

## Zusammenfassung

Chondrodysplasien sind skeletale Erkrankungen, die u.a. durch Mutationen in COMP und Matrilin-3 hervorgerufen werden können. Beide Proteine werden vornehmlich in der extrazellulären Matrix des Knorpels exprimiert, wo sie als Adapterproteine zwischen den Kollagenfibrillen und anderen Komponenten der Matrix fungieren. Bei der Pathogenese von Chondrodysplasien sind sowohl intra- als auch extrazelluläre molekulare Mechanismen beteiligt, die in der vorliegenden Arbeit anhand von krankheitsrelevanten Mutationen in COMP und Matrilin-3 näher untersucht wurden. Da COMP einen katalytischen Effekt auf die Bildung von Kollagenfibrillen hat, wurde hier der Einfluss der sekretierten Mutante COMP H587R auf diesen Prozess analysiert. Eine *in vitro* Kollagenfibrillogenese unter Einfluss von COMP sollte Aufschluss über extrazelluläre Auswirkungen der H587R Mutante geben. Durch die Mutante wurde die Fibrillogenese noch stärker beschleunigt. Allerdings wurden in Anwesenheit von COMP H587R Intermediate und Endprodukte mit auffallend zerstörten Strukturen nachgewiesen. Die hier untersuchten Matrilin-3 Mutationen R116W und C299S führen zur Retention der Proteine im endoplasmatischen Retikulum. Die Auswirkungen dieses gestörten Proteintransports wurden zunächst in HEK-293-EBNA Zellen untersucht. Durch Immunoblotanalysen und Immunfluoreszenzfärbungen stellte sich heraus, dass mutierte Proteine vorwiegend unlösliche Proteinaggregate bilden, welche die Sekretion behindern und letztendlich ER-Stress induzieren. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand auch die Etablierung einer sekretionsfördernden Methode, um weitere Analysen mutierter Proteine zu ermöglichen. Die Absenken der Inkubationstemperatur führte zur verbesserten Sekretion von R116W, sowohl in HEK-293-EBNA Zellen als auch in primären Chondrozyten. Darüber hinaus wurde der ER-Stress der Zellen auf diesem Wege deutlich vermindert. Die Behandlung mit chemischen Chaperonen oder Inhibitoren von Proteasomen und Lysosomen hatten letztlich nur einen geringen Einfluss. Nach Co-Transfektion mit Wildtyp- und mutiertem Matrilin-3 konnte die heterozygote Expression autosomal dominanter Erkrankungen in Zellkultur simuliert werden. Die Heterooligomerisierung wildtypischer und mutierter Monomere resultierte zum einen in einer verbesserten Sekretion mutierter Untereinheiten, zum anderen in der Retention von Wildtyp Proteinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass sich intrazellulär zurückgehaltene Proteine sehr unterschiedlich verhalten können, was die unterschiedliche Symptomatik von autosomal dominanten und rezessiven Erkrankungen erklären könnte.

## *Abstract*

Chondrodysplasias are skeletal diseases, which are associated with mutations in COMP and matrilin-3. Both proteins are mainly expressed in the extracellular matrix of cartilage, where they act as adapter proteins between collagen fibrils and other matrix constituents. The pathogenesis of chondrodysplasias is caused by both intra- and extracellular molecular mechanisms, which were analysed by mutations in COMP and matrilin-3. COMP has a catalytic stimulatory effect on the fibril formation of collagens. Extracellular effects of COMP were analyzed by *in vitro* fibrillogenesis of collagens in presence of the secreted H587R mutant. H587R accelerated the formation of higher complexes even more. However, electron microscopy showed fibrils with remarkable disrupted structures. In contrast to mutations in COMP, the matrilin-3 mutations, R116W and C299S lead to retention of mutant proteins in the endoplasmic reticulum of chondrocytes. The intracellular consequences of protein accumulation were analyzed in HEK-293-EBNA cells. Immunoblot analysis and immunofluorescence stainings showed, that mutant proteins predominantly form insoluble protein aggregates, which markedly hamper secretion and enhance ER-stress. A main aim of this study was to establish a method that promotes secretion to allow further analysis of mutant proteins. Lowering the culture temperature promotes secretion of R116W, in HEK-293-EBNA cells and primary chondrocytes. In addition, ER-stress in HEK-293-EBNA cells was significantly reduced. Furthermore, heterozygous expression of autosomal dominant diseases was simulated in cell culture by co-transfecting wildtype- and mutant matrilin-3. Heterooligomers, consisting of wildtype- and C299S monomers were formed, resulting in enhanced secretion of mutant subunits, but also increased retention of wildtype proteins. These results show that intracellularly retained proteins behave differently, which could explain the variable pathology of autosomal dominant and autosomal recessive diseases.