detektiert werden. Bei höherer Vergrößerung ist hyaliner Knorpel weiter einzuteilen in Territorium (Knorpelzelle mit Knorpelhof) und Interterritorium (Interzellulärsubstanz). Sowohl im Territorium als auch im Interterritorium konnte Matrilin-3 nachgewiesen werden. Auch in flachen Knochen, wie dem Brustbein (Sternum), und in einigen Schädelknochen, die sich chondral entwickeln, wurde Matrilin-3 gefunden (Abb. B 6.1). Neben einer Expression im hyalinen Knorpel konnte Matrilin-3 auch im Faserknorpel detektiert werden. Faserknorpel ist eine Mischung aus hyalinem Knorpel und faserigem Bindegewebe und kommt u.a. im knorpeligen Teil (Anulus fibrosus) der

Zwischenwirbelscheiben sowie im Meniscus lateralis vor (Abb. B 6.1). Eine Matrilin-3 Expression im elastischen Knorpel konnte nicht nachgewiesen werden.

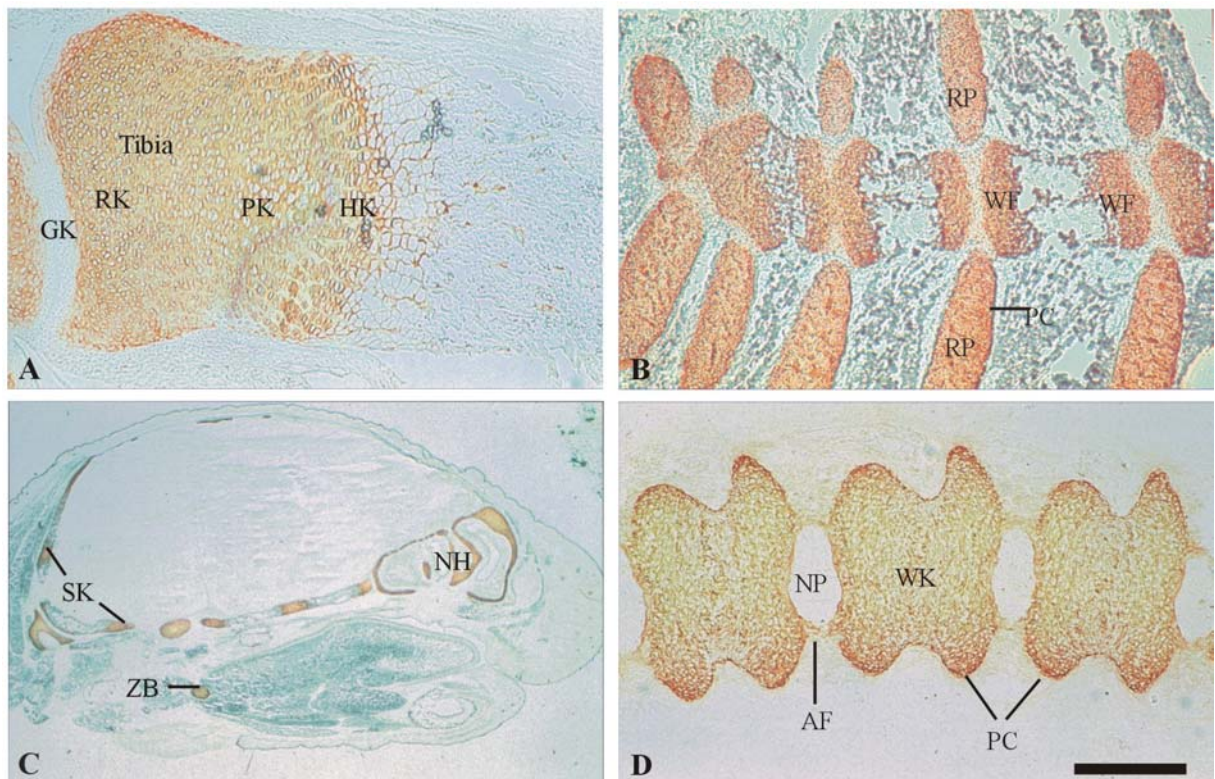


Abb. B 6.1 **Immunlokalisierung von Matrilin-3 in skeletalen Geweben neugeborener Mäuse.** A) In der distalen Tibia wurde Matrilin-3 im ruhenden (RK), im proliferierenden (PK) und im hypertrophen Knorpel (HK) nachgewiesen. Im entwickelnden Gelenkknorpel (GK) konnte Matrilin-3 nicht detektiert werden. B) Im Sternum wurde Matrilin-3 in den Wachstumsfugen (WF), im Perichondrium (PC) sowie im ventralen Rippenknorpel (RP) detektiert. C) Im Kopf wurde Matrilin-3 in den Schädelknochen (SK) gefunden (NH, Nasenhöhle; ZB, Zungenbein). D) Im Schwanz wurde Matrilin-3 in den Wirbelkörpern (WK) sowie im Anulus fibrosus (AF) detektiert. Der Nucleus pulposus (NP) war negativ. Der Balken entspricht 0.15 mm (A), 1.1 mm (B), 2.2 mm (C) und 0.3 mm (D).

Während des Wachstums findet man hyalinen Knorpel in der Metaphyse, die das Längenwachstum der Knochen gewährleistet (Wachstumsfuge) und schließlich ganz durch Knochen ersetzt wird. Dauerhaft findet man hyalinen Knorpel an den Gelenkoberflächen (artikulärer Knorpel), in den Wänden der Luftwege (Trachea, Bronchi), am Schwertfortsatz (Prozessus xiphoideus), in der Nasenhöhle und Nasenscheidewand, sowie am ventralen Rippenansatz. Bis auf den artikulären Knorpel wurde Matrilin-3 in allen aufgezählten Geweben nachgewiesen (Abb. B 6.2).

Eine starke Matrilin-3 Expression wurde auch im Perichondrium gefunden (Abb. B 6.2). Das Perichondrium, welches bis auf die Gelenkoberflächen den hyalinen Knorpel umgibt, zählt zu den dichten Bindegeweben und besteht u.a. aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die zu Chondroblasten differenzieren können.

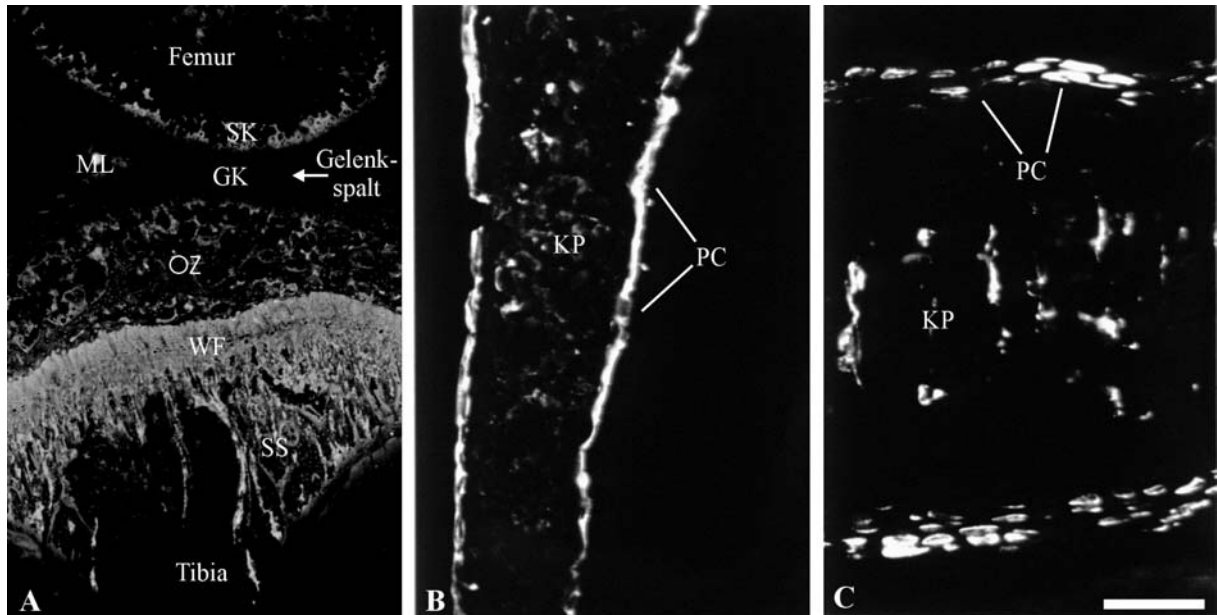


Abb. B 6.2 **Immunlokalisierung von Matrilin-3 in sechs Wochen alten Mäusen.** A) Im Knie wurde Matrilin-3 am stärksten in der Wachstumsfuge (WF) detektiert. Weitere Signale wurden im Meniscus lateralis (ML), im subchondralen Knorpel (SK), im Gelenkspalt (GK), im zweiten Ossifikationszentrum (OZ) und in der Substantia spongiosa (SS) gefunden. B) In der Trachea konnte Matrilin-3 im Knorpel (KP) und im Perichondrium (PC) nachgewiesen werden. C) Im ventralen Rippenknorpel wurde Matrilin-3 im Knorpel (KP) sowie im Perichondrium (PC) an der Peripherie von flachen Fibroblasten-ähnlichen Zellen gefunden. Der Balken entspricht 500 μm (A), 120 μm (B) und 60 μm (C).

Das Längenwachstum des Sternums erfolgt durch mehrere Ossifikationszentren. Bei der Verbindung zwischen zwei Zentren handelt es sich um ein kontinuierliches Gelenk (Synarthrose), d. h. ein Gelenk ohne Gelenkspalt. Man unterscheidet weiter zwischen Synarthrosen aus Bindegewebe (Syndesmosen) und knorpeligen Synarthrosen (Synchondrosen). In den kaudalen Synchondrosen der Sterni sechs Wochen alter Mäuse wurde Matrilin-3 in fibrillären Strukturen detektiert. Immunfluoreszenz-Untersuchungen paralleler Schnitte zeigten, dass Kollagen II auch Bestandteil dieser fibrillären Strukturen ist (Abb. B 6.3). Matrilin-1, -2 und -4 konnten in diesen Strukturen nicht nachgewiesen werden.

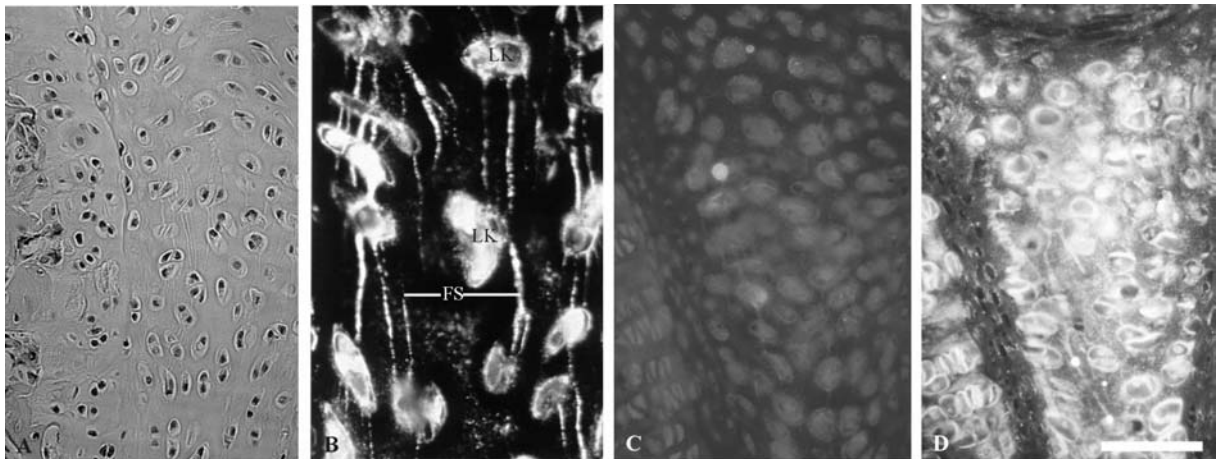


Abb. B 6.3 **Immunlokalisierung von Matrilin-3 im Sternum sechs Wochen alter Mäuse.** H/E Färbung (A) und Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen Matrilin-3 (B), Kollagen I (C) und Kollagen II (D) auf paraffineingebetteten Sternumschnitten. In der Synchondrose des Sternums wurde Matrilin-3 in den Lakunen (LK) und in fibrillären Strukturen (FS) zwischen den Lakunen detektiert. Die entsprechenden fibrillären Strukturen waren auch in der H/E Färbung zu erkennen und zeigten eine Reaktivität mit Kollagen II Antikörpern. Kollagen I war in diesen Strukturen nicht nachweisbar. Der Balken entspricht 170 μm (A, C, D) und 85 μm (B).

Weiterhin wurde Matrilin-3 im Knochen detektiert. Knochen besteht aus einer äußeren kompakten Schicht (Substantia compacta, kompakter/kortikaler Knochen) und einem schwammartigen inneren Balkenwerk (Substantia spongiosa, trabekularer Knochen). Knochengrundsubstanz wird in erster Linie von Osteoblasten produziert, die an der Oberfläche der Substantia spongiosa liegen. Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor, befinden sich inmitten der verkalkten Grundsubstanz und dienen dem Erhalt der interzellulären Substanz. Matrilin-3 konnte an der Oberfläche der Substantia spongiosa sowie um Osteozyten innerhalb der Substantia compacta nachgewiesen werden (Abb. B 6.4).

Die entsprechenden immunhistologischen Ergebnisse konnten durch in situ Hybridisierungen (nicht gezeigt) bestätigt werden und zeigten, dass Matrilin-3 von Zellen des umgebenden Gewebes sekretiert wurde. Dadurch konnte die Aussage gefestigt werden, dass es sich um im Knochen synthetisiertes Protein und nicht um Knorpelreste der Epiphysenfuge handelt.

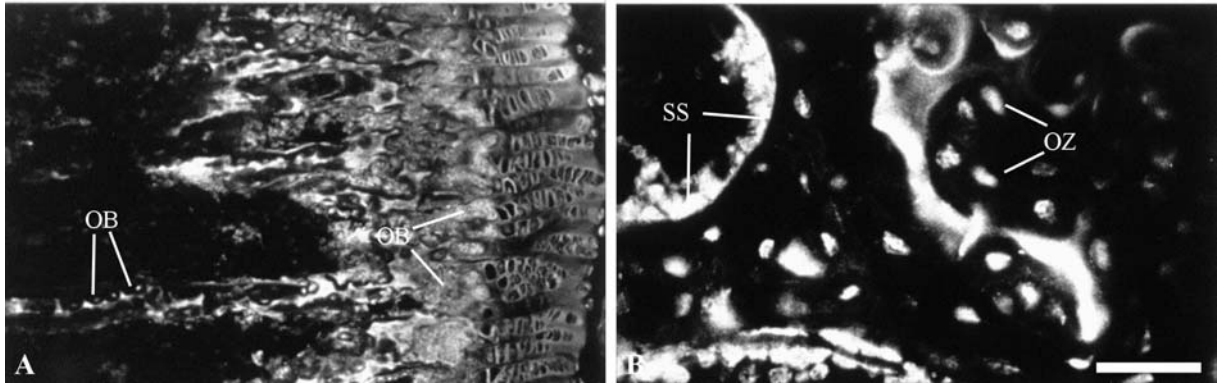


Abb. B 6.4 **Immunlokalisierung von Matrilin-3 im Knochen einer sechs Wochen alten Maus.** A) In der Verknöcherungszone der proximalen Tibia wurde Matrilin-3 um Osteoblasten unterhalb der Wachstumsfuge und entlang der Substantia spongiosa detektiert. B) Im zweiten Ossifikationszentrum der proximalen Tibia wurde Matrilin-3 an der Oberfläche der Substantia spongiosa (SS) und um Osteozyten (OZ) herum detektiert. Der Balken entspricht 120 μm (A) und 60 μm (B).

B 6.2 Gewebeverteilung von Matrilin-4

Im Gegensatz zu Matrilin-3 zeigte Matrilin-4 eine breitere Gewebeverteilung. Die stärkste Expression von Matrilin-4 konnte im Bindegewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde Matrilin-4 in Nerven-, Epithel- und Muskelgewebe detektiert. Im folgenden wird die Expression von Matrilin-4 in den vier Gewebetypen beschrieben und anschließend auf eine Expression in einzelnen Organen eingegangen.

Bindegewebe

Bindegewebe zeichnet sich im Gegensatz zu Nerven, Epithel und Muskelgewebe durch einen hohen Anteil an Interzellulärsubstanz aus. Man unterteilt Bindegewebe in lockeres und straffes Bindegewebe, in Knorpel und Knochen. Matrilin-4 wurde in allen Arten des Bindegewebes nachgewiesen (Abb. B 6.5).

Im dichten Bindegewebe wurde Matrilin-4 in Sehnen, im Perichondrium und im Periost, einem dem Perichondrium verwandten Gewebe aus Fibroblasten-ähnlichen Zellen, welches den Knochen umgibt und ihn vom umliegenden Gewebe abtrennt, detektiert (Abb. B 6.5).

Lockeres Bindegewebe ist im Körper weit verbreitet. Es umgibt u.a. Muskelfasern, Nerven- und Epithelgewebe (s.u.) und bildet in zahlreichen Organen das Stroma. Im lockeren Bindegewebe konnte man eine starke Matrilin-4 Expression u.a. in den Papillen der Dermis (Stratum papillares) detektieren (Abb. B 6.5).

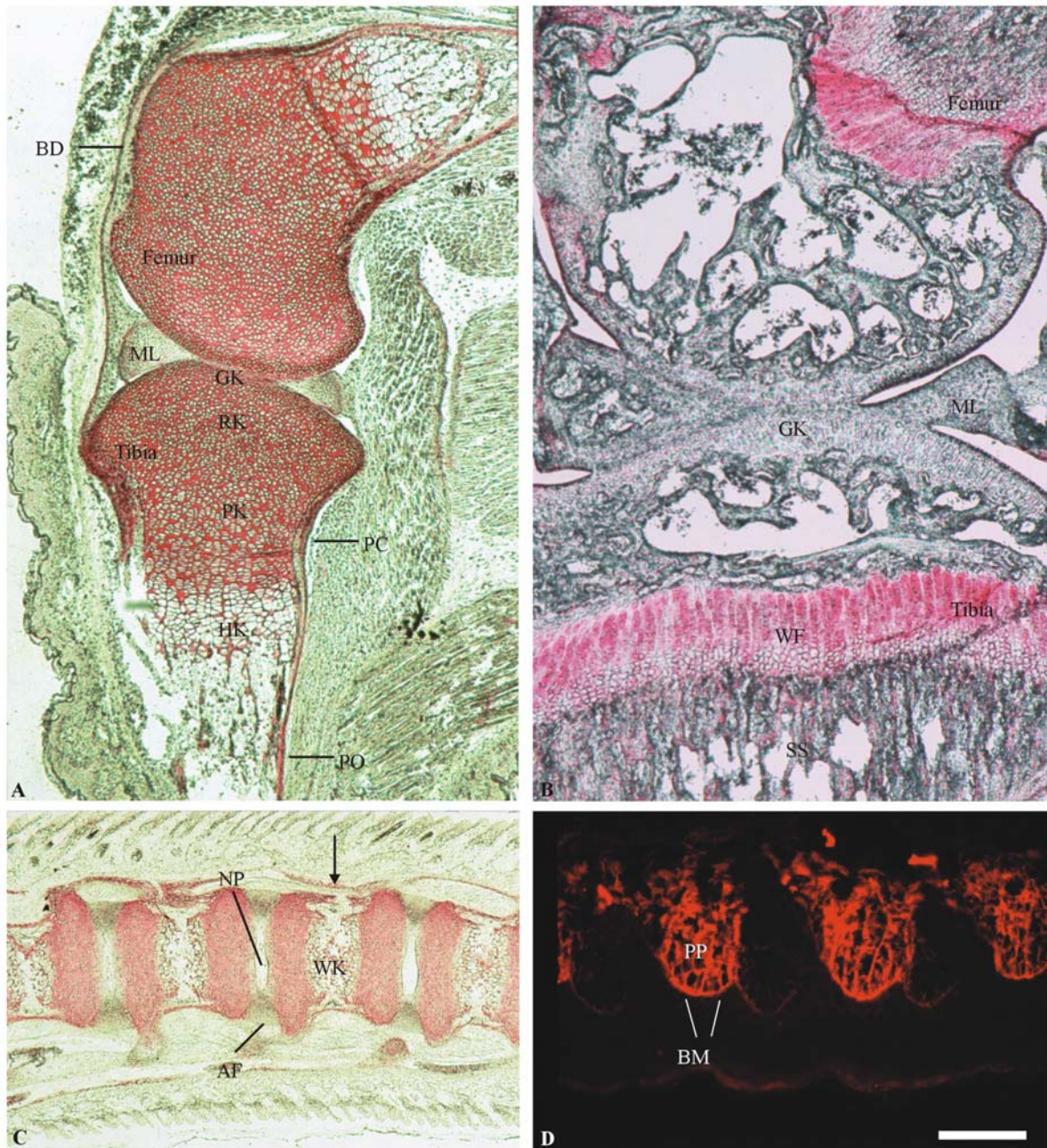


Abb. B 6.5 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 im Bindegewebe, im Knorpel und im Knochen.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten (A-C) und Gefrierschnitten (D) einer neugeborenen (A, C, D) und sechs Wochen alten Maus. Die Detektion erfolgte mittels alkalischer Phosphatase (A, B, C) oder fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper (D). A) Im Knie wurde Matrilin-4 im sich entwickelnden Gelenkknorpel (GK), ruhenden (RK), proliferierenden (PK) und hypertrophen (HK) epiphysären Knorpel detektiert. Eine starke Expression wurde auch im Perichondrium (PC), Periost (PO) und den Bändern (BD) gefunden. ML: Meniskus lateralis. B) Matrilin-4 wurde stark in der epiphysären Wachstumsfuge und in der neugebildeten Substantia spongiosa des distalen Femur und der proximalen Tibia nachgewiesen. C) Im Schwanz wurde Matrilin-4 in den Wirbelkörpern (WK), im Anulus fibrosus (AF) und in Sehnen (Pfeil) detektiert (NP: Nucleus pulposus). D) In der Dermis wurde Matrilin-4 in den Papillen (PP) und assoziiert mit der Basalmembran (BM) nachgewiesen. Der Balken entspricht 330 μm (A, B), 500 μm (C) und 60 μm (D).

Matrilin-4 wurde im Trachealknorpel, Prozessus xiphoideus und in der Nasenscheidewand, sowie im ruhenden, proliferierenden und hypertrophen Knorpel wachsender Knochen nachgewiesen. Weiterhin fand man eine starke Expression im heranreifenden Gelenkknorpel, obwohl im reifen artikulären Knorpel Matrilin-4 nicht nachgewiesen werden konnte. Eine schwache Expression konnte auch im Faserknorpel des Anulus fibrosus und des Meniskus lateralis detektiert werden (Abb. B 6.5).

Weiterhin wurden große Mengen an Matrilin-4 im neugebildeten Knochen gefunden (Abb. B 6.5).

Nervengewebe

Eine starke Matrilin-4 Expression konnte auch im zentralen und peripheren Nervengewebe detektiert werden. Nervengewebe besteht aus Nervenzellen, die für die Reizweiterleitung zuständig sind, und aus Gliazellen, die u.a. eine Schutz- und Isolationsfunktion übernehmen. Weiterhin unterscheidet man zwischen Nervenfasern bestehend aus einem Axon und dem umgebenden Myelin (Lamellen der Hüllzellen), sowie Nervenfaserbündeln, die von Bindegewebe (Epi-, Peri- und Endoneurium) umgeben sind. Bei einer Ansammlung von Nervenzellen oder Nervenfasern unterteilt man weiterhin in graue, nervenzellreiche und weiße, nervenfaserreiche Substanz.

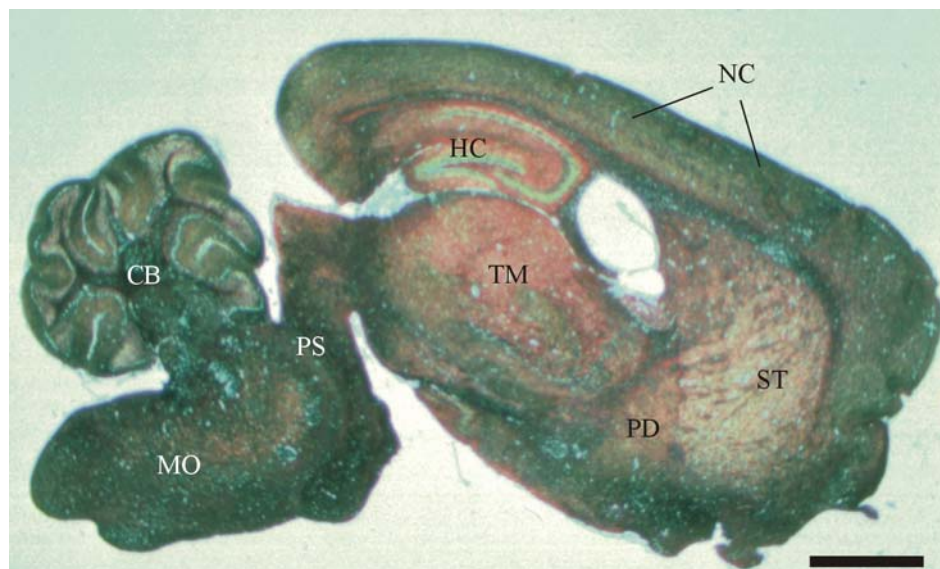


Abb. B 6.6 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 im Nervengewebe.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebetteten adultem Hirn mittels alkalischer Phosphatasefärbung. Matrilin-4 Expression konnte im Neocortex (NC), Striatum (ST), Pallidum (PD), Hippocampus (HC), Thalamus (TM), Pons (PS), Cerebellum (CB) und Medulla oblongata (MO) nachgewiesen werden. Der Balken entspricht 1.5 mm.

Die Expression von Matrilin-4 im zentralen Nervensystem ist breit. Matrilin-4 konnte im Rückenmark, im Hirnstamm, im Zwischenhirn und im Endhirn detektiert werden (Abb. B 6.6).

Auch im peripheren Nervensystem wurde Matrilin-4 detektiert. Eine Expression wurde im Spinalnerv und im sympathischen Nervenstrang detektiert (nicht dargestellt).

Muskelgewebe

Matrilin-4 wurde auch im Muskelgewebe detektiert. Morphologisch und funktionell lässt sich das Muskelgewebe in quergestreifte Skelettmuskulatur und glatte Muskulatur einteilen. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur ist der Aufbau der glatten Muskulatur weniger geordnet. Myofibrillen sind von einer Basalmembran (s.u.) und Muskelfasern von Bindegewebe (Epi-, Peri- und Endomysium) umgeben. Eine Matrilin-4 Expression konnte in der glatten Muskelschicht des Dünndarms (Lamina muscularis mucosae) nachgewiesen werden (Abb. B 6.7). Weiterhin wurde eine schwache Matrilin-4 Expression in der quergestreiften Skelettmuskulatur zwischen den Rippen detektiert (Abb. B 6.20).

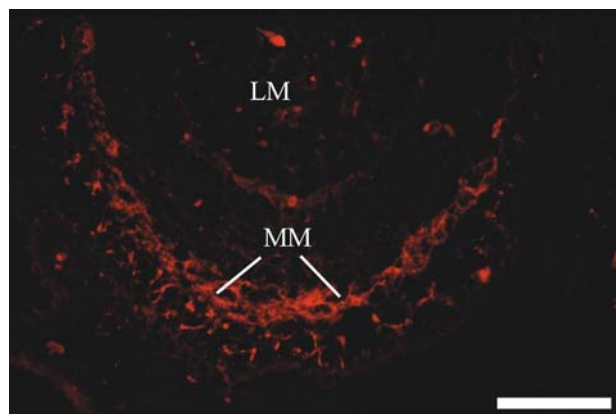


Abb. B 6.7 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 im Muskelgewebe.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf einem Gefrierschnitt eines 15.5 Tage alten Mausembryos mittels fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper. Matrilin-4 Expression konnte in der Lamina muscularis mucosae (MM) nachgewiesen werden (LM: Lumen). Der Balken entspricht 130 µm.

Epithelgewebe

Epithelgewebe zeichnet sich durch einen engen Verbund an Epithelzellen mit schmalen Interzellularräumen aus. Epithelgewebe ist zu unterteilen in Oberflächenepithel, Drüsenepithel, Sinnesepithel und Myoepithel. Benachbart zu den Epithelzellen befindet sich

immer eine Basalmembran (s.u.). Matriline-4 Expression konnte im mehrschichtigen unverhornten Oberflächenepithel des Oesophagus nachgewiesen werden (Abb. B 6.8).

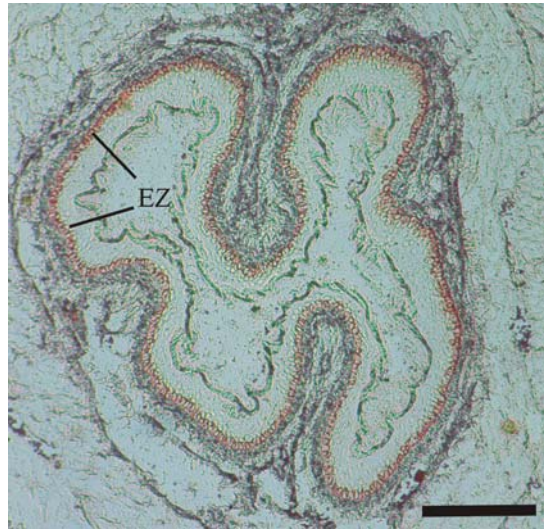


Abb. B 6.8 **Immunlokalisierung von Matriline-4 im Epithelgewebe.** Peroxidase-Färbung von Matriline-4 auf paraffineingebettetem Gewebe einer adulten Maus. Matriline-4 Expression konnte um Epithelzellen (EZ) der Oesophagus detektiert werden. Der Balken entspricht 100 μ m.

Basalmembran

Basalmembranen dienen als Haftstrukturen und Permeabilitätsschranken des molekularen Stoffaustausches, aber auch als Schutz vor Zellinvasionen. Die Basalmembran ist zu unterteilen in Lamina rara externa, Lamina densa, Lamina rara interna und Lamina fibroreticularis und besteht zu einem hohen Anteil aus Kollagen IV und Laminin. Matriline-4 scheint mit der Basalmembran assoziiert zu sein (Abb. B 6.7 und B 6.9). Eine Aussage ob Matriline-4 Bestandteil der Basalmembran ist, kann nur mittels Elektronenmikroskopie gemacht werden.



Abb. B 6.9 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 in der Basalmembran.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebettetem Gewebe einer neugeborenen Maus mittels alkalischer Phosphatase. Dargestellt ist ein Teil der Pfote. Die Pfeile markieren die Basalmembran. Der Balken entspricht 200 μm .

Herz

Das Herz besteht u.a. aus dreischichtigen Herzwänden (Endo-, Myo- und Epikard) und einem Herzskelett. Das innenliegende Endokard besteht aus Endothel und lockerem Bindegewebe, das Myokard wird gebildet aus netzartigen Strängen, Herzmuskelzellen und Bindegewebe, und das äußere Epikard besteht aus lockerem Bindegewebe, welches durch ein Plattenepithel abgedeckt wird. Das innere Herzskelett besteht aus straffem Bindegewebe, welches zwei Faserringe an der Öffnung der Vorhöfe und Kammern und einen Faserring um Aorta und Truncus pulmonalis bildet. Zwischen diesen Faserringen befindet sich Faserknorpel (Trigona fibrosa). Die Herzklappen bestehen wie das Endokard aus lockerem Bindegewebe und sind von Endothel bedeckt. Matrilin-4 wurde im Herzskelett detektiert, wobei eine Zuordnung zu den Faserringen oder dem Trigona fibrosa nicht möglich war. Weiterhin wurde Matrilin-4 in den Herzklappen nachgewiesen. Eine schwache Matrilin-4 Expression wurde auch in den Herzwänden gefunden (Abb. B 6.10).

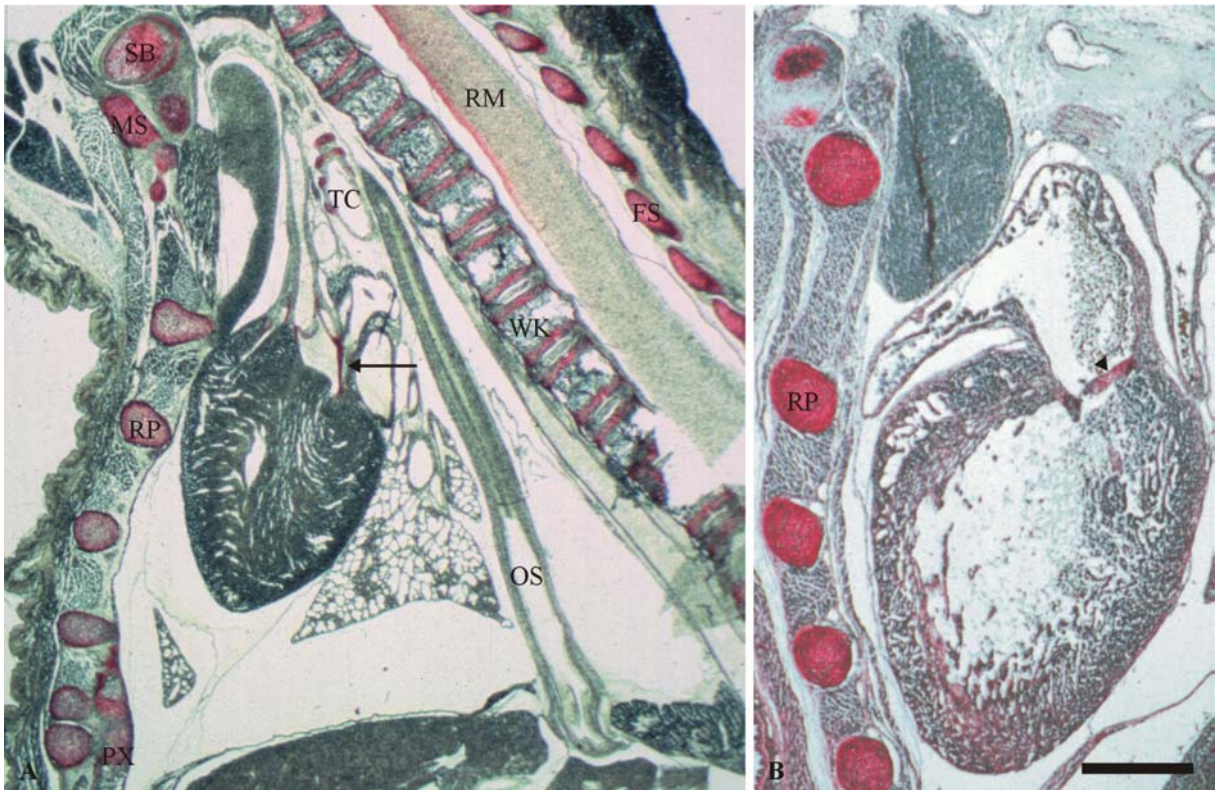


Abb. B 6.10 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 im Herzen.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebettetem Gewebe einer neugeborenen Maus (A) und einem 15.5 Tage alten Mausembryo (B) mittels alkalischer Phosphatase. A) Dargestellt ist der Thorax mit Schlüsselbein (SB), Manubrium sternum (MS), Rippen (RP), Prozessus xiphoideus (PX), Trachea (TC), Wirbelkörpern (WK) und ihren Fortsätzen (FS), Rückenmark (RM) und Oesophagus (OS). Der Pfeil markiert das Herzskelett. B) Zu erkennen ist eine Expression von Matrilin-4 in der Herzklappe (Pfeilspitze). Der Balken entspricht 1.2 mm (A) und 0.6 mm (B).

Trachea und Lunge

Die Trachea teilt sich in zwei Bronchii, diese wiederum in Bronchioli, Bronchioli terminales, Bronchioli respiratorii, Ductus alveolares und endet in den Alveolen. Benachbarte Alveolen werden durch ein Septum interalveolare getrennt. Ein Septum interalveolare besteht auf beiden Seiten aus einem Epithel und enthält u.a. Kapillaren, retikuläre und kollagene Fasern (Kollagen I und III), sowie Fibrozyten, Leukozyten, Makrophagen, Mastzellen und Nervenfasern. Matrilin-4 wurde in den knorpeligen Anteilen der Trachea und in den Alveolarwänden nachgewiesen (Abb. B 6.10 und B 6.11).

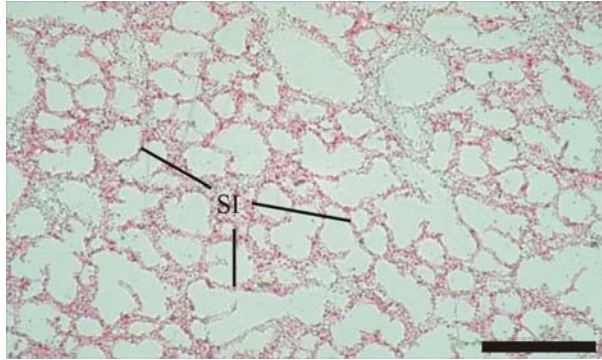


Abb. B 6.11 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 in der Lunge.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebettetem Gewebe einer adulten Maus mittels alkalischer Phosphatase. Dargestellt ist der Teil einer Lunge. Zu erkennen ist eine Matrilin-4 Expression in den Septi interalveolare (SI). Der Balken entspricht 140 μ m.

Auge

Das Auge besteht aus einer äußeren, mittleren und inneren Augenhaut, den Augenkammern, der Linse und dem Glaskörper. Die äußere Augenhaut besteht aus der weißlich aussehenden Sklera aus straffen Bindegewebe und der vorderen durchsichtigen Cornea, bestehend aus vorderem und hinterem Epithel, gefolgt von der Bowmann- bzw. Descement-Membran (Basalmembran) und dem zwischen den Membranen liegendem Stroma, bestehend hauptsächlich aus sauren Glycosaminoglykanen. Matrilin-4 wurde in der Sklera und in der Cornea sowie in der Übergangszone von Sklera und Cornea (Limbus cornea) nachgewiesen (Abb. B 6.12).

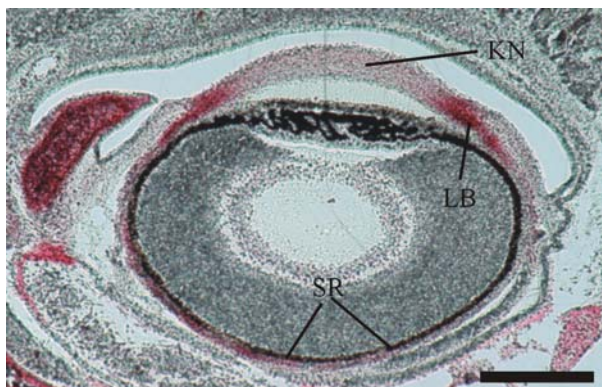


Abb. B 6.12 **Immunlokalisierung von Matrilin-4 im Auge.** Immunhistologische Färbung von Matrilin-4 auf paraffineingebettetem Gewebe einer neugeborenen Maus mittels alkalischer Phosphatase. Zu erkennen ist eine Matrilin-4 Expression in der Sklera (SR), Cornea (KN) und im Limbus (LB). Der Balken entspricht 0.65 mm.

Haare und Zähne

Haare sind in der Haut von einer dem Haar zugewandten epithelialen Wurzelscheide und einer äußeren dermalen Wurzelscheide umgeben. Epitheliale und dermale Wurzelscheide sind durch eine Basalmembran getrennt. Matrilin-4 wurde in der dermalen Wurzelscheide nachgewiesen (Abb. B 6.24).

Zähne entwickeln sich aus ektodermalem und mesenchymalem Ursprungsgewebe. Ein Zahn besteht aus Zahnschmelz (97% anorganisches Material), Dentin (70% anorganisches Material), welches härter als Knochen ist, und Pulpa, einem lockeren, gallertartigen Bindegewebe. Bei dem anorganischen Material handelt es sich hauptsächlich um Hydroxylapatit. Matrilin-4 konnte während der Zahnentwicklung detektiert werden (Abb. B 6.24).

B 6.3 Expression der Matriline während der Embryonalentwicklung

Zur Untersuchung der Expression von Matrilin-1 bis -4 während der Embryonalentwicklung wurden Mausembryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Befruchtung immunhistologisch mit den entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörpern untersucht. 6.5 und 7.5 Tage alte Embryonen wurden im Uterus geschnitten, während die 10.25 und 14.25 Tage alten Embryonen ohne maternales Gewebe präpariert wurden. Die Embryonen wurden in Paraffin eingebettet und mittels Immunfluoreszenz im Falle der 6.5, 7.5 und 10.25 Tage alten Embryonen, und mittels alkalischer Phosphatase im Falle des 14.25 Tage alten Embryos untersucht.

In 6.5 Tage alten Embryonen konnte keines der Matriline nachgewiesen werden. Eine erste Expression von Matrilin-2 und -4 wurde in 7.5 Tage alten Embryonen im Bereich des äußeren Konus der Placenta detektiert. Die Expression von Matrilin-4 war sehr schwach und konnte deshalb nicht fotografiert werden. Im 10.25 Tage alten Embryo konnten alle Matriline im Herzen (Abb. B 6.14), im kranialen mesenchymalen Gewebe (Abb. B 6.15) und im Ursegment der Wirbelsäule (Abb. B 6.16) detektiert werden. Zur einfacheren Zuordnung der Expressionsorte wurde ein 10.25 Tage alter Embryo mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und die unten dargestellten Expressionorte der Matriline markiert (Abb. B 6.13).

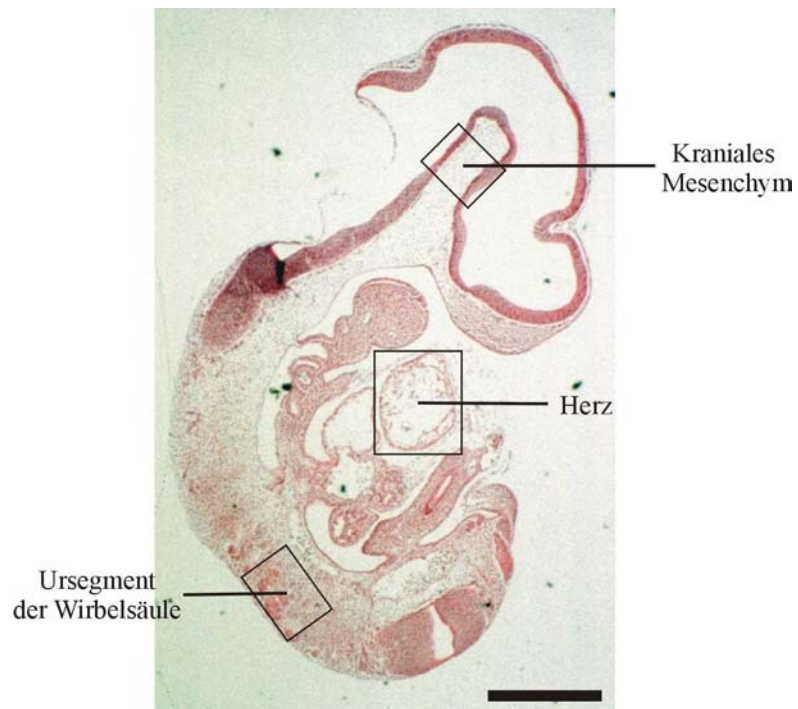


Abb. B 6.13 **H/E-Färbung eines 10.25 Tage alten Embryos.** Bei den eingerahmten Bereichen handelt es sich um die in den folgenden Abbildungen dargestellten Ausschnitte. Der Balken entspricht 1 mm.

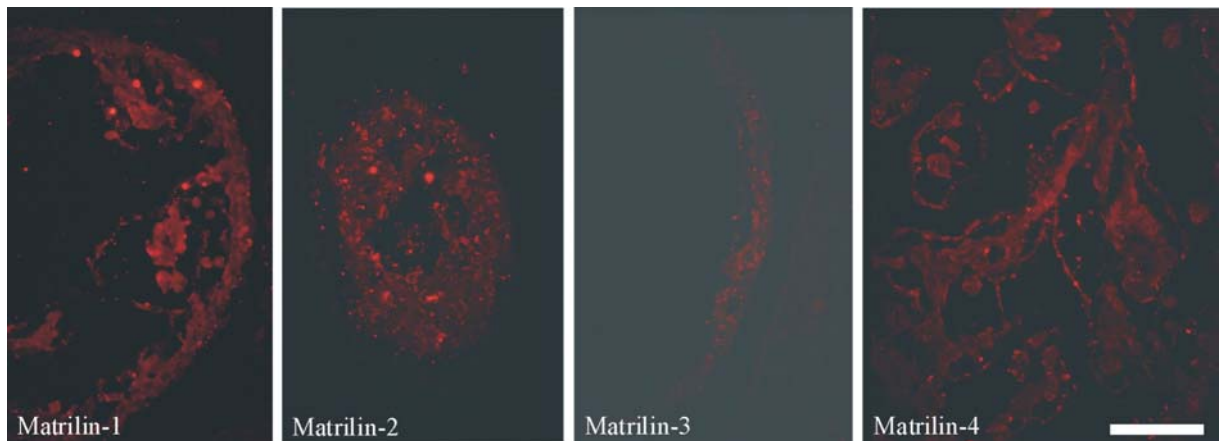


Abb. B 6.14 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Herzen eines 10.25 Tage alten Embryos.** Immunfluoreszenzmikroskopie mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf einem paraffineingebetteten 10.25 Tage alten Embryo. Der Balken entspricht 150 μ m.

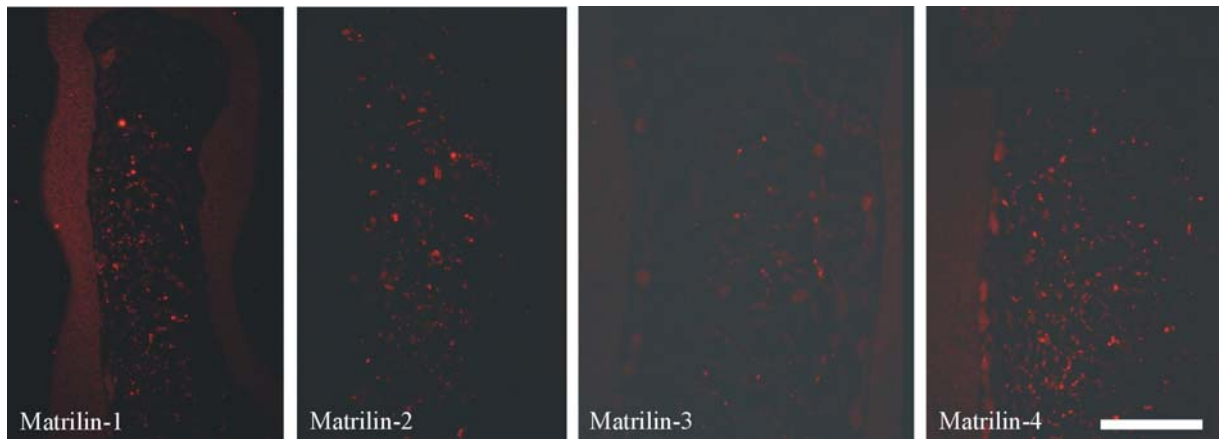


Abb. B 6.15 **Expression von Matrilin-1 bis –4 im kranialen Mesenchym eines 10.25 Tage alten Embryos.** Immunfluoreszenzmikroskopie mit Matrilin-1, -2, -3 und –4 Antikörpern auf einem paraffineingebetteten 10.25 Tage alten Embryo. Der Balken entspricht 200 μm (A, B, D) und 90 μm (C).

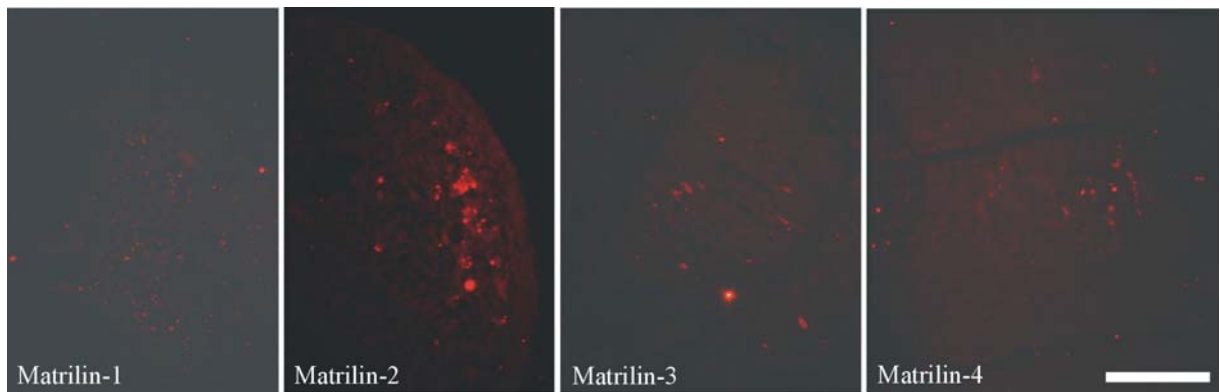


Abb. B 6.16 **Expression von Matrilin-1 bis –4 im Ursegment der Wirbelsäule eines 10.25 Tage alten Embryos.** Immunfluoreszenzmikroskopie mit Matrilin-1, -2, -3 und –4 Antikörpern auf einem paraffineingebetteten 10.25 Tage alten Embryo. Der Balken entspricht 80 μm

Im 14.25 Tage alten Embryo wurden alle Matriline im axialen Skelett und in einigen Schädelknochen nachgewiesen. Weiterhin konnten man alle Matriline im Knorpel des Kehlkopfes detektieren. Matrilin-1, -2 und –4 wurden in der Lunge, im Herzen und im Plexus choroideus gefunden, während Matrilin-3 dort nur schwach detektierbar war.

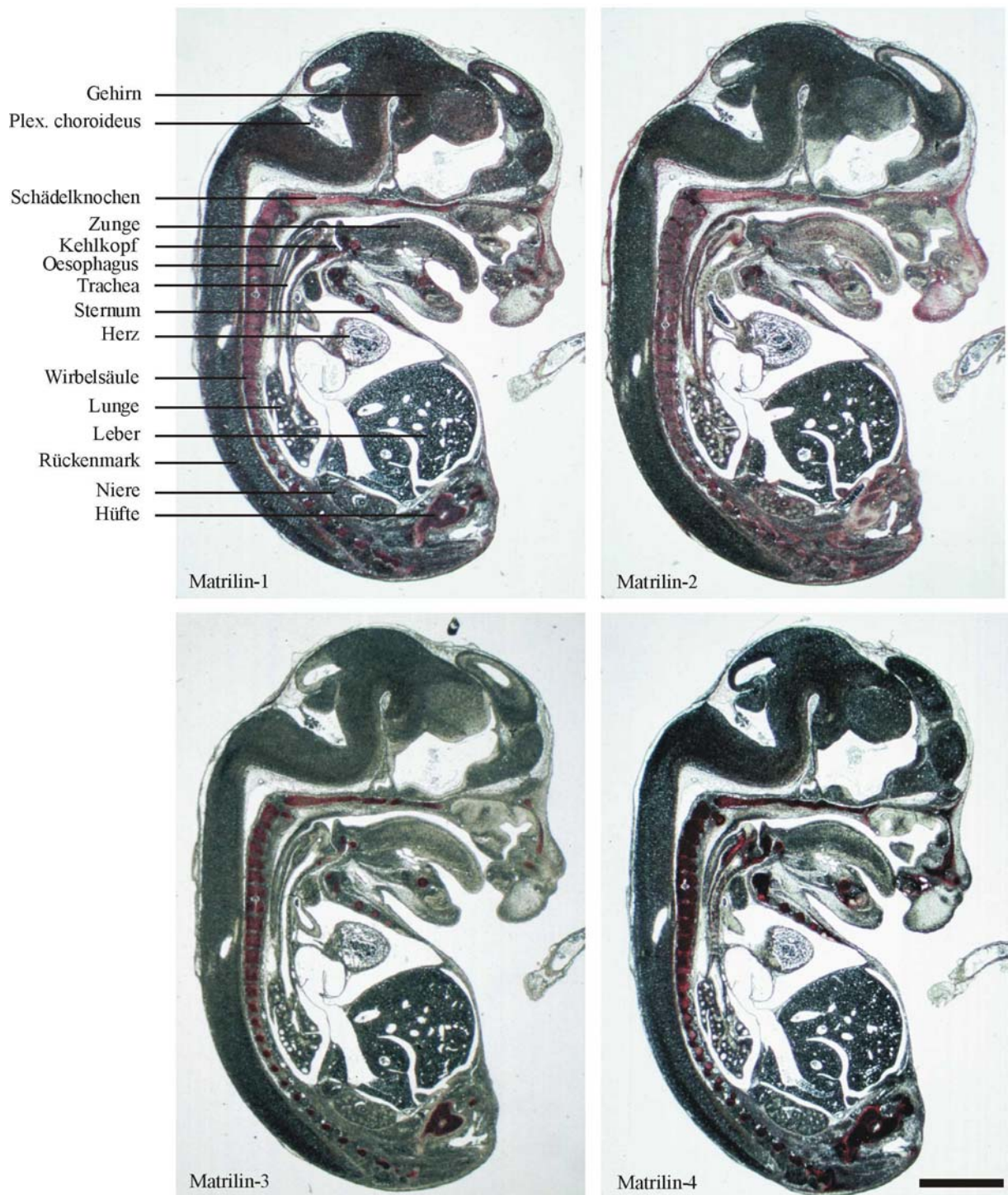


Abb. B 6.17 **Expression von Matrilin-1 bis -4 in einem 14.25 Tage alten Embryo.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten eines 10.25 Tage alten Embryos. Der Balken entspricht 1.6 mm.

Matrilin-1 und -4 konnten zusätzlich im Hirn und im Rückenmark nachgewiesen werden, wohingegen Matrilin-2 in den Meningen exprimiert wurde. Matrilin-1, -3 und -4 zeigten entlang des Schädeldaches eine Färbung der Schädelknochen und eine distinkte Färbung, die

keine morphologische Ähnlichkeit zu Knochen bzw. Knorpel aufwies und vermutlich von den Meningen stammt. Zusätzlich wurde Matrilin-2 in der Aorta, und in den Gefäßen der Leber und der Niere exprimiert, während Matrilin-1 und -4 im Bindegewebe, das die Niere umgibt zu detektieren waren. Weiterhin wurde Matrilin-2 und -4 im Unterkiefer und Matrilin-2 in der Zunge nachgewiesen (Abb. B 6.17).

B 6.4 Skeletale Expression der Matrilin-Familie

Zur Untersuchung der skeletalen Expression von Matrilin-1 bis -4 wurden neugeborene und sechs Wochen alte Mäuse immunhistologisch mit den entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörpern untersucht. Die sechs Wochen alten Mäuse wurden vor der Paraffineinbettung mit 5% HNO₃ entmineralisiert.

Im Knie einer neugeborenen Maus wurden Matrilin-1, -3 und -4 im ruhenden, im proliferierenden und im hypertrophen Knochen exprimiert. Matrilin-2 wurde im proliferierenden und im oberen hypertrophen Knorpel detektiert. Im unteren hypertrophen Knorpel konnten Matrilin-2 und -4 im Gegensatz zu Matrilin-1 und -3 nur schwach nachgewiesen werden. Bis auf Matrilin-3 wurden alle Matriline im Sehnenansatz detektiert (Abb. B 6.18).

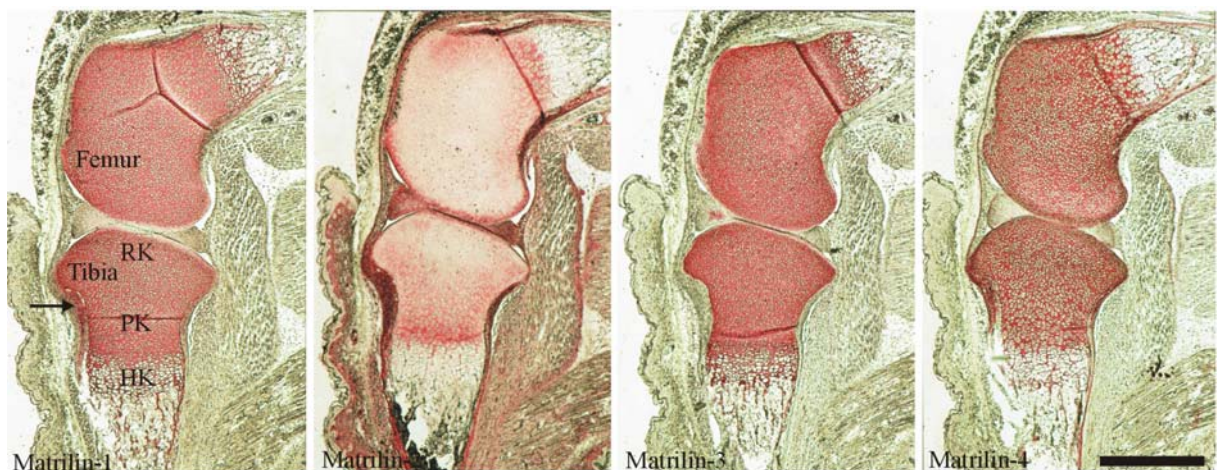


Fig. B 6.18 Expression von Matrilin-1 bis -4 im Knie einer neugeborenen Maus. Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Schnitten. RK: Ruhender Knorpel, PK: proliferierender Knorpel, HK: hypertropher Knorpel, Pfeil: Sehnenansatz. Der Balken entspricht 0.7 mm.

Im Knie einer sechs Wochen alten Maus wurden alle Matriline schwach im peripheren Gelenkknorpel, im Meniskus und Matrilin-1 und -3 zusätzlich im subchondralen Knorpel nachgewiesen. Weiterhin waren Matrilin-1, -3 und -4 in allen Zonen der Wachstumsfuge detektierbar, während Matrilin-2 am stärksten im proliferierenden und hypertrophen Knorpel exprimiert wurde. Matrilin-3 konnte in der Interterritorialmatrix sowie in der Kapsel um Knorpelzelle und Knorpelhof nachgewiesen werden, wohingegen speziell Matrilin-1, aber auch Matrilin-2 und -4 stärker in der Kapsel als in der Interterritorialmatrix zu detektieren waren.

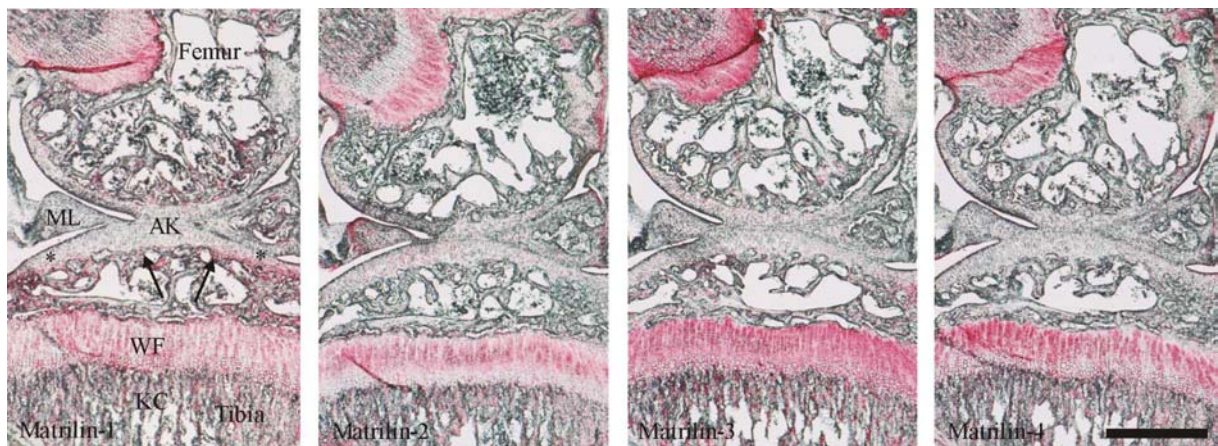


Fig. B 6.19 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Knie einer sechs Wochen alten Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf entmineralisiertem, paraffineingebetteten Gewebe. WF: Wachstumsfuge, AK: artikulärer Knorpel, ML: Meniskus lateralis, KC: Knochen, Pfeil: subartikulärer Knochen, Sternchen: peripheres Gelenk. Der Balken entspricht 0.7 mm.

Im Sternum einer neugeborenen Maus wurden alle Matriline in den Wachstumsfugen des Sternums detektiert. Matrilin-1, -3 und -4 wurden in allen Zonen, Matrilin-2 nur in der hypertrophen Zone gefunden. Auch im Sternum zeigte sich eine stärkere Expression von Matrilin-1, -2 und -4 in der Kapsel als in der Interterritorialmatrix. In den sich bildenden kontinuierlichen Gelenken des Sternums (Synarthrose) und zwischen Sternum und Rippen (Synarthrose) konnte nur Matrilin-2 nachgewiesen werden. Im Perichondrium der Rippen wurden alle Matriline exprimiert. Im Rippenknorpel konnten nur Matrilin-1, -3 und -4 nachgewiesen werden. Im Muskel zwischen den Rippen konnte Matrilin-2 stark und Matrilin-4 schwach nachgewiesen werden. (Abb. B 6.20).

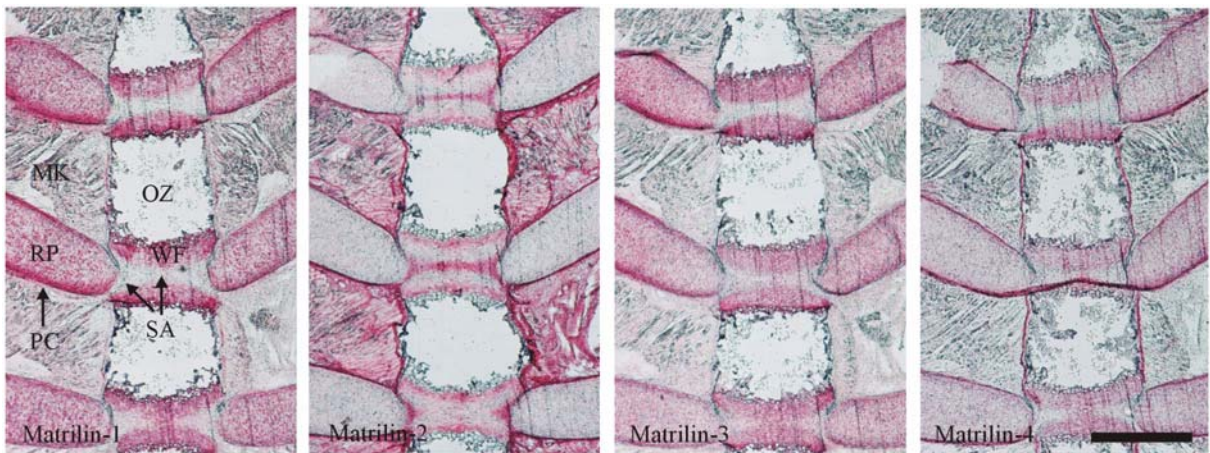


Fig. B 6.20 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Sternum einer neugeborenen Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Geweben. WF: Wachstumsfuge, RP: Rippenknorpel, MK: Muskel, OZ: Ossifikationszentrum, PC: Perichondrium, SA: Synarthrose. Der Balken entspricht 0.7 mm.

Im Sternum einer sechs Wochen alten Maus wurde im Vergleich zur neugeborenen Maus weiterhin eine starke Matrilin-1 Expression im Rippenknorpel und eine schwache Expression in der Wachstumsfuge gefunden. Matrilin-3 zeigte im Vergleich zur neugeborenen Maus weiterhin eine starke Expression in der Wachstumsfuge und eine schwache Expression im Rippenknorpel. Das Expressionsmuster von Matrilin-2 und -4 veränderte sich bei der neugeborenen und der sechs Wochen alten Maus nicht. In den Synchondrosen des Sternums konnten Matrilin-1, -2 und -3 nachgewiesen werden (Abb. B 6.21).

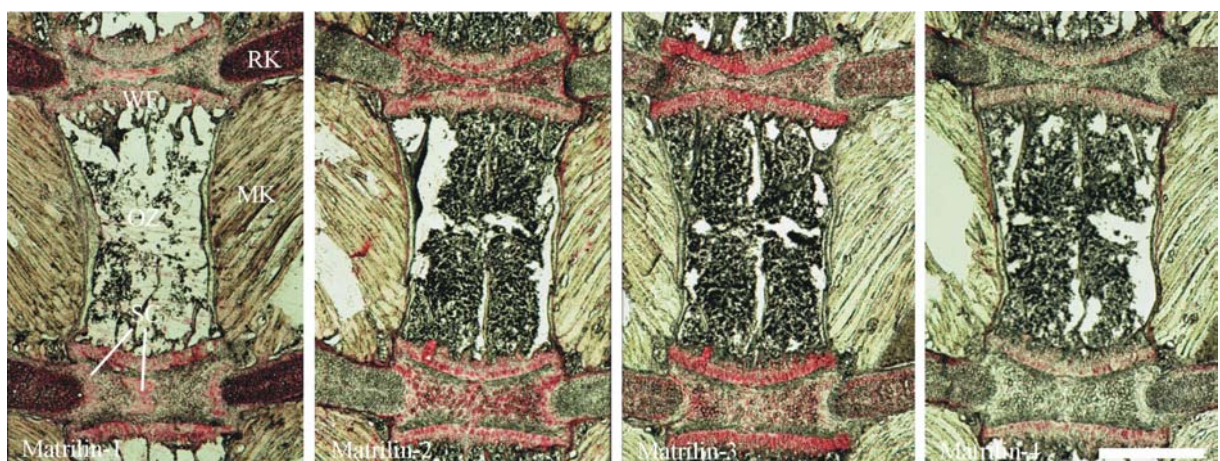


Fig. B 6.21 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Sternum einer sechs Wochen alten Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf entmineralisiertem, paraffineingebettetem Gewebe. WF: Wachstumsfuge, MK: Muskel, SC: Synchondrose, OZ, Ossifikationszentrum, RK: Rippenknorpel. Der Balken entspricht 0.7 mm.

Keines der Matriline konnte in ähnlichen fibrillären Strukturen, die für Matrilin-3 gezeigt wurden (s. Abb. B 6.3), nachgewiesen werden.

Im Schwanz einer neugeborenen Maus wurden die Matriline-1, -3 und -4 in den Wirbelkörpern exprimiert. Matrilin-2 konnte stark im Anulus fibrosus und schwach im Nucleus pulposus und im hypertrophen Knorpel der Wirbelkörper nachgewiesen werden. Matrilin-2 und -4 wurden auch in den Bändern nachgewiesen (Abb. B 6.22).

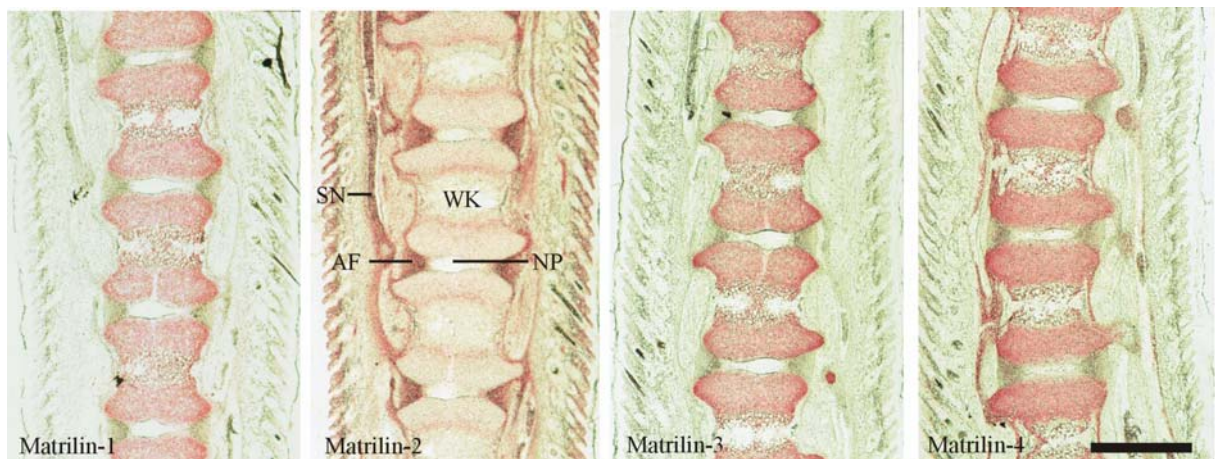


Fig. B 6.22 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Schwanz einer neugeborenen Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Gewebe. WK: Wirbelkörper, SN: Sehne, AF: Anulus fibrosus, NP: Nucleus pulposus. Der Balken entspricht 0.7 mm.

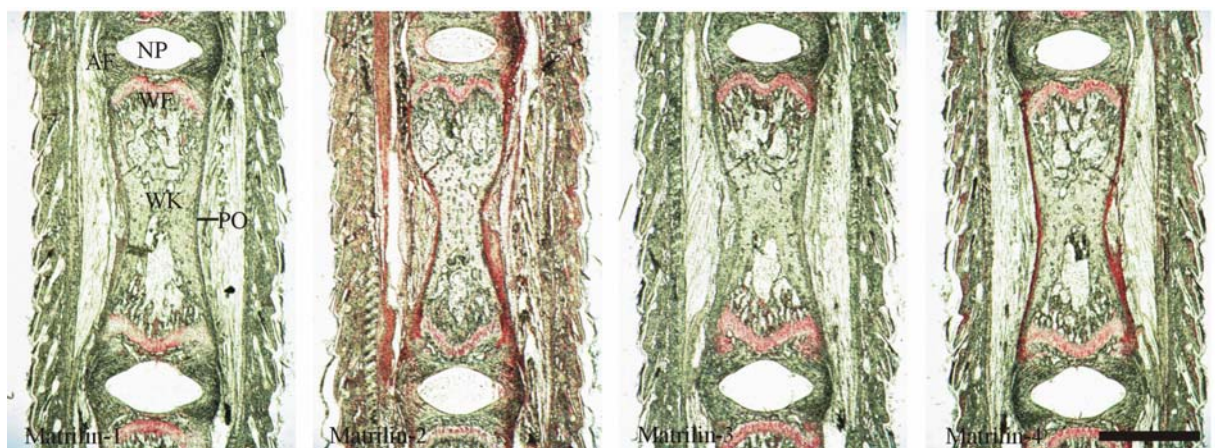


Fig. B 6.23 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Schwanz einer sechs Wochen alten Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf entmineralisiertem, paraffineingebetteten Gewebe. WK: Wirbelkörper, WF: Wachstumsfuge, PO: Periost, AF: Anulus fibrosus, NP: Nucleus pulposus. Der Balken entspricht 0.7 mm.

Im Schwanz einer sechs Wochen alten Maus wurden alle Matrilin in der Wachstumsfuge exprimiert. Alle Matrilin konnten, im Falle von Matrilin-1, -3 und -4 schwach, im Anulus fibrosus und Matrilin-2 zusätzlich im Nucleus pulposus nachgewiesen. Weiterhin zeigten Matrilin-2 und -4 eine starke periostale Expression (Abb. B 6.23).

Im Kopf einer neugeborenen Maus wurden alle Matrilin in den heranreifenden Schädelknochen und Knochen des Nasenraums nachgewiesen (Abb. B 6.24). Matrilin-1 und -4 zeigten eine gleichmäßig starke Färbung. Matrilin-3 konnte stark in den Knochen des Nasenhohlraums, jedoch nur schwach in der Nasenscheidewand detektiert werden. In den Schädelknochen zeigte sich eine Matrilin-3 Expression mit schwankender Intensität. Matrilin-2 konnte nur schwach nachgewiesen werden.

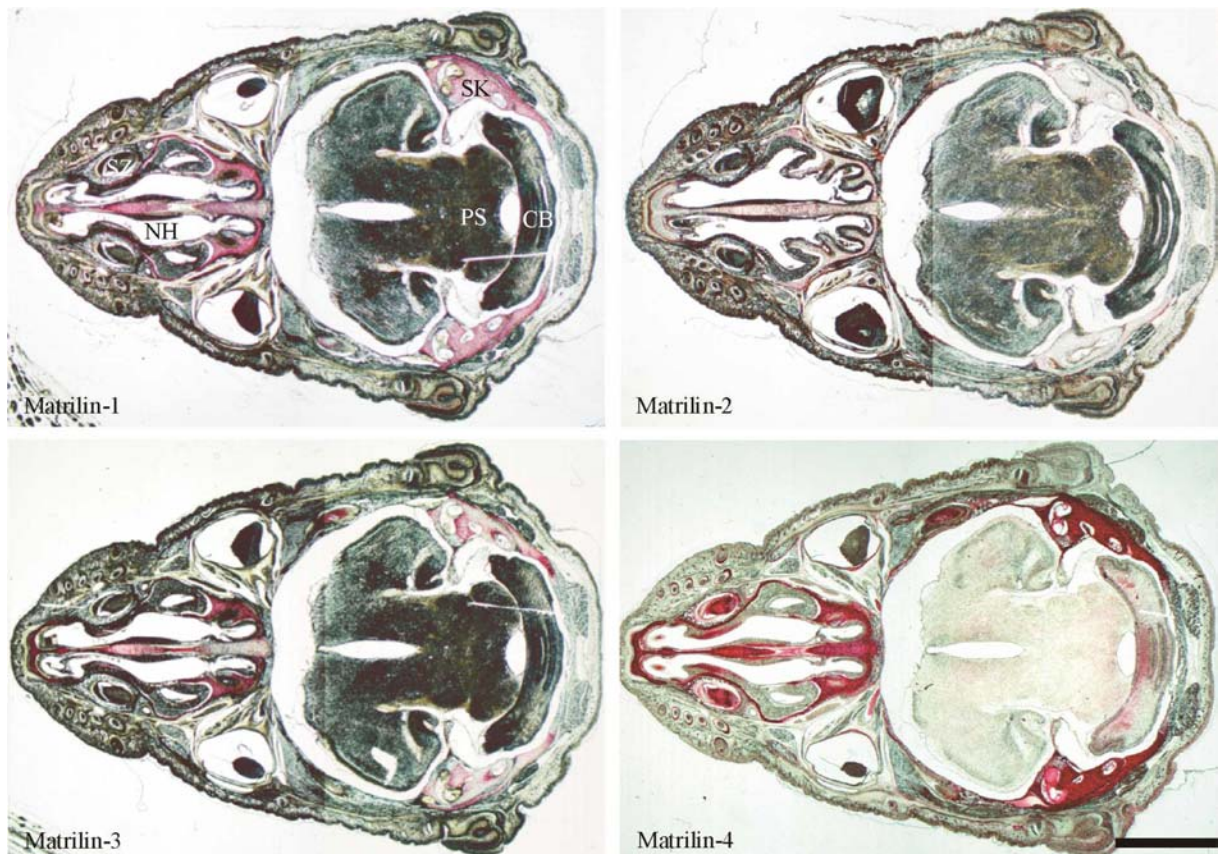


Fig. B 6.24 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Kopf einer neugeborenen Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Gewebe. NH: Nasenhohlraum, SK: Schädelknochen, SZ: Schneidezahn, PS: Pons, CB: Cerebellum. Der Balken entspricht 3 mm.

B 6.5 Expression der Matriline im Gelenk

Im Kniegelenk einer neugeborenen Maus wurde Matrilin-4 in der Gelenkoberfläche detektiert. Matrilin-2 zeigte in der Gelenkoberfläche eine schwache Expression, Matrilin-1 und -3 konnten dort nicht detektiert werden (Abb. B 6.25).

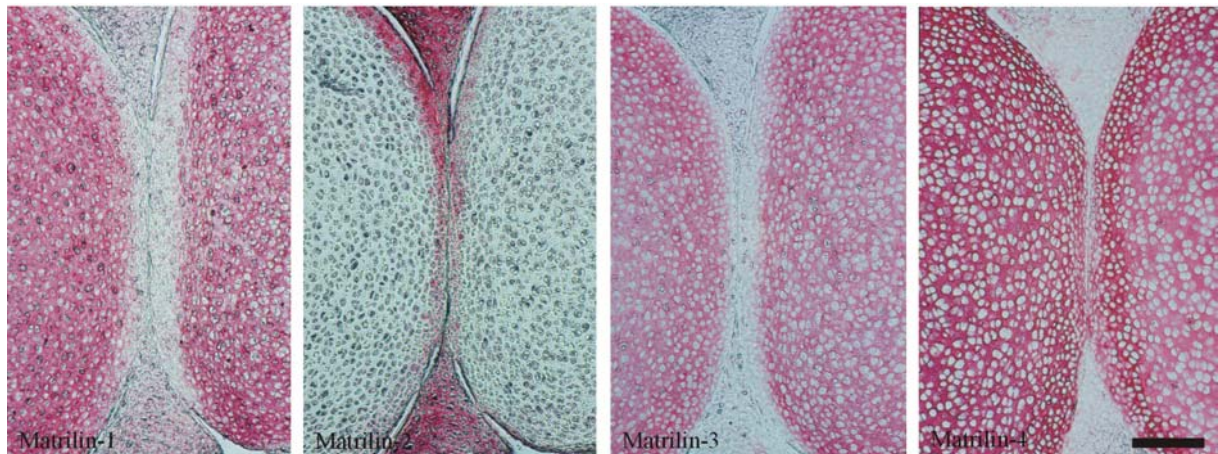


Fig. B 6.25 **Expression von Matrilin-1 bis -4 im Kniegelenk einer neugeborenen Maus.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Schnitten. Der Balken entspricht 0.1 mm.

Um einen detaillierten Eindruck über die Verteilung der Matriline im Gelenk zu erhalten wurden Doppelimmunfluoreszmarkierungen auf verschiedenen Gelenken durchgeführt. Deutlich zu erkennen war im Gegensatz zu Matrilin-1 und -3 die Expression von Matrilin-4 im Gelenk bis zum Gelenkspalt. Die Expression von Matrilin-1 und -3 war sich sehr ähnlich. Zusätzlich wurden, neben einer breiten Kolo-kalisation von Matrilin-1 und -3, Bereiche gefunden, in denen nur Matrilin-3 exprimiert wurde. Diese Bereiche umrandeten die Bereiche der Kolo-kalisation und besaßen eine Ausdehnung von wenigen Zelldurchmessern (Abb. B 6.26).

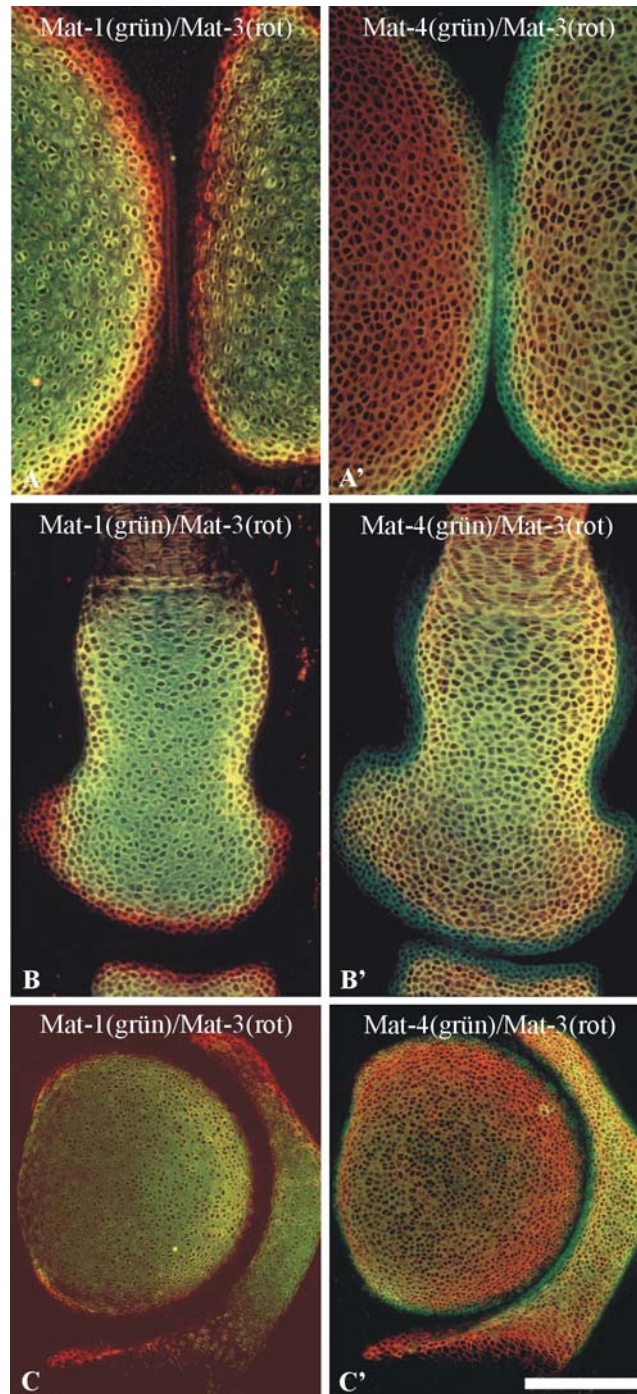


Fig. B 6.26 **Expression von Matrilin-1, -3 und -4 verschiedenen Gelenken neugeborener Mäuse.** Doppelimmunfluoreszenz Färbung mit Matrilin-1, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten. A; A': Kniegelenk, B, B': Fingergelenk, C, C': Hüftgelenk. Der Balken entspricht 0.2 mm (A, A', B, B') und 0.4 mm (C, C').

B 6.6 Expression der Matriline in humanem, gesundem und arthrotischem Gelenkknorpel

Arthrose (Osteoarthrose) ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die auf einer primären (spontanen) oder sekundären (postinfektiösen, posttraumatischen, metabolischen) Beeinträchtigung des Chondrozytenstoffwechsels beruht. Morphologisch wird die Knorpelschädigung in vier Stadien eingeteilt, angefangen bei einer leichten Fibrillation (Stadium 1), Knorpelabrieb (Stadium 2), Freilegung der subchondralen Knochenplatte (Stadium 3), bis hin zur Eröffnung des spongiösen Markraums (Stadium 4). Der pathologische Verlauf einer entzündlichen Gelenkerkrankung (Arthritis) ist dem Verlauf der Arthrose ähnlich, jedoch beginnt der pathologische Prozess in der Synovialschicht der Gelenkkapsel.

Artikulärer Knorpel kann entsprechend der Orientierung der Kollagenfasern erstens in eine Tangentialfaserzone, in der die Kollagenfasern parallel zur Gelenkoberfläche verlaufen, zweitens in eine Übergangszone zwischen Tangentialfaser- und Radiärzone und drittens in eine Radiärzone eingeteilt werden.

Die Expression der Matriline in humanen, einerseits gesunden und andererseits arthrotischen Gelenken wurde immunhistologisch auf paraffineingebetteten Schnitten und mittels Immunoblot (s. Kapitel B 5) untersucht.

Immunhistologisch konnten alle Matriline, wenn auch zum Teil nur schwach, im gesunden Gelenkknorpel detektiert werden. Matrilin-1 zeigte eine etwas erhöhte Expression im arthrotischen Gelenk im Vergleich zum gesunden Gelenk. Im Falle von Matrilin-2 war kein signifikanter Unterschied im Expressionsverhalten zwischen gesundem und arthrotischem Gewebe zu detektieren. Die auffälligste Änderung zwischen gesundem und arthrotischem Gewebe zeigte Matrilin-3. Im arthrotischen Gewebe konnte eine verstärkte Matrilin-3 Expression festgestellt werden. Im Falle von Matrilin-4 konnte keine Änderung des Expressionsverhaltens nachgewiesen werden (Abb. B 6.27).

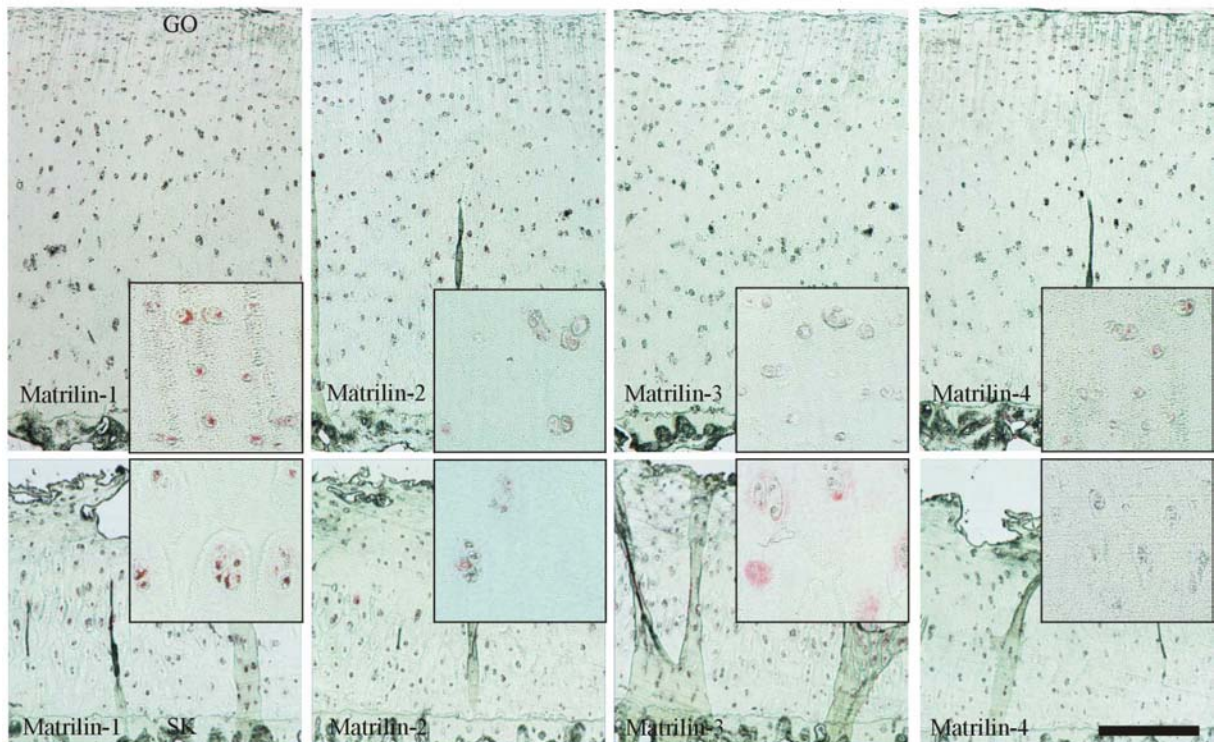


Fig. B 6.27 **Expression von Matrilin-1 bis -4 in humanem, gesundem und arthrotischem Gelenkknorpel.** Alkalische Phosphatasefärbung mit Matrilin-1, -2, -3 und -4 Antikörpern auf paraffineingebetteten Schnitten. Obere Reihe gesund, untere Reihe arthrotisch, mit den entsprechenden Vergrößerungen. GO: Gelenkoberfläche, SK: Subartikulärer Knorpel. Der Balken entspricht 0,7 mm in den Übersichten und 0,15 mm in den Vergrößerungen.

Eine verstärkte Expression von Matrilin-3 im humanen, arthrotischen Gelenkknorpel konnte mittels quantitativer PCR bestätigt werden (Pullig et al., Manuskript in Vorbereitung). Eine verstärkte Expression von Matrilin-1 im arthrotischen Knorpel wurde bereits beschrieben (Okimura et al., 1997).

B 7 Supramolekulare Assemblierung der Matrilin

Für Matrilin-1 und -2 konnte gezeigt werden, dass endogenes Matrilin-1 in Hühnerchondrozyten (Winterbottom et al., 1992, Chen et al., 1995) bzw. Matrilin-2 in glatten Muskelzellen der Ratte (Piecha et al., 1999) Bestandteil eines fibrillären, extrazellulären Netzwerks sind. Zur Untersuchung, ob auch Matrilin-3 und -4 diese Eigenschaft besitzen, wurden verschiedene Zelllinien auf endogene Matrilin-3 und -4 Expression untersucht. Im folgenden wird die supramolekulare Assemblierung von Matrilin-3 im extrazellulären Netzwerk von Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen (Abb. B 7.1) beschrieben und mit der Assemblierung von Matrilin-1 verglichen. Anschließend wird die Untersuchung der Assemblierung von Matrilin-4 in primären embryonalen Mausfibroblasten (EmFi) sowie der morphologische Vergleich mit der Assemblierung von Matrilin-2 beschrieben.

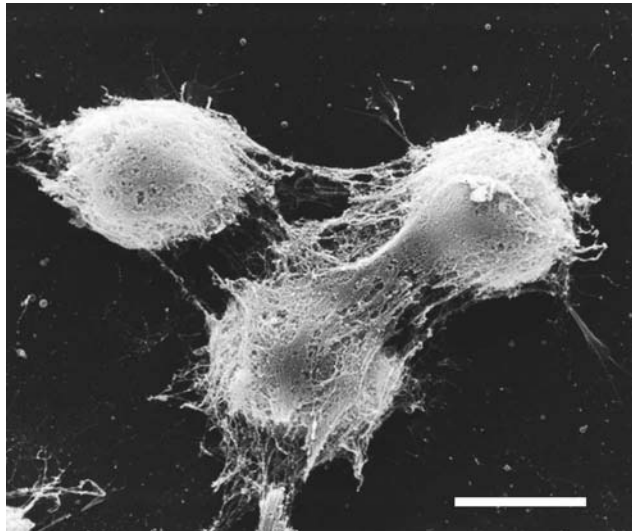


Abb. B 7.1 **Scanning Elektronenmikroskopie von RCS-Zellen.** Der Balken entspricht 10 μm (Aufnahme von M. Mörgelin).

B 7.1 Supramolekulare Assemblierung von Matrilin-1 und -3

Zur Untersuchung des extrazellulären Netzwerks von RCS-Zellen wurden die Zellen auf geeigneten Objektträgern ausplattiert und mit und ohne Zusatz von Ascorbat kultiviert. Die Zugabe von Ascorbat, eines Kofaktors der Prolyl-Hydroxylase, dient der Ausbildung eines Kollagen II-Netzwerkes. Die Untersuchung der extrazellulären Matrix erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Wurden die Zellen mit Ascorbat kultiviert, konnte Matrilin-3 in einem stark vernetzten, ausgedehnten, extrazellulären Netzwerk detektiert werden. Ohne Ascorbat wurde Matrilin-3 in weniger ausgedehnten Fibrillen zwischen einzelnen Zellen nachgewiesen (Abb. B 7.2).

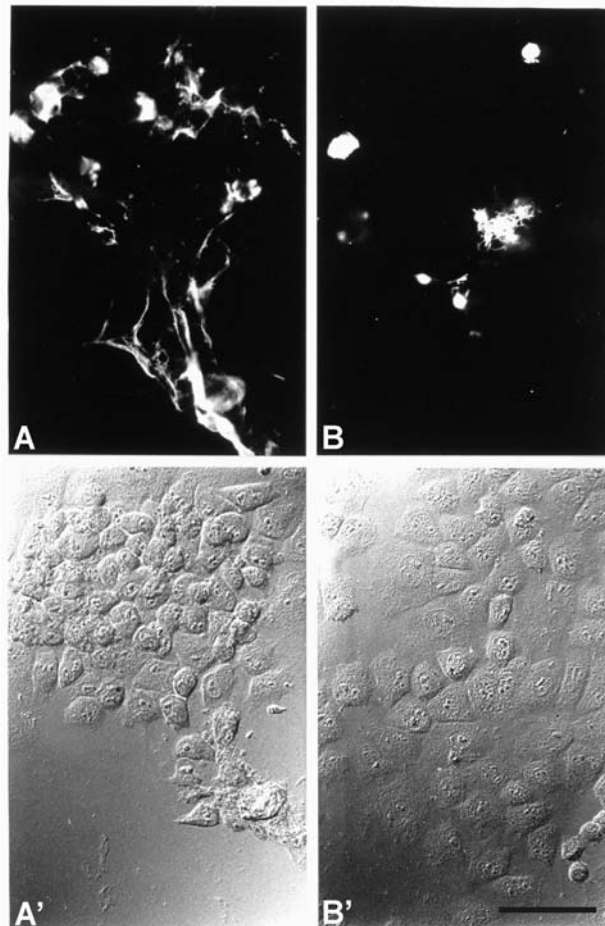


Abb. B 7.2 **Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Matrilin-3-haltigen Filamenten in der extrazellulären Matrix von RCS-Zellen.** RCS-Zellen wurden in der Gegenwart (A, A') oder Abwesenheit (B, B') von Ascorbat kultiviert und mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-3, gefolgt von einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs, untersucht. Der Balken entspricht 40 μ m.

Bei stärkerer Vergrößerung des Netzwerks ohne Ascorbat konnte Matrilin-3 an der Zelloberfläche sowie in Fibrillen zwischen zwei Zellen detektiert werden, die sich gerade geteilt haben (Abb. B 7.3).

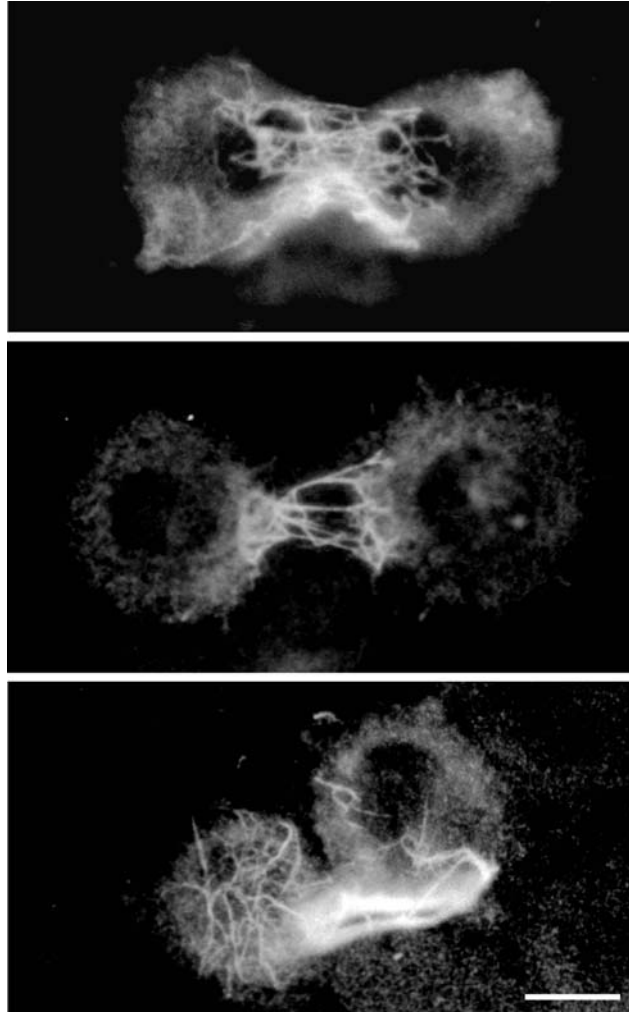


Abb. B 7.3 **Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Kollagen II-unabhängigen Matrilin-3-haltigen Filamenten.** RCS-Zellen wurden ohne Ascorbat kultiviert und mit affinitätsgereinigtem Antikörper gegen Matrilin-3, gefolgt von einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs, untersucht. Der Balken entspricht 5 μ m.

Zum Vergleich wurden entsprechende Untersuchungen mit einem Antiserum gegen Matrilin-1 durchgeführt (Abb. B 7.4). Auch Matrilin-1 wurde in einem ausgedehnten, Kollagen II-haltigen extrazellulären Netzwerk sowie in einem Kollagen II-unabhängigen Netzwerk, zwischen zwei Zellen nachgewiesen.

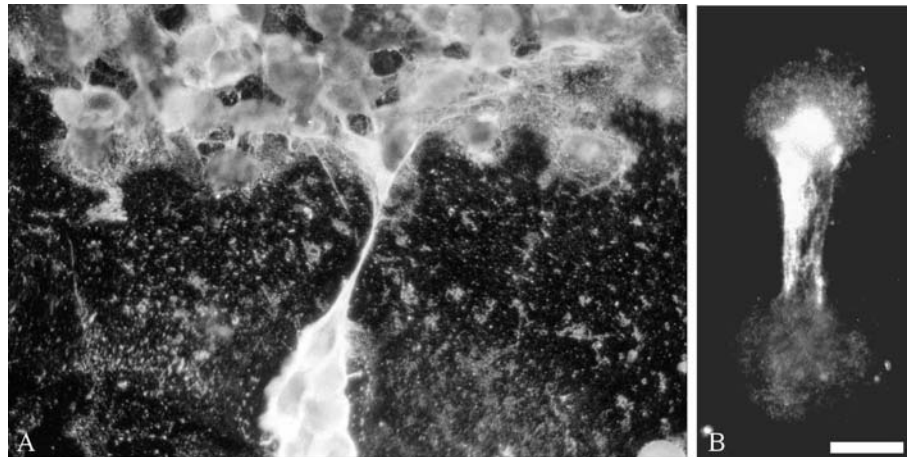


Abb. B 7.4 **Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Matrilin-1-haltigen Filamenten in der extrazellulären Matrix von RCS-Zellen.** RCS-Zellen wurden in der Gegenwart (A) oder Abwesenheit (B) von Ascorbat kultiviert und mit Antiserum gegen Matrilin-1, gefolgt von einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs, untersucht. Der Balken entspricht 20 µm in A und 5 µm in B.

B 7.2 Supramolekulare Assemblierung von Matrilin-2 und -4

Zur Untersuchung der extrazellulären Assemblierung von Matrilin-4 wurden primäre embryonale Mausfibroblasten verwendet, auf geeigneten Objektträgern ausplattiert und mit Ascorbat kultiviert.

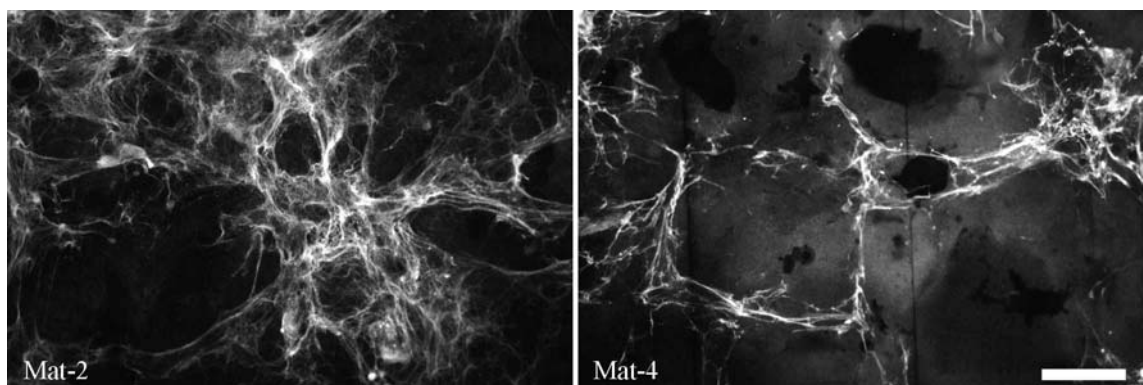


Abb. B 7.5 **Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Matrilin-2- und Matrilin-4-haltigen Filamenten in der extrazellulären Matrix von primären, embryonalen Fibroblasten (EmFi).** Embryonale Fibroblasten wurden mit Ascorbat kultiviert und mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen Matrilin-2 und -4, gefolgt von einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs, untersucht. Der Balken entspricht 40 µm bei Mat-2 und 20 µm bei Mat-4.

Matrilin-4 wurde in einem stark verzweigten, ausgedehnten Netzwerk detektiert (Abb. B 7.5). Zum Vergleich wurden entsprechende Untersuchungen auch mit Matrilin-2 Antikörpern durchgeführt (Abb. B 7.5).

Auch Matrilin-2 konnte in einem stark ausgedehnten, extrazellulären Netzwerk der embryonalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Morphologisch lies sich das Matrilin-2 und Matrilin-4 Netzwerk nicht voneinander unterscheiden.

B 8 Kolokalisationsstudien von Matrilin-1 und –3 im extrazellulären Netzwerk von RCS-Zellen

Das extrazelluläre Netzwerk von Rattenchondrosarkom (RCS)-Zellen (Abb. B 8.1) wurde mittels Doppelimmunfluoreszenztechnik auf eine Kolokalisation von Matrilin-1 sowie Matrilin-3 mit anderen Hauptbestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) untersucht. Im folgenden werden erst die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen mit Antikörpern gegen Matrilin-1 und –3 beschrieben, anschließend wird repräsentativ die Kolokalisation von Matrilin-3 und Kollagen II, Kollagen VI, Aggrekan, Biglykan, Decorin, COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) und Fibronektin gezeigt.

Weiterhin werden Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen dargestellt, bei denen die RCS-Zellen zuvor ohne Ascorbat kultiviert wurden.

Alle folgenden Untersuchungen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt.

B 8.1 Kolokalisationsstudien von Matrilin-1 und Matrilin-3

Die folgenden Untersuchungen wurden mit RCS-Zellen durchgeführt, welche auf adhäsiven Objektträgern ausplattiert und unter Zusatz von Ascorbat kultiviert wurden.

Mittels Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen konnte eine Kolokalisation von Matrilin-1 und –3 in der extrazellulären Matrix von RCS-Zellen gezeigt werden. Matrilin-1 und Matrilin-3 konnten auf lichtmikroskopischer Ebene nebeneinander im fibrillären Netzwerk der RCS-Zellen nachgewiesen werden (Abb. B 8.1).

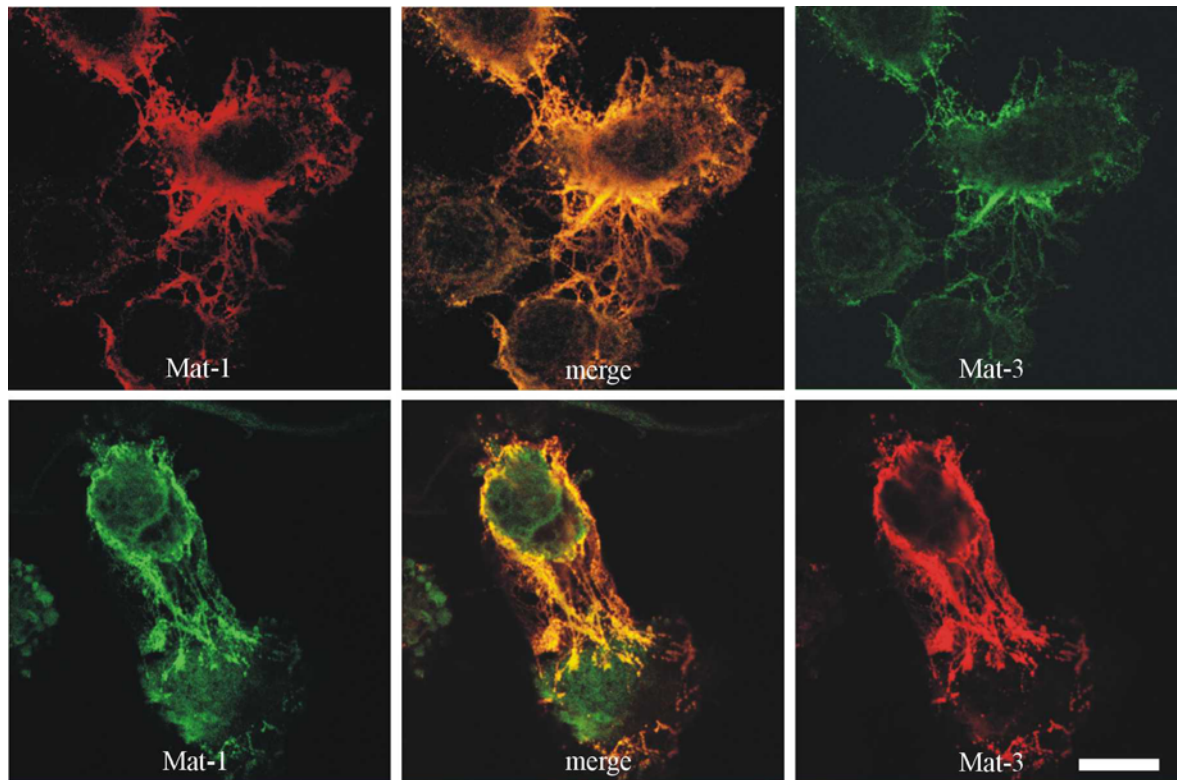


Abb. B 8.1 **Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie der extrazellulären Matrix von RCS-Zellen mit affinitätsgereinigtem Matrilin-1 und -3 Antikörper.** RCS-Zellen wurden in der Gegenwart von Ascorbat kultiviert. In der oberen Reihe wurde mit affinitätsgereinigtem Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-1 und affinitätsgereinigtem Kaninchen Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert. In der unteren Reihe wurde mit affinitätsgereinigtem Kaninchen Antikörper gegen Matrilin-1 und affinitätsgereinigtem Hühnchen Antikörper gegen Matrilin-3 inkubiert. Detektion erfolgte mit einem CyTM2-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs und einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Hühnchen IgGs. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Lasermikroskop System der Firma Leica. Der Balken entspricht 15 μ m in der oberen und 10 μ m in der unteren Reihe.

B 8.2 Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit anderen Bestandteilen der ECM

Da Matrilin-1 und -3 in der extrazellulären Matrix der RCS-Zellen kolokalisiert sind, werden im folgenden nur die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von Matrilin-3 und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix dargestellt. Entsprechende Untersuchungen wurden auch für Matrilin-1 durchgeführt und ergaben identische Ergebnisse.

B 8.2.1 Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronektin und COMP

Kollagen II zeigte eine starke Kolokalisation mit Matrilin-3 (Abb. B 8.2). Auch für Kollagen VI und Matrilin-3 konnte eine Kolokalisation gezeigt werden, die allerdings nicht so vollkommen zu sein schien, wie die von Kollagen II und Matrilin-3 (Abb. B 8.2).

Das Netzwerk von Fibronektin zeigte eine zum Kollagenetzwerk unterschiedliche Morphologie und eine geringe Kolokalisation mit Matrilin-3 (Abb. B 8.2). COMP und Matrilin-3 zeigten im extrazellulären Netzwerk der RCS-Zellen eine Kolokalisation. Weiterhin konnte eine intrazelluläre Retention von COMP detektiert werden (Abb. B 8.2).

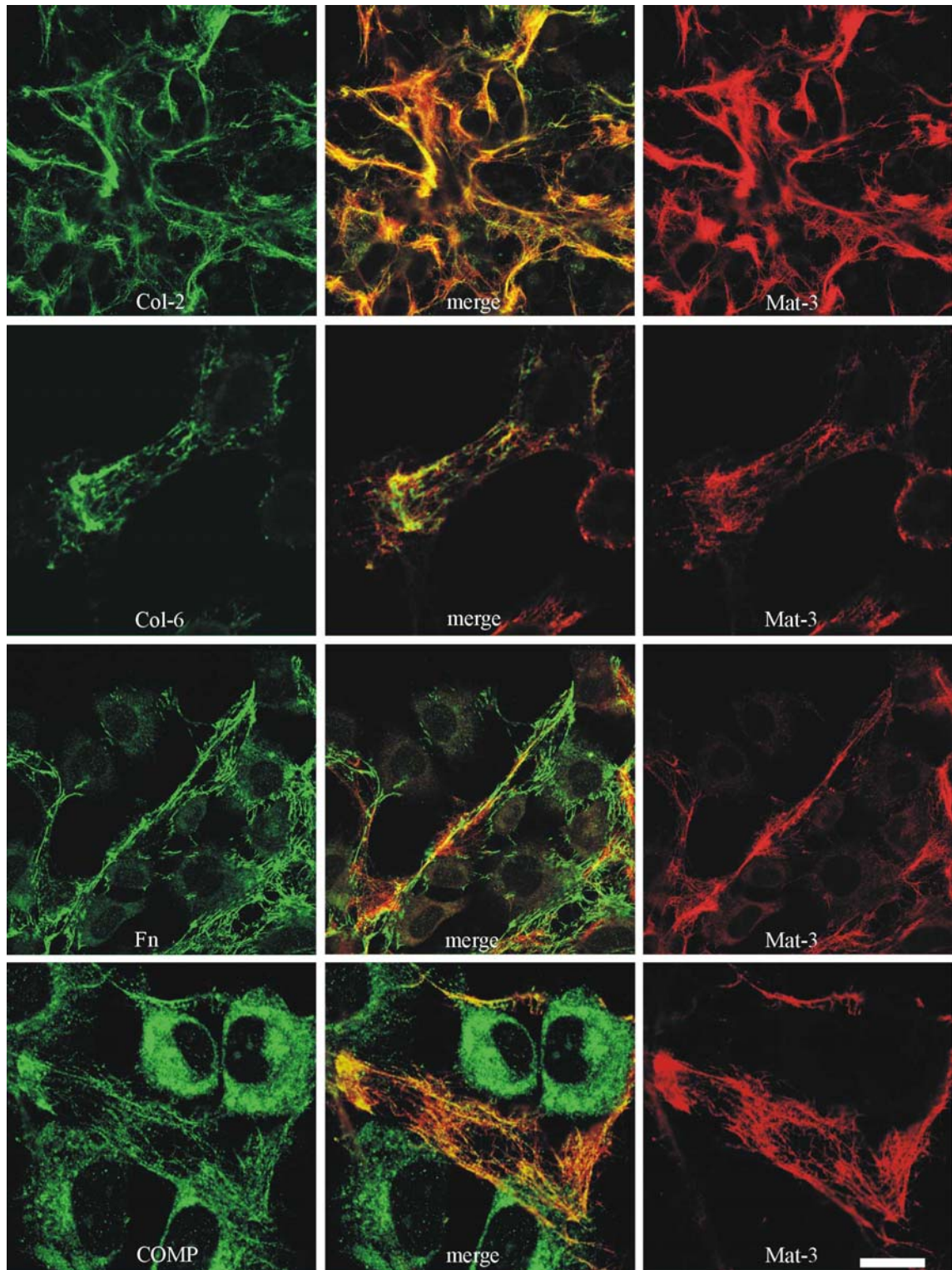


Abb. B 8.2 **Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von RCS-Zellen mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronektin, COMP und Matrilin-3 Antikörper.** RCS-Zellen wurden in Gegenwart von Ascorbat kultiviert. Detektion erfolgte mit einem CyTM2-konjugierten Antikörper gegen Maus bzw. Kaninchen IgGs und einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Hühnchen IgGs. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Lasermikroskop System der Firma Leica. Der Balken entspricht 30 μ m bei Kollagen II/Matrilin-3, 20 μ m bei Fibronektin/Matrilin-3 und 10 μ m bei Kollagen VI/Matrilin-3 und COMP/Matrilin-3.

B 8.2.2 Kolokalisationsstudien von Matrilin-3 mit Aggrekan, Biglykan und Decorin

Doppelimmunfluoreszenz-Markierungen zeigten eine Kolokalisation von Aggrekan und Matrilin-3 im extrazellulären Netzwerk der RCS-Zellen. An der Zellperipherie endete die Kolokalisation und es konnte nur Aggrekan detektiert werden (Abb. B 8.3). Auch für die kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglykan und Decorin wurde eine Kolokalisation im extrazellulären Netzwerk gefunden, die an der Zellperipherie endete (Abb. B 8.3).

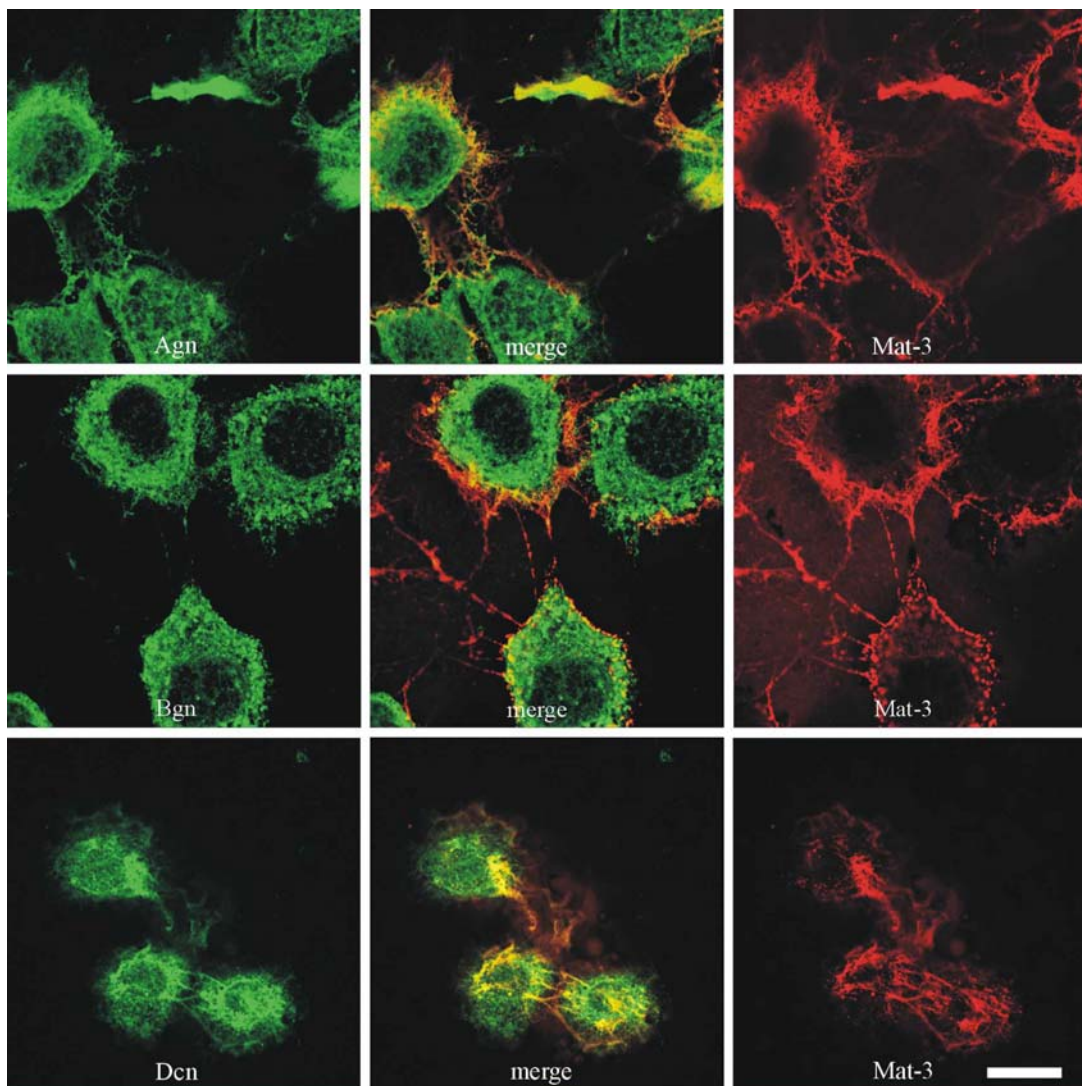


Abb. B 8.3 **Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von RCS-Zellen mit Aggrekan, Biglykan, Decorin und Matrilin-3 Antikörper.** RCS-Zellen wurden in Gegenwart von Ascorbat kultiviert. Detektion erfolgte mit einem CyTM2-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs und einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Hühner IgGs. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Lasermikroskop System der Firma Leica. Der Balken entspricht 7 μ m bei Aggrekan/Matrilin-3 und Biglykan/Matrilin-3 und 10 μ m bei Decorin/Matrilin-3.

B 8.3 Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen, extrazellulären Netzwerk von RCS-Zellen

Die folgenden Untersuchungen fanden mit RCS-Zellen statt, die wie oben beschrieben, jedoch ohne Zusatz von Ascorbat kultiviert wurden. Unter diesen Umständen findet keine Kollagen II Sekretion statt, und das Kollagen II verbleibt intrazellulär (Abb. B 8.4).

B 8.3.1 Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen Netzwerk von RCS-Zellen von Matrilin-3 mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronectin und Matrilin-1

Ein Einfluß des fehlenden Kollagen II-Netzwerk auf das Matrilin-3-Netzwerk ist deutlich zu erkennen. Während Kollagen II intrazellulär verbleibt, erkennt man ein extrazelluläres Kollagen II-unabhängiges Matrilin-3 Netzwerk (Abb. B 8.4). Auch das Kollagen VI-Netzwerk ist deutlich vermindert und weniger ausgedehnt. Weiterhin konnte ein Kollagen II-unabhängiges Kollagen VI-Netzwerk mit und ohne Matrilin-3 detektiert werden (Abb. B 8.4). Das Netzwerk von Fibronectin scheint noch am wenigsten beeinflusst zu sein. Auch hier konnte nur selten eine Kolokalisation mit Matrilin-3 gefunden werden (Abb. B 8.4). Auch im nicht Kollagen II-haltigen Netzwerk konnte eine Kolokalisation von Matrilin-1 und -3 gezeigt werden (Abb. B 8.4). Bei starker Vergrößerung lies sich eine räumlich getrennte Verteilung von Matrilin-1 und -3 innerhalb der Fibrillen vermuten (Abb. B 8.4).

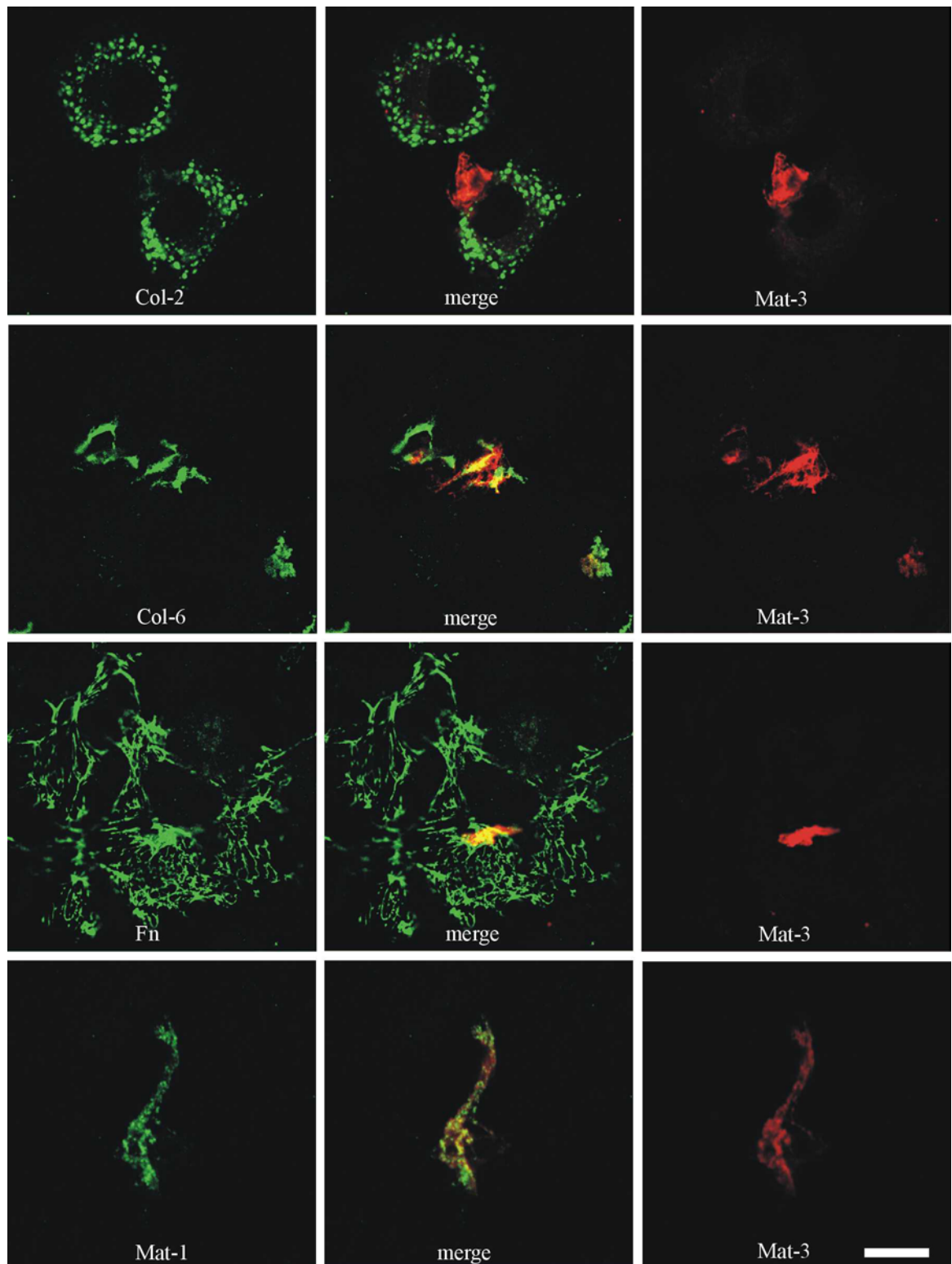


Abb. B 8.4 **Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von RCS-Zellen mit Kollagen II, Kollagen VI, Fibronectin, Matrilin-1 und Matrilin-3 Antikörper.** RCS-Zellen wurden in der Gegenwart von Ascorbat kultiviert. Detektion erfolgte mit einem CyTM2-konjugierten Antikörper gegen Maus bzw. Kaninchen IgGs und einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Hühnchen IgGs. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Lasermikroskop System der Firma Leica. Der Balken entspricht 7 μ m bei Kollagen II/Matrilin-3, 30 μ m bei Kollagen VI/Matrilin-3 und Fibronectin/Matrilin-3 und 3 μ m bei Matrilin-1/Matrilin-3.

B 8.3.2 Kolokalisationsstudien im Kollagen II-unabhängigen Netzwerk von RCS-Zellen von Matrilin-3 mit Aggrekan und Biglykan

Auch das extrazelluläre Netzwerk von Aggrekan scheint vermindert, jedoch nicht in so starkem Maße wie von Kollagen VI. Die perizelluläre Verteilung von Aggrekan scheint unbeeinflusst. Obwohl das Aggrekan Netzwerk noch vorhanden ist, konnten nur an wenigen Stellen eine Kolokalisation mit Matrilin-3 detektiert werden (Abb. B 8.5).

Auch das Netzwerk von Biglykan scheint perizellulär weniger, extrazellulär stärker beeinflusst zu sein. Auch hier sind nur wenige Bereiche mit Matrilin-3 zu erkennen (Abb. B 8.5).

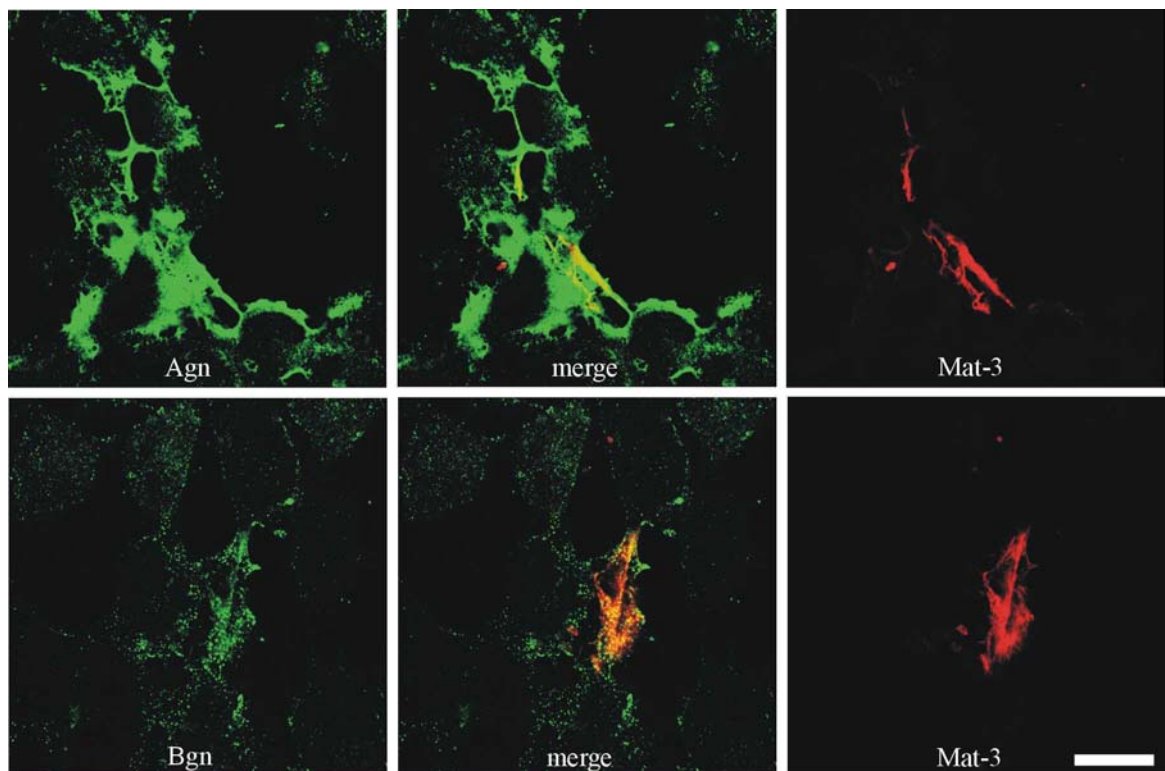


Abb. B 8.5 **Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von RCS-Zellen mit Aggrekan, Biglykan und Matrilin-3 Antikörper.** RCS-Zellen wurden in der Gegenwart von Ascorbat kultiviert. Detektion erfolgte mit einem CyTM2-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs und einem CyTM3-konjugierten Antikörper gegen Hühnchen IgGs. Die Aufnahmen erfolgten an einem konfokalen Lasermikroskop System der Firma Leica. Der Balken entspricht 15 µm bei Aggrekan/Matrilin-3 und 10 µm bei Biglykan/Matrilin-3.

C DISKUSSION

C 1 Rekombinante Expression, Reinigung und Antikörpergeneration

Zur Charakterisierung von Matrilin-3 und -4 auf Proteinebene wurden diese in einem eukaryotischen Expressionssystem exprimiert. Der Vorteil eines eukaryotischen Expressionssystems liegt in der Ausbildung posttranslationaler Modifikationen im endoplasmatischem Retikulum und im Golgi Apparat. Sowohl Matrilin-3 als auch Matrilin-4 besitzen potentielle N- und O-Glykosylierungsstellen (Wagener et al., 1997; Wagener et al., 1998) sowie Cysteinreste in den EGF- und vWFA-ähnlichen Domänen und vor der Coiled-Coil Domäne, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind.

Die N-terminale His₆-Myc-Markierung wie auch die C-terminale StrepII-Markierung ermöglichten eine Reinigung über eine Ni-NTA- bzw. eine Streptactin-Affinitätssäule, ohne dass weitere Reinigungsschritte notwendig waren. Der Vorteil der Affinitätsreinigungen, im Gegensatz zur Verwendung verschiedener herkömmlicher Chromatographie-Methoden, liegt in der Effektivität und in der Zeitersparnis. Da die C-terminale Markierung direkt auf die Coiled-Coil Domäne folgt, musste ein Einfluß der Markierung auf die Oligomerisierung von Matrilin-4 ausgeschlossen werden. Ein Vergleich des Bandenmusters von N- und C-terminal markiertem Matrilin-4 in der SDS-PAGE, zeigte keinen Unterschied in der Oligomerisierung. Zur Immunisierung eines Kaninchens wurde N-terminal His₆-Myc-markiertes Matrilin-4 verwendet und mit C-terminal StrepII-markiertem Matrilin-4 affinitätsgereinigt. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Markierungen zur Immunisierung und Affinitätsreinigung, resultierte ein matrilin-4-spezifischer Antikörper ohne Reaktivität gegen die Markierungen.

Alle Matriline besitzen den gleichen modulären Aufbau und die Homologie zwischen den vWFA- und EGF-ähnlichen Domänen liegt zwischen 40-60%. Eine Kreuzreaktivität der affinitätsgereinigten Antikörper konnte jedoch im Immunoblot ausgeschlossen werden.

C 2 Proteolytische Prozessierung der Matriline

Rekombinant exprimiertes Matrilin-2 (Piecha et al., 1999), -3 (Abb. B 4.4) und -4 (Abb. B 4.1) zeigten in der SDS-PAGE heterogene Bandenmuster, welche unterschiedliche oligomere

Formen des jeweiligen Matrilins vermuten ließen. Mittels Elektronenmikroskopie konnte für rekombinantes Matrilin-2 (Piecha et al., 1999) und -3 (Klatt et al., 2000) Moleküle vom Monomer bis zum Tetramer, im Falle von Matrilin-4 (Klatt et al., 2001), Moleküle vom Monomer bis zum Trimer detektiert werden. Das Vorkommen unterschiedlicher oligomerer Formen konnte zum einen die Konsequenz einer unvollständigen Oligomerisierung der Coiled-Coil Domäne sein, zum anderen durch eine proteolytische Prozessierung nahe der Coiled-Coil Domäne nach Oligomerisierung erfolgen. Wegen der zu geringen Auflösung ist eine Unterscheidung mittels Elektronenmikroskopie nicht möglich.

SDS-PAGE mit Überstand von Zellen die rekombinantes Matrilin-4 sezernieren und anschließende Untersuchungen mittels Immunoblot mit einem Matrilin-4 und einem Myc-Antikörper, zeigten die Existenz zweier unterschiedlicher monomerer Formen von Matrilin-4 (M und M-CC; Nomenklatur s. Anhang I und Abb. B 4.3), welche beide einen intakten N-Terminus besaßen und gaben somit erste Hinweise auf eine C-terminale proteolytische Prozessierung von Matrilin-4. Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten den Verdacht einer C-terminalen Prozessierung. Weiterhin konnte mittels Edman-Sequenzierung der trimeren Coiled-Coil Domäne eine Spaltstelle hinter dem Glutaminsäurerest E⁵⁷¹ identifiziert werden, der sich zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne befindet. Bei den Glutaminsäureresten E⁵⁷⁰ und E⁵⁷¹ (Abb. C 1) handelt es sich um konservierte Aminosäurereste, die an dieser Stelle auch in der Sequenz der anderen Matriline aus Maus, Mensch und Huhn vorkommen.

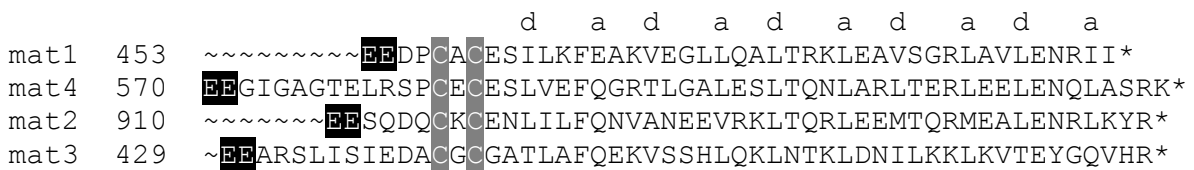


Abb. C 1 Vergleich der Aminosäuresequenz der Coiled-Coil Domäne aller Matriline. In schwarz hervorgehoben sind die konservierten Glutaminsäurereste vor der Coiled-Coil Domäne. Grau markiert sind die Cysteinreste, die die Untereinheiten kovalent miteinander verbinden. Die Buchstaben a und d markieren die Positionen der hydrophoben Aminosäurereste der Coiled-Coil Domäne.

SDS-PAGE und massenspektrometrische Untersuchungen zeigten auch eine Prozessierung von rekombinantem N-terminal His₆-markiertem Matrilin-3. Eine Edman-Sequenzierung konnte nicht durchgeführt werden, da die trimere Coiled-Coil Domäne von N-terminal His₆-markiertem Matrilin-3 nicht über die Affinitätsäule aufkonzentriert werden konnte.

Auch rekombinantes Matrilin-1 (persönliche Mitteilung N. Smyth) und Matrilin-2 (Piecha et al., 1999) zeigten in der SDS-PAGE Fragmente, die eventuell durch eine proteolytische Prozessierung entstanden sein konnten. Die proteolytische Prozessierung scheint jedoch bei Matrilin-1 nicht so häufig aufzutreten, wie bei den anderen Matrilinen. Ein Grund hierfür könnte der geringe Abstand zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne (Abb. C 1) sein, der zu einer sterischen Abschirmung der Schnittstelle führt. Eine Deletion der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne führt dagegen zu einem Gemisch aus Tri-, Di- und Monomeren (Chen et al., 1999). Matrilin-2 zeigte das ausgeprägteste Fragmentierungsmuster. Interessanterweise besitzt Matrilin-2 zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne ein Modul von 75 Aminosäuren, in dem zwei weitere nebeneinanderliegende Glutaminsäurereste vorhanden sind. Diese Schnittstelle ist vielleicht besser zugänglich und könnte eine alternative Schnittstelle darstellen.

Wie der zeitliche Verlauf der Fragmentierung von rekombinatem Matrilin-4 zeigte (Abb. B 4.4), findet keine weitere proteolytische Prozessierung im Zellüberstand statt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich entweder um eine intrazelluläre Protease oder um eine zellmembranassoziierte Protease handelt, wie z.B. die MT-MMPs (membrane-type-matrix metalloproteinases), eine Unterklasse der MMP-Familie, die offenbar eine entscheidene Rolle bei der Invasion von Tumorzellen spielt (Nakagawa et al., 1994).

C 3 Struktur der Matrilin im Gewebe

Rekombinantes Matrilin-4 wurde hauptsächlich als Trimer sekretiert. Im Immunoblot zeigte der Vergleich von rekombinatem Matrilin-4 mit verschiedenen Gewebeextrakten, dass Matrilin-4 auch im Gewebe zum größten Teil als Trimer vorliegt. Eine Nebenbande über der Bande des potentiellen Trimers weist auf eine mögliche tetramere Form hin (Abb. B 5.2), wurde jedoch nicht weiter untersucht. Weiterhin waren in den Gewebextrakten Banden zu detektieren, die dem proteolytisch prozessierten Dimer (D+CC), dem Monomer mit zwei Coiled-Coil Fragmenten (M+2CC) und dem Monomer ohne Coiled-Coil Domäne entsprachen und ein Vorkommen der proteolytischen Prozessierung in vivo andeuteten (Nomenklatur s. Anhang I). Zwei weitere Banden mit Molekulargewichten zwischen potentiell Dimer und Trimer, konnten nicht zugeordnet werden. Zum einen könnte es sich dabei um derzeit nicht identifizierte proteolytische Fragmente handeln, zum anderen können kovalent-gebundene Heterooligomere oder posttranslationale Modifikationen als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Der Vergleich von rekombinantem Matrilin-3 mit verschiedenen Gewebeextrakten im Immunoblot (Abb. B 5.4 und B 5.6) zeigte auch für Matrilin-3 neben der höchsten oligomeren Form, dem Tetramer, Banden, die dem proteolytisch prozessierten Trimer (T+CC), dem Dimer (D+2CC), dem Monomer mit drei zusätzlichen Coiled-Coil Fragmenten (M+3CC) und dem Monomer ohne Coiled-Coil Domäne (M-CC) zuzuordnen waren (Nomenklatur s. Anhang I). Auch Matrilin-3 wird offenbar in-vivo proteolytisch prozessiert. Zusätzlich konnten auch im Falle von Matrilin-3 Banden detektiert werden, die eventuell durch derzeit unbekannte proteolytische Prozessierungen entstanden sind. Im Gegensatz zu Matrilin-4 zeigte eine der Banden von Matrilin-3 ein unterschiedliches Laufverhalten in verschiedenen Gewebextrakten. Eine Erklärung hierfür könnten unterschiedliche Prozessierungen oder unterschiedliche posttranslationale Modifikationen in unterschiedlichen Geweben sein.

Auch im Falle von Matrilin-1 (Abb. B 5.5) und Matrilin-2 (Piecha et al., 1999) wurden in Gewebeextrakten kleinere Fragmente detektiert. Für Matrilin-2 konnten unterschiedliche Substitutionen durch Glykosaminoglykane oder N-gebundene Oligosaccharide als Ursache des heterogenen Bandenmusters ausgeschlossen werden (Piecha et al., 1999).

Arthrose, eine degenerative Gelenkerkrankung, beruht primär auf einer Störung des Chondrozytenstoffwechsels und einer Änderung des Phänotyps der Chondrozyten. Im Immunoblot von Gewebeextrakten aus gesundem und arthrotischem humanem Knorpel konnten Banden detektiert werden, die den unterschiedlichen proteolytischen Fragmenten von rekombinantem Matrilin-3 entsprachen. Obwohl eine genaue Quantifizierung nicht möglich war, konnten im arthrotischem Knorpel tendentiell mehr proteolytisch prozessierte als intakte Fragmente detektiert werden (Abb. B 5.4), was auf eine höhere proteolytische Aktivität im arthrotischen Knorpel hinweist. Weiterhin treten zusätzliche Banden auf, welche eventuell durch Proteasen entstanden sind, die an einer anderen Stelle spalten.

Auch Matrilin-1 und -2 zeigten im Immunoblot von Extrakten gesunder und arthrotischer Patienten potentielle proteolytische Fragmente (Abb. B 5.8). Ein Unterschied in den Bandenintensitäten konnte jedoch nicht festgestellt werden (s. auch C 4, Gewebeverteilung der Matriline).

Wie gezeigt wurde (Wu et al., 1998; Klatt et al., 2000; Kleemann-Fischer et al., 2001), existieren in Rind und Mensch Heterooligomere von Matrilin-1 und -3 in unterschiedlichen Stöchiometrien. Untersuchungen von Guanidiniumhydrochloridextrakten einer Wildtyp und einer Matrilin-1 defizienten Maus im Immunoblot (Aszodi et al., 1999) zeigten keinen

Unterschied im Bandenmuster von Matrilin-3. Jedoch wies das SDS-Polyacrylamidgel im Molekulargewichtsbereich um 200 kDa eine zu geringe Auflösung auf, um eine endgültige Aussage zu machen.

Ein Vergleich des Bandenmusters von Matrilin-1 von Rinder- und Mausextrakten zeigte eine starke Ähnlichkeit (Abb B 5.5). Obwohl eine Existenz von Heterooligomeren in der Maus in früheren Arbeiten nicht bestätigt wurde (Aszodi et al., 1999), ist die Ähnlichkeit des Bandenmusters zwischen Maus- und Rinderextrakten beachtlich, so dass auch eine Heterooligomerenbildung in der Maus wahrscheinlich ist. Um eine sichere Aussage über die Existenz von Heterooligomeren aus Matrilin-1 und -3 auch in der Maus machen zu können, sollten nicht nur Gewebeextrakte, sondern auch angereinigte Gewebeproben untersucht werden, um eine mögliche Nebenpopulation an Heterooligomeren nicht zu übersehen. Auch im Falle von Matrilin-2 und -4 konnten im Immunoblot keine Heterooligomere detektiert werden (Abb. B 5.7). Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob die Coiled-Coil Domänen der Matrilin für die Bildung von Heterooligomeren untereinander kompatibel sind. Dies könnte z.B. anhand von Doppeltransfektionen geprüft werden.

Bei der höchsten oligomeren Form von Matrilin-1 (Hauser et al., 1994) und -4 (Klatt et al., 2001) handelt es sich um ein Trimer. Matrilin-2 (Piecha et al., 1999) und -3 (Klatt et al., 2000) bilden Tetramere. Mit Hilfe einer Regel (Harbury et al., 1993), in der ein entscheidender Einfluß der am β -Kohlenstoff verzweigten Aminosäuren Isoleucin und Valin in den Positionen "a" und "d" postuliert wurde (Chen et al., 1999), kann der Oligomerisierungsgrad vorhergesagt werden. Jedoch ist die aufgestellte Regel nicht zuverlässig.

Auch sterische Faktoren könnten einen Einfluss auf die Oligomerisierung haben. Matrilin-1 und -4 oligomerisieren hauptsächlich als Trimere. Matrilin-2, welches ein zusätzliches Modul zwischen der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne und der Coiled-Coil Domäne besitzt, bildet Tetramere, wie auch Matrilin-3, dem die zweite vWFA-ähnliche Domäne fehlt. Matrilin-1 und -3 existieren u.a. als Heterotetramere, und eine Deletion der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne in Matrilin-1 (Chen et al., 1999) weist eine Proteinbande über der Trimerbande auf, welche als Matrilin-1 Tetramer interpretiert werden könnte. Eine Deletion der ersten vWFA-ähnlichen Domäne liefert nur Trimere (Chen et al., 1999). Offensichtlich scheint der Abstand zwischen der Coiled-Coil Domäne und der benachbarten vWFA-ähnlichen Domäne einen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad auszuüben. Ein sterischer Einfluß der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne in direkter Nachbarschaft zu der Coiled-Coil Domäne, wie z.B. im Falle von Matrilin-1 und -4, scheint einen höheren Oligomerisierungsgrad als ein Trimer nicht zu

begünstigen, während die Deletion der zweiten vWFA-ähnlichen Domäne von Matrilin-1 (Chen et al., 1999) auch zu Tetrameren führt.

Neben der Coiled-Coil Domäne und sterischen Gegebenheiten könnten auch Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls einen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad haben. Ein synthetisches Matrilin-2 Peptid, das die Coiled-Coil Domäne enthält, assembliert *in vitro* hauptsächlich als Trimer (Pan und Beck, 1998), während Matrilin-2 aus Gewebe als Tetramer vorkommt. Offensichtlich scheinen im Falle von Matrilin-2 Wechselwirkungen zwischen den vWFA- und EGF-ähnlichen Domänen die Oligomerisierung zum Tetramer zu fördern, während das Matrilin-2 Coiled-Coil Peptid allein als Trimer assembliert.

C 4 Gewebeverteilung der Matriline

Während der Embryonalentwicklung konnten Matrilin-2 und -4 ab dem siebten Tag im äußeren Konus der Plazenta nachgewiesen werden. Alle Matriline wurden ab dem zehnten Tag im Herzen, im kranialen Mesenchym und im Ursegment der Wirbelsäule detektiert. Eine Expression im Herzen ist für Matrilin-1 und -3, die ansonsten skeletal exprimiert werden, ungewöhnlich. Allerdings haben das Herzskelett, die Herzklappen und das Endokard einen hohen Anteil an Bindegewebe.

Am Tag 14 der Embryonalentwicklung konnten alle Matriline in den Anlagen der Schädelknochen und im axialen Skelett detektiert werden.

Postnatal ist die Expression von Matrilin-3 auf den hyalinen Knorpel, das Perichondrium und den Knochen beschränkt. Mittels *in-situ*-Hybridisierungen konnte eine Expression in Fibroblasten-ähnlichen Zellen, in Chondroblasten und in Osteoblasten detektiert werden (Klatt et al., 2000).

Matrilin-3 ist das in der Maus am wenigsten verbreitete Matrilin. Auch Matrilin-1 zeigte hauptsächlich eine auf den hyalinen Knorpel und das Perichondrium beschränkte Expression, jedoch konnte Matrilin-1 auch außerhalb des Knorpels, z.B. in Bändern (Segat et al., 2000), detektiert werden.

Matrilin-2 wird in allen Arten des Bindegewebes, in Muskel- und Epithelgewebe exprimiert (Piecha et al., 1999). Im hyalinen Knorpel der Knochenepiphysen konnte Matrilin-2 im proliferierenden und im hypertrophen Bereich nachgewiesen werden.

Entsprechend der Erwartungen aufgrund der Northern-Blot Ergebnisse (Wagener et al. 1998) zeigte Matrilin-4 eine ähnlich breite Gewebeverteilung wie Matrilin-2, wurde jedoch auch zusätzlich in den Bereichen exprimiert, in denen auch Matrilin-1 und -3 vorhanden waren. Mittels *in-situ*-Hybridisierungen konnte eine starke Matrilin-4 Expression in Geweben

mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Transkription in Epithel- und Neuronalzellen, die vom Endo- bzw. Neuroectoderm abstammen, gezeigt (Klatt et al., 2001).

Alle Matrilin konnten während der endochondralen Knochenbildung detektiert werden, jedoch waren deutliche Unterschiede in der zeitlichen und räumlichen Expression vorhanden. Am auffälligsten war das komplementäre Expressionmuster von Matrilin-1/-3 und Matrilin-2 im sich bildenden Gelenkknorpel. Weiterhin wurden mittels Doppelimmunfluoreszenz auch distinkte Bereiche detektiert, in denen nur Matrilin-3, aber kein Matrilin-1 exprimiert wurde (Abb. B 6.26). Matrilin-4 konnte in allen Regionen detektiert werden. Im reifen artikulären Knorpel wurden alle Matrilin nur schwach detektiert. In der Wachstumsfuge wurden alle Matrilin exprimiert. Die Expression von Matrilin-2 war auf den proliferierenden und hypertrophen Bereich beschränkt, während die anderen Matrilin in der gesamten Wachstumsfuge detektierbar waren. Jedoch zeigten auch Matrilin-1, -3 und -4 feine Unterschiede im Expressionsmuster. Während Matrilin-4 stärker im ruhenden und proliferierenden Knorpel exprimiert wurde, konnten Matrilin-1 und -3 in ähnlicher Intensität in allen Zonen der Wachstumsfuge detektiert werden. Weiterhin wurden Matrilin-1, -2 und -4 stärker in der Kapsel um die Chondrozyten als in der Interterritorialmatrix detektiert, während Matrilin-3 ähnlich stark in der Kapsel und in der Interterritorialmatrix nachweisbar war.

Die Gewebeverteilung von Matrilin-1 und -3 im hyalinen Knorpel ist sehr ähnlich und offensichtlich üben Matrilin-1 und -3 im Gewebe auch eine Funktion in Form von Heterooligomeren aus (Wu and Eyre, 1998; Klatt et al., 2000; Kleemann-Fischer et al., 2001). Trotzdem variiert die Expressionsrate von Matrilin-1 und -3 im Knorpel. Mittels quantitativer RT-PCR konnte für Matrilin-1 die stärkste Expression im proliferierenden Knorpel, und nur schwache Expression im ruhenden und hypertrophen Knorpel nachgewiesen werden, während Matrilin-3 die stärkste Expression im ruhenden, und nur schwache Expression im proliferierenden und hypertrophen Knorpel zeigte (Zhang and Chen, 2000). Weiterhin wurden Matrilin-1 und -3 im Rippenknorpel einer neugeborenen Maus in ähnlichen Mengen gefunden, während Matrilin-3, im Gegensatz zu Matrilin-1 im Rippenknorpel einer sechs Wochen alten Maus nur noch schwach zu detektieren war. Die unterschiedliche Expression von Matrilin-1 und -3 während der Differenzierung von Chondrozyten deutet eine strenge Transkriptionskontrolle und unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Zonen des Knorpels an.

Matrilin-1 und -3 können im Knorpel des Rinds (Wu and Eyre, 1998; Klatt et al., 2000) und des Menschen (Kleemann-Fischer et al., 2001) als Homo- und Heterooligomere vorkommen.

Da die Chondrozyten beide Arten von Oligomeren nebeneinander exprimieren, obwohl die Gene auf unterschiedlichen Chromosomen liegen (Aszodi et al., 1998; Wagener et al., 2000), kann eine Kontrolle der Heterooligomerenbildung auf Transkriptionsebene nur in der Regulation der relativen Mengen an reifer mRNA stattfinden. Bei dem letzten Intron aller Matrilin Gene handelt es sich um AT/AC Introns (Deak et al. 1999). Vielleicht bietet das Spleißen des AT/AC Intron durch U12-Spleißosomen eine Möglichkeit zur posttranskriptionalen Regulation.

Während der Arthrose kommt es zunehmend zum Verlust des artikulären Knorpels. Immunhistologische Untersuchungen (Abb. B 6.27) und in-situ-Hybridisierungen zeigten eine starke Expression von Matrilin-3 im humanen, arthrotischen Knorpel. Auch für Matrilin-1 wurde eine stärkere Expression im arthrotischen Knorpel nachgewiesen (Okimura et al., 1997), während für Matrilin-2 und -4 kein Unterschied festzustellen war (Abb. B 6.27). Die verstärkte Expression von Matrilin-1 und -3 im artikulären Knorpel könnte z.B die Reaktion der Chondrozyten auf den voranschreitenden Gewebeverlust sein, daher werden Matrilin-1 und -3 zum Neuaufbau des artikulären Knorpels synthetisiert. Eine andere Erklärung der Matrilin-1 und -3 Synthese während der Arthrose wäre eine Änderung des Phänotyps der artikulären Chondrozyten in Richtung des Phänotyps ruhender bzw. proliferierender Chondrozyten. Die Differenzierung der artikulären Chondrozyten könnte z.B. durch Druckbelastung oder durch eindringende Wachstumsfaktoren der Synovialflüssigkeit ausgelöst werden. Ein Einfluss von FGF-2 und TGF- β 2 auf die Differenzierung primärer Chondrozyten konnte in Agarosekulturen gezeigt werden (Szüts et al., 1998). Da Matrilin-2 und -4, nicht aber Matrilin-1 und -3, während der Entwicklung des Gelenkknorpels exprimiert werden, erscheint eine Differenzierung der artikulären Chondrozyten als Ursache der Matrilin-1 und -3 Synthese während der Arthrose wahrscheinlicher.

C 5 Supramolekulare Assemblierung der Matriline

Für Matrilin-1 (Chen et al., 1995), Matrilin-2 (Piecha et al., 1999), Matrilin-3 (Klatt et al., 2000) und Matrilin-4 (Klatt et al., 2001) konnte eine Teilnahme am extrazellulären Netzwerk verschiedener Zelllinien gezeigt werden. Bei den Netzwerken handelt es sich um ausgedehnte Fibrillen mit variabler Dicke, häufig mit einer Länge von mehreren Zelldurchmessern.

Neben einer Teilnahme an einem Kollagen II-haltigen Netzwerk, konnte für Matrilin-1 (Chen et al., 1995) und Matrilin-3 (Klatt et al., 2000) auch eine Teilnahme an einem Kollagen II-

unabhängigen Netzwerk gezeigt werden. In dem Kollagen II-unabhängigen Netzwerk wurden Matrilin-1 und -3 in Fibrillen zwischen einzelnen Zellen nachgewiesen, die an der Zellperipherie anhafteten. Weiterhin konnte in Rekonstitutionsversuchen mit Matrilin-1, das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurde, ein Netzwerk detektiert werden, das dem Kollagen II-unabhängigen Matrilin-1-Netzwerk morphologisch ähnelt (Chen et al., 1999).

Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigten eine Kolokalisation von Matrilin-1 und -3 im fibrillären Netzwerk der extrazellulären Matrix. Im Immunoblot wurde im Überstand der RCS-Zellen größtenteils Homooligomere gefunden, so dass Heterooligomerenbildung als Ursache der Kolokalisierung auszuschließen war. Auch im Kollagen II-unabhängigen Netzwerk konnten Matrilin-1 und -3 gemeinsam in Fibrillen detektiert werden, eine starke Vergrößerung läßt jedoch u.a. eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der Fibrille erahnen. Eine eindeutige Aussage über die Verteilung innerhalb der Fibrillen kann aber nur mittels Elektronenmikroskopie gemacht werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Matrilin-3 am Kollagen II- und am Kollagen VI-Netzwerk partizipiert. Auch mit COMP konnte eine starke Kolokalisation gezeigt werden. Im Fibronectin-Netzwerk konnte dagegen nur wenig Matrilin-3 detektiert werden. Doppelmarkierungen mit Antiseren gegen die Proteoglykane Aggrekan, Biglykan und Decorin zeigten eine Kolokalisation im extrazellulären Netzwerk, jedoch nicht an der Zellperipherie.

Ohne Ascorbat konnte eine intrazelluläre Retention des Kollagen II detektiert werden. Ein Einfluß des fehlenden Kollagen II-Netzwerks konnte auch deutlich für alle anderen untersuchten Proteine gesehen werden. Während das Fibronectin- und Aggrekan-Netzwerk nur eine leichte Beeinflussung zeigte, war das Netzwerk von Kollagen VI und Biglycan stark vermindert.

Ursprünglich sollten mittels Doppelimmunfluoreszenz potentielle Bindungspartner im extrazellulären Netzwerk der RCS-Zellen gefunden oder ausgeschlossen werden. Wie die Untersuchungen jedoch zeigten, schienen alle untersuchten Proteine, ob Proteoglykane, Kollagene oder nicht-kollagene Proteine, an einem gemeinsamen fibrillären Netzwerk teilzunehmen. Mittels Lichtmikroskopie konnte keines der untersuchten Proteine als Wechselwirkungspartner ausgeschlossen werden.

C 6 Physiologische Bedeutung der Matriline

Über die Funktion der Matriline ist derzeit wenig bekannt. Die Expression der Matriline während der Embryonalentwicklung und des skeletalen Wachstums, sowie die Synthese von Matrilin-1 (Okimura et al., 1997) und Matrilin-3 (Pullig et al., Manuskript in Vorbereitung) im pathologischen Verlauf der Arthrose deuten eine wichtige Funktion der Matriline während der Gewebeentwicklung an. Weiterhin weist auch die zeitlich und örtlich differenzierte Expression auf eine spezielle Funktionen der einzelnen Matriline hin.

Für alle Matriline konnte gezeigt werden, dass sie ein integraler Bestandteil der extrazellulären Matrix sind und dass Matrilin-1 die Fähigkeit der Selbstassemblierung besitzt (Chen et al., 1999). Mittels Mutagenese wurde gezeigt, dass für die Netzwerkbildung von Matrilin-1 mindestens ein intaktes MIDAS-Motiv und beide vWFA-ähnlichen Domänen notwendig sind (Chen et al., 1999). Dementsprechend scheint eine Wechselwirkung von Matrilin-1 mit der extrazellulären Matrix über die vWFA-ähnlichen Domänen als wahrscheinlich. Oligomere Formen der Matriline sind multivalent und könnten daher mit mehreren Liganden gleichzeitig in Wechselwirkung treten. Für Matrilin-1 wurde eine Interaktion mit Kollagen II-Fibrillen (Winterbottom et al., 1992) und Aggrekan (Hauser et al. 1996) nachgewiesen und es wurde postuliert, dass Matrilin-1 als Adapter zwischen diesen Molekülen fungiert.

Matrilin-3 und -4 unterliegen einer proteolytischen Prozessierung, und aufgrund des heterogenen Bandenmusters von Matrilin-1 und -2 in der SDS-PAGE und der konservierten potentiellen Schnittstelle scheint auch eine proteolytische Prozessierung von Matrilin-1 und -2 als wahrscheinlich. Während der Embryonalentwicklung, Morphogenese, der Geweberesorption und des Gewebeumbaus ändert sich die Architektur der extrazellulären Matrix. Die proteolytische Spaltung extrazellulärer Moleküle ist dabei ein wichtiger Mechanismus um bestehende Verbindungen wieder zu lösen. Störungen des Gleichgewichts zwischen Proteinsynthese und Proteolyse sind häufig die Grundlage pathologischer Prozesse. Weiterhin können Degradationsprodukte zusätzliche Funktionen übernehmen und z.B. der Zelle Informationen aus der Umgebung liefern. Endostatin z.B., ein Fragment von Kollagen XVIII, konnte als Angiogenese-Inhibitor identifiziert werden (Zätterström et al., 2000).

Die Generation einer Matrilin-1 defizienten Maus zeigte eine normale skeletale Entwicklung (Aszodi et al., 1999) und eine Redundanz der Matriline wurde postuliert. Vergleicht man den modulären Aufbau der Matriline miteinander, liegt der auffälligste Unterschied, neben der fehlenden zweiten vWFA-ähnlichen Domäne von Matrilin-3, in der Anzahl der EGF-

ähnlichen Domänen und damit in der Ausdehnung des Moleküls. Unter der Annahme einer Funktion der Matrilin als Adaptoren zur Vernetzung von Molekülen der extrazellulären Matrix, ist es auffällig, dass ultrastrukturelle Untersuchungen der Matrilin-1 defizienten Maus Hinweise auf eine untypische Kollagen II-Fibrillogenese und Fibrillenorganisation zeigten (Huang et al., 1999).

D MATERIAL UND METHODEN

D 1 Molekularbiologische Arbeiten

Soweit im Text nicht auf andere Quellen hingewiesen wurde, erfolgte die Durchführung nach Standardmethoden von Sambrook et al. (1989).

D 1.1 Klonierungsstrategie der Matrilin-4 cDNA-Konstrukte

Zur rekombinanten Expression von N- und C-terminal markiertem Matrilin-4 wurde die benötigte cDNA mittels RT-PCR aus muriner Lungen-mRNA generiert. Die Matrilin-4 cDNA wurde durch geeignete Primer mittels PCR amplifiziert und in den modifizierten Expressionsvektors pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997; Wuttke, Dissertation 2001; Smyth et al., 2000) inseriert.

Insert:



Primer:

M4SpeI: 5'-GCCACTAGTCCCAGCTCCAGTCTGCAGGTCC-3'

M4NotI (His-Myc): 5'-CAATGACTGCGGCCGCTCACTTTCGGCTAGCCAGCTG-3'

M4NotI (StrepII): 5'-CAATGCGGCCGCCTTTCGGCTAGCCAGCT-3'

Vektoren:

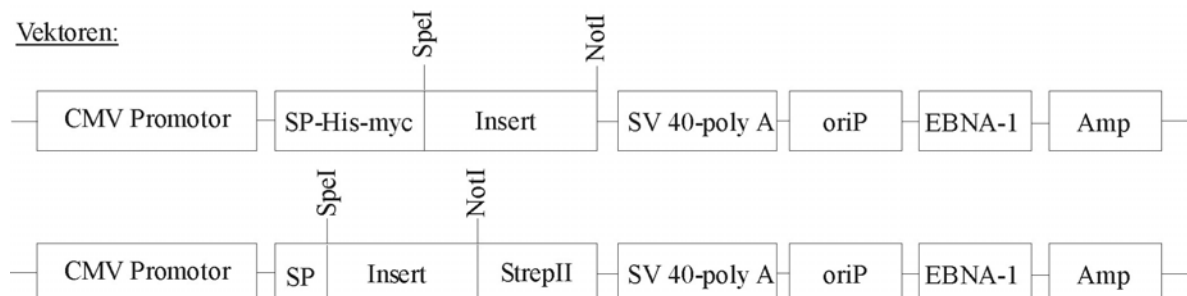


Abb. D 1 **Klonierungsstrategie.** cDNA von Matrilin-4 wurde mittels PCR mit den Primern M4Spe I und M4Not I amplifiziert. Der Primer für den N-Terminus war für beide Vektoren (Markierungen) gleich, während für den C-Terminus unterschiedliche Primer verwendet wurden. Die cDNA wurde in die modifizierten pCEP-Pu

Vektoren über die Schnittstelle Spe I und Not I (unterstrichene Sequenz) inseriert. Dargestellt sind die modifizierten, linearen Formen des Vektors pCEP-Pu, welche entweder eine Sequenz für eine N-terminale His₆-Myc-Markierung oder eine C-terminale StrepII-Markierung besaßen. Das Plasmid pCEP-Pu (9,5 kb) besitzt eine SV40polyA-Kassette und ein Gen für Puromycinresistenz. Es verfügt über das EBNA-1 Gen, welches für ein virales, DNA-bindendes Protein kodiert und die Epstein-Barr Virus Replikationsstelle (oriP), an die EBNA-1 bindet. Dies gewährleistet die extrachromosomale Replikation des Plasmids in Säugetierzellen und dessen stabile Verteilung auf sich teilende Zellen.

D 1.2 RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion)

Die zur Amplifizierung der Konstrukte benötigte cDNA wurde mittels RT-PCR aus gesamt Lungen RNA generiert.

Zusammensetzung des RT-PCR Ansatzes:

RNA : 1 µg
 Oligo dT-Primer (69 µM): 0,4 µl
 10 min, 75°C (Denaturierung), dann auf Eis abkühlen.

5fach Puffer:	2 µl	<u>5fach RT-PCR-Puffer:</u>
DTT(0,1 M):	1 µl	250 mM Tris-HCl pH 8,3
dNTP's (25 mM):	0,4 µl	375 mM KCl
SuperScriptII (200 U/µl):	0,5 µl	15 mM MgCl ₂
Endvolumen mit H ₂ O:	10,0 µl	
60 min, 42°C		

Die Oligo dT-Primer stammten von MWG. SuperScript, 5fach Puffer und DTT waren aus dem SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase Kit. dNTPs wurden von der Firma Pharmacia bezogen.

D 1.3 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Zur Amplifizierung wurden die unten aufgeführten PCR-Ansätze einem Temperaturprogramm unterworfen, in dem sich wiederholende Denaturierung, Primerhybridisierung und Polymerisation zu einer exponentiellen Vervielfältigung der cDNA führten.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:

cDNA:	1 µl (RT-PCR Ansatz)
Primer (Abb. D 1):	1,0 µl (10 pmol/µl)
dNTPs (25 mM):	0,5 µl
10fach PCR-Puffer:	5,0 µl
Enzym (Polymerase):	0,5 µl (2,5 U/µl)
Endvolumen mit H ₂ O:	50,0 µl

10fach PCR-Puffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,4
500 mM KCl
15 mM MgCl ₂
0,1% Gelatine

dNTP's, 10fach PCR-Puffer und 100fach MgCl₂ stammten aus dem ExpandTM High Fidelity PCR Kit (Boehringer). Die verwendeten Primer wurden bei der Firma MWG in Auftrag gegeben.

Temperaturprogramm:

1. Zyklus:		2. bis 40. Zyklus:	
Denaturierung:	3 min 95°C	Denaturierung:	75 s 95°C
Primer-Hybridisierung:	2 min 62°C	Primer-Hybridisierung:	75 s 62°C
Polymerisation:	5 min 72°C	Polymerisation:	90 s 72°C
		am Ende:	10 min 72°C

D 1.4 Reinigung der PCR-Produkte

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels einer elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel. Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kits der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt.

D 1.5 Restriktionsverdau

Alle bei den Klonierungsarbeiten verwendeten Enzyme und Puffer wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Vektoren:

Die Plasmid-DNA wurde zwei Stunden bei 37°C mit 1 µl der Restriktionsendonuklease Nhe I (5 U/µl) und 0,5 µl der Restriktionsendonuklease Not I (10 U/µl) in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer inkubiert. Das Endvolumen betrug 30 µl.

cDNA-Fragmente:

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden jeweils zwei Stunden bei 37°C mit 0,5 µl der Restriktionsendonuklease Not I (10 U/µl) und mit 1,5 µl der Restriktionsendonuklease Spe I (3 U/µl) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. Spe I und Nhe I erzeugen kompatible Enden. Das Endvolumen betrug 30 µl.

Die Isolierung der Restriktionsprodukte erfolgte analog der Reinigung der PCR-Produkte.

D 1.6 Ligation

Zur Insertion der cDNA-Fragmente in den modifizierten Vektor pCEP-Pu wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Moleküle.

Standard Ansatz:

2 µl Plasmid (400 ng)
10 µl cDNA-Konstrukt
1 µl T4-DNA-Ligase (10 U/µl)
2 µl 10fach T4-Ligase-Puffer
10 µl H₂O

10fach T4-Ligase-Puffer:

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

Die Ligation erfolgte im Wasserbad bei 17 °C über Nacht.

D 1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte mit den zur Amplifizierung verwendeten sowie internen Primern durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor unter Leitung von Herrn Dr. M. Macht mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm EditView 1.0.1

(Perkin Elmer) bzw. dem Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8.1 (Genetics Computer Group, Inc.).

D 1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrats können Nukleinsäuren in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die resultierende Auflösung aufgrund des Molekularsiebeckeffekts ist von der Konzentration der Agarose abhängig. Durch Zugabe von Ethidiumbromid können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden, da Ethidiumbromid zwischen die gepaarten Basen der Duplex-DNA interkaliert, und nach Anregung mit UV-Strahlung fluoresziert. Mit Hilfe eines Standards in bekannter Konzentration, besteht die Möglichkeit, die Nukleinsäuremenge abzuschätzen.

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):

0,04 M Tris-Acetat

1 mM EDTA

pH 8,0

6fach Probenpuffer:

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylen Cyanol FF

30% Glycerin

D 1.9 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Neben der Konzentrationsabschätzung über das Agarosegel, bietet sich die photometrische Konzentrationsbestimmung an. Die zugrundeliegenden Zusammenhänge gibt das Lambert-Beer'sche Gesetz wieder, welches die Intensitätsabnahme eines durch eine Lösung gehenden Lichtstrahls bestimmter Wellenlänge in Abhängigkeit von der Konzentration beschreibt. Die Absorption von Nukleinsäuren wird üblicherweise bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da sich bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum des im Gegensatz zu den Pyrimidinbasen erweiterten aromatischen Systems der Purinbasen befindet. Das Absorptionsmaximum von tryptophan- und tyrosinhaltigen Proteinen liegt bei 280 nm, wodurch der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (E_{260}/E_{280}) einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der DNA darstellt. Abweichende Werte können jedoch durch die Gegenwart phenylalaninhaltiger Proteine zustande kommen, da Phenylalanin eine starke Absorption bei 260 nm besitzt.

$$\frac{1 \text{ OD} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}}{a \text{ OD} = x \text{ } \mu\text{g/ml}} \implies x = \frac{a \cdot 50 \cdot \text{VF}}{1000} \text{ } \mu\text{g/ml}$$

a: ermittelte OD; VF: Verdünnungsfaktor

D 1.10 Transformation

Kompetente *E.coli* DH5 α -Zellen (100 μ l) wurden mit 0,5 μ l (50 ng/ μ l) DNA in ein vorgekühltes Eppendorf Gefäß gegeben und mit der Pipettenspitze kurz gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 1 min in ein 42°C warmes Wasserbad gegeben. Danach wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis gekühlt. Zur Regeneration der Zellen wurde das Reaktionsgefäß mit LB-Medium auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und für 1 h im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert.

Von dem Transformationsansatz wurden 50 μ l und 300 μ l auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

D 1.11 Minipräparation

Es wurden einzelne Kolonien von der LB-Agarplatte gepickt und in ein Reaktionsgefäß mit je 10 ml LB-Amp-Medium (Ampicillin-Endkonzentration: 50 μ g/ml) gegeben. Nach 9 h Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 2 ml der Bakterienkultur in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 2 min mit 21500 x g zentrifugiert. Aus dem Bakterienpellet wurde mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Macherey-Nagel) die Plasmid-DNA gereinigt.

D 1.12 Midipräparation

Mit 1 μ l der Bakterienkultur wurden 100 ml LB-Amp-Medium angeimpft und 16 h im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen 15 min bei 3300 x g zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde mit Hilfe des Nucleobond AX Kits (Macherey-Nagel) aufgearbeitet.

D 1.13 Ethanolfällung

Zur Ethanolfällung wurde der gelösten DNA 1/10 Volumen an 3 M NaOAc-Lösung, pH 5,2 zugesetzt. Anschließend wurde das doppelte Volumen an 96%igem EtOH zugegeben und 30 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 10 min, 21500 x g) wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen.

D 2 Zellkulturarbeiten

D 2.1 Transfektion von 293-EBNA-Zellen

a) Allgemeines zu 293-EBNA-Zellen und dem Plasmid pCEP-Pu (Kohfeldt et al., 1997)

Das Plasmid pCEP-Pu (9,5 kb) ist aus dem Vektor pCEP 4 (Invitrogen) durch Substitution der TKpolyA-Kassette gegen eine SV40polyA-Kassette und Substitution des Hygromycin-Resistenzgens gegen ein Gen für Puromycin-Resistenz hervorgegangen. Es verfügt über das EBNA-1 Gen, welches für ein virales, DNA-bindendes Protein kodiert und die Epstein-Barr Virus Replikationsstelle (oriP), an die EBNA-1 bindet, wodurch die extrachromosomale Replikation des Plasmids in Säugetierzellen und dessen stabile Verteilung auf sich teilende Zellen gewährleistet wird. Die „multiple cloning site“ mit dem BM-40 Signalpeptid befindet sich zwischen dem CMV Promotor und dem Polyadenylierungs- und Terminationssignal des SV-40 Virus. Bei 293-EBNA-Zellen handelt es sich um adhärenzte HEK 293-Zellen (human embryonic kidney cell clone 293), welche das Resistenzgen gegen Neomycin tragen und daher auch gegen Geneticin (G 418) resistent sind. Auch im Genom der EBNA-Zellen ist das EBNA-1 Gen integriert.

b) Elektroporation

Eine mit 293-EBNA-Zellen konfluente Gewebekulturschale (\varnothing 90 mm) wurde nach Waschen mit PBS durch Behandeln mit Trypsin geerntet. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet in DMEM F-12 Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, Gibco) mit NaCl-Lösung (25 mM) aufgenommen, sodass die Zellkonzentration 10^6 Zellen/ml betrug. 500 μ l (500 000 Zellen) wurden mit DMEM F-12 Medium mit NaCl-Lösung (25 mM) auf 800 μ l (erforderliches Küvettenvolumen) aufgefüllt und mit 3 μ g DNA für 5 min bei RT inkubiert. Nach blasenfreiem Einfüllen in die Elektroporationsküvette (Gene Pulser[®], Biorad) erfolgte die Elektroporation bei einer Kapazität von 500 μ F und einer Stromstärke von 230 V/0,4 cm². Anschließend wurden die Zellen nach 5 min Stehen bei RT auf eine Gewebekulturschale (\varnothing 90 mm) mit Regenerationsmedium gegeben.

c) Selektion

Nach 48 Stunden Regenerationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde die Selektion gestartet. Das Regenerationsmedium wurde gegen Selektionsmedium ausgewechselt, welches zusätzlich noch Puromycin enthält.

d) Kontrolle der Transformation

Die Transformation wurde überprüft, indem das Selektionsmedium einer fast konfluenten Gewebekulturschale gegen serumfreies Medium ausgewechselt und der Zellüberstand nach Präzipitation auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurde.

PBS (phosphate-buffered saline):

140 mM NaCl
10 mM KCl
8 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄
pH 7,4

Regenerationsmedium:

DMEM F-12 Medium
10% FCS (Gibco)
200 mM Glutamin (Gibco)
Geneticin (0,25 mg/ml, Sigma)

Selektionsmedium:

DMEM F-12 Medium
10% FCS
200 mM Glutamin
Geneticin (0,25 mg/ml)
Puromycin (1 µg/ml)

Serumfreies Medium:

DMEM F-12 Medium
200 mM Glutamin

D 2.2 Kultivierung von 293-EBNA-Zellen

a) Mediumwechsel

Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage, jedoch spätestens, wenn der Säure-Base Indikator des Mediums nach Gelb umschlug. Vor der Zugabe des frischen Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen.

b) Umsetzen der Zellen

Waren die Zellen einer Gewebekulturschale konfluent gewachsen, wurden sie auf mehrere Gewebekulturschalen verteilt. Dafür wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit Trypsin von der Gewebekulturschale gelöst und auf die gewünschte Anzahl von Gewebekulturschalen verteilt.

c) Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen mußten diese in Gefriermedium überführt werden. Dazu wurden die Zellen nach Waschen mit Trypsin von der Gewebekulturschale abgelöst und zentrifugiert. Anschließend wurden sie in 2 ml Gefriermedium aufgenommen und in Cryo-Gefäße der Firma Greiner gegeben. Die Cryo-Gefäße wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo 1°C Freezing Container (diese Container besitzen eine Abkühlrate von 1°C/min) auf -80°C gekühlt und bei dieser Temperatur aufbewahrt.

Gefriermedium: DMEM F-12 Medium, 20% FCS, 10% DMSO

d) Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryo-Gefäße erwärmt, bis sich der Inhalt in ein mit 10 ml Selektionsmedium gefülltes Falcon-Röhrchen überführen ließ. Nach Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 10 ml Selektionsmedium aufgenommen und auf eine Gewebekulturschale gegeben.

e) Ernten der rekombinanten Proteine

Das Selektionsmedium der fast konfluenten Gewebekulturschalen wurde gegen serumfreies Medium ausgewechselt. Nach drei Tagen wurde der Zellüberstand geerntet und neues serumfreies Medium auf die Gewebekulturschalen gegeben. Das geerntete Medium wurde wahlweise bei -20°C oder -80°C aufbewahrt.

D 2.3 Kultivierung von RCS (Rattenchondrosarkom)-Zellen und embryonalen Mausfibroblasten

Die Handhabung der RCS-Zellen (erhalten von Dr. J. Kimura, Henry Ford Hospital, Detroit) und der embryonalen Mausfibroblasten (erhalten von Dr. N. Smyth, Inst. f. Biochemie, MEK, Köln), erfolgte analog der Handhabung der 293-EBNA Zellen. Als Kulturmedium wurde anstatt DMEM F-12 Medium, Ham's F-12 nutrient mixture Medium, mit 10% FCS und Penicilin-Streptomycin (1:50, Gibco), verwendet. Bei Bedarf wurden die Zellen in Gegenwart von 50-100 µg/ml Ascorbat kultiviert.

D 3 Proteinchemische Arbeiten

D 3.1 Protein-Präzipitationen

a) Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

1 ml der zu untersuchenden Proteinlösung wurde mit 10 µl einer 10%igen Triton 100X-Lösung und 250 µl 50%iger Trichloressigsäure versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Proteinlösung für 15 min bei 4°C mit 21500 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut für 15 min bei 4°C und 21500 x g zentrifugiert.

b) Ethanol-Fällung

1 ml Proteinlösung wurde zu 10 ml 96%igem EtOH gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei -20°C wurde für 30 min bei 4°C bei 5500 x g zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70%iger EtOH gewaschen, in ein Eppendorf Gefäß überführt und erneut für 15 min bei 4°C mit 21500 x g zentrifugiert.

D 3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

a) Theorie

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen in einem konstanten elektrischen Feld entsprechend ihrer Masse, bedient man sich der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch die Gegenwart von Natriumdodecylsulfat, einem Detergenz, werden die nicht kovalenten Wechselwirkungen in Proteinen weitgehend unterbrochen. Weiterhin lagern sich negativ geladene SDS-Moleküle idealerweise in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/1 g Protein) an die Proteine an, wodurch man SDS-Protein-Komplexe erhält, deren Ladung nicht durch die Ladung der Aminosäureseitenketten bestimmt wird, sondern größtenteils von der Ladung der SDS-Moleküle abhängt. Die Mobilität der Proteine in einem Polyacrylamidgel ist also weitgehend unabhängig von der räumlichen Struktur und Nettoladung des Proteins. Parameter der Laufgeschwindigkeit ist die Größe der Polypeptide, welche durch den Siebeffekt des Polyacrylamidgels proportional ihrer Masse aufgetrennt werden.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Polyacrylamidgel, welches durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Als Initiator der radikalischen Polymerisation dient Amoniumpersulfat (APS), dessen Disproportionierung zu einem Sulfatanion und einem Radikalanion durch geringe Mengen Tetramethylethyldiamin (TEMED) eingeleitet wird.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt nach der von Laemmli 1970 publizierten diskontinuierlichen, vertikalen Flachbettelektrophorese. Die aufzutrennenden Proteine durchlaufen zuerst ein weitmaschiges Sammelgel und treten dann in das für die Auftrennung erforderliche Trenngel ein. Die Funktion der zwei verschiedenen Gelsysteme ist die Konzentrierung der makromolekularen Ionen in schmale Banden durch Unterschiede des pH-Werts und der Ionenstärke des Sammelgels und des Elektrophorese- bzw. Trenngelpuffers.

b) Vorbereitung und Durchführung der PAGE

Probenvorbereitung (für Minigele):

Proteinpellets wurden in 15 µl Probenpuffer und 15 µl Probencocktail aufgenommen. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde die Lösung mit 2,5 µl β-Mercaptoethanol (Reduktionsmittel) versetzt. Abschließend wurde die gesamte Probenlösung für 5 min auf 100°C erwärmt, um die Proteine zu denaturieren und dadurch die Anlagerung der SDS-

Moleküle auch in Regionen mit starken intramolekularen Wechselwirkungen zu gewährleisten.

Probenpuffer:

50 mM Tris
250 mM NaCl
10 mM EDTA

Probenscocktail:

200 mM Tris
1 mM EDTA
4% SDS
30% Glycerol
0,5% Bromphenolblau

Polyacrylamidgel

Trenngel-Puffer:

0,5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA, 0,4% SDS, pH 8,8

Sammelgel-Puffer:

1,5 M Tris-HCl, 8 mM EDTA, 0,4% SDS, pH 6,8

Elektrophorese-Puffer:

192 mM Glycin, 0,1% SDS, 20 mM Tris, pH 8,3

Monomer-Lösung:

Protogel (30% Acrylamid/Methylen Bisacrylamid Lösung
(37,5:1; National Diagnostics))

c) Färbemethoden für SDS-Polyacrylamid Gele

Coomassie Blue Färbung

Nach Beenden der SDS-PAGE wurde das Gel für eine Stunde in die saure, methanolische Farbstofflösung gegeben. Die Proteine wurden durch den extremen pH-Wert vollständig denaturiert, im Gel fixiert und bildeten einen Komplex mit dem in Methanol gelösten hydrophoben Farbstoff. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrfaches Wechseln einer sauren Entfärberlösung entfernt, bis der gewünschte Kontrast erreicht war.

Die Nachweisgrenze dieser Methode lag bei ca. 500 ng pro Bande.

Färbe-Lösung:

0,125% Coomassie Brilliant Blue R250
50% MeOH
10% Essigsäure

Entfärbe-Lösung:

70% MeOH
10% Essigsäure

Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde erstmalig 1979 von Schwitzer et al. publiziert und findet ihre Anwendung in der Visualisierung von Proteinmengen, die unter der Nachweisgrenze der Coomassie Blue-Färbung liegen. Bei der Durchführung dieser Methode ist es wichtig, Detergenzien, verbleibende Mengen an Reduktionsmitteln oder reaktive Komponenten des Puffers (z.B. Glycin) zu entfernen, da diese bei der Färbung stören würden. Die Farbentwicklung erfolgt nach Inkubieren des Gels in Silbernitrat-Lösung, durch Reduktion des Silbernitrats mit Formaldehyd im basischen Millieu. Beendet wird die Reaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure.

Die Silberfärbung ist um ein Vielfaches empfindlicher als die Coomassie Blue Färbung, sodass man mit dieser Methode Proteinmengen von unter 10 ng pro Bande sichtbar machen kann.

Standard Protokoll:

Fixierung:	2 mal 10 min mit 30% EtOH / 10% Eisessig
Erste Inkubation:	15 min in 30% EtOH, 4 M NaOAc, 0,3% Eisessig, 0,5% Glutaraldehyd, 0,4 mM Na-Thiosulfat-Pentahydrat
Waschen:	3 mal 5 min und 2 mal 10 min
Zweite Inkubation:	0,6 mM Silbernitrat, 0,001% Formaldehyd
Reduktion:	2,5% Na ₂ CO ₃ , 0,03% Formaldehyd
Reaktionsstop:	5% Essigsäure

Die Silberfärbung wurde nur mit kleinen Gelen durchgeführt. Das Volumen der jeweiligen Lösungen betrug 50 ml pro Gel.

D 3.3 Immunoblot (Western Blot)

a) Theorie

Zur spezifischen Detektion wurden die Proteine nach SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran überführt (geblottet) und auf dieser anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Dafür wurden zwei Antikörper benötigt. Der erste Antikörper war ein für das Protein spezifischer Antikörper und band nach Blocken unspezifischer potentieller Bindungsstellen nur an das zu detektierende Protein. Der zweite Antikörper erkannte den für eine Spezies konstanten Teil des ersten Antikörpers. An den

zweiten Antikörper war eine Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase HRP) gekoppelt, welche unter alkalischen Bedingungen und in Gegenwart von H_2O_2 die Oxidation von Luminol katalysiert. Als direktes Reaktionsprodukt entstand eine elektronisch angeregte Form des 3-Aminophthalats, das bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand Strahlung abgab. Diese reichte aus, um einen Röntgenfilm zu belichten.

b) Elektrotransfer (Blot)

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel und die zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran (Protran NC, Schleicher und Schuell, Deutschland) kurz in Transfer-Puffer eingelegt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei auf die Nitrocellulosemembran und beides zwischen zwei Lagen feuchtes Whatman 3MM Papier gelegt und in der dafür vorgesehenen Gitterkassette in das Elektrotransfersystem der Firma Hoefer gegeben. Der elektrophoretische Transfer erfolgt über Nacht bei $4^\circ C$ mit 200 mA.

Transfer-Puffer: 50 mM Borsäure, 10% MeOH, pH 8,5 mit NaOH eingestellt.

c) Bindung der Antikörper

Nach dem elektrophoretischen Transfer wurde die Membran für 5 min in 10% Ponceau S-Lösung gefärbt und die Banden des Markers nach kurzem Entfärben durch H_2O mit einem Stift markiert. Nachdem die Membran mit TBS vollständig entfärbt worden war, wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit 5%igem Milchpulver in TBS abgesättigt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem für das Protein spezifischen Antikörper. Nachdem die Membran dreimal mit 0,05% Tween in TBS gewaschen worden war, erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen-IgGs. Abschließend erfolgten drei Waschschritte mit 0,05% Tween 20 in TBS für jeweils 5 min.

TBS: 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, pH 7,6

d) Detektion des Proteins

Die Detektion des Proteins erfolgte durch Chemolumineszenz mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham) nach Angaben des Herstellers.

D 3.4 Protein-Sequenzierung (Edman-Abbau)

Zur Sequenzierung mußte das Protein (Mindestens 50 pmol) auf eine PVDF-Membran (Millipore) überführt werden. Dies geschah durch SDS-PAGE und anschließendem Elektrotransfer (Blot) in einem Elektrotransfersystem der Firma Hoefer.

<u>Vorbereitung der PVDF-Membran:</u>	15 s in MeOH 2 min in H ₂ O 5 min in Transfer-Puffer
<u>Vorbereitung des Gels nach SDS-PAGE:</u>	15 min in Transfer-Puffer
<u>Elektrotransfer:</u>	20 h bei 4°C mit 200 mA
<u>Transfer-Puffer:</u>	50 mM Borsäure 20% MeOH pH 8,5
<u>Färbung:</u>	2 min mit 0,1% Coomassie/50% MeOH 5 min entfärben bis geeigneter Kontrast

Nach dem Herausschneiden wurden die Banden erst mit 90%igem MeOH, anschließend mit 10 mM NaOH entfärbt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem 473A Protein Sequencer (Applied Biosystems) durch das Service-Labor des ZMMK nach einer modifizierten Methode des Edman-Abbaus.

D 3.5 Chromatographische Verfahren

Zur Reinigung von N-terminal His₆-Myc-markiertem und C-terminal StrepII-markiertem Matrilin-4 wurden ausschließlich Affinitätsäulen verwendet. Vor der Affinitätsreinigung wurden die serumfreien Zellüberstände zentrifugiert (JLA 10500, Beckmann, 8000 rpm, 60 min, 4°C), dialysiert und filtriert.

D 3.5.1 Ni-NTA (Nitrilo-Triacetat)-Säule

His₆-Myc-markiertes Matrilin-4 wurde mit einer Ni-NTA-Säule (Qiagen) affinitätsgereinigt. Nickel, welches koordinativ über die drei Carboxylgruppen und das freie Elektronenpaar des Stickstoffs der NTA-Gruppe an das Säulenmaterial gebunden wird, besitzt weitere zwei Koordinationsstellen, welche die freien Elektronen des Stickstoffs zweier Histidine binden können. Elution erfolgte durch Verdrängung der Histidine durch Imidazol.

Eine Säule wurde mit 10 ml Matrix nach Angaben des Herstellers gepackt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min beladen, gewaschen und eluiert.

<u>Dialyse-Puffer:</u>	<u>Waschpuffer:</u>	<u>Elutionspuffer:</u>
50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄	50 mM NaH ₂ PO ₄
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
pH 8,0	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
	pH 8,0	2 M Harnstoff
		pH 8,0

D 3.5.2 Streptactin-Säule

C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-4 wurde mit einer Streptactin-Säule (Inst. f. Bioanalytik) affinitätsgereinigt. StrepII ist ein Peptid, welches eine Affinität zu Streptavidin, dem funktionellen Säulenmaterial der Streptactinsäule, besitzt. Elution erfolgte durch Verdrängung des StrepII Peptids durch Desthiobiotin.

Eine Säule wurde mit 3 ml Matrix nach Angaben des Herstellers gepackt und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,2 ml/min beladen, gewaschen und eluiert.

<u>Dialyse-Puffer:</u>	<u>Elutionspuffer:</u>
100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
pH 8,0	2,5 mM Desthiobiotin
	pH 8,0

D 3.6 Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper

Zur Auswahl der zur Immunisierung verwendbaren Tiere wurden mehrere Präimmunsereen mittels Immunoblot auf Kreuzreaktivitäten mit verschiedenen Gewebeextrakten getestet.

Die Immunisierung jeweils eines Kaninchens bzw. eines Hühnchens erfolgten mit je 500 µg der gereinigten Proteinkonstrukte in einem Auftragslabor (Pineda).

Das resultierende Serum wurde affinitätsgereinigt. Hierfür wurde das entsprechende Antigen an eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Säule gekoppelt. Das Serum wurde 10fach verdünnt und dreimal über die Säule gegeben. Die Elution erfolgte durch einen pH-Wert-Wechsel mit einem Glycin-Puffer, pH 2,5. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte in ein gleiches Volumen an 1 M Tris-HCl, pH 8,8, um eine irreversible Denaturierung zu vermeiden.

Waschpuffer:

10 mM Tris, pH 7,5
0,5 M NaCl

Elutionspuffer:

100 mM Glycin, pH 2,5

D 3.7 Sequentielle Gewebeextraktion

Zur sequentiellen Gewebeextraktion wurde das Gewebe grob mit dem Skalpell gereinigt und mit dem Polytron (Kinematica AG) in einem 10fachen Volumen Extraktionspuffer-1 unter Eiskühlung zerkleinert (1 min, max. Geschw.). Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Das Pellet wurde in einem entsprechendem Volumen Extraktionspuffer-2 suspendiert und erneut mit dem Polytron behandelt. Analog wurde mit den Extraktionspuffern 3 und 4 verfahren.

Extraktionspuffer-1:

150 mM NaCl
50 mM Tris, pH 7,4

Extraktionspuffer-2:

1 M NaCl
50 mM Tris, pH 7,4
10 mM EDTA

Extraktionspuffer-3:

Extraktionspuffer-2
+ 4 M Harnstoff

Extraktionspuffer-4:

4 M Guanidinium-Hydrochlorid

Den Extraktionspuffern-1 bis -3 waren zusätzlich 2 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) und NEM (N-Ethylmaleinimid) zugesetzt.

D 4 Massenspektrometrie

Gereinigtes StrepII-markiertes Matrilin-4 und His₆-markiertes Matrilin-3 wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht. Weiterhin wurde Matrilin-4, nach einem Verdau mit Trypsin, aus einem SDS-Polyacrylamidgel eluiert und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert und die Trypsinfragmente mittels ESI Q-TOF Massenspektrometrie sequenziert.

D 4.1 MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight)

MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde auf einem Bruker Reflex III TOF-Massenspektrometer durchgeführt. Hierfür wurde 1 µl der Probelösung mit 1 µl einer gesättigten Lösung an Sinapinsäure in Acetonitril/Wasser (2:1) und 0,1% Trifluoressigsäure gemischt und mit einem UV Laser bei 337 nm ionisiert. Die Spektren wurden ohne Reduktion, sowie nach Reduktion durch DTT (Dithiothreitol) auf dem Target aufgenommen.

D 4.2 ESI Q-TOF (electrospray ionisation quadropole-time of flight)

Elektrospray Massenspektrometrie wurde auf einem Micromass QTOF II (Micromass, Manchester) durchgeführt. Hierfür wurden die Proben über C₁₈-reversed phase Säulen entsalzt und aufkonzentriert. Elution der adsorbierten Peptide erfolgte mit 5% Ameisensäure/Methanol (1:1).

Die Messungen erfolgten durch das Service-Labor des ZMMK.

D 4.3 Trypsinverdau

Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, 15 min bei 37°C mit 20 mM DTT reduziert und 15 min bei 37°C mit 50 mM Jodacetamid in 50 mM NH₄CO₃-Puffer

alkyliert. Nach Inkubation über Nacht mit Trypsin oder Endoprotease Glu-C erfolgte die Elution mit 0,1% Trifluoressigsäure/Acetonitril (2:3).

D 5 Immunhistologische Arbeiten

Die histologischen Untersuchungen fanden auf Paraffin- oder Kryoschnitten von Mausembryonen, neugeborenen und sechs Wochen alten Mäusen statt. Gewebe von sechs Wochen alten Mäuse wurde vor der Paraffineinbettung entmineralisiert.

D 5.1 Fixierung des Gewebes

Um die Gewebestruktur möglichst gut zu erhalten, wurden die Gewebe fixiert. Dies geschah im Falle der Paraffineinbettung vor der Infiltration, im Falle der Kryoschnitte auf dem Gewebeschnitt. Zur chemischen Fixierung wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C, oder 20 min auf dem Objektträger bei RT, in 3,6% Formaldehyd in PBS inkubiert.

D 5.2 Entmineralisierung

Fixiertes Gewebe sechs Wochen alter Mäuse wurde entweder mit 0,1 M EDTA, pH 8,0 über 4 Wochen bei täglichem Pufferwechsel, oder mit 5% HNO₃ über Nacht bei 4°C, entmineralisiert. Nach der Entmineralisierung mit 5% HNO₃ wurde das Gewebe für 24 h in 5% Na₂SO₄ inkubiert, um ein Aufquellen zu vermeiden. Anschließend wurde das Gewebe für 24 h in Leitungswasser aufbewahrt.

D 5.3 Paraffineinbettung (Infiltration)

Zur Paraffineinbettung wurde das Gewebe entwässert, in Intermedien überführt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Inkubationszeiten in den entsprechenden Medien

waren abhängig vom Gewebedurchmesser, jedoch wurden die Gewebe im absolutem Alkohol, in Xylol und in Paraffin nicht länger als nötig inkubiert, um eine Härtung des Gewebes zu vermeiden.

<u>Alkoholreihe (je 2h):</u>	50%, 70%, 96%, 100%, 100%
<u>Intermedien (je 2h):</u>	2 mal Methylbenzoat, 2 mal Xylol, 1 mal Xylol/Paraffin
<u>Paraffin:</u>	1 mal 2h, 2 mal 3-6h

D 5.4 Entparaffinierung

Zum Herabführen wurden die Gewebeschnitte in folgenden Lösungen inkubiert:

Rotihistol:	2 mal 15-30 min, 50°C
Isopropanol:	2 mal 5 min
Alkoholreihe:	96%, 70%, 50%, je 3 min

D 5.5 Immunhistologische Nachweismethoden

Um eine gute Gewebepenetration der Antikörper zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte zuerst für 30 min bei 37°C einem Hyaluronidaseverdau unterzogen (1-2 mg/ml, PBS, pH 5-6) und anschließend für 5-10 min bei 37°C mit Proteinase K (0,5 µg/ml, 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) verdaut. Nach dem Proteinase K-Verdau wurde das Gewebe für 20 min mit 3,6% Formaldehyd in PBS fixiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1% BSA (Rinderserumalbumin) in TBS abgesättigt. Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C.

HRP (Meerrettich-Peroxidase, Dako): Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte eine Inkubation für 1h mit einem HRP-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgGs. Detektion erfolgte durch Umsetzung von AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma).

AP (Alkalische Phosphatase, , Jackson ImmunoResearch Laboratories): Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte sukzessiv eine Inkubation für 1h mit einem Biotin-SP-konjugiertem Antikörper gegen Kaninchen IgGs (Jackson ImmunoResearch Laboratories) und mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Detektion erfolgte durch Umsetzung von Fast Red TR/Naphtol (Sigma).

Chromophor (Cy2, Cy3, Jackson ImmunoResearch Laboratories): Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte eine Inkubation für 1h mit einem Cy2- oder Cy3-konjugiertem Antikörper gegen Kaninchen IgGs. Die Untersuchungen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop, Axiophot (Zeiss).

Doppelmarkierungen: Doppelmarkierungen erfolgten durch gleichzeitige Inkubation der Primärantikörper aus Kaninchen und Huhn für 1h, gefolgt von fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gegen Kaninchen und Huhn IgGs.

Alle Antikörper sowie AP-konjugiertes Streptavidin wurden in 1% BSA/TBS verdünnt. Zwischen allen Inkubationschritten, ausser nach dem Blockieren, wurde mehrere Male mit TBS/0,5% Tween gewaschen.

D 6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Zellen

RCS (Rattenchondrosarkom)-Zellen oder primäre, embryonale Mausfibroblasten wurden auf Glas- oder Plastikobjektträgern (Nunc) kultiviert und nach 3-7 Tagen mit 3,6% Formaldehyd in PBS fixiert. Nach Blockieren mit 1% BSA/TBS erfolgte die Einzel- oder Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie wie unter D 5.4 beschrieben.

Die Untersuchungen der Einzelimmunfluoreszenzen erfolgten an einem Fluoreszenzmikroskop, Axiophot (Zeiss). Die Untersuchungen der Doppelimmunfluoreszenzen wurden an einem konfokalen Mikroskop, TCS-SP (Leica), durchgeführt.

ANHANG

Anhang I Nomenklatur

Um die Beschreibung der proteolytischen Fragmente von Matrilin-3 und -4 zu vereinfachen, wurde folgende Nomenklatur eingeführt:

Q: Tetramer

T: Trimer

D: Dimer

M: Monomer

CC: Coiled-Coil Fragment

CC-R: Coiled-Coil Fragment ohne terminales Arginin

Den Bezeichnungen folgt entweder -CC oder +CC. Die Bezeichnung -CC weist auf das Fehlen des Coiled-Coil Fragmentes hin. Die Bezeichnung +CC weist auf ein zusätzliches Coiled-Coil Fragment hin, das über Disulfidbrücken an eine intakte Untereinheit gebunden ist. Besitzt eine Untereinheit mehr als ein zusätzliches Coiled-Coil Fragment, so ist dies durch eine Zahl gekennzeichnet. Im Falle von M+2CC handelt es sich um ein intaktes Monomer mit zwei zusätzlichen Coiled-Coil Fragmenten, die über Disulfidbrücken an das intakte Monomer gebunden sind. Es handelt sich also um ein Monomer bezüglich der vWFA- und EGF-ähnlichen Domänen, welches eine trimere Coiled-Coil Domäne besitzt.

Zusätzliche Coiled-Coil Fragmente, bzw. das Fehlen des Coiled-Coil Fragmentes, resultieren durch eine proteolytische Prozessierung vor den Cysteinresten der Coiled-Coil Domäne.

Eine schematische Darstellung der proteolytischen Fragmente findet man in Abb. B 4.3 und B 4.6.

Verzeichnis der Abkürzungen

Amp	Ampicillin
BM-40	Basalmembranprotein (40 kDa)
BSA	Rinderserumalbumin
CC	Coiled-Coil
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CMV	Cytomegalovirus
CNBr	Bromcyan
DDR	Discoidin-Domänen Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESI	Elektronenspray Ionisation
EST	Expressed Sequence Tag
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
GAG	Glykosaminoglykan
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HEK 293-Zellen	Humaner embryonaler Nierenzellenklon 293
HM4	N-terminal Histidin-Myc-markiertes Matrilin-4
HMW	Proteinstandard mit hohem Molekulargewicht
HOAc	Essigsäure
HNO ₃	Salpetersäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSPG	Heparansulfat Proteoglykan
IgG	Immunglobulin G

kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor
LB	Luria-Bertani
LMW	Proteinstandard mit niedrigem Molekulargewicht
M4S	C-terminal StrepII-markiertes Matrilin-4
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation- Time of Flight
MeOH	Methanol
MIDAS	Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle
min	Minute(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Ni	Nickel
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
NTA	Nitrilo Triacetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p.c.	post coitus
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q-TOF	Quadropole-Time of Flight
RCS-Zellen	Rattenchondrosarkom Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natrium Dodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Tumor Wachstumsfaktor
TNF	Tumor Nekrose-Faktor
TOF	Time of Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
vWFA	Von Willebrand-Faktor A
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin Köln

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, J. C., Watt, F. M. (1993), *Development* 117, 1183-98.
- Andac, Z., Sasaki, T., Mann, K., Brancaccio, A., Deutzmann, R., Timpl, R. (1999), *J. Mol. Biol.* 287, 253-64.
- Aszódi, A., Hauser, N., Studer, D., Paulsson, M., Hiripi, L., Bösze, Z. (1996), *Eur. J. Biochem.* 236, 970-7.
- Aszódi, A., Bateman, J. F., Hirsch, E., Baranyi, M., Hunziker, E. B., Hauser, N., Bösze, Z., Fässler, R. (1999), *Mol. Cell. Biol.* 19, 7841-5.
- Barcellos-Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram, T. G., Bissell, M. J. (1989), *Development* 105, 223-35.
- Beck, K., Gambee, J. E., Bohan, C. A., Bächinger, H. P. (1996), *J. Mol. Biol.* 256, 909-23.
- Beck, K., Gambee, J. E., Kamawal, A., Bächinger, H. P. (1997), *EMBO J.* 16, 3767-77.
- Bissell, D. M., Caron, J. M., Babiss, L. E., Friedman, J. M. (1990), *Mol. Biol. Med.* 7, 187-97.
- Bissell, M. J., Hall, H. G., Parry, G. (1982), *J. Theor. Biol.* 99, 31-68
- Blau, H. M. (1992), *Nature* 358, 284-5.
- Cavaldesi, M., Macchia, G., Barca, S., Defilippi, P., Tarone, G., Petrucci, T. C. (1999), *J. Neurochem.* 72, 1648-55.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 7709-12.
- Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R., Tondravi, M. M., Goetinck, P. F. (1995), *Mol. Biol. Cell.* 6, 1743-53.
- Chen, Q., Zhang, Y., Johnson, D. M., Goetinck, P. F. (1999), *Mol. Biol. Cell.* 10, 2149-62.
- Chu, M. L., Pan, T. C., Conway, D., Saitta, B., Stokes, D., Kuo, H. J., Glanville, R. W., Timpl, R., Mann, K., Deutzmann, R. (1990), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 580, 55-63.
- Clark, E. A., Brugge, J. S. (1995), *Science* 268, 233-9.
- Colombatti, A., Bonaldo, P., Doliana, R. (1993), *Matrix* 13, 297-306.
- Cruz, M. A., Yuan, H., Lee, J. R., Wise, R. J., Handin, R. I. (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 10822-7

- Cruz, M. A., Yuan, H., Lee, J. R., Wise, R. J., Handin, R. I. (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 19668, Zusatz und Korrektur von *J. Biol. Chem.* 270, 10822-7.
- Deák, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulsson, M., Kiss, I. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 9268-74.
- Deák, F., Wagener, R., Kiss, I., Paulsson, M. (1999), *Matrix Biol.* 18, 55-64.
- Deutzmann, R., Aumailley, M., Wiedemann, H., Pysny, W., Timpl, R., Edgar, D. (1990), *Eur. J. Biochem.* 191, 513-22.
- Durbeej, M., Larsson, E., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Roberds, S. L., Campbell, K. P., Ekblom, P. (1995), *J. Cell. Biol.* 130, 79-91.
- Eckes, B., Mauch, C., Huppe, G., Krieg, T. (1996), *Biochem. J.* 315, 549-54.
- Emerman, J. T., Pitelka, D. R. (1977), *In Vitro* 13, 316-28.
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., Campbell, K. P. (1990), *Nature* 345, 315-9.
- Ervasti, J. M., Campbell, K. P. (1991), *Cell* 66, 1121-31.
- Fantl, W. J., Johnson, D. E., Williams, L. T. (1993), *Annu. Rev. Biochem.* 62, 453-81.
- Fernig, D. G., Gallagher, J. T. (1994), *Prog. Growth Factor Res.* 5, 353-77.
- Furlan, M., Robles, R., Lamie, B. (1996), *Blood* 87, 4223-34.
- George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., Hynes, R. O. (1993), *Development* 119, 1079-91.
- Guimond, S., Maccarana, M., Olwin, B. B., Lindahl, U., Rapraeger, A. C. (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 23906-14.
- Handford, P. A., Mayhew, M., Baron, M., Winship, P. R., Campbell, D. I., Brownlee, G. G. (1991), *Nature* 351, 164-7.
- Harbury, P. B., Zhang, T., Kim, P. S., Alber, T. (1993), *Science* 262, 1401-7.
- Hauser, N., Paulsson, M. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 25747-53
- Hauser, N., Paulsson, M., Heinegård, D., Mörgelin, M (1996), *Acta Orthopaedica Scan.* 66, suppl. 266, 71-2.
- Hay, E. D. (1993), *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5, 1029-35.
- Henry, M. D., Campbell, K. P. (1998), *Cell* 95, 859-70.
- Hershkoviz, R., Cahalon, L., Gilat, D., Miron, S., Miller, A., Lider, O. (1993), *Scand. J. Immunol.* 37, 111-5.

- Howe, A., Aplin, A. E., Alahari, S. K., Juliano, R. L. (1998), *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 220-31.
- Huang, X., Birk, D. E., Goetinck, P. F. (1999), *Dev. Dyn.* 216, 434-41.
- Humphries, M. J. (2000), *Trends. Pharmacol. Sci.* 21, 29-32.
- Hynes, R. O. (1996), *Dev. Biol.* 180, 402-12.
- Katayama, K., Armendariz-Borunda, J., Raghov, R., Kang, A. H., Seyer, J. M. (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 9941-4.
- Kiss, I., Deák, F., Holloway, R. G., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W. S., Tsonis, P. A., Winterbottom, N., Goetinck, P. F. (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 8126-34.
- Klatt, A. R. (1997), Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 3999-4006.
- Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Macht, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2001), *J. Biol. Chem.* 276, 17267-75.
- Kleemann-Fischer, D., Kleemann, G. R., Engel, D., Yates, J. R., Wu, J., Eyre, D. R. (2001), *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 209-15.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C., Timpl, R. (1997), *FEBS Lett.* 414, 557-61.
- Laemmeli, U. K. (1970), *Nature* 227, 680-5.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., Liddington, R. (1995), *Cell* 80, 631-8.
- Lin, C. Q., Bissell, M. J. (1993), *FASEB J.* 7, 737-43.
- Liu, J. K., DiPersio, C. M., Zaret, K. S. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 773-84
- Lopez-Casillas, F., Payne, H. M., Andres, J. L., Massague, J. (1994), *J. Cell. Biol.* 124, 557-68.
- Lyon, M., Deakin, J. A., Gallagher, J. T. (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 11208-15.
- Nakagawa, T., Kubota, T., Kabuto, M., Sato, K., Kawano, H., Hayakawa, T., Okada, Y. (1994), *J. Neurosurg.* 81, 69-77.
- Oh, E. S., Woods, A., Couchman, J. R. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 8133-6.
- Oh, E. S., Woods, A., Couchman, J. R. (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 11805-11.
- Oh, E. S., Woods, A., Lim, S. T., Theibert, A. W., Couchman, J. R. (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 10624-9.

- Okimura, A., Okada, Y., Makihiro, S., Pan, H., Yu, L., Tanne, K., Imai, K., Yamada, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Yan, W., Kato, Y. (1997), *Arthritis. Rheum.* 40, 1029-36.
- Olsen, B. R. (1989), *Connect. Tissue. Res.* 23, 115-21.
- Owen, T. A., Holthuis, J., Markose, E., van Wijnen, A. J., Wolfe, S. A., Grimes, S. R., Lian, J. B., Stein, G. S. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5129-33.
- Paglia, L. M., Wiestner, M., Duchene, M., Ouellette, L. A., Horlein, D., Martin, G. R., Müller, P. K. (1981), *Biochemistry* 20, 3523-7.
- Pan, O. H., Beck, K. J. (1998), *Biol. Chem.* 273, 14205-9.
- Patthy, L. (1991), *Bioessays* 13, 187-92.
- Paulsson, M., Heinegård, D. (1979), *Biochem. J.* 183, 539-45.
- Paulsson, M., Heinegård, D. (1982), *Biochem. J.* 207, 207-13.
- Pullig, O., Weseloh, G., Klatt, A. R., Wagener, R., Swoboda, B., Manuskript in Vorbereitung.
- Piecha, D., Muratoglu, S., Mörgelin, M., Hauser, N., Studer, D., Kiss, I., Paulsson, M., Deák, F. (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 13353-61.
- Saitta, B., Stokes, D. G., Vissing, H., Timpl, R., Chu, M. L. (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 6473-80.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning, A laboratory Manual.*, 2te Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schwitzer, R. C., Merrill, C. R., Shifrin, S. (1979), *Anal. Biochem.* 98, 231.
- Segat, D., Frie, C., Nitsche, P. D., Klatt, A. R., Piecha, D., Korpos, E., Deák, F., Wagener, R., Paulsson, M., Smyth, N. (2000), *Matrix Biol.* 19, 649-55.
- Shaw, L. M., Olsen, B. R. (1991), *Trends Biochem. Sci.* 16, 191-4.
- Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Huizinga, E. G., van der Plas, R. M., Verkley, M., Wu, Y. P., Gros, P., de Groot, P. G. (1997), *Thromb. Haemost.* 78, 434-8.
- Smyth, N., Odenthal, U., Merkl, B., Paulsson, M. (2000), *Methods Mol. Biol.* 139, 49-57.
- Stokes, D. G., Saitta, B., Timpl, R., Chu, M. L. (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 8626-33.
- Streuli, C. H., Bissell, M. J. (1991), *Cancer Treat. Res.* 53, 365-81.
- Stryer, L. (1994), *Biochemie*, 2. Korr. Nachdruck der völlig neu bearbeiteten Aufl. 1990, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Talts, J. F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A., Timpl, R. (1999), *EMBO J.*, 18, 863-70.
- Tremble, P., Chiquet-Ehrismann, R., Werb, Z. (1994), *Mol. Biol. Cell* 5, 439-53.

- Tsonis, P. A., Goetinck, P. F. (1988), *Exp. Eye Res.* 46, 753-64.
- van der Rest, M., Aubert-Foucher, E., Dublet, B., Eichenberger, D., Font, B., Goldschmidt, D. (1991), *Biochem. Soc. Trans.* 19, 820-4.
- Vaughan, L., Mendler, M., Huber, S., Bruckner, P., Winterhalte, K. H., Irwin, M. I., Mayne, R. (1988), *J. Cell. Biol.* 106, 991-7.
- Vogel, W., Brakebusch, C., Fässler, R., Alves, F., Ruggiero, F., Pawson, T., (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5779-84.
- Wagener, R., Kobbe, B., Paulsson, M. (1997), *FEBS Lett.* 413, 129-34.
- Wagener, R., Kobbe, B., Paulsson, M. (1998), *FEBS Lett.* 436, 123-7.
- Wagener, R., Kobbe, B., Aszódi, A., Liu, Z., Beier, D. R., Paulsson, M. (2000), *Mamm. Genome* 11, 85-90.
- Werb, Z., Tremble, P. M., Behrendtsen, O., Crowley, E., Damsky, C. H. (1989), *J. Cell. Biol.* 109, 877-89.
- Wiestner, M., Krieg, T., Horlein, D., Glanville, R. W., Fietzek, P., Müller, P. K. J. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 7016-23.
- Wiltschek, R., Kammerer, R. A., Dames, S. A., Schulthess, T., Blommers, M. J., Engel, J., Alexandrescu, A. T. (1997), *Protein Sci.* 6, 1734-45.
- Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M., Goetinck, P. F. (1992), *Dev. Dyn.* 193, 266-76.
- Witt, D. P., Lander, A. D. (1994), *Curr. Biol.* 4, 394-400.
- Woods, A., Oh E. S., Couchman, J. R. (1998), *Matrix Biol.* 17, 477-83
- Wu, J. J., Eyre, D. R. (1998), *J. Biol. Chem.* 273, 17433-8.
- Wuttke, T. (2001), Dissertation, Universität zu Köln.
- Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J, Koretzky, G., Campbell, K. P. (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 11711-4.
- Zätterström, U. K., Felbor, U., Fukai, N., Olsen, B. R. (2000), *Cell Struc. Func.* 25, 97-101.
- Zhang, Y., Chen, Q. (2000), *J. Biol. Chem.*, 275, 32628-34.

Erklärung

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

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

Köln, den 08.05.2001

Teilpublikationen:

Segat D., Frie C., Nitsche P. D., Klatt A. R., Piecha D., Korpos E., Deák F., Wagener R., Paulsson M., Smyth N. (2000), Matrix Biol. 19, 649-55.

Klatt*, A. R., Nitsche*, D. P., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2000), J. Biol. Chem. 275, 3999-4006. (*geteilte Erstautorenschaft)

Klatt, A. R., Nitsche, D. P., Kobbe, B., Macht, M., Paulsson, M., Wagener, R. (2001), J. Biol. Chem. 276, 17267-75.

DANKE

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben!

Prof. Paulsson danke ich für die interessante Themenstellung, für ausgezeichnete Arbeitsbedingungen und sein Engagement bei der Betreuung der Arbeit.

Prof. Klein danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Allen Kollegen danke ich für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen gilt meinen Eltern.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an die Matrilin-Familie, sprich Raimund Wagener, Patric Nitsche, Birgit Kobbe und Mats Paulsson, mit denen die Zeit einfach sehr schön war.

Leider fehlt mir die Fähigkeit mich in blumigen Sätzen zu bedanken. Trotzdem hoffe ich, dass die genannten Personen sich dem Anteil an dieser Arbeit und der schönen Zeit die ich hier am Institut verbracht habe, bewußt sind.

Andreas

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Andreas Ralf Rainer Klatt
Geburtsdatum, -ort	24.04.1970, Bergisch-Gladbach
Anschrift	Scheidtweilerstr. 48, 50933 Köln
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

31.08.76-03.08.80	Grundschule, Köln-Ehrenfeld
04.08.80-31.05.90	Montessori Gymnasium, Köln-Bickendorf

Hochschulbildung

01.10.90-01.10.94	Grundstudium Chemie, Universität zu Köln
01.10.94-21.12.96	Hauptstudium Chemie, Universität zu Köln
06.01.-06.10.97	Diplomarbeit, Inst. f. Biochemie II, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln, Thema: Proteinchemische Untersuchungen an Matrilin-3

Doktorarbeit

Beginn: 09.10.97	Doktorarbeit in physiologischer Chemie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, durchgeführt am Inst. f. Biochemie II bei Prof. Paulsson, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln
------------------	--