

Abstract

Collagen IX, COMP and matrilin-3 are important adaptor proteins in the extracellular matrix (ECM) of cartilage. Mutations in the genes coding for these proteins have been linked to the same chondrodysplasia, multiple epiphyseal dysplasia (MED). They play crucial roles in mediating interactions between the two major supermolecular networks in the ECM, the collagen fibrils and the proteoglycan gel, adjusting the matrix assembly and participating in regulating chondrocyte behavior. The three proteins bind to each other and even if they are structurally different they are functionally related and may be redundant. To assess this issue in greater detail, we first analyzed the influence of COMP and matrilin-3 on ECM assembly and chondrocyte behavior and generated collagen IX, COMP and matrilin-3 triple deficient (TKO) mice. Both in vitro and in vivo studies showed that COMP and matrilin-3 affect chondrocyte adhesion, proliferation and differentiation, probably by regulating the expression and assembly of other ECM components. In the characterization of collagen IX/COMP/matrilin-3 triple deficient mice, we found that at newborn stage these mice showed similar defects in longitudinal bone growth as collagen IX single deficient mice. Also the chondrocyte arrangement was affected in a similar manner. However, the increase in bone width in collagen IX deficient mice was attenuated by additional loss of COMP and matrilin-3. At one month of age, the cortical bone parameters were regulated in opposite directions in collagen IX deficient and COMP/matrilin-3 double deficient mice, which leads to normal cortical bone parameters in TKO mice. We propose that collagen IX and non-collagenous adaptor proteins COMP/matrilin-3 have antagonistic effects on appositional bone growth.

Collagen II is the major fibril-forming collagen in cartilage. Mutations in the human COL2A1 gene lead to osteochondrodysplasias with diverse phenotypes ranging from mild early-onset osteoarthritis to perinatal lethality. By siRNA knockdown of collagen II in primary mouse chondrocytes, we found that cells with a decreased collagen II expression produced more collagen I.

COMP could associate with newly formed collagen I, while other collagen II binding proteins like collagen IX and matrilin-3 were less anchored to the matrix and were increased in the cell culture supernatant. Collagen II plays an important role in the regulation of the Ihh/PTHrP feedback loop and the differentiation of collagen II deficient cells was accelerated. The results suggest a novel mechanism of chondrocyte maturation, which is regulated by the integrin-mediated crosstalk between the extracellular matrix and the cells.

Zusammenfassung

Collagen IX, COMP and Matrilin-3 sind wichtige Adapterproteine in der extrazellulären Matrix (EZM) des Knorpels. Mutationen in Genen, die für diese Proteine kodieren, führen im Menschen zu einer bestimmten Chondrodysplasieform, der sogenannten multiplen epiphysären Dysplasie (MED). Adapterproteine spielen bei Interaktionen zwischen den beiden Suprastrukturen in der EZM, den Collagenfibrillen und dem Proteoglycangel, eine entscheidende Rolle, indem sie die Assemblierung der Matrix vermitteln und unterstützen aber auch direkt das Verhalten der Chondrocyten regulieren. Die drei hier untersuchten Proteine interagieren miteinander und könnten trotz ihres unterschiedlichen strukturellen Aufbaus eine funktionelle Redundanz erfüllen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss von COMP und Matrilin-3 auf die Assemblierung der EZM und das Verhalten von Chondrocyten untersucht. Ausserdem wurden Mäuse generiert, die für Collagen IX, COMP und Matrilin-3 defizient sind (TKO). Sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen zeigten, dass COMP und Matrilin-3 die Adhesion, die Proliferation und die Differenzierung der Chondrocyten beeinflussen, wahrscheinlich durch die Regulation der Expression und den veränderten Einbau anderer EZM Komponenten. Die Charakterisierung neugeborener TKO Mäuse ergab ähnliche Defekte im Längenwachstum, wie sie bereits in Collagen IX defizienten Mäusen beschrieben wurden. Auch die Anordnung der Chondrocyten war in gleicher Weise beeinträchtigt. Allerdings wurde die Erhöhung der Knochenbreite in Collagen IX defizienten Mäusen durch den zusätzlichen Verlust von COMP und Matrilin-3 abgeschwächt. Kortikale Knochenparameter verhielten sich in einem Monat alten Tieren in Collagen IX bzw. in COMP/Matrilin-3 doppelt-defizienten Mäusen in entgegengesetzter Richtung, was schließlich in einer Normalisierung dieser Parameter in TKO Mäusen resultierte. Daraus lässt sich schließen, dass Collagen IX und die beiden nicht-collagenen Adapterproteine COMP und Matrilin-3 antagonistische Effekte auf das appositionelle Knochenwachstum haben.

Collagen II ist das häufigste fibrillenbildende Collagen im Knorpel. Mutationen im humanen COL2A1 Gene führen zu Osteochondrodysplasien mit einem breiten Spektrum verschiedener Phänotypen von einer milden, früh einsetzenden Osteoarthritis bis hin zu perinataler Lethalität. Der siRNA knockdown von Collagen II in primären Chondrocyten führt zu einer reduzierten Expression von Collagen II aber gleichzeitig zu einer verstärkten Expression von Collagen I. Überraschenderweise kann COMP auch mit neu gebildetem Collagen I interagieren, wohingegen andere Collagen II bindende Proteine wie z.B. Collagen IX und Matrilin-3 weniger gut in der Matrix verankert und daher vermehrt im Überstand der Zellkulturen nachweisbar waren. Collagen II spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation des Ihh/PTHrP Kreislaufs. Die Differenzierung Collagen II defizienter Zellen war dadurch beschleunigt. Diese Ergebnisse implizieren einen neuen integrin-vermittelten Mechanismus der Chondrocytenreifung, der über eine Zell-Matrix Interaktion reguliert wird.