

Biologie

**Suprastrukturelle Organisation der
Kollagenfibrillen in der Haut und der Cornea:
Rolle der Kollagene I, II, III, V und XI**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Philipp Clemens Uhlig
aus Trier
- 2010 -

Dekan: Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Martin Bähler

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Peter Bruckner

Tag der mündlichen Prüfung: ~~12.05.2024~~

Tag der Promotion: ~~12.05.2024~~

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
1 Einleitung	7
1.1 Allgemeiner Aufbau des Bindegewebes	7
1.2 Aufbau der Haut	8
1.2.1 Epidermis	9
1.2.2 Dermis und Subkutis.....	10
1.2.3 Dermo-epidermale Junctionszone	11
1.3 Aufbau der Cornea	12
1.4 Suprastrukturen der extrazellulären Matrix	14
1.4.1 Kollagene	15
1.4.2 Fibrilläre Kollagene und Fibrillenbildung.....	17
1.4.2.1 Kollagen I	19
1.4.2.2 Kollagen II	20
1.4.2.3 Kollagen III	21
1.4.2.4 Kollagen V und XI	22
1.4.2.5 Funktion der N-terminalen Propeptide von Kollagen V und XI	23
1.4.2.6 Ehlers-Danlos Syndrom und Kollagen V-Defekte.....	25
1.4.2.7 Kollagen VI-Mikrofibrillen.....	26
1.4.3 Nichtkollagene Matrix-Proteine.....	27
1.4.3.1 Elastische Fasern.....	27
1.4.3.2 Weitere nichtkollagene Glykoproteine	28
1.4.3.3 Proteoglykane	30
1.5 Zielsetzung.....	33
2 Material und Methoden	35
2.1 Gewebeprobe.....	35
2.1.1 Humane Hautproben	35
2.1.1.1 Gewinnung von Hautschichten unterschiedlicher Tiefe.....	35
2.1.2 Humane Corneaprobe	36
2.1.3 Bovine Haut- und Corneaprobe	36
2.1.4 Murine Hautproben	36
2.1.5 Murines Wundgewebe	36
2.2 Antikörper	37
2.2.1 Kollagen V-Antikörper	37
2.2.2 Kollagen α 5(VI)-Antikörper	39
2.2.3 Kollagen III-Antikörper	39
2.2.4 Kollagen II-Antikörper	39
2.2.5 Antikörper gegen weitere Matrix-Proteine	40

2 Inhaltsverzeichnis

2.3	Zellkultur.....	41
2.3.1	Gewinnung dermalen Fibroblasten.....	41
2.3.2	Einfrieren und Lagerung von Fibroblasten	41
2.3.3	Kultivierung von Fibroblasten	42
2.3.3.1	Monolayerkulturen.....	42
2.3.3.2	Dreidimensionale Kultivierung.....	42
2.3.3.3	Metabolische Markierung von Kollagenen.....	43
2.4	Proteinbiochemie	43
2.4.1	Herstellung von Proteinextrakten.....	43
2.4.1.1	Limitierter Pepsin-Verdau von Gewebeproben.....	44
2.4.1.2	Limitierter Pepsin-Verdau von Zellkulturmaterial.....	44
2.4.1.3	Kollagenase-Verdau von Proteinextrakten.....	45
2.4.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.4.2.1	Gelanfärbung mit Coomassie-Blau	47
2.4.2.2	Silberfärbung.....	47
2.4.3	Immunblot.....	48
2.4.4	Anfertigung von Kollagen-Fluorogrammen.....	49
2.4.5	Massenspektrometrische Untersuchungen von Kollagenen	50
2.4.6	Bestimmung der Molekularmassen von Proteinbanden.....	51
2.4.7	Densitometrie von SDS-Gelen und Immunblots.....	51
2.5	Histologie.....	52
2.5.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	52
2.5.2	Immunhistochemie.....	53
2.5.2.1	Immunperoxidase-Verfahren.....	53
2.5.2.2	Enzymatische Demaskierung von Epitopen.....	54
2.5.2.3	Immunfluoreszenz.....	54
2.6	Transmissionselektronenmikroskopie.....	55
2.6.1	Anfertigung von Ultradünnschnitten	55
2.6.2	Extraktion suprastruktureller Fragmente	56
2.6.2.1	Extraktion mit Essigsäure.....	57
2.6.3	Immunogold-Elektronenmikroskopie	57
2.6.3.1	Vorbehandlung von Ultradünnschnitten mit Ethanol	58
2.6.3.2	Demaskierung von Epitopen mit bakterieller Kollagenase	59
2.6.3.3	Demaskierung von Epitopen mit MMP-1.....	59
3	Ergebnisse.....	61
3.1	Untersuchungen fibrillärer Kollagene der Haut.....	61
3.1.1	Lokalisation von Kollagen V.....	61
3.1.2	Lokalisation der Kollagene I, III, und IV sowie Tenascin-C und -X.....	64
3.1.3	Lokalisation von Kollagen V nach enzymatischer Demaskierung	66
3.1.4	Kolokalisation der Kollagene V und IV	68
3.1.5	Kolokalisation der Kollagene V und I.....	70
3.1.6	Kolokalisation von Kollagen V und Fibrillin-1.....	71

3.1.7	Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette	72
3.1.8	Immunblots des Kollagen V in der Haut	74
3.1.9	Untersuchung von α -Ketten des Kollagen V in unterschiedlichen Hautschichten	76
3.1.10	Nachweis der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette in unterschiedlichen Hautschichten	78
3.1.11	Massenspektrometrische Analyse dermalen Kollagene	80
3.1.12	Immunogold-Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten	83
3.1.13	Immunogold-Elektronenmikroskopie suprastruktureller Fragmente	85
3.1.14	Immunogold-Elektronenmikroskopie von Essigsäure-Extrakten.....	86
3.1.15	Proteolytische Demaskierung dermalen Kollagenfibrillen.....	88
3.2	Untersuchungen fibrillärer Kollagene aus Wundgewebe und junger Haut.....	90
3.2.1	Fibrilläre Kollagene in junger humaner Haut	90
3.2.2	Kollagen α -Ketten in junger muriner Haut	91
3.2.3	Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen der jungen murinen Haut	93
3.2.4	α -Ketten des Kollagen V in dermale Wundgewebe.....	96
3.3	Untersuchungen fibrillärer Kollagene aus Kulturen dermalen Fibroblasten	98
3.3.1	Lokalisation der Kollagene I und V	98
3.3.2	Kollagensynthese durch kutivierte Fibroblasten	100
3.3.3	Immunblots der Kollagene III und V aus kultivierten Fibroblasten	102
3.3.4	Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen kultivierter Fibroblasten	105
3.3.5	Bindegewebs-Suprastrukturen kultivierter Fibroblasten.....	107
3.4	Untersuchungen fibrillärer Kollagene der Cornea.....	110
3.4.1	Lokalisation von Kollagen V.....	111
3.4.2	Lokalisation der Kollagene I und II	112
3.4.3	Lokalisation der Kollagene I und III	114
3.4.4	Kolokalisation der Kollagene IV und V	115
3.4.5	Immunblots des Kollagen V	117
3.4.6	Immunblots der Kollagene I und II	119
3.4.7	Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen der bovinen Cornea	120
3.4.8	Immunogold-Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten	123
3.4.9	Extrakte suprastruktureller Fragmente der bovinen Cornea	124
3.4.10	Demaskierung suprastruktureller Fragmente der Cornea.....	127
3.4.11	Extrakte suprastruktureller Fragmente der humanen Cornea.....	128
4	Diskussion.....	131
4.1	Kollagen V in extrafibrillären Suprastrukturen.....	131
4.1.1	Maskierung des N-Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette	131
4.1.1.1	Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen.....	133
4.1.1.2	Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette	135
4.1.1.3	Suprastrukturen der Kollagene V und I	137
4.1.2	Kollagen V in tieferen Schichten der Haut und der Cornea.....	138
4.1.2.1	Kollagen V und Tenascin-X.....	138
4.1.2.2	Demaskierung von Kollagen V-Epitopen.....	139

4 Inhaltsverzeichnis

4.1.3	Prozessierung und Ketten-Zusammensetzung des Kollagen V	140
4.1.3.1	Prozessierungsvarianten der $\alpha 1(V)$ -Kette in der Haut und der Cornea	142
4.1.3.2	Kovalente Quervernetzungen des Kollagen V	142
4.1.3.3	Aggregate der $\alpha 1(V)$ -Kette in unterschiedlichen Hautschichten	143
4.1.4	Transiente Synthese der $\alpha 3(V)$ -Kette	144
4.1.5	Transiente Synthese von Kollagen I- und III-Multimeren	146
4.1.6	Kollagen V-haltige Suprastrukturen kultivierter Fibroblasten	148
4.1.6.1	Sekretion von Prokollagen III durch kultivierte Fibroblasten	150
4.1.7	Schlussfolgerung I.	151
4.2	Kollagenfibrillen der adulten Cornea	152
4.2.1	Dicke Kollagenfibrillen in der Cornea	153
4.2.2	Kollagen II in dicken Fibrillen der bovinen Cornea	154
4.2.3	Kollagen I und III in dicken Fibrillen der humanen Cornea	155
4.2.4	Kollagen II und XI in der bovinen Cornea	156
4.2.5	Schlussfolgerung II.	157
4.3	Experimenteller Ausblick	158
4.3.1	Funktion von Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen	158
4.3.2	Funktion dicker Fibrillen in der Cornea	159
5	Anhang	161
5.1	Zusätzlich getestete Kollagen V-Antikörper	161
5.2	Abkürzungsverzeichnis	163
5.3	Literaturverzeichnis	165
5.4	Lebenslauf	183
5.5	Danksagung	184

Zusammenfassung

Der quantitativ bedeutendste Anteil der Bindegewebs-Suprastrukturen sind Kollagenfibrillen. Sie setzen sich je nach Organ und Gewebsregion aus mehreren verschiedenen Kollagentypen (hauptsächlich die fibrillären Kollagene I, II, III, V und XI sowie die Fibrillen-assoziierten Kollagene IXI, XII und XIV) in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zusammen. Besonders deutlich wird der Unterschied in der Organisation von Kollagenfibrillen bei dem Vergleich des elastischen und undurchsichtigen Bindegewebes der Haut mit dem lichtdurchlässigen und unelastischen Bindegewebe der Cornea. Die Lichtdurchlässigkeit der Cornea ist im Wesentlichen auf die lamellare Organisation der homogenen dünnen Kollagenfibrillen und deren Zusammensetzung (vorwiegend Kollagen I und V) zurückzuführen. Die Durchmesser und die Zusammensetzung dermalen Kollagenfibrillen (vorwiegend Kollagen I, III und V) sind hingegen heterogen. Auf Grund seiner Funktion als Nukleationskeim für die Fibrillogenese und der regulierenden Eigenschaften hinsichtlich der Fibrillendurchmesser, hat Kollagen V eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der charakteristischen dünnen Kollagenfibrillen der Cornea. Hier wurde untersucht, ob Kollagen V auch ein Bestandteil nichtfibrillärer Bindegewebs-Suprastrukturen der Haut und der Cornea ist und weitere Funktionen aufweist. Außerdem wurde untersucht, ob in der adulten Cornea neben Kollagen I und V andere fibrilläre Kollagene vorkommen.

Kollagen V wurde im Bereich der epithelialen Verankerungszonen der Haut und der Cornea gefunden, wobei Kollagen V-Epitope durch andere Bindegewebs-Proteine weniger stark maskiert waren als im retikulären Bindegewebe. In der Haut war das unmaskierte N-terminale Propeptid der $\alpha 1$ -Kette des Kollagen V mit der $\alpha 5$ -Kette des Kollagen VI kolokalisiert. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Kollagen V zusammen mit Kollagen VI ein Bestandteil mikrofibrillärer Netzwerke der epithelialen Verankerungszonen ist und möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung von Teilen der Basalmembran mit der interstitiellen Matrix übernimmt.

Außerdem wurden neben den dünnen Kollagen I/IV-Fibrillen auch dicke Kollagen II- und III-haltige Fibrillen im Stroma der adulten Cornea identifiziert. Dabei handelt es sich jedoch um quantitativ seltene Suprastrukturen. Der Nachweis dicker Kollagenfibrillen in der Cornea junger adulter Rinder sowie älterer humaner Spender deutet auf eine altersunabhängige Rolle dicker Fibrillen für die Aufrechterhaltung der Integrität des cornealen Stromas hin. Da dicke Kollagenfibrillen eine stärkere

Lichtstreuung aufweisen als dünne, werden die optischen Eigenschaften der Cornea demnach durch die geringe Anzahl dicker Fibrillen nur unerheblich beeinträchtigt.

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Aufbau des Bindegewebes

In mehrzelligen Organismen erfüllt das Bindegewebe Funktionen als Gerüst- oder Stützsubstanz und wird, da es interstitielle Räume ausfüllt, als extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*: ECM) bezeichnet. Bei den Zellen des Bindegewebes handelt es sich um Fibroblasten oder um Chondroblasten und Osteoblasten, die sich von Fibroblasten ableiten (Deutzmann *et al.*, 2007). Zusätzlich zu diesen Zelltypen synthetisieren auch Endothelzellen, Epithelzellen sowie glatte Muskelzellen eine Vielzahl von ECM-Molekülen. Am Beispiel der Säugetiere wird deutlich, in welchen unterschiedlichen Ausprägungen das Bindegewebe vorkommt. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang zwischen festen Strukturen wie den Bändern, Sehnen, Knorpel und Knochen sowie dem locker gepackten Bindegewebe wie der Haut und dem interstitiellen Raum innerhalb der Organe (Deutzmann *et al.*, 2007). Das Bindegewebe verschiedener Organe setzt sich aus jeweils ähnlichen Bestandteilen zusammen, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Quantität und Organisation unterscheiden und daher für morphologische und funktionelle Unterschiede der entsprechenden Organe verantwortlich sind.

Der quantitativ bedeutendste Proteinanteil der ECM, sowie des gesamten Organismus, sind die Kollagene, welche eine vorwiegend strukturgebende Funktion haben und daher für Zug- und Stoßfestigkeit sorgen (Myllyharju und Kivirikko, 2004). Im Gegensatz dazu verleiht Elastin den Geweben elastische Eigenschaften (Kielty *et al.*, 2002). Außerdem kommen im Bindegewebe Proteoglykane vor, die durch einen hohen Kohlenhydratanteil charakterisiert sind und vielfältige Funktionen wie Strukturgebung, Zell-Matrix Interaktion, Vernetzung von Bindegewebs-Komponenten und Signaltransduktion aufweisen (Iozzo und Murdoch, 1996). Mit ihrem hohen Kohlenhydratanteil und dem poly-anionischen Charakter bestimmter Proteoglykane sind Wasser-speichernde Eigenschaften verbunden, wodurch zum Beispiel Aggrecan für die Druckbelastbarkeit des Knorpels sorgt (Hardingham und Muir, 1972). Zusätzlich kommt eine Vielzahl von nichtkollagenen Glykoproteinen in der ECM vor, deren Funktionen ebenfalls vielfältig sind (Strukturgebung, Zell-Matrix Interaktionen, Vernetzung von Bindegewebs-Komponenten, Signaltransduktion) (Aumailley und Gayraud, 1998).

Bei der ECM handelt es sich nicht um eine statische Struktur. Es kommt hingegen zu einer ständigen Reorganisation der verschiedenen Bestandteile. Außerdem ist die ECM durch Interaktion ihrer Komponenten mit Zellrezeptoren, wie zum Beispiel den Integrinen, an der Differenzierung, dem Wachstum und der Zellwanderung beteiligt (Hynes, 2009). ECM-Komponenten, die typischerweise zu supramolekularen Aggregaten in Form von Fibrillen, Mikrofibrillen oder Netzwerken polymerisieren, üben ihre Funktion in Form von Suprastrukturen aus, bei denen es sich um Kopolymere aus mehr als einer molekularen Spezies handelt (Bruckner, 2010). Heterotypische Kollagenfibrillen beeinflussen die funktionellen Eigenschaften von Organen durch ihre strukturelle und kompositionelle Organisation maßgeblich. So unterscheiden sich die homogenen dünnen Kollagenfibrillen der Cornea, die ein zweidimensionales belastungsresistentes und transparentes Bindegewebe bilden, von den heterogenen und dickeren Kollagenfibrillen der Haut, die elastisch und nicht transparent ist.

1.2 Aufbau der Haut

Die Haut ist ein Organ, das sowohl eine strukturelle als auch funktionelle Barriere zwischen dem Inneren und der Umgebung eines Organismus darstellt. Ihre Aufgabe ist der Schutz vor physikalischen Einwirkungen wie Hitze, Kälte, UV-Strahlung sowie vor Wasserverlust, mikrobieller Invasion und mechanischer Verletzung. Außerdem sind die immunologische Abwehr, die Thermoregulation und Sinnesfunktionen wie Tast und Schmerzreize weitere wichtige Funktionen der Haut. Um diese vielfältigen Anforderungen zu erfüllen weist die Haut eine charakteristische Organisation auf. Es kann allgemein zwischen drei verschiedenen Schichten der Haut unterschieden werden (Epidermis, Dermis, Subkutis) (Abbildung 1.1) (Holbrook und Smith, 2002). Die Epidermis ist ein vielschichtiges Plattenepithel, das die äußerste Schicht der Haut bildet. Durch eine Basalmembran, die Teil eines spezialisierten epithelialen Verankerungskomplexes darstellt (dermo-epidermale Junctionszone), ist die Epidermis mit der vaskularisierten, Bindegewebes-haltigen Dermis verbunden. Die unterste Schicht der Haut, die als Fettpolster auf den Faszien der darunter liegenden Muskulatur aufliegt, wird als Subkutis oder Hypodermis bezeichnet.

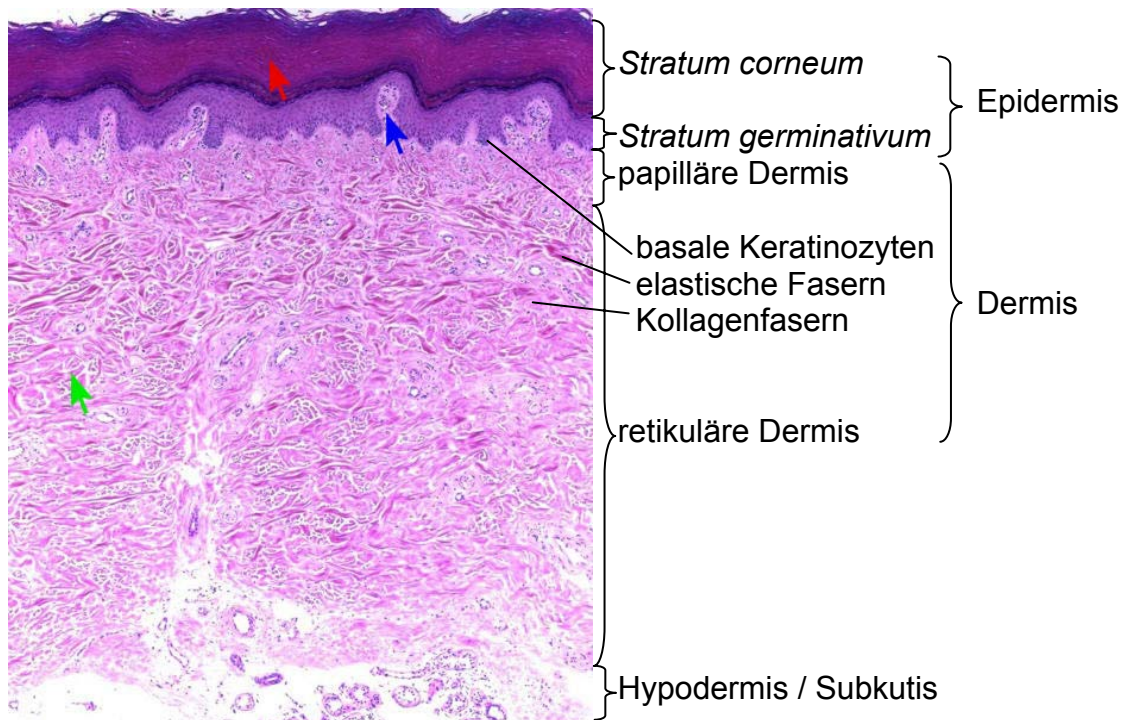


Abbildung 1.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen normaler, humaner Haut. Histologische Färbung (H&E) der Haut. Roter Pfeil: tote Keratinozyten; blauer Pfeil: Dermispapille; grüner Pfeil: Kollagen-haltiges Bindegewebe der Dermis. ([http://missinglink.ucsf.edu/lm/Dermatology Glossary](http://missinglink.ucsf.edu/lm/Dermatology%20Glossary))

1.2.1 Epidermis

Bei der Epidermis handelt es sich um die äußere Schicht der Haut. Sie setzt sich aus geschichteten, schuppenartig angeordneten Zellen (Keratinozyten) zusammen und ist 0,06 – 1,0 mm dick (Holbrook und Smith, 2002). Das Hauptproteinprodukt der Keratinozyten ist Keratin, das sich zu Cytoskelett-Filamenten (Intermediärfilamenten) zusammenlagert (Byrne und Hardman, 2002). Es können mehr als 50 verschiedene Typen der Keratine unterschieden werden, die je nach Schicht der Epidermis und Differenzierungsstadium der Keratinozyten exprimiert werden. Die Keratinozyten sind über Desmosomen miteinander verbunden und bieten auf Grund ihrer dichten Anordnung wenig Platz für interstitielle Räume. Es kann in der Epidermis zwischen lebenden Keratinozyten und abgestorbenen Keratinozyten unterscheiden werden. Das auf der proximalen Seite der Epidermis lokalisierte *Stratum germinativum* setzt sich aus lebenden Zellen zusammen, wohingegen das *Stratum corneum* auf der distalen Seite aus toten Zellen besteht und in Form von Hornschuppen an der Oberfläche abschilfert (Abbildung 1.1) (Holbrook und Smith, 2002). Als basale Keratinozyten wird hingegen die unterste Zellschicht (*Stratum basale*) des *Stratum germinativums* bezeichnet, die durch eine Basalmembran getrennt an die Dermis

angrenzt. Es handelt sich hier um eine proliferative Schicht aus kubischen Zellen, die untereinander über Desmosomen und mit der darunter liegenden Basalmembran über Hemidesmosomen verbunden sind.

1.2.2 Dermis und Subkutis

Die Dermis besteht im Gegensatz zu der Epidermis zum größten Teil aus Bindegewebe und ist von Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nerven und Drüsen durchzogen. In der Dermis differenziert man zwischen zwei weiteren Schichten. Die so genannte papilläre Dermis stülpt sich an mehreren Stellen in die darüber liegende Epidermis ein (Dermispapillen) und unterscheidet sich hinsichtlich der Anordnung und der Dichte ihres Bindegewebes von der darunter liegenden retikulären Dermis (Abbildung 1.1). Auf der proximalen Seite grenzt die retikuläre Dermis an die Hypodermis an, welche auch als Subkutis bezeichnet wird (Holbrook und Smith, 2002). Die vorwiegend Fettgewebe enthaltende Subkutis steht über Bindegewebsstrukturen, Blutgefäßen, Lymphgefäßen und Nerven mit der Dermis in Verbindung.

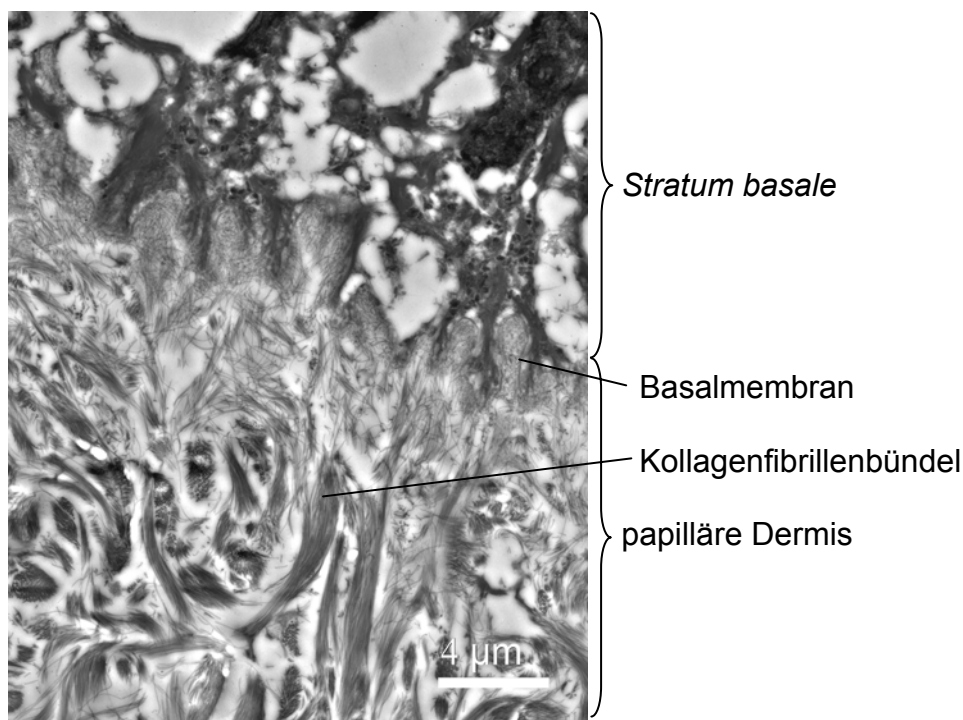


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler, humaner Haut. (Arbeitsgruppe Bruckner, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, UKM, Münster)

Das Bindegewebe der papillären Dermis, das etwa doppelt so dick wie die Epidermis ist, setzt sich zum größten Teil aus kleinen Kollagenfibrillenbündeln zusammen, die miteinander verwoben sind (Abbildung 1.2) (Adachi *et al.*, 1997). Diese spezielle Organisation des Bindegewebes gewährleistet die Anpassung an mechanische Deformationen. Im Vergleich zu der papillären Dermis sind die Kollagenfibrillenbündel der retikulären Dermis, die den größten Teil der Haut ausmacht, deutlich dicker. Dabei ist mit zunehmender Tiefe der Dermis auch eine weitere Zunahme der Dicke solcher Bündel verbunden (Holbrook und Smith, 2002). Weiterhin sind in der Dermis große elastische Fasern lokalisiert, deren Durchmesser ebenfalls in Abhängigkeit zu der Tiefe der Dermis zunimmt (Abbildung 1.1). Die elastischen Fasern der papillären Dermis werden als Oxytalan-Fasern bezeichnet und sind im Vergleich zu denjenigen der retikulären Dermis dünner (Low, 1962). Auch ist die Dichte der Fibroblasten in der papillären Dermis höher als in der retikulären Dermis. Zusätzlich sind die papillären Fibroblasten durch eine höhere metabolische Rate, eine gesteigerte proliferative Kapazität und eine längere Teilungsfähigkeit gekennzeichnet (Holbrook und Smith, 2002).

1.2.3 Dermo-epidermale Junktionszone

Die Grenzschicht zwischen der Epidermis und der Dermis, die auch als dermo-epidermale Junktionszone bezeichnet wird und durch eine spezialisierte Basalmembran charakterisiert ist, erfüllt in der Haut unterschiedliche Funktionen. Zum einen verankert sie die Epidermis in der darunter liegenden papillären Dermis, und trägt damit zur mechanischen Stabilität der Haut bei, zum anderen reguliert sie den Transit von Molekülen anhand ihrer Größe und Ladung sowie die Passage von Zellen wie den Lymphozyten und Langerhans-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen. Weiterhin beeinflusst sie die Differenzierung und die Migration von basalen Keratinozyten, weshalb sie eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielt (Deutzmann *et al.*, 2007).

Der dermo-epidermale Verankerungskomplex setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Suprastrukturen zusammen. So durchspannen Hemidesmosomen die Plasmamembranen der basalen Keratinozyten, welche ihrerseits über Verankerungsfilamente mit der darunter liegenden netzwerkartig organisierten Basalmembran verbunden sind (Holbrook und Smith, 2002). Die Basalmembran, die

hauptsächlich aus Kollagen IV-haltigen (siehe 1.4.1) und Laminin-haltigen (siehe 1.4.3.2) Netzwerken aufgebaut ist, zeichnet sich durch zwei Schichten aus, die auf Grund ihrer Elektronendichte elektronenmikroskopisch hell oder dunkel erscheinen. Als *Lamina lucida* wird daher die elektronendurchlässigere Schicht auf der epithelialen Seite der Basalmembran bezeichnet, wohingegen die Schicht auf der dermalen Seite als *Lamina densa* bezeichnet wird. Für die Verankerung der Basalmembran in der papillären Dermis wird zwischen vier verschiedenen Verbindungssystemen unterschieden (Adachi *et al.*, 1997). In der Region unmittelbar unterhalb der Basalmembran, die auch als *Lamina fibroreticularis* bezeichnet wird, erstrecken sich ein Netzwerk aus Fibrillin- oder Fibronectin-haltigen Mikrofibrillen (1.4.3.2, Tabelle 1.3), Kollagen VI-haltigen Mikrofibrillen (siehe 1.4.2.7), Kollagen VII-haltigen Verankerungsfibrillen (1.4.1, Tabelle 1.1) und Proteoglykan-haltigen Mikrofasern, die mit Kollagenfibrillen verwoben sind. Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den Verankerungsfibrillen zu, die mit der *Lamina densa* verbunden sind und die obere papilläre Dermis schleifenförmig durchspannen (Briggaman und Wheeler, Jr., 1975; Burgeson, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Verankerungsfibrillen dabei direkt an Kollagenfibrillen der oberen papillären Dermis gebunden sind (Villone *et al.*, 2008).

1.3 Aufbau der Cornea

Die feste, Bindegewebs-haltige Lederhaut, die die äußere Hülle des Auges bildet, geht im vorderen Bereich in eine transparente Hornhaut (Cornea) über. Die Cornea, unter der die vordere Augenkammer, die Pupille, die hintere Augenkammer und die Linse liegen, schließt den Sehapparat nach außen ab und muss unterschiedliche Funktionen erfüllen. Zum einen schützt sie die innerocularen Strukturen und zum anderen ist sie an den optischen Prozessen des Sehapparates beteiligt. Sie muss daher eine große Festigkeit aufweisen und trotzdem transparent sein. Diese Voraussetzungen werden durch ihren einzigartigen Aufbau gewährleistet (Abbildung 1.3). An der Außenseite der Cornea befindet sich ein mehrschichtiges Epithel, das durch eine Basalmembran, die so genannte Bowman's Membran, von dem darunter liegenden Stroma abgegrenzt wird. Die proximale Seite der Cornea wird von einem Endothel begrenzt, das ebenfalls durch eine Basalmembran, die als Descemet

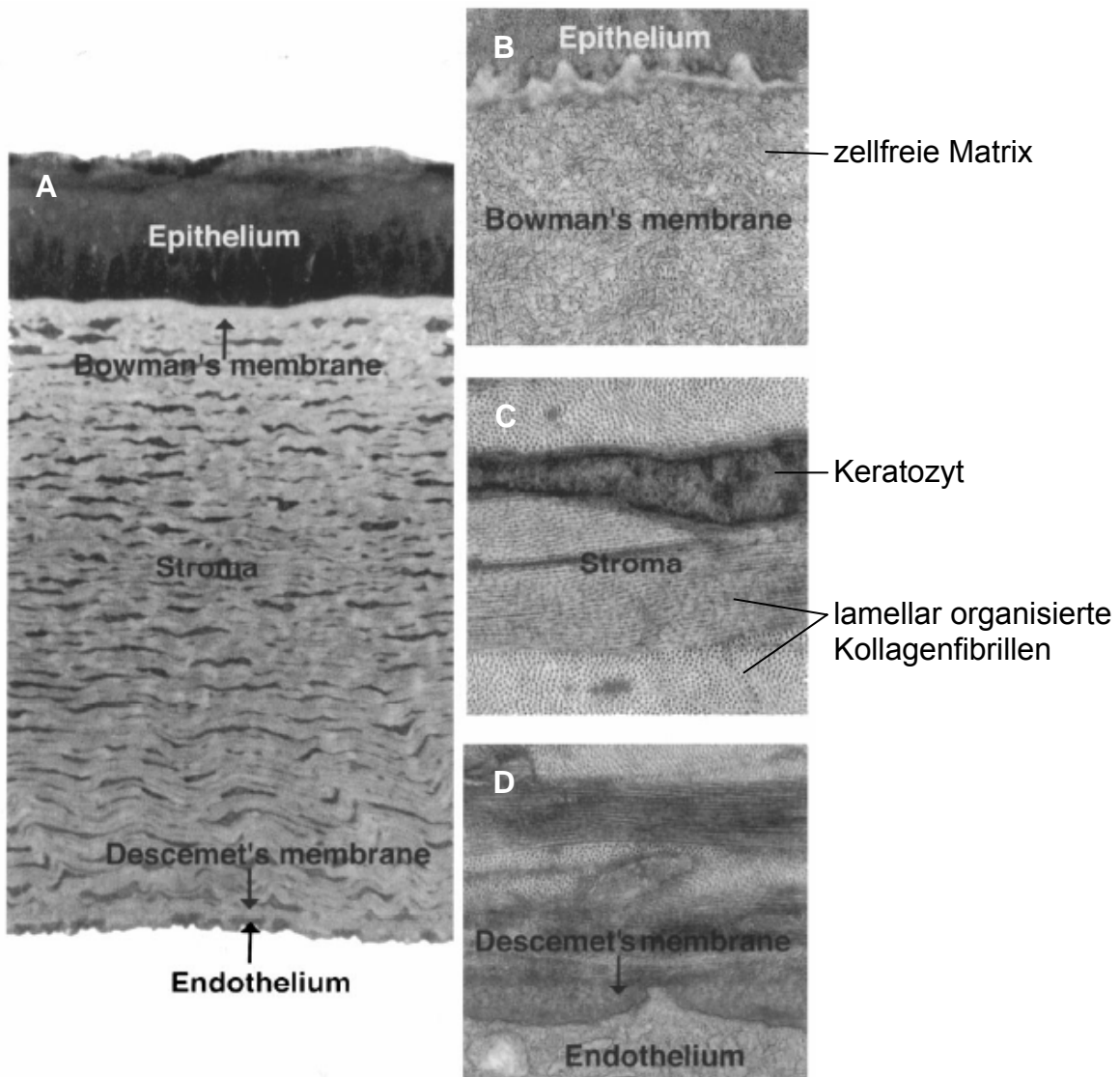


Abbildung 1.3: A: Lichtmikroskopische Aufnahme der Hühner-Cornea. B, C, D: elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hühner-Cornea. (Linsenmayer *et al.*, 1998)

-Membran bezeichnet wird, von dem Stroma abgegrenzt wird. Das zwischen diesen Schichten liegende corneale Stroma setzt sich vorwiegend aus Bindegewebe zusammen und macht 90 % der Dicke der Cornea aus. Es enthält Kollagene, die etwa 71 % des Trockengewichtes der gesamten Cornea entsprechen (Newsome *et al.*, 1981). Eine charakteristische Eigenschaft des cornealen Stromas ist die parallele Orientierung von Kollagenfibrillen, die typischerweise in orthogonal zueinander verlaufenden Lamellen angeordnet sind (Abbildung 1.3). Zwischen diesen Lamellen befinden sich einzelne abgeflachte corneale Fibroblasten (Keratozyten). Zusätzlich zeichnen sich die einzelnen Fibrillen innerhalb der Laminae durch sehr homogene dünne Durchmesser (24 nm in der Hühner-Cornea) und homogene interfibrilläre Abstände aus (Craig und Parry, 1981). Da dicke Fibrillen zu einer stärkeren

Lichtstreuung führen als dünne, sind Schichten von dünnen Fibrillen für eine effektive Lichttransduktion besser geeignet.

Der Bereich des Stromas direkt unterhalb des Epithels, welcher auch als Bowman's Schicht bezeichnet wird, ist durch eine andere Bindegewebsorganisation als das tiefere Stroma charakterisiert (Abbildung 1.3). Es handelt sich hier um eine zellfreie Matrix die Kollagenfibrillen enthält, die nicht lamellar organisiert und deren Durchmesser dünner (12 – 18 nm in der Hühner-Cornea) als die des tieferen Stromas sind (Hay und Revel, 1969). Einzelne Fibrillen sind in der Bowman's Schicht miteinander verwoben, wodurch eine für die effektive Verankerung des epithelialen Adhäsionskomplexes wichtige Matrix-Organisation gewährleistet wird.

1.4 Suprastrukturen der extrazellulären Matrix

Die oben beschriebenen Suprastrukturen (verschiedene Formen von Fibrillen und Mikrofibrillen, Intermediärfilamenten, Desmosomen und Hemidesmosomen, Basalmembrannetzwerken etc.) sind Polymere von Matrix-Molekülen. Man kann bei diesen Aggregaten der ECM zwischen Suprastrukturen unterscheiden, deren Hauptbestandteile Kollagene (siehe 1.4.1) beziehungsweise nichtkollagene Matrix-Proteine (siehe 1.4.3) sind. Häufig handelt es sich jedoch um Mischstrukturen unterschiedlicher Kollagene sowie nichtkollagener Bindegewebs-Komponenten (Bruckner, 2010).

Kollagenfibrillen sind multimolekulare Suprastrukturen, die hauptsächlich aus den fibrillären Kollagenen I, II, III, V und XI (siehe 1.4.2) sowie den so genannten FACITs (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices*, siehe auch 1.4.2) Kollagen IX, XII und XIV aufgebaut sind. Die Zusammensetzung aus diesen Bestandteilen sowie deren Mengenverhältnisse variieren zwischen den Fibrillen unterschiedlicher Organe jedoch deutlich. Kollagenfibrillen der Haut enthalten beispielsweise Kollagen I, III und V, wohingegen die Kollagenfibrillen der Cornea Kollagen I und V enthalten. Entsprechend der bisher veröffentlichten Untersuchungen wurde Kollagen III nicht als Bestandteil cornealer Fibrillen identifiziert. Kollagen II, das kein Bestandteil der Kollagenfibrillen in der Haut ist, wurde in Kollagenfibrillen der embryonalen jedoch nicht der adulten Cornea nachgewiesen (Hendrix *et al.*, 1982). Neben den Kollagenen I, III und V ist Kollagen VI, das in Mikrofibrillen

zwischen und um die Kollagenfibrillen vorkommt, ein weiterer wichtiger Bestandteil des Bindegewebes der Haut und der Cornea (siehe 1.4.2.7).

Einige der nichtkollagenen ECM-Proteine (vor allem die kleinen Leuzin-reichen Proteoglykane) sind maßgeblich an der Organisation von Kollagenfibrillen beteiligt. Da nichtkollagene Glykoproteine und Proteoglykane hier jedoch nur im Zusammenhang mit Kollagenfibrillen behandelt werden, wird ein Teil ihrer Funktionen anhand weniger Beispiele erläutert (siehe 1.4.3).

1.4.1 Kollagene

Das gemeinsame Strukturmerkmal der Kollagene ist ein stabförmiger Abschnitt mit einer tripelhelikalen Konformation (kollagene Domäne: COL). Alle Kollagenmoleküle setzen sich aus drei α -Ketten zusammen, die in den tripelhelikalen Domänen eine sich wiederholende Tripletsequenz (Gly-X-Y) aufweisen. Dieses Triplet besteht immer aus der Aminosäure Glycin sowie zwei weiteren Aminosäuren in X- und Y-Position. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich meist um Prolin oder Hydroxyprolin (Canty und Kadler, 2005; Gordon und Hahn, 2010). Die verschiedenen Kollagene unterscheiden sich hinsichtlich der Länge ihrer tripelhelikalen Domänen, die auch durch unterschiedlich lange nicht-tripelhelikale Abschnitte (nichtkollagene Domäne: NC) unterbrochen sein können, sowie der Länge nichtkollagener Domänen. Die tripelhelikalen Abschnitte der Kollagene sind gegenüber einem limitierten Verdau mit Trypsin oder Pepsin resistent, wohingegen die nicht-tripelhelikalen Domänen größtenteils degradiert werden (Miller, 1972; Bruckner und Prockop, 1981). Die unterschiedliche Domänenstruktur der Kollagene ist maßgeblich für ihre vielfältigen Funktionen und Suprastrukturen verantwortlich (Myllyharju und Kivirikko, 2004). Bisher sind 29 verschiedene Kollagene beschrieben worden (Boot-Handford *et al.*, 2003; Veit *et al.*, 2006b; Plumb *et al.*, 2007; Söderhall *et al.*, 2007) (Tabelle 1.1), wobei es sich bei den Kollagenen XXVIII und XIX jedoch um Varianten des Kollagen VI handelt (Veit *et al.*, 2006b; Gara *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2008; Gordon und Hahn, 2010). Die verschiedenen Kollagentypen werden hinsichtlich ihrer Eigenschaften und supramolekularen Organisation in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (fibrilläre Kollagene [I – III, V, XI, XXIV und XXVII], Basalmembran-Kollagene [IV], Multiplexine [XV und XVIII], Fibrillen-assoziierte Kollagene [IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI und XXII], netzwerkbildende Kollagene [VIII und X], Transmembran-Kollagene

[XIII, XVII, XXIII und XXV], sonstige Kollagene [VI, VII und XXVI]) (Gordon und Hahn, 2010).

Tabelle 1.1: Kollagentypen. (Canty und Kadler, 2005)

Collagen type	Genes	Supramolecular organization in tissues (where known)	References
I	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	Fibrils in tendon, bone, skin, cornea and blood vessel walls	Chu et al., 1982 Myers et al., 1981
II	<i>COL2A1</i>	Fibrils in cartilage	Miller and Matukas, 1969
III	<i>COL3A1</i>	Forms heterotypic fibrils with type I collagen	Cameron et al., 2002
IV	<i>COL4A1</i> <i>COL4A2</i> <i>COL4A3</i> <i>COL4A4</i> <i>COL4A5</i> <i>COL4A6</i>	Network in basement membrane	Timpl and Brown, 1996; Timpl et al., 1981
V	<i>COL5A1</i> <i>COL5A2</i> <i>COL5A3</i>	Forms heterotypic fibrils with type I	Birk, 2001
VI	<i>COL6A1</i> <i>COL6A2</i> <i>COL6A3</i>	Fine microfibrils with ubiquitous distribution (distinct from fibrillin-containing microfibrils)	Kielty et al., 1992
VII	<i>COL7A1</i>	Forms anchoring fibrils in skin at the dermal/epidermal junction (basement membrane)	Keene et al., 1987
VIII	<i>COL8A1</i> <i>COL8A2</i>	3D hexagonal lattice in Descemet's membrane in the eye	Kapoor et al., 1986; Kapoor et al., 1988; Stephan et al., 2004
IX	<i>COL9A1</i> <i>COL9A2</i>	Associated with type II collagen fibrils	Olsen, 1997; Shimokomaki et al., 1990
X	<i>COL10A1</i>	Mat-like structure/hexagonal lattice in the hypertrophic zone of the growth plate	Kwan et al., 1991
XI	<i>COL11A1</i> <i>COL11A2</i> <i>COL2A1</i>	Forms heterotypic fibrils with type II	Mendler et al., 1989
XII	<i>COL12A1</i>	Associated with type I fibrils	Keene et al., 1991; Nishiyama et al., 1994; Zhang et al., 2003
XIII	<i>COL13A1</i>	Transmembrane and possibly involved in cell adhesion	Latvanlehto et al., 2003
XIV	<i>COL14A1</i>	Associated with type I fibrils	Young et al., 2000b; Young et al., 2002
XV	<i>COL15A1</i>	Specialized basement membranes, cleaved to produce antiangiogenic fragment (restin)	Myers et al., 1996; Ramchandran et al., 1999
XVI	<i>COL16A1</i>	Component of specialized fibrillin-rich microfibrils in skin and type II collagen fibrils in cartilage	Kassner et al., 2003
XVII	<i>COL17A1</i>	Transmembrane component of hemidesmosomes (cell-cell junctions), which attach epidermis to basement membrane in skin	Hopkinson et al., 1998
XVIII	<i>COL18A1</i>	Cleaved to produce antiangiogenic fragment (endostatin)	Sasaki et al., 1998
XIX	<i>COL19A1</i>	Radially distributed aggregates formed by association at one end in vitro	Myers et al., 2003
XX	<i>COL20A1</i>	May be associated with type I collagen fibrils	Koch et al., 2001
XXI	<i>COL21A1</i>	May be fibril associated, widespread expression pattern	Fitzgerald and Bateman, 2001
XXII	<i>COL22A1</i>	Located in specific tissue junctions and may be associated with microfibrils	Koch et al., 2004
XXIII	<i>COL23A1</i>	Transmembrane collagen identified in cell culture	Banyard et al., 2003
XXIV	<i>COL24A1</i>	Expressed in tissues containing type I collagen	Koch et al., 2003
XXV	<i>COL25A1</i>	Transmembrane collagen, cleaved form present in Alzheimer's amyloid plaques in neurons	Hashimoto et al., 2002
XXVI	<i>COL26A1</i>	Expressed in testis and ovary of adult tissues	Sato et al., 2002
XXVII	<i>COL27A1</i>	Widespread expression particularly in cartilage	Boot-Handford et al., 2003; Pace et al., 2003

1.4.2 Fibrilläre Kollagene und Fibrillenbildung

Die fibrillären Kollagene besitzen eine Aminosäuresequenz mit fast identischen Domänenstrukturen und assemblieren zu Suprastrukturen in Form von quergestreiften Kollagenfibrillen (Periodizität: 64 - 67 nm). Das charakteristische Strukturmerkmal der fibrillären Kollagene ist eine tripelhelikale Domäne mit 310 - 340 Gly-X-Y *repeats* (siehe 1.4.1), die durch ca. 20 Aminosäuren große N-terminale und C-terminale Telopeptide flankiert wird. In Prokollagenen sind die Telopeptide wiederum von einem C-terminalen sowie einem N-terminalen Propeptid flankiert. Die intrazelluläre Assemblierung von Kollagen-Trimeren beginnt mit der Sekretion und Assoziation von drei α -Ketten über die C-terminalen Propeptide. Dadurch entsteht auch der Nukleationskeim für die native Konformation, deren Bildung vom Carboxyl-Ende in Richtung des Amino-Endes der tripelhelikalen Domäne reisverschlussartig fortschreitet (Bruckner *et al.*, 1981). Die Propeptide werden anschließend im Rahmen von extrazellulären Prozessierungen der Prokollagenmoleküle durch C-Propep-

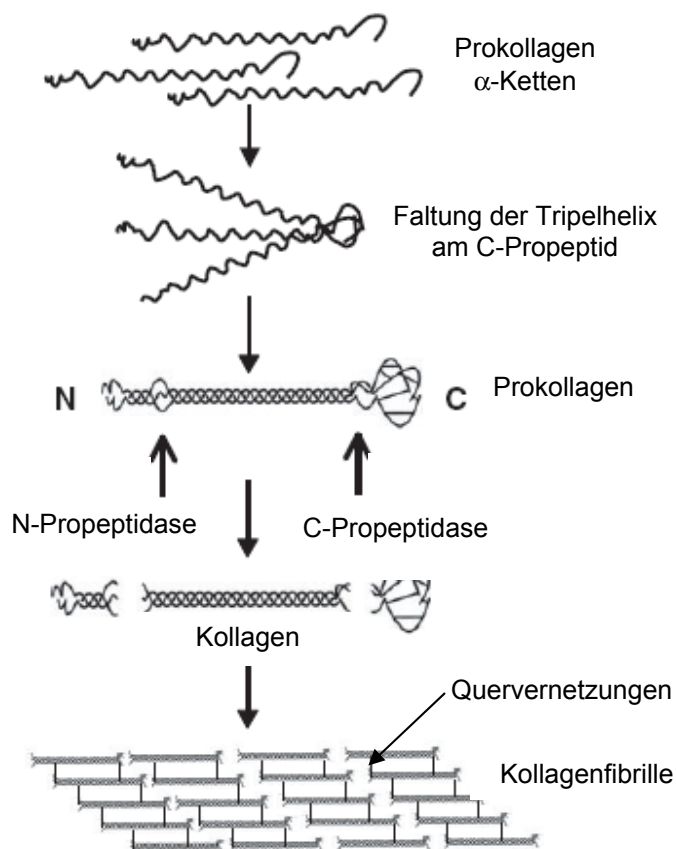


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Assemblierung von Kollagen α -Ketten und der Bildung von Kollagenfibrillen. Die im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Prokollagen α -Ketten assemblieren zu Prokollagen-Trimeren. Nach der Abspaltung der N-terminalen und C-terminalen Propeptide lagern sich reife Kollagenmoleküle zu Kollagenfibrillen zusammen. (Canty und Kadler, 2005)

tidasen und N-Propeptidasen abgespalten (Tuderman *et al.*, 1978; Njieha *et al.*, 1982; Tuderman und Prockop, 1982; Wozney *et al.*, 1988; Kessler *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Prockop *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2001), wobei im Gewebe zum Teil auch pN-Kollagene vorkommen, deren N-Propeptide nicht prozessiert werden (Fleischmajer *et al.*, 1981; Fleischmajer *et al.*, 1983; Fichard *et al.*, 1995; Kessler *et al.*, 1996; Kessler *et al.*, 2001). Im Bereich der Telopeptide werden für die Bildung von Kollagenfibrillen wichtige Quervernetzungen ausgebildet (Abbildung 1.4). Außerdem werden ca. 50 % der Proline und einige Lysine hydroxyliert. Dieser Prozess ist für die Stabilität von Kollagenfibrillen essentiell und wird durch die Enzyme Prolylhydroxylase oder Lysylhydroxylase, die Vitamin-C (L-Ascorbinsäure) als Kofaktor benötigen, katalysiert. Die Molekülstruktur der fibrillären Kollagene ist durch vier homologe Regionen (D1 - D4) charakterisiert, die eine Länge von ca. 67 nm aufweisen. Um maximale hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit den Nachbarmolekülen zu erreichen, lagern sich diese Regionen bei der Assemblierung von Kollagenfibrillen versetzt zu einander an. Durch diese Anordnung weisen Kollagenfibrillen Lücken in regelmäßigen Abständen auf, wodurch so genann-

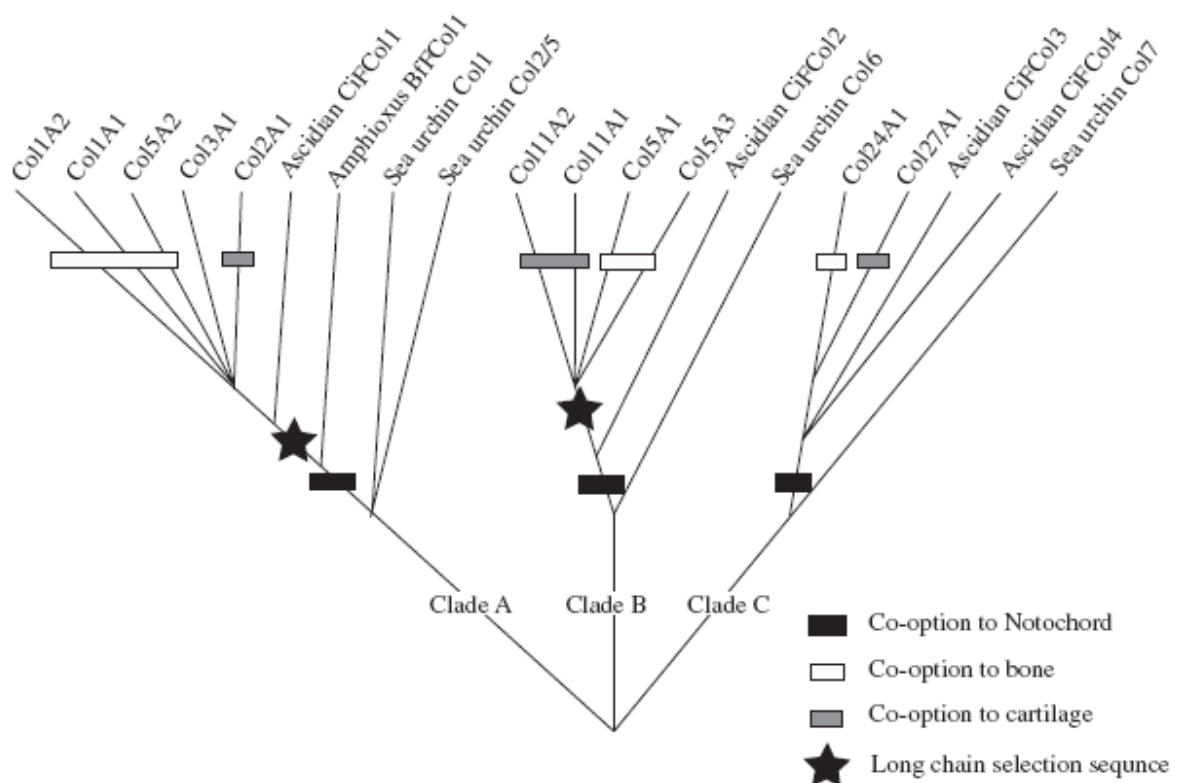


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der molekularen Evolution der Gene fibrillärer Kollagene. (Wada *et al.*, 2006)

te *Gap*- und *Overlap*-Regionen entstehen (Petruska und Hodge, 1964; Kadler *et al.*, 1996). Da sich elektronenmikroskopische Kontrastmittel in der *Gap*-Region anlagern können, ist auf ultrastruktureller Ebene eine Querstreifung (*D-stagger*) von Kollagenfibrillen mit einer Periodizität von 64 - 67 nm zu erkennen.

Auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften werden die fibrillären Kollagene auf drei phylogenetische Stammbäume aufgeteilt (*clade A*, *-B*, *-C*) (Wada *et al.*, 2006; Exposito *et al.*, 2008) (Abbildung 1.5). Der *clade A* beinhaltet die Kollagene I - III sowie die Pro α 2(V)-Kette. Ein gemeinsames Merkmal der *clade A* Kollagene ist eine von-Willebrand Faktor-Typ C Domäne (VWC) im N-terminalen Propeptid (in der Pro α 2(I)-Kette jedoch nicht vorhanden). Der *clade B* beinhaltet hingegen die Pro α 1(V)-, Pro α 3(V)-, Pro α 4(V)-, Pro α 1(XI)- und Pro α 2(XI)-Kette. Zu dem *clade C* werden die neu beschriebenen Kollagene XXIV und XXVII gezählt (Koch *et al.*, 2003; Hjorten *et al.*, 2007), wobei sowohl die Kollagene des *clade B* als auch des *clade C* ein *Thrombospondin-1 N-terminal domain-like* (TSPN) Motiv in ihrem N-Propeptid aufweisen (Sicot *et al.*, 1997; Boot-Handford *et al.*, 2003).

1.4.2.1 Kollagen I

Kollagen I ist das häufigste Protein des Bindegewebes von Sehnen, Knochen, Bändern, Haut und der Cornea sowie weiterer Organe. Es ist, mit Ausnahme des Faserknorpels, kein Bestandteil des Knorpels. Bisher sind zwei α -Ketten [α 1(I), α 2(I)], die durch unterschiedliche Gene kodiert werden, bekannt. Typischerweise assemblieren diese Ketten im Gewebe zu [α 1(I)]₂ α 2(I) Heterotrimeren. Aus embryonalen Geweben (Jimenez *et al.*, 1977) sowie aus einer Vielzahl von pathologischen Situationen, wie Tumoren (Moro und Smith, 1977; Rupard *et al.*, 1988) oder den Krankheitsbildern der *Osteogenesis Imperfecta* und des Ehlers-Danlos Syndroms (Nicholls *et al.*, 1984; Sasaki *et al.*, 1987; Hata *et al.*, 1988; Schwarze *et al.*, 2004), ist jedoch die Bildung von [α 1(I)]₃ Homotrimeren bekannt (siehe unten sowie 1.4.2.6). In der Haut ist Kollagen I die Hauptkomponente heterotypischer Kollagenfibrillen, die zusätzlich Kollagen III, V, XII und XIV enthalten und deren molekulare Zusammensetzung je nach Hautregion und Alter variieren kann (Keene *et al.*, 1987). In der Cornea bildet Kollagen I hingegen heterotypische Kollagenfibrillen mit Kollagen V, XII und XIV (Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988; Birk, 2001). Bei den in der Haut und in der Cornea vorkommenden Kollagen I-Monomeren

werden die Propeptide posttranslational abgespalten. Speziell in der oberen papillären Dermis kommen aber auch zusätzliche Kollagen I-Moleküle vor, deren N-terminale Propeptide nicht vollständig prozessiert werden [$pN\alpha 1(I)$ oder $pN\alpha 2(I)$] und die Fibrillen mit kleinen Durchmessern bilden (Fleischmajer *et al.*, 1983). Es wird angenommen, dass das unprozessierte N-terminale Propeptid die Fibrillendicke während der Fibrillogenese reguliert (Fleischmajer *et al.*, 1987).

Defekte in den Genen der $\alpha 1(I)$ -Kette (COL1A1) und der $\alpha 2(I)$ -Kette (COL1A2) haben schwere Bindegewebs-Schwächen zur Folge, die auf Grund einer defizienten oder fehlerhaften Synthese von Kollagen [$\alpha 1(I)$]₂ $\alpha 2(I)$ Heterotrimeren zustande kommen. Dazu gehört zum Beispiel das Krankheitsbild der *Osteogenesis Imperfecta*, dass sich durch eine starke Knochenbrüchigkeit und ein schwaches Bindegewebe sowie eine deutlich reduzierte Knochenmasse auszeichnet (Prockop und Kivirikko, 1995). Auch der „Arthrochalasie Typ“ des Ehlers-Danlos Syndroms (Typ VIIA und VIIB) (1.4.2.6, Tabelle 1.2), der durch überstreckbare Gelenke, und ein überdehnbare Haut charakterisiert ist, wird durch Mutationen des COL1A1 oder COL1A2 Gens verursacht (Steinmann *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt dass eine fehlende Prozessierung N-terminaler Propeptide zu der Assemblierung dünner und ungeordneter Kollagenfibrillen führt.

1.4.2.2 Kollagen II

Kollagen II ist das häufigste Kollagen des Knorpels. Bisher ist die $\alpha 1(II)$ -Kette, die zu [$\alpha 1(II)$]₃ Homotrimeren assembliert, als einzige Untereinheit identifiziert worden. Hinsichtlich ihrer Primärstruktur zeigt die $\alpha 1(II)$ -Kette eine starke Homologie mit der $\alpha 1(I)$ -Kette. Im Knorpel bilden die Kollagene II und XI heterotypische Fibrillen. Zunächst bilden sich als Prototypen nur dünne Fibrillen, die außer den Kollagenen II und XI auch das FACIT, Kollagen IX enthalten (Mendler *et al.*, 1989). In reifen Fibrillen der interterritorialen Knorpelmatrix wird Kollagen IX durch das kleine Proteoglykan Decorin ersetzt (Hagg *et al.*, 1998), was zur Fusion der Fibrillenprototypen und der Bildung von dicken Fibrillen mit starkem Bandenmuster führt (Hansen, Dreier, Seidler, Iozzo und Bruckner, unveröffentlicht).

Ursprünglich wurde Kollagen II als knorpelspezifische Komponente betrachtet. Es konnte jedoch auch in anderen Geweben geringe Mengen an Kollagen II nachgewiesen werden. Beispielsweise wurden im primären Stroma der embryonalen Hühner-

Cornea heterotypische Kollagen I- und II-haltige Fibrillen lokalisiert (von der Mark *et al.*, 1977; Linsenmayer *et al.*, 1977; Hendrix *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1993; Fitch *et al.*, 1995). In der adulten Hühner-Cornea wurde hingegen eine Immunreaktivität von Kollagen II-Antikörpern nur mit der Descemet-Membran festgestellt (Hendrix *et al.*, 1982). Kollagen II konnte jedoch weder in der Kälber-Cornea (Davison *et al.*, 1979) noch in fötaler oder adulter humaner Cornea (Ben-Zvi *et al.*, 1986; Nakayasu *et al.*, 1986) nachgewiesen werden.

Defekte im COL2A1 Gen wirken sich in der Manifestierung verschiedener Formen von Chondrodysplasien aus. Es handelt sich dabei um eine heterogene Gruppe von Bindegewebs-Defekten, die Kleinwuchs mit kurzen Extremitäten oder skeletale Deformationen einschließen (Olsen, 1995; Francomano *et al.*, 1996). Kollagen II-Mutationen wurden auch bei Patienten mit früh beginnender familiärer Arthrose festgestellt (Ritvaniemi *et al.*, 1995).

1.4.2.3 Kollagen III

Ein weiterer Vertreter der fibrillären Kollagene ist Kollagen III. Es kommt in heterotypischen Kollagenfibrillen mit Kollagen I in vorwiegend dehnbaren Geweben wie Haut, Lunge und Blutgefäßen vor. Für Kollagen III ist bisher nur eine α -Kette beschrieben worden, aus der sich $[\alpha 1(\text{III})]_3$ Homotrimere zusammensetzen. Die tripelhelikale Domäne zeigt dabei viele sequenzielle Ähnlichkeiten mit der des Kollagen I, die jedoch um 15 Aminosäuren kürzer ist (Ala-Kokko *et al.*, 1989). Im Gegensatz zu anderen fibrillären Kollagenen treten am C-terminalen Ende des tripelhelikalen Abschnittes der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette Cysteine auf, die zur Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb von $[\alpha 1(\text{III})]_3$ Homotrimeren führen (Lillie *et al.*, 1987). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zu Lysin-vermittelten *cross links* zwischen Kollagen I- und Kollagen III-Molekülen kommt (Henkel und Glanville, 1982). Ähnlich wie für Kollagen I wurden vor allem in dünnen Fibrillen Kollagen III nachgewiesen, dessen N-terminales Propeptid unprozessiert ist $[\text{pN}\alpha 1(\text{III})]$ (Fleischmajer *et al.*, 1981). Weiterhin gibt es Hinweise für eine transiente Expression des Kollagen III. So besteht in der adulten Haut ein Mengenverhältnis zwischen Kollagen I und III von 6:1 (Uitto *et al.*, 1985), wohingegen in der fötalen Haut Kollagen III 50 % der Pepsin-löslichen Kollagene ausmacht (Epstein, 1974). Außerdem wurde in der Cornea adulter Rinder 1 – 2 % Kollagen III nachgewiesen, wohingegen die Cornea drei

Monate alter fötaler Kälber 4,5 % Kollagen III enthält (Schmut, 1977; Tseng *et al.*, 1982; Lee und Davison, 1984).

Mutationen in dem COL3A1 Gen haben das Krankheitsbild des „vaskulären Typs“ des Ehlers-Danlos Syndroms (EDS Typ IV) zur Folge (1.4.2.6, Tabelle 1.2), welcher durch eine dünne durchscheinende Haut, im Besonderen jedoch durch eine Fragilität des arteriellen, intestinalen und uterinen Bindegewebes sowie eine starke Hämatombildung charakterisiert ist. Bei dieser schweren Form des Ehlers-Danlos Syndroms kann es zum plötzlichen Tod durch Risse innerer Organe wie großer Arterien oder dem Darm kommen (Kuivaniemi *et al.*, 1991; Prockop und Kivirikko, 1995; Steinmann *et al.*, 2002). Zusätzlich wurden Kollagen III-Mutationen auch bei Patienten mit Aneurysmen festgestellt, die jedoch wenig zusätzliche Bindegewebs-Veränderungen aufweisen (Tromp *et al.*, 1993).

1.4.2.4 Kollagen V und XI

Kollagen V ist ein Minderheiten-Kollagen, dass ebenfalls zur Gruppe der fibrillären Kollagene gezählt wird (Adachi und Hayashi, 1985; van der Rest und Garrone, 1991), und in Vertebraten ein Bestandteil von Kollagen I-Fibrillen ist (Nakayasu *et al.*, 1986; Schuppan *et al.*, 1986; Adachi und Hayashi, 1987; Birk *et al.*, 1988; Adachi *et al.*, 1991; Keene *et al.*, 1997). Zusätzlich zu heterotypischen Kollagen I/III/V-Fibrillen wurden auch dünne Fibrillen in unmittelbarer Nähe von Basalmembranen lokalisiert, die in die interstitielle Matrix gerichtet sind und Kollagen V enthalten (Fitch *et al.*, 1984; Modesti *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986). Kollagen V kommt vor allem in Kollagen I-haltigen Geweben vor, in denen es 1 – 3 % der gesamten Kollagenmenge ausmacht. Die Cornea enthält mit 15 - 20 % (Birk, 2001) hingegen deutlich mehr Kollagen V als andere Organe wie die Haut, die Knochen oder die Bänder. Bisher sind vier verschiedene Isoformen $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$ und $\alpha 4(V)$ beschrieben worden, die zu Heterotrimeren assemblieren können. Im Gewebe kommt Kollagen V vorwiegend in Form von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren vor (Bentz *et al.*, 1978; Fichard *et al.*, 1995). Die Plazenta, in der die $\alpha 3(V)$ -Kette ursprünglich nachgewiesen wurde (Sage und Bornstein, 1979), enthält neben $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren auch $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ Heterotrimere (Rhodes und Miller, 1981; Niyibizi *et al.*, 1984). Zusätzlich gibt es Hinweise für die Assemblierung von $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren unter Zellkulturbedingungen (Haralson *et al.*, 1980; Haralson *et al.*, 1984; Moradi-Ameli *et*

al., 1994) sowie von $[\alpha 3(V)]_3$ Homotrimeren in der humanen Plazenta (Madri *et al.*, 1982).

Die $\text{Pro}\alpha 1(\text{XI})$ - und die $\text{Pro}\alpha 2(\text{XI})$ -Kette des vorwiegend im Knorpel vorkommenden Kollagen XI weisen starke Homologien mit der Primärstruktur der $\text{Pro}\alpha 1(\text{V})$ -Kette auf (Greenspan *et al.*, 1991; Nah *et al.*, 1992). Zusätzlich zu der $\alpha 1(\text{V})$ - und $\alpha 2(\text{V})$ -Kette konnte die $\alpha 1(\text{XI})$ -Kette im bovinen Knochen (Niyibizi und Eyre, 1989) sowie die $\alpha 2(\text{V})$ -Kette gemeinsam mit der $\alpha 1(\text{XI})$ -Kette im bovinen Glaskörper (Mayne *et al.*, 1993) nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Beobachtungen und nicht zuletzt auf Grund der strukturellen Gemeinsamkeiten des für die Assemblierung von α -Ketten wichtigen C-terminalen Propeptids wird angenommen, dass die Polypeptidketten der Kollagene V und XI Heterotrimer bilden können. Tatsächlich sind in der humanen Rhabdomyosarcoma-Zelllinie A204 $[\alpha 1(\text{XI})]_2\alpha 2(\text{V})$ Heterotrimere nachgewiesen worden (Kleman *et al.*, 1992). Bei dem typischerweise in Kollagen II-haltigen Knorpelfibrillen vorkommenden Kollagen XI handelt es sich um $\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$ Heterotrimere (Burgeson und Hollister, 1979; Morris und Bächinger, 1987). Des Weiteren wurden im Knorpel $\alpha 1(\text{XI})\alpha 1(\text{V})\alpha 3(\text{XI})$ Heterotrimere identifiziert, wobei die $\alpha 1(\text{V})$ -Kette intermolekulare Quervernetzungen zu der $\alpha 1(\text{XI})$ -Kette aufweist und im Verlauf der Reifung des Knorpels die $\alpha 2(\text{XI})$ -Kette zunehmend ersetzt (Wu *et al.*, 2009). Weitere Isoformen von Kollagen V/XI-Heterotrimeren wie $[\alpha 1(\text{XI})]_2\alpha 2(\text{V})$ wurden in Bandscheiben identifiziert (Wu *et al.*, 2009). Abgesehen von den sequenziellen Ähnlichkeiten der $\alpha 1(\text{XI})$ - und der $\alpha 2(\text{XI})$ - mit der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette wurde gezeigt, dass es sich bei der $\text{Pro}\alpha 3(\text{XI})$ -Kette und der $\text{Pro}\alpha 1(\text{II})$ -Kette um dasselbe Genprodukt handelt (Oxford *et al.*, 1994). Die reifen $\alpha 1(\text{II})$ - und $\alpha 3(\text{XI})$ -Ketten unterscheiden sich nur hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen.

1.4.2.5 Funktion der N-terminalen Propeptide von Kollagen V und XI

Eine strukturelle Gemeinsamkeit zwischen Kollagen V und Kollagen XI besteht auch in der fehlenden und/oder unvollständigen Prozessierung der N-terminalen Propeptide. Zusätzlich weisen Kollagen V und Kollagen XI funktionelle Gemeinsamkeiten auf, für die das unprozessierte N-terminale Propeptid eine wichtige Rolle spielt. Kollagen XI, das im Knorpel ein Minderheiten-Kollagen darstellt, bildet heterotypische Fibrillen zusammen mit Kollagen II oder den Kollagenen II und

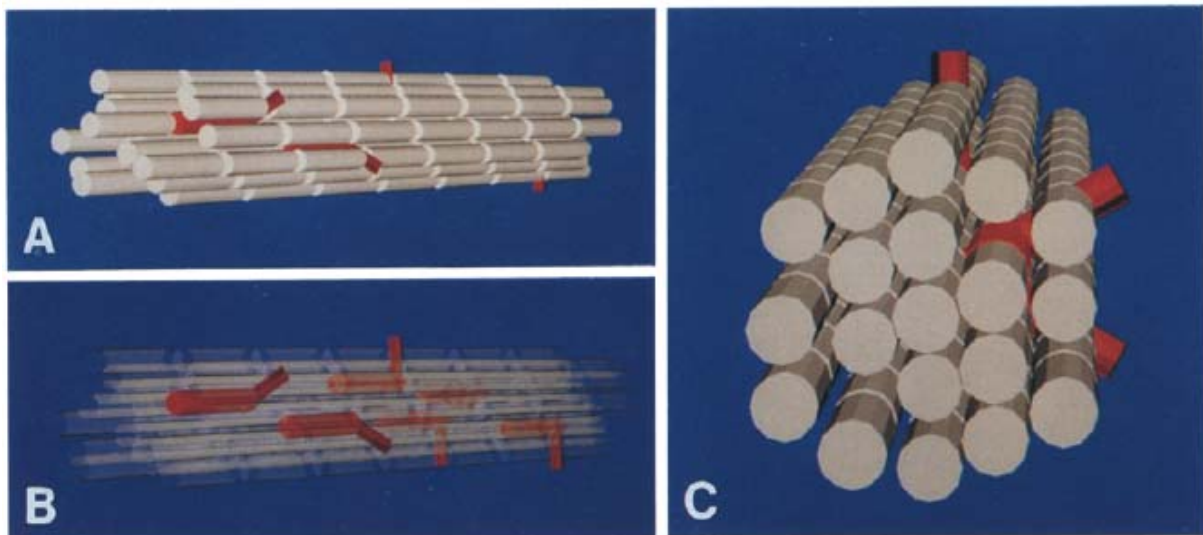


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Anordnung von Kollagen I und V in heterotypischen Kollagenfibrillen der Cornea. A und B: longitudinale Ansicht. C: Querschnitt. Kollagen I ist in beige und Kollagen V in rot dargestellt. Die tripelhelikalen Abschnitte des Kollagen V sind in die Fibrille eingebettet und werden durch Kollagen I maskiert. Die N-terminalen Propeptide ragen aus der Fibrille heraus. (Linsenmayer *et al.*, 1993)

IX (Morris und Bächinger, 1987; Mendler *et al.*, 1989), wobei es ein Nukleationskeim für die Fibrillogenese der Knorpelfibrillen ist und dabei die Fibrillendicke reguliert (Blaschke *et al.*, 2000). Für Kollagen V wurde eine analoge Funktion bei der Fibrillogenese von Kollagen I-haltigen Fibrillen beschrieben (Fessler *et al.*, 1985; Birk *et al.*, 1990b). Untersuchungen von *in vitro* rekonstituierten Kollagen I/V-Fibrillen haben gezeigt, dass Kollagen V ebenfalls ein negativer Regulator der Fibrillendicke ist, jedoch nicht in der stringenten Art des Kollagen II/XI-Systems (Birk *et al.*, 1990a). Wie für Kollagen XI wird diese Funktion des Kollagen V auf das unprozessierte N-terminale Propeptid zurückgeführt, das die Anlagerung weiterer Kollagenmoleküle während der Fibrillogenese limitiert (Birk *et al.*, 1990a; Linsenmayer *et al.*, 1993; Moradi-Ameli *et al.*, 1994).

Durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen der Hühner-Cornea konnte gezeigt werden, dass die tripelhelikale Domäne des Kollagen V in Kollagenfibrillen eingebettet ist und durch Kollagen I maskiert wird, wohingegen das N-terminale Propeptid an die Fibrillenoberfläche exponiert ist (Birk *et al.*, 1988; Linsenmayer *et al.*, 1993) (Abbildung 1.6). In der Bowman's Schicht wurde hingegen keine Maskierung der tripelhelikalen Domäne festgestellt, was Birk *et al.* (1986) auf die für die Bowman's Schicht typischen dünnen Fibrillendurchmesser (20 nm) zurückführen.

1.4.2.6 Ehlers-Danlos Syndrom und Kollagen V-Defekte

Bei dem Ehlers-Danlos Syndrom (EDS) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Bindegewebs-Defekten, die vorwiegend die Haut, die Gelenke, und die Bänder sowie in einigen Fällen die Arterien, den Darm und den Uterus betreffen (Steinmann *et al.*, 2002). Auf Grund von klinischen Symptomen wurde ursprünglich zwischen 11 verschiedenen Typen des EDS (Typ I - XI) unterschieden, die jedoch auf ein breites Spektrum genetischer Defekte zurückzuführen sind. Entsprechend einer überarbeiteten Einteilung wird zwischen 6 verschiedenen EDS Typen unterschieden (Tabelle 1.2). Die „klassischen Typen“ (Typ I und II), die durch eine hyperelastische und fragile Haut sowie überdehnbare Gelenke charakterisiert sind, können in ca. 50 % der Fälle auf Mutationen der für Kollagen V codierenden COL5A1 oder COL5A2 Gene zurückgeführt werden (Loughlin *et al.*, 1995; Burrows *et al.*, 1996; Michalickova *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1998). Das dermale Bindegewebe von Patienten mit Kollagen V-Mutationen zeichnet sich durch eine deutlich gestörte Organisation der Kollagenfibrillen aus, von denen einzelne Fibrillen veränderte Querschnitte aufweisen (Hausser und Anton-Lamprecht, 1994; De Paepe *et al.*, 1997; Schwarze *et al.*, 2000; Giunta *et al.*, 2002). Zusätzlich zu Kollagen V-Defekten wurde beschrieben, dass in einigen Fällen auch Tenascin-X-Defekte im Zusammenhang mit den „klassischen Typen“ des EDS stehen (Burch *et al.*, 1997; Schalkwijk *et al.*, 2001). An Mausmodellen wurde gezeigt, dass Kollagen V-Defekte zu der Manifestierung von dermalen Bindegewebs-Veränderungen führen, die phänotypisch größtenteils dem „klassischen EDS“ entsprechen (Chanut-Delalande *et al.*, 2004; Wenstrup *et al.*, 2004a). In diesem Zusammenhang konnten ebenfalls Kollagenfibrillen mit veränderten

Tabelle 1.2: Einteilung der Ehlers-Danlos Syndrom Typen. OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) = Datenbank; AD: autosomal dominant; AR: autosomal recessive; XL: *X chromosom-linked*. (Beighton *et al.*, 1998)

New	Former	OMIM	Inheritance
Classical type	Gravis (EDS type I)	130000	AD
	Mitis (EDS type II)	130010	AD
Hypermobility type	Hypermobile (EDS type III)	130020	AD
Vascular type	Arterial-ecchymotic (EDS type IV)	130050	AD
		(225350)	
Kyphoscoliosis type	Ocular-Scoliotic (EDS type VI)	(225360)	
		225400	AR
Arthrochalasia type	Arthrochalasia multiplex congenita (EDS types VIIA and VIIB)	(229200)	
Dermatosparaxis type	Human dermatosparaxis (EDS type VIIC)	130060	AD
		225410	AR
Other forms	X-linked EDS (EDS type V)	305200	XL
	Periodontitis type (EDS type VIII)	130080	AD
	Fibronectin-deficient EDS (EDS type X)	225310	?
	Familial hypermobility syndrome (EDS type XI)	147900	AD
	Progeroid EDS	130070	?
	Unspecified forms	—	—

Querschnitten beschrieben werden (Wenstrup *et al.*, 2004a; Wenstrup *et al.*, 2006). Zusätzlich weisen $\alpha 1(V)$ -defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Menge von Kollagenfibrillen auf (Wenstrup *et al.*, 2004a). Außerdem wurde in $\alpha 2(V)$ -defizienten Mäusen eine reduzierte Dicke der dermo-epidermalen Basalmembran sowie eine verstärkte Apoptose stromaler Fibroblasten festgestellt (Chanut-Delalande *et al.*, 2004).

1.4.2.7 Kollagen VI-Mikrofibrillen

Kollagen VI ist ein weiterer Bestandteil nahezu aller interstitieller Bindegewebe und daher auch für die Funktionalität der Haut und der Cornea wichtig. Es ist Bestandteil von perlenschnurartig organisierten Mikrofibrillen, die in der Dermis sowie im cornealen Stroma in Räumen zwischen und um die Kollagenfibrillen lokalisiert sind (Hessle und Engvall, 1984; Linsenmayer *et al.*, 1986; Keene *et al.*, 1988). Die Primärstruktur des Kollagen VI ist durch eine kurze tripelhelikale Domäne sowie große nichtkollagene Abschnitte charakterisiert, die aus mehreren von-Willebrand Faktor Typ-A Domänen zusammengesetzt sind. Bei Kollagen VI-Molekülen handelt es sich typischerweise um Heterotrimere, die sich aus der $\alpha 1(VI)$ -, $\alpha 2(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$ -Kette in einem Verhältnis von 1:1:1 zusammensetzen. Diese so genannten Monomere lagern sich wiederum antiparallel zusammen, wodurch Dimere entstehen, die durch eine 75 nm lange linksdrehende Superhelix aus zwei verdrillten Tripelhelices charakterisiert sind. Die globulären Domänen liegen an den Enden der Dimere, wobei die C-terminalen globulären Domänen mit den benachbarten Tripelhelices interagieren und Disulfidbindungen ausbilden (Furthmayr *et al.*, 1983). Kollagen VI-Dimere polymerisieren wiederum zu Tetrameren, die ebenfalls im Bereich der globulären Domänen durch Disulfidbindungen stabilisiert sind. Die charakteristischen Kollagen VI-haltigen Mikrofibrillen werden schließlich durch die nicht-kovalente Aggregation von Tetrameren gebildet (Furthmayr *et al.*, 1983; Engvall *et al.*, 1986; Colombatti *et al.*, 1987). Erst kürzlich wurden 3 weitere α -Ketten [$\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$, $\alpha 6(VI)$] identifiziert, zu deren suprastrukturellen Organisation bisher wenig bekannt ist. Das menschliche Gen COL6A4 ist durch die Invasion eines Teilabschnittes inaktiviert, sodass im Menschen keine $\alpha 4(VI)$ -Ketten vorkommen (Gara *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2008). Im murinen Muskel- und Darmgewebe wurden die $\alpha 4(VI)$ -,

$\alpha 5(\text{VI})$ -, $\alpha 6(\text{VI})$ -Ketten in unmittelbarer Nähe von Basalmembranen lokalisiert (Gara *et al.*, 2008).

1.4.3 Nichtkollagene Matrix-Proteine

Ein weiterer Bestandteil des Bindegewebes sind nichtkollagene Matrix-Proteine, bei denen es sich überwiegend um Proteoglykane (siehe 1.4.3.3) sowie Glykoproteine (siehe 1.4.3.2) handelt. Wie die Kollagene sind auch Proteoglykane und nichtkollagene Glykoproteine Bestandteile einer Vielzahl unterschiedlicher multimolekularer Suprastrukturen (Aumailley und Gayraud, 1998; Heinegard, 2009; Bruckner, 2010). Die molekulare Heterogenität von Matrix-Suprastrukturen wird am Beispiel von Basalmembranen besonders deutlich. Glykoproteine wie Laminine, Nidogene und Fibuline sind in netzwerkartigen Aggregaten organisiert, die zusammen mit Kollagen IV und dem Proteoglykan Perlecan zu den Hauptkomponenten von Basalmembranen gehören (Aumailley und Gayraud, 1998). Dabei kann die Zusammensetzung dieser Komponenten in der Basalmembran je nach Organ und Region stark variieren. Ein weiteres Beispiel solcher Suprastrukturen sind die elastischen Fasern (siehe 1.4.3.1). Sie sind für die Funktionalität elastischer Gewebe wie die Aorta, elastische Arterien, die Haut, die Lunge und die Bänder besonders wichtig (Kielty *et al.*, 2002; Kielty, 2006).

1.4.3.1 Elastische Fasern

Elastische Fasern sind vorwiegend unlösliche supramolekulare Aggregate, die einen durch Quervernetzungen stabilisierten Kern aus Elastin aufweisen, der von Fibrillin-haltigen Mikrofibrillen ummantelt wird. Dieser Kern setzt sich aus einem Polymer aus Tropoelastin-Untereinheiten (65 - 70 kDa) zusammen (Mithieux und Weiss, 2005; Tamburro *et al.*, 2005). Tropoelastin weist eine Multidomänenstruktur mit sich wiederholenden hydrophoben Domänen und Quervernetzungs-Domänen auf. Fibrilline sind große Glykoproteine (ca. 350 kDa) von denen im Menschen bisher drei Isoformen bekannt sind (Fibrillin 1 - 3) (Sakai *et al.*, 1986; Kielty *et al.*, 2005). Polymere der Fibrilline bilden das strukturelle Grundgerüst von Mikrofibrillen (Durchmesser: 15 - 23 nm), die neben Fibrillin zahlreichen weiteren Matrix-Proteinen enthalten (Kielty, 2006). Fibrillin-haltige Mikrofibrillen besitzen für sich bereits

elastische Eigenschaften (Reinhardt *et al.*, 1995; Handford *et al.*, 2000). Die Elastizität der Haut wird durch ein Netzwerk aus elastischen Fasern gewährleistet, dass von Bündeln aus Mikrofibrillen (Oxytalan-Fasern) in der dermo-epidermalen Junktionszone über senkrecht orientierte Elaunin-Fasern der papillären Dermis bis zu horizontal angeordneten dicken elastischen Fasern in der retikulären Dermis reicht. Elastische Fasern enthalten dabei mit zunehmender Tiefe der Haut eine größere Menge Elastin (Holbrook und Smith, 2002; Kielty *et al.*, 2002; Kielty, 2006). In der adulten Cornea kann Elastin nicht nachgewiesen werden (Alexander und Garner, 1983), wohingegen Fibrillin-haltige Mikrofibrillen im Bereich des Limbus zu finden sind (Wheatley *et al.*, 1995; Schlötzer-Schrehardt *et al.*, 1997).

1.4.3.2 Weitere nichtkollagene Glykoproteine

Das Glykoprotein Fibronectin ist ein dimeres Molekül mit Untereinheiten von 250 - 280 kDa, die über Disulfidbrücken am C-Terminus verknüpft sind. Es ist durch eine spezifische Domänenstruktur charakterisiert, die drei verschiedene, sich wiederholende Motive (FnI, FnII, FnIII) aufweist und in unterschiedlichen Spleißvarianten vorkommt (z.B. lösliches Plasma-Fibronectin, unlösliches Fibronectin). In der ECM bildet Fibronectin Fibrillen (Hynes, 1990) und besitzt Brückenfunktionen sowohl für Zell-Matrix Interaktionen als auch für Kollagenfibrillen und andere ECM-Bestandteile (Chernousov *et al.*, 1991; Morla und Ruoslahti, 1992; Dzamba *et al.*, 1993).

Die Tenascine, von denen in Säugetieren bisher vier verschiedene Typen identifiziert wurden (Tenascin-C, Tenascin-R, Tenascin-X, Tenascin-W), sind ebenfalls Glykoproteine der ECM. Sie enthalten neben EGF-*like*- und globulären Fibrinogen-Domänen auch FnIII-Domänen und setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen, die über Disulfidbrücken stabilisierte *coiled coil* Strukturen annehmen. Tenascin-Trimer assemblieren wiederum zu Hexameren (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003; Hsia und Schwarzbauer, 2005). Tenascin-C ist ein anti-adhäsives ECM-Protein, das die Adhäsion von Zellen an Fibronectin beeinflusst (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1988; Sage und Bornstein, 1991; Orend und Chiquet-Ehrismann, 2000). In entwickelten Organen kommt es meist in geringen Mengen vor, wobei es jedoch unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen, Infektionen oder der Tumorbildung erhöht exprimiert wird (Chiquet-Ehrismann, 1995; Jones und Jones, 2000). Von Tenascin-X, das im Herzen, den Skelettmuskeln und der Haut vorkommt (Matsumoto *et al.*, 1994; Burch *et al.*, 1995), wird angenommen, dass es eine

wichtige Rolle bei der Organisation von Kollagenfibrillen ausübt. Mutationen des Tenascin-X-Gens führen zu Symptomen des „klassischen EDS“ (Burch *et al.*, 1997; Schalkwijk *et al.*, 2001) (siehe auch 1.4.2.6), wobei Veränderungen in der Kollagenverteilung zu beobachten sind (Mao *et al.*, 2002).

Laminine sind die nichtkollagenen Hauptproteinkomponenten aller Basalmembranen. Sie setzen sich aus je einer α -, β - und γ -Kette zu Heterotrimeren zusammen, die

Tabelle 1.3: Matrix-Glykoproteine (Auswahl). (Deutzmann *et al.*, 2007).

Protein(-Typ)	biologische Wirkung (Auswahl)
matricellular proteins	
Proteine, die Zellrezeptoren, ECM-Moleküle, Cytokine, und Proteasen binden; Modulatoren der Zell-Matrix-Interaktion; wegen der Vielzahl möglicher Interaktionen unterschiedliche Wirkung in verschiedenen Geweben möglich, Beispiel:	
SPARC* (=BM40, Osteonectin)	<i>Knock out</i> Phänotyp: Linsentrübung, erhöhte Adipogenese, Störung der Kollagenfibrillenbildung
Thrombospondine	Aktivierung von TGF- β ; Regulation der Kollagenfibrillenbildung; Regulation der Angiogenese; Plättchenregulation
Tenascin-C, -X, -R, -Y, -W	hohe Expression während der Gewebsbildung in der Embryonalentwicklung, Reexpression während der Wundheilung und der Tumorbildung; bei Ausfall: geringe neurologische Defekte (Tenascin-C, -R), erhöhte Aktivität an MMPs und verstärkte Tumor-Metastasierung (Tenascin-X)
Osteopontin	Regulation der Calcifizierung; Bindung von Hydroxyapatit
Bone sialoprotein	Regulation der Calcifizierung; Bindung von Hydroxyapatit
zelladhäsive Proteine	
Vitronectin	Vorkommen im Blut und in der ECM, beteiligt an der Regulation der Blutgerinnung und dem proteolytischen Abbau der ECM, bindet mehrere Integrine, vor allem $\alpha_v\beta_3$ (Modulation von Zellwanderung, Angiogenese)
Fibronectin	wichtiges Zelladhäsionsmolekül, Einbau in Fibringerinsel, wichtige Rolle bei der Wundheilung, Brückenfunktion zwischen ECM-Proteinen
Laminine	wichtiges Zelladhäsionsmolekül, Hauptkomponente nichtkollagener Netzwerke von Basalmembranen, entwicklungs- und organspezifische Expression
Argin	Basalmembranprotein, verschiedene Spleißvarianten mit unterschiedlichen Aktivitäten, notwendig für die Differenzierung der neuromuskulären Synapsen (Aggregation der Acetylcholin-Rezeptoren), <i>knock-out</i> letal
* SPARC= <i>secreted protein acidic und rich in cysteine</i>	

eine T- oder kreuzförmige Molekülstruktur aufweisen. Bisher sind fünf α -, drei β - und drei γ -Ketten bekannt, die entwicklungs- und gewebsspezifisch exprimiert werden. Laminine bilden ein stark quervernetztes Proteingerüst und binden zahlreiche andere ECM-Proteine, wie Perlecan, Fibulin-1 und Nidogen, über das sie mit dem Kollagen IV-Gerüst verknüpft sind. Durch ihre Zell-adhäsiven Eigenschaften sind sie ein wichtiger Bestandteil epithelialer Verankerungskomplexe (Durbeej, 2010).

Zusätzlich zu strukturgebenden Eigenschaften ist die ECM an zelluläre Funktionen wie der Zellwanderung, Differenzierung und Proliferation beteiligt (Aumailley und Gayraud, 1998; Deutzmann *et al.*, 2007). Dies geschieht vorwiegend über Wechselwirkungen von suprastrukturellen Aggregaten der ECM-Komponenten mit Integrin-Rezeptoren, zu denen viele Glykoproteine gehören (Hynes, 1992). Wichtige Funktionen einiger Glykoproteine der ECM sind in der Tabelle 1.3 aufgeführt.

1.4.3.3 Proteoglykane

Die Proteoglykane sind eine heterogene Gruppe von Zelloberflächen- oder ECM-Proteinen, die durch die Anhaftung von Glycosaminoglykan-Seitenketten (GAG) an ihr Kernprotein charakterisiert sind. Sie weisen vielfältige Funktionen als Korezeptoren für Cytokine (z.B. FGF, TGF- β , Wnt, Hedgehog), Modulatoren der Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen, Regulatoren der Aktivität einiger Proteasen, sowie Regulatoren der Assemblierung von Matrix-Suprastrukturen (z.B. von Kollagenfibrillen). Die GAG-Seitenketten stellen nicht verzweigte Polymere aus Disaccharid-Einheiten dar, die entsprechend ihrer Grundbausteine in Dermatansulfat, Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Keratansulfat eingeteilt werden. Bei den Disaccharid-Einheiten handelt es sich um GlcA (β -D-*glucuronic acid*) - GalNAc (β -D-N-*acetylgalactosamine*) Einheiten (Dermatansulfat und Chondroitinsulfat) und GlcA - GlcNAc (α -D-N-*acetylglucosamine*) Einheiten (Heparansulfat), die jedoch durch Sulfatierungen der C-Atome sowie durch die Epimerisierung von GlcA zu IdoA (α -L-*iduronic acid*) modifiziert sein können. Neben der großen Vielfalt möglicher Modifikationen der GAG-Seitenketten zeichnen sich Proteoglykane durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteingerüste aus. Bezüglich der Größe der Kernproteine wird daher zwischen den kleinen Leuzin-reichen Proteoglykanen (SLRP: *small leucine rich proteoglycan*) (Kernproteine 36 – 42 kDa) und den großen

Tabelle 1.4: Verteilung von SLRPs im Gewebe und Phänotypen in *knock out* Mäusen.
(Kalamajski und Oldberg, 2010)

SLRP	Vorkommen	<i>Knock out</i> Phänotyp in Mäusen	Hochregulation in
Biglycan	Haut, Sehnen, Knochen, Knorpel, Niere, Muskel, Prädentin und Wurzelhaut	reduzierte Knochenmasse, Risse der Aorta, geschwächte Sehnen	Fibrose, Arteriosklerose
Decorin	Haut, Sehnen, Knochen, Knorpel, Niere, Muskel, Prädentin und Wurzelhaut	fragile Haut, geschwächte Sehnen, geringe Festigkeit der Atemwege, langsame Wundheilung und Angiogenese	Fibrose, Krebs, Arteriosklerose
Asporin	Leber, Herz, Uterus, Perichondrium, Peritoneum, Prädentin und Wurzelhaut	langsame Wundheilung und Angiogenese	Skleroderma, Arthrose
Fibromodulin	Sehnen, Gelenke, Knorpel, Prädentin und Wurzelhaut	geschwächte Sehnen und Arthrose	Fibrose, Krebs, Arteriosklerose
Lumican	ubiquitär, Prädentin und Wurzelhaut	fragile Haut und trübe Cornea	Skleroderma, Krebs
Prolargin	Knochen, Lunge, Niere, Haut		
Osteoadherin	mineralisierter Knochen		
Keratocan	Cornea, Sklera, Sehnen, Gelenke, Knorpel	dünne und flache Cornea	
Epiphycan	Knorpel		
Opticin	Glaskörper (Auge)		
Osteoglycin	Cornea, Haut	leichte Hautfragilität, jedoch normale (klare) Cornea	
Chondroadherin	Knorpel, Cornea, Linse, und Retina		
Tsukushin	Primitivrinne und Primitivknoten (Gastrulation)		

Proteoglykanen (Kernproteine 100 – 370 kDa) unterschieden (Iozzo, 1998; Kresse und Schönherr, 2001; Heinegard, 2009). Bei den großen Proteoglykanen wird wiederum zwischen den Hyalectanen (Versican, CD44, Aggrecan, Neurocan, Brevican), die Hyaluronan binden (Iozzo und Murdoch, 1996), den Basalmembran-Proteoglykanen (Perlecan, Argin, Bamacan) (Aumailley und Gayraud, 1998) und den membrangebundenen Proteoglykanen (Syndecan, Betaglykan, Glypikan) (Mythreya und Blobel, 2009) unterschieden.

Das charakteristische Merkmal der SLRPs sind die sich wiederholenden Motive mit Leuzin-Resten (Schaefer und Iozzo, 2008). Die Leuzin-reichen Abschnitte werden von Regionen mit *cystein clusters* flankiert, wobei am N-terminalen Ende der Polypeptidketten 1 - 4 GAG-Ketten angeheftet sind. Typischerweise nehmen die SLRPs eine hufeisenförmige Struktur an, die für Protein-Protein Bindungen besonders an Kollagenfibrillen wichtig ist (Orgel *et al.*, 2009). Den SLRPs kommt auf Grund ihrer vernetzenden Eigenschaften von ECM-Proteinen eine besondere Bedeutung als Regulatoren bei der Assemblierung von Kollagenfibrillen zu (Hedbom und Heinegard, 1993; Douglas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Kalamajski und Oldberg, 2010). Decorin ist zum Beispiel eine wichtige Komponente multimolekularer Komplexe, über die FACITs (Kollagen XII und XIV) oder das mikrofibrilläre Kollagen VI mit Kollagen I- oder II-haltigen Fibrillen verknüpft sind (Font *et al.*, 1996; Ehnis *et al.*, 1997; Wiberg *et al.*, 2003; Nareyeck *et al.*, 2004). In der Haut ist Decorin, das an die *Gap*-Region von Kollagenfibrillen bindet, maßgeblich an der Organisation dermalen Fibrillen beteiligt (Scott, 1988; Scott, 1990; Bianco *et al.*, 1990). Eine entsprechende Funktion wurde für Decorin (Li *et al.*, 1992) und Lumican (Blochberger *et al.*, 1992) auch in der Cornea beschrieben. Bisher beschriebene SLRPs sind in der Tabelle 1.4 zusammengefasst.

1.5 Zielsetzung

Kollagenfibrillen, die den quantitativ größten Anteil von Bindegewebs-Suprastrukturen ausmachen, beeinflussen die Eigenschaften und damit die Funktionalität der extrazellulären Matrix entscheidend. Bei einem Vergleich der Haut mit der Cornea wird deutlich, wie unterschiedlich Kollagenfibrillen, die zum Teil aus gleichen Kollagenen aufgebaut sind, organisiert sein können. Wie das Beispiel der Haut zeigt, können in einem Organ Kollagenfibrillen mit sehr unterschiedlichen kompositionellen und morphologischen Eigenschaften gemeinsam vorkommen. In anderen Organen, wie der Cornea weisen Kollagenfibrillen hingegen eine homogene Zusammensetzung und Organisation auf. Um die Zusammenhänge zwischen dem Aufbau und den Eigenschaften heterotypischer Kollagenfibrillen zu untersuchen, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die unten aufgeführten Fragestellungen mit den entsprechenden methodischen Vorgehensweisen beantwortet werden. Es sollte dabei insbesondere die Rolle des Kollagen V, dem eine Funktion als Nukleationskeim bei der Assemblierung heterotypischer Kollagenfibrillen zugesprochen wird, untersucht werden.

- I. Kommt Kollagen V zusätzlich zu heterotypischen Kollagenfibrillen auch in nichtfibrillären Bindegewebs-Suprastrukturen vor, wo es bisher noch unbekannt Funktionen ausübt?
 - Es wurde die Verteilung der Kollagene I, III und V in der Haut und der Cornea immunhistologisch untersucht.
 - Außerdem wurde die Verteilung von α -Ketten des Kollagen V in Abhängigkeit zu der Tiefe der Dermis mit biochemischen Methoden untersucht.
 - Für die Identifikation von fibrillären Kollagenen des dermalen und cornealen Bindegewebes wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt.
 - Durch die Immunogold-Elektronenmikroskopie wurden Kollagen V-haltige Suprastrukturen des dermalen und cornealen Bindegewebes untersucht.
- II. Gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung von α -Ketten des Kollagen V in Abhängigkeit zu der Entwicklung des dermalen Bindegewebes?

- Es wurde die Zusammensetzung von α -Ketten des Kollagen V in junger humaner Haut biochemische untersucht.
 - Zusätzlich wurde die Zusammensetzung fibrillärer Kollagene, die durch kultivierte Fibroblasten junger humaner Haut sezerniert werden, mit Hilfe der Kollagen-Fluorographie untersucht.
 - Um altersabhängige Unterschiede in der Zusammensetzung von fibrillären Kollagenen zu analysieren, wurden biochemische und massenspektrometrische Analysen junger, muriner Haut durchgeführt.
 - Um die entwicklungsabhängigen Zusammensetzung von α -Ketten des Kollagen V in der Haut zu untersuchen wurde murines Wundgewebe untersucht.
- III.** Sind Kollagen I, III und V Bestandteile heterotypischer Kollagenfibrillen, die von kultivierten Fibroblasten sezerniert werden, und wird Kollagen V auch in nicht-fibrillären Bindegewebs-Suprastrukturen inkorporiert?
- Die Verteilung der Kollagene I und V in der durch kultivierte Fibroblasten sezernierten Matrix wurde immunhistologisch untersucht.
 - Durch biochemische und massenspektrometrische Analysen wurde die Zusammensetzung der fibrillären Kollagene in kultivierten Fibroblasten untersucht.
 - Die Zusammensetzung von Kollagenfibrillen der durch kultivierte Fibroblasten sezernierten Matrix wurde mit Immunogold-Elektronenmikroskopie analysiert.
- IV.** Kommen im cornealen Stroma heterotypische Kollagenfibrillen vor, die zusätzlich zu Kollagen I und V weitere fibrilläre Kollagene enthalten?
- Es wurde die Verteilung unterschiedlicher fibrillärer Kollagene in der bovinen und der humanen Cornea immunhistologisch untersucht.
 - Für die Identifikation von fibrillären Kollagenen im cornealen Stroma wurden biochemische und massenspektrometrische Analysen durchgeführt.
 - Durch die Immunogold-Elektronenmikroskopie wurden kompositionelle sowie morphologische Eigenschaften von cornealen Kollagenfibrillen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die Untersuchungen von Bindegewebs-Proteinen, insbesondere von Kollagenen, wurden im Rahmen dieser Arbeit an Gewebeproben humaner und muriner Haut sowie humaner und boviner Cornea durchgeführt. Alle in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden im Einverständnis mit der Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

2.1.1 Humane Hautproben

Bei den verwendeten humanen Hautproben handelte es sich um Hautpartien, die im Rahmen von operativen Eingriffen aus Bereichen der Brust, des Bauches oder der Oberschenkel in der Fachklinik Hornheide in Münster (Deutschland) sowie der Vorhäute von Kindern in der Klinik für Kinderchirurgie und Kinderurologie in Bielefeld (evangelisches Krankenhaus, Bielefeld, Deutschland) entfernt wurden. Es wurden Hautbiopsien erwachsener Probanden von weiblichen und männlichen Patienten im Alter von 20 bis 50 Jahren verwendet. Die gleichen Hautproben wurden außerdem zur Herstellung von Kulturen dermalen Fibroblasten verwendet (siehe 2.3.1).

2.1.1.1 Gewinnung von Hautschichten unterschiedlicher Tiefe

Für die Untersuchung des Bindegewebes aus Hautregionen unterschiedlicher Gewebetiefen wurden mehrere Schichten einer Hautbiopsie sukzessiv abgetragen. Dafür wurden ca. 5 x 3 cm große Hautstücke, von denen das subkutane Fettgewebe zuvor entfernt wurde, mit der Dermis nach unten, auf einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallplatte gleichmäßig festgefroren. Anschließend wurde die oberste Schicht des fixierten Gewebes bis zu einer Tiefe von 250 nm mit einem Dermatom nach Professor Mollowitz (Howmedica / Styker, Duisburg, Deutschland) abgetragen. Im nächsten Schritt wurde eine zweite Schicht an derselben Stelle bis zu einer Tiefe von 250 nm abgetragen. Auf diese Weise wurden vier Hautschichten

unterschiedlicher Gewebetiefen gewonnen (Schicht 1: 0 – 250 nm; 2: 250 – 500 nm; 3: 500 – 750 nm; 4: 750 – 1000 nm).

2.1.2 Humane Corneaprobe

Für die Untersuchungen der humanen Cornea wurden Reste des Spendergewebes von Transplantationsoperationen verwendet, wobei das Alter der Spender zwischen 50 und 60 Jahren lag. Bei solchen Geweberesten handelte es sich um Corneapräparate, die mit einem Teil der Sklera kreisförmig vom Auge des Spenders abgetrennt und aus denen der mittlere Teil der Cornea entfernt wurde. Diese ringförmigen Gewebeproben enthielten sowohl Teile der Sklera als auch der Cornea. Für die hier dargestellten Untersuchungen wurden aus solchen Ringen Stücke herausgeschnitten, von denen die Sklera anschließend entfernt wurde.

2.1.3 Bovine Haut- und Corneaprobe

Bei den bovinen Haut- und Corneaprobe handelte es sich um Schlachtabfälle einer ortsansässigen Schlachtereier. Das Alter der geschlachteten Rinder lag zwischen 1 und 2 Jahren. Für die Gewinnung von Gewebeproben der Cornea wurde der mittlere Teil der Cornea ohne die Sklera kreisförmig vom Auge entfernt.

2.1.4 Murine Hautprobe

Murine Hautprobe wurden von Wildtypmäusen des Stammes C57/BL6 aus dem Tierstall des Institutes für Physiologische Chemie und Pathobiochemie (Universitätsklinikum, Münster, Deutschland) entnommen. Für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden neugeborene Mäuse sowie 14 Tage alte Mäuse desselben Wurfes verwendet.

2.1.5 Murines Wundgewebe

Für Untersuchungen von Bindegewebs-Proteinen in dermale Wundgewebe wurden 10 Wochen alte Wildtypmäuse des Stammes C57/BL6 verwendet. Das verwendete Wundgewebe wurde von excisionalen (die gesamte Haut betreffend, ohne Faszie)

Hautwunden mit einem Durchmesser von 6 mm gewonnen. Jede Maus erhielt durch das Ausstanzen der Haut eine Eintritt- sowie eine Austrittswunde. Für die hier dargestellten Experimente wurde das Gewebe der Austrittswunden verwendet. Die Präparation von Wundgewebe sowie der normalen Haut derselben Tiere wurde 8 Tage nach der Verwundung vorgenommen. Die Generierung von Hautwunden sowie die anschließende Präparation des Gewebes erfolgte im Labor von Beate Eckes (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum, Köln, Deutschland). Die biochemischen Analysen der entsprechenden Gewebeproben wurden am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie in Münster, Deutschland durchgeführt.

2.2 Antikörper

Für die Untersuchung von Proteinen der extrazellulären Matrix wurden sowohl kommerziell erworbene Antikörper als auch Antikörper, die von kooperierenden Forschergruppen zur Verfügung gestellt wurden, verwendet.

2.2.1 Kollagen V-Antikörper

Ein Großteil der Untersuchungen des Kollagen V wurde mit Antikörpern durchgeführt, die im Labor von Florence Ruggiero (*Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université de Lyon, Frankreich*) hergestellt wurden. Es handelte sich dabei um murine monoklonale Antikörper mit den Klonnummern 13F6, 6A7 und 18G5, die alle gegen das rekombinant hergestellte N-terminale Propeptid der humanen $\alpha 1(V)$ -Kette (Abbildung 2.1) erzeugt wurden. Die Herstellung dieser Antikörper sowie die Charakterisierung der durch die Antikörper 6A7 und 18G5 gebundenen Epitope

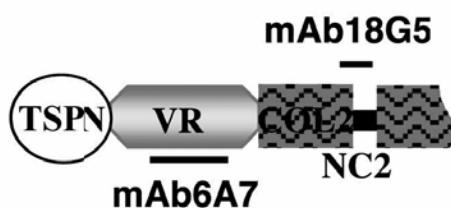


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette. Die Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper (mAb) 6A7 und 18G5 sind durch Striche gekennzeichnet. TSPN: Thrombospondin-ähnliche Domäne; VR: variable Domäne; COL2: kurze tripelhelikale Domäne; NC2: nicht-tripelhelikale Domäne. (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007)

der $\alpha 1(V)$ -Kette wurde an anderer Stelle bereits beschrieben (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Es wurde gezeigt, dass der Antikörper 6A7 spezifisch mit der variablen Region (VR) des N-Propeptids der Kollagen $\alpha 1(V)$ -Kette reagiert. Der Antikörper 18G5 reagiert hingegen spezifisch mit einem Teil der NC2- sowie der COL2-Domäne des N-Propeptids der Kollagen $\alpha 1(V)$ -Kette. Eine schematische Darstellung der durch die Antikörper 6A7 und 18G5 gebundenen Epitope ist in Abbildung 2.1 zu sehen. Das durch den Antikörper 13F6 erkannte Epitop der $\alpha 1(V)$ -Kette befindet sich in enger Nachbarschaft zu dem des Antikörpers 18G5 (unveröffentlichte Daten, Florence Ruggiero).

Zusätzlich wurde für Untersuchungen des Kollagen V der kommerziell erworbene, murine, monoklonale Antikörper MAB3393 (Chemicon / Millipore, Billerica, USA) verwendet. Die Herstellung sowie die Charakterisierung dieses Antikörpers (Klonnummer: 1E2-E4) wurde an anderer Stelle bereits beschrieben (Werkmeister *et al.*, 1989; Werkmeister und Ramshaw, 1989; Werkmeister und Ramshaw, 1991a). Es wurde gezeigt, dass dieser Antikörper spezifisch mit Kollagen V von Mensch, Rind, Hund, Schwein, Schaf, Känguru und schwach mit demjenigen des Kaninchens reagiert. Er reagiert nicht mit Kollagen V von Huhn, Meerschweinchen oder der Ratte. Die für Immunblots (IB), Immunhistochemie (ICH), Immunfluoreszenz (IF) und Immunogold-Elektronenmikroskopie (EM) eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Kollagen V-Antikörper sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Liste verwendeter monoklonaler Kollagen V-Antikörper.

Reaktivität	Bezeichnung Artikel Nr.	Herkunft	Wirtstier	Klon Nr.	Verdünnung		
					Blot	ICH / IF	EM
Kollagen $\alpha 1(V)$	13F6	F. Ruggiero Lyon Frankreich	Maus	13F6	1:2500	1:100	1:100
Kollagen $\alpha 1(V)$	18G5	F. Ruggiero Lyon Frankreich	Maus	18G5	1:5000	1:100	1:100
Kollagen $\alpha 1(V)$	6A7	F. Ruggiero Lyon Frankreich	Maus	6A7	1:2500	1:100	1:100
Kollagen V	MAB3393	Chemicon Billerica USA	Maus	1E2-E4	1:1000	1:100	1:100

2.2.2 Kollagen $\alpha 5(\text{VI})$ -Antikörper

Antikörper gegen die humane $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette wurden von Raimund Wagener (Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Es wurden zwei verschiedene polyklonale Antikörper verwendet, die gegen die rekombinant hergestellten Domänen N2-N6 der humanen $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette produziert wurden. Einer der beiden Antikörper wurde im Kaninchen [$\alpha 5(\text{VI})\text{RB}$] der andere im Meerschweinchen [$\alpha 5(\text{VI})\text{GP}$] hergestellt. Die Seren, der für die Antikörperherstellung immunisierten Tiere, wurden mittels der rekombinanten Domänen affinitätsge-reinigt. Die Vorgehensweise bei der Herstellung von Kollagen VI-Antikörpern ist zuvor an anderer Stelle beschrieben worden (Gara *et al.*, 2008).

2.2.3 Kollagen III-Antikörper

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit der murine, monoklonale Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Chemicon / Millipore, Billerica, USA) verwendet (Klonnummer IE7-D7). Die Herstellung sowie eine nähere Charakterisierung dieses Antikörpers wurde bereits beschrieben (Werkmeister *et al.*, 1989; Werkmeister und Ramshaw, 1989; Werkmeister und Ramshaw, 1991b). Es wurde gezeigt, dass dieser Antikörper spezifisch mit Kollagen III von Mensch und Ratte aber nicht von Schaf und Rind reagiert.

2.2.4 Kollagen II-Antikörper

Außerdem wurde der murine, monoklonale Kollagen II-Antikörper MAB8887 (Chemicon / Millipore, Billerica, USA) (Klonnummer: 6B3) verwendet, für dessen Herstellung Kollagen II aus Hühner-Sterna verwendet wurde (Linsenmayer und Hendrix, 1980; Mayne *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass der Antikörper mit Kollagen II von Huhn, Mensch, Salamander und Maus reagiert. Kreuzreaktionen mit weiteren Spezies wurden nicht getestet.

2.2.5 Antikörper gegen weitere Matrix-Proteine

Für Untersuchungen von Bindegewebs-Proteinen sind weitere monoklonale und polyklonale Primärantikörper verwendet worden. Die für Immunblots (IB), Immunhistochemie (ICH), Immunfluoreszenz (IF) und Immunogold-Elektronenmikroskopie (EM) eingesetzten Konzentrationen dieser Antikörper sowie die der oben bereits beschriebenen Antikörper sind in Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Liste verwendeter monoklonaler Antikörper.

Reaktivität	Bezeichnung Artikel Nr.	Herkunft	Wirtstier	Klon Nr.	Verdünnung		
					Blot	ICH / IF	EM
Kollagen I	AF5610	Acris Hiddenhausen Deutschland	Maus	I-8H5	1:5000	1:500	1:100
Kollagen III	MAB3392	Chemicon Billerica USA	Maus	IE7-D7	1:5000	1:500	1:500
Kollagen II	MAB8887	Chemicon Billerica USA	Maus	6B3	1:2500	1:100	1:100
Kollagen α 2(IV)	MAB1910	Chemicon Billerica USA	Maus	2311C3	-	1:500	-
Tenascin-X	TNXB	Abnova Taipeh Taiwan	Maus	2D3- 1B10	-	1:100	-
Tenascin-C	CP-100	M. Koch Köln Deutschland	Maus	-	-	1:100	-

Tabelle 2.3: Liste verwendeter polyklonaler Antikörper.

Reaktivität	Bezeichnung Artikel Nr.	Herkunft	Wirtstier	Verdünnung		
				Blot	ICH / IF	EM
Kollagen α 5(VI)	α 5(VI)RB	R. Wagener Köln Deutschland	Kaninchen	1:2500	1:200	-
Kollagen α 5(VI)	α 5(VI)GP	R. Wagener Köln Deutschland	Meerschweinchen	-	1:1000	-
Kollagen I	BP8028	Acris Hiddenhausen Deutschland	Kaninchen	1:5000	1:500	1:500
Kollagen IV	R1041	Acris Hiddenhausen Deutschland	Kaninchen	-	1:1000	-
Fibrillin-1	rF6H	Dieter Reinhardt Montreal Kanada	Kaninchen	-	1:500	-

2.3 Zellkultur

2.3.1 Gewinnung dermalen Fibroblasten

Für die Gewinnung von dermalen Fibroblasten wurden humane Hautbiopsien verwendet. Diese Biopsien wurden unmittelbar nach ihrer operativen Entnahme in keimfreien Kunststoffbeuteln verpackt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Vorbereitung der Kultivierung wurde das subkutane Fettgewebe von der jeweiligen verwendeten Hautpartie entfernt und diese in 0,5 cm² große Stücke geschnitten. Jedes Hautstück wurde mit der Dermis nach unten in eine mit 500 µl „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) und 20 % fötalem Kälberserum (FKS) befüllte 11 cm² Zellkulturschale (Falcon / BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) gesetzt und für 1 – 2 Wochen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) inkubiert, so dass die Zellen aus der Hautbiopsie auswachsen und die Zellkulturschalen konfluent besiedeln. Für das anschließende Passagieren wurden die auf den Schalen verbleibenden Zellen einmal mit sterilem PBS (*phosphate buffered saline*) (GIBCO / invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und für 1 – 5 min mit 250 µl 0,05 % (w/v) Trypsin-EDTA (GIBCO / invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei Standardbedingungen inkubiert. Durch die Zugabe von DMEM mit 10 % FKS wurde das Trypsin-EDTA inhibiert sowie die abgelösten Zellen suspendiert. Diese erste Passage wurde in eine mit 5 ml DMEM und 10 % FKS befüllte 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt und bei Standardbedingungen inkubiert. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tage erneuert. Bei Erreichen einer konfluenten Besiedelung der Zellkulturflaschen wurden die Zellen erneut passagiert und in eine 75 cm² Zellkulturfläche (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 10 ml DMEM und 10 % FKS überführt (Passage 2). Die so gewonnenen Fibroblasten wurden noch zweimal in einem Verhältnis von 1:3 passagiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe 2.3.2).

2.3.2 Einfrieren und Lagerung von Fibroblasten

Die Fibroblasten aus 9 Zellkulturflaschen (siehe 2.3.1) der vierten Passage wurden in je 4,5 ml Einfriermedium (DMEM, 10 % FKS, 10 % Dimethylsulfoxid) aufgenommen und zu je 500 µl auf 9 Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) verteilt. Die

portionierten Zellen wurden über Nacht bei -80 °C in einem „Cryo 1 °C Freezing Container“ (Nalgene, Rochester, USA) tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.3 Kultivierung von Fibroblasten

2.3.3.1 Monolayerkulturen

Für Untersuchungen der durch kultivierte Fibroblasten synthetisierten Kollagene, wurden die zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerten Fibroblasten (siehe 2.3.1, 2.3.2) aus je einem Kryoröhrchen bei 37 °C aufgetaut und in drei $31,4\text{ cm}^2$ Zellkulturschalen (Falcon / BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) überführt. Jede Zellkulturschale wurde mit 5 ml DMEM, 10 % FKS befüllt und bis zur konfluenten Besiedelung bei Standardbedingungen inkubiert. Das Kulturmedium wurde, um restliches Dimethylsulfoxid zu entfernen, nach 2 h erneuert. Anschließend wurde das Kulturmedium alle drei bis vier Tage erneuert.

Um die Synthese von Kollagenen zu induzieren, wurde $0,14\text{ mM}$ L(+)-Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum dem Zellkulturmedium, das in einigen Fällen ohne die Zugabe von FKS eingesetzt wurde, konfluent besiedelter Zellkulturschalen hinzugegeben. Zusätzlich wurden 1 mM Natriumpyruvat (Fluka / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 1 mM L-Cystein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zum Medium hinzugegeben. Intermolekulare *cross links* der synthetisierten Kollagene wurden in einigen Zellkulturschalen durch die Zugabe von $0,23\text{ mM}$ β -Aminopropionitril (BAPN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inhibiert. Die Kultivierung von Fibroblasten mit Ascorbinsäure wurde jeweils über einen Zeitraum von 6 oder 12 Tagen bei Standardbedingungen durchgeführt. Anschließend wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellschicht mit einem Plastikschaber aus den Zellkulturschalen gelöst.

2.3.3.2 Dreidimensionale Kultivierung

Als Ergänzung zu Monolayerkulturen (siehe 2.3.3.1), wurden Fibroblasten auch in einem dreidimensionalen System kultiviert. Es wurden dafür 24 Well-Zellkulturplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark), mit einer Kultivierungsfläche von $1,9\text{ cm}^2$ pro Well, verwendet. Frisch aufgetaute Zellen (siehe 2.3.1, 2.3.2) wurden dazu in DMEM mit

10 % FKS aufgenommen und nach der Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer zu je 2×10^5 Zellen pro Well in Zellkulturplatten überführt, sodass sich mehrere Zellschichten übereinander absetzen konnten. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei Standardbedingungen inkubiert und das Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FKS) nach 2 h erneuert (jeweils 1 ml pro Well).

Um die Synthese von Kollagenen zu induzieren, wurden die Zellen nach 16 - 18 h mit 0,14 mM L(+)-Ascorbinsäure stimuliert. Außerdem wurden 1 mM Natriumpyruvat und 1 mM L-Cystein zu den Kulturen hinzugegeben. Wahlweise wurden intermolekulare *cross links* durch die Zugabe von 0,23 mM BAPN inhibiert. Die Kultivierung von Fibroblasten mit Ascorbinsäure wurde jeweils über einen Zeitraum von 6 oder 12 Tagen unter Standardbedingungen durchgeführt. Anschließend wurde das Medium aus den Zellkulturplatten entfernt und der aus mehreren Schichten bestehende Zellverband in einem Stück aus den Vertiefungen gelöst.

2.3.3.3 Metabolische Markierung von Kollagenen

Für den Nachweis der durch kultivierte Fibroblasten synthetisierten Kollagene, wurden Kollagen-Fluorogramme angefertigt (siehe 2.4.4). Dazu wurde zu dem Zellkulturmedium, der wie in 2.3.3.1 beschrieben kultivierten Zellen, radioaktives ^{14}C -Prolin (Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland) in einer Konzentration von 37 kBp/ml gegeben. Nach einer Kultivierungsdauer von 6 Tagen, wurden das Zellkulturmedium und die Zellschicht wie unter 2.4.1.2 beschrieben einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen.

2.4 Proteinbiochemie

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Für proteinchemische Untersuchungen wurden Proteinextrakte der Haut oder der Cornea hergestellt. Das jeweilige Gewebe wurde dafür mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und in einem Tris-haltigen Neutralsalzpuffer (siehe unten) mit Proteaseinhibitoren für 20 s auf Eis mit einem Polytron Homogenisator (Kinematica, Littau / Luzern, Schweiz) zunächst bei niedriger, dann bei zunehmend höherer Drehzahl homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 s auf Eis gekühlt.

Dieser Homogenisierungsschritt wurde zweimal wiederholt. Um größere Gewebefragmente zu entfernen, wurden die Homogenate im nächsten Schritt für 3 min und 2500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde anschließend durch die BCA-Methode (Thermo Scientific, Rockford, USA) (Smith *et al.*, 1985) bestimmt.

Neutralsalzpuffer:

Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM
Natrium Chlorid 150 mM

Proteaseinhibitoren:

6-Aminocaprinsäure 100 mM
Benzamidin-HCl 5 mM
N-Ethylmaleimidin 5 mM
Phenylmethylsulphonylfluorid 1 mM

2.4.1.1 Limitierter Pepsin-Verdau von Gewebeproben

Um die Zusammensetzung von Kollagen α -Ketten zu untersuchen, wurden Gewebeproben einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurden frische oder zuvor bei -80 °C gelagerte Gewebeproben mit einer Schere zerkleinert und auf Eis in 0,5 M Essigsäure mit dem Polytron Homogenisator homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde zuvor in 0,5 M Essigsäure gelöstes Pepsin (Serva, Heidelberg, Deutschland) bis zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zu dem Homogenat hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 24 h bei 4 °C auf einem Drehrad rotiert und dann mit 23.000 x g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation gewonnene Überstand wurde für eine Fällung der darin enthaltenen Proteine mit 2 M NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad rotiert. Die so ausgefällten Proteine wurden durch erneutes Zentrifugieren mit 23.000 x g bei 4 °C für 30 min präzipitiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Präzipitat in 100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,6 gelöst und gegebenenfalls mit 1 M Tris auf pH 8,6 titriert. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde abschließend mit der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) bestimmt.

2.4.1.2 Limitierter Pepsin-Verdau von Zellkulturmaterial

Um Kollagene aus Fibroblastenkulturen zu isolieren wurden die Zellschicht sowie das Zellkulturmedium einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen. Die Zellschicht, der

wie unter 2.3.3.1, 2.3.3.2 oder 2.3.3.3 kultivierten Fibroblasten, wurde dazu in 0,5 M Essigsäure aufgenommen und mit 1 mg/ml Pepsin (Serva, Heidelberg, Deutschland) versetzt. Parallel dazu wurde Essigsäure zu den separierten Zellkulturmedien bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M hinzugegeben. Die angesäuerten Medien wurden ebenfalls mit 1 mg/ml Pepsin versetzt. Sowohl die Zellysate als auch die Medien wurden für 2 h bei Raumtemperatur mit Pepsin inkubiert und anschließend mit 2 M NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Um die in der Lösung präzipitierten Proteine zu pelletieren, wurden die Ansätze für 30 min bei 4 °C mit 23.000 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der Überstände wurden die Proteinpellets in 100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,6 gelöst. Der pH-Wert der Lösungen wurde gegebenenfalls mit 1 M Tris auf pH 8,6 titriert. Im nächsten Schritt wurde bei -20 °C vorgekühltes, technisches Ethanol im Verhältnis von 4:1 zu den Lösungen gegeben und diese nach einem kurzen Mischen über Nacht bei -20 °C gelagert. In einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4 °C und 23.000 x g wurden präzipitierte Proteine erneut pelletiert. Nach dem anschließenden Entfernen der Überstände wurden die Proteinpellets getrocknet und in Probenpuffer (siehe 2.4.2) resuspendiert.

2.4.1.3 Kollagenase-Verdau von Proteinextrakten

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden Proteinextrakte in einigen Fällen mit bakterieller Kollagenase (CLSPA, Worthington, Lakewood, USA) verdaut. Dazu wurden Gewebeproben analog zu 2.4.1 entweder in Neutralsalzpuffer mit 10 mM CaCl₂, 5 mM N-Ethylmaleimidin und 0,1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid homogenisiert oder bereits vorhandene Proteinextrakte gegen denselben Puffer dialysiert. Nach der Zugabe von 20 U CLSPA / µg Protein wurden die Proben für 6 h bei 37 °C inkubiert. Um den Verdau zu beenden wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und anschließend mit Probenpuffer (siehe 2.4.2) versetzt. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der Probe mit gleichen Pufferbedingungen ohne CLSPA inkubiert.

2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteingemische aus Zellkulturmaterial (siehe 2.3.3) oder Gewebeproben (siehe 2.4.1) entsprechend der Molekularmassen aufzutrennen, wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid-gel*

electrophoresis: SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es wurden für die Auftrennung Gradientengele mit einer Größe von 13 x 13 cm angefertigt. Für die Sammelgele wurde eine Polyacrylamidkonzentration von 4,5 % und für die Trenngele wahlweise ein Konzentrationsgradient von 4,5 – 8 % oder 4,5 – 15 % gewählt. Die zu untersuchenden Proteingemische wurden in 1- bis 5-fach konzentriertem Probenpuffer aufgenommen, gegebenenfalls neutralisiert und für 5 - 10 min bei 95 °C gekocht. Für reduzierende Bedingungen wurde dem Probenpuffer noch zusätzlich 3 % β -Mercapthoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt. Die Gradientengele wurden mit 5 – 40 μ g Proteingemisch beladen. Als Größenvergleich für Proteinbanden wurden die Gradientengele außerdem mit 15 μ l eines Molekulargewichtsstandards (Precision Plus Dual Color standard, Bio-Rad, Hercules, USA) beladen. In einigen Fällen wurde 1 – 5 μ g Pepsin-lösliches aufgereinigtes Kollagen V aus humaner Plazenta (biomarket, Turku, Finnland) als Kontrolle mitgeführt. Bei einer Laufzeit der Proteinauftrennung von 3 h wurde eine Stromstärke von 30 mA mit variabler Spannung eingestellt. Alternativ dazu wurde die elektrophoretische Auftrennung über Nacht durchgeführt. In diesem Fall wurde die niedrigste mögliche Stromstärke (ca. 8 - 12 mA) gewählt.

Probenpuffer:

Tris	10 mM
Glycerol	10 % [v/v]
Bromphenolblau	0,03 mg/ml
Natriumdodecylsulphat	0,02 g/ml
Harnstoff	0,5 M

Sammelgel:

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
Natriumdodecylsulfat	0,1 % (w/v)
Acrylamid / Bisacrylamid	4,5 % (w/v)
Tetramethylethyldiamin	0,33 % (v/v)
Ammoniumperoxodisulfat	75 μ g/ml

Laufpuffer:

Tris-HCl (pH8,8)	25 mM
Natriumdodecylsulfat	0,1% (w/v)
Glycin	Glycin

Trenngel:

Tris-HCl (pH 8,8)	400 mM
Natriumdodecylsulfat	0,1 % (w/v)
Acrylamid / Bisacrylamid	4,5-8 % (w/v) 4,5-15 % (w/v)
Tetramethylethyldiamin	0,1 % (v/v)

2.4.2.1 Gelanfärbung mit Coomassie-Blau

Um die Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung für 16 – 20 h in einer Kolloidal-Coomassie Lösung gefärbt. Anschließend wurde ungebundenes Coomassie-Blau durch 4-maliges Waschen der Gele mit deionisiertem H₂O über einen Zeitraum von 8 – 16 h entfernt. Um eine langfristige Konservierung zu gewährleisten wurden die gefärbten Gele zwischen Zellophanfolien getrocknet.

Kolloidal-Coomassie Lösung:

Coomassie G 250	800 mg/l
Ammoniumsulfat	80 g/l
Phosphorsäure	1,36 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

2.4.2.2 Silberfärbung

Für die Visualisierung von Proteinbanden mit geringen Proteinmengen in SDS-Gelen wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen wurden SDS-Gele 2-mal für 10 min mit 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure inkubiert. Anschließend wurden die Gele für 15 min in Fixierlösung geschwenkt und nach 3-maligem Waschen (jeweils 5 min) mit deionisiertem H₂O in eine Silbernitrat-haltige Färbelösung überführt. Nach weiteren 15 min wurde die Färbelösung entfernt und die Gele kurz mit Entwicklerlösung gewaschen. Entsprechend der gewünschten Färbeintensität von Proteinbanden wurde die Entwicklung nach 1 – 5 min mit 7 %iger (v/v) Essigsäure gestoppt. Schließlich wurden die Gele intensiv mit Wasser gewaschen und für eine längerfristige Konservierung zwischen Zellophanfolien getrocknet.

Fixierlösung:

Natriumthiosulfat	4 mM
Natriumacetat	0,4 M
Glutaraldehyd	0,25 % (v/v)
Essigsäure	0,4 % (v/v)
Ethanol	15 % (v/v)

Färbelösung:

Silbernitrat	5,88 mM
Formaldehyd	9,25 % (w/v)

Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)
Formaldehyd	0,0148 % (v/v)

2.4.3 Immunblot

Für die biochemische Analyse von Proteingemischen wurden unter anderem Immunblots durchgeführt. Hierfür wurden die mittels einer SDS-PAGE (siehe 2.4.2) aufgetrennten Proteingemische in einem Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, Dassel, Deutschland) übertragen. Das Blotting wurde bei 4 °C über einen Zeitraum von 3 h mit einer Stromstärke von 17,5 mA pro cm² Nitrocellulose-Membran durchgeführt. Anschließend wurden die Blotmembranen 4- bis 5-mal mit deionisiertem H₂O gewaschen. Für eine Anfärbung aller transferierten Proteinbanden wurden die Blotmembranen in einem weiteren Schritt für 1 – 5 min mit „Mem Code Reversible Stain“ Lösung (Thermo Scientific, Rockford, USA) inkubiert. Durch erneutes 4- bis 5-maliges Waschen mit deionisiertem H₂O wurde überschüssige Färbelösung entfernt. Um die so sichtbar gemachten Proteinbanden zu dokumentieren, wurden die Blotmembranen zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und fotokopiert. Durch das Schwenken der Blotmembranen für 1 – 5 min in „Eraser-Lösung“ (Thermo Scientific, Rockford, USA), wurde die Proteinfärbung wieder entfernt.

Nach 4- bis 5-maligem Waschen mit deionisiertem H₂O wurden die Blotmembranen dann für 60 min bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) blockiert. Anschließend wurden Primärantikörper (2.2, Tabelle 2.1, Tabelle 2.2, Tabelle 2.3) in TBS mit 0,02 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (TBS/T) und 2,5 % (w/v) Magermilchlösung verdünnt. Die Inkubation der Blotmembranen mit der Primärantikörperlösung wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Blotmembranen über einen Zeitraum von 30 min 4-mal mit TBS/T gewaschen. Die ebenfalls in TBS/T und 2,5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnten Peroxidase (Horse-Radish-Peroxidase, HRP) konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.4) wurden anschließend für 2 h bei Raumtemperatur auf die Blotmembranen gegeben. Anschließend wurden die Blotmembranen über einen Zeitraum von 30 min 4-mal mit TBS/T gewaschen. Um die Immundetektion von Proteinbanden auf den Blotmembranen zu visualisieren, wurde eine durch HRP enzymatisch katalysierte Chemolumineszenz (ECL) erzeugt. Dazu wurden die Blotmembranen für 2 min mit einer ECL-Lösung (10 mM Tris [pH 8,5], 0,2 mM Luminol, 0,4 mM P-Cumarsäure, 0,01 % [v/v] H₂O₂,) inkubiert. Die so erzeugte Chemolumineszenz wurde durch die Exposition der Blotmembranen für 15 s, 1 min, 5 min oder 15 min auf Röntgenfilmen

(Amersham Biosciences / GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) und deren anschließende Entwicklung, dokumentiert.

Transferpuffer:

Tris	50 mM
Glycin	380 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

Tabelle 2.4: Liste verwendeter Sekundärantikörper für Immunblots.

Firma	Konjugat	Wirtstier	Reaktivität	Verdünnung
Dako, Glostrup, Dänemark	HRP	Ziege	Maus IgG	1:5000
Chemicon, Billerica, USA	HRP	Esel	Kaninchen IgG	1:5000
Chemicon, Billerica, USA	HRP	Esel	Meerschweinchen IgG	1:5000

2.4.4 Anfertigung von Kollagen-Fluorogrammen

Für die Anfertigung von Kollagen-Fluorogrammen wurde Zellkulturmaterial nach einer metabolischen Markierung (siehe 2.3.3.3) wie unter 2.4.1.2 beschrieben einem limitierten Verdau mit Pepsin unterzogen und anschließend für 5 min bei 95 °C in nicht-reduzierendem Probenpuffer (siehe 2.4.2) erhitzt. Um die Konzentration radioaktiv markierter Proteine zu bestimmen, wurden 2 µl der Lösungen in Scintillationsgefäße (Beckman, Fullerton, USA) zu je 2 ml „Lumasafe Plus“ (Lumac LSC, Groningen, Niederlande) gegeben und gründlich gemischt. An einem „Multi-Purpose Scintillation counter“ (Beckman, Fullerton, USA) wurde anschließend die zu der Radioaktivität proportionale Radiolumineszenz der Lösung in cpm (*counts per minute*) gemessen.

Die Auftrennung radioaktiv markierter Proteingemische wurden wie unter 2.4.2 beschrieben mittels einer 4,5 - 8 % SDS-PAGE durchgeführt. Es wurden dazu 14.000 cpm der Proben pro Tasche aufgetragen. Als Größenvergleich wurden 2 µl eines radioaktiv markierten Molekulargewichtsstandards (CF626, Amersham Biosciences / GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) mitgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele 3-mal für 20 min in Dimethyl-

sulfoxid entwässert und anschließend für 3 h mit 20 % (w/v) Diphenyloxazol in Dimethylsulfoxid inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Gele wieder für mindestens 45 min gewässert und in einem Gelrockner (Bio-Rad, Hercules, USA) getrocknet. Für die Detektion von Radiolumineszenz wurden Röntgenfilme (Amersham Biosciences / GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Großbritannien) den getrockneten Gelen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Lichtausschluss für 7 – 14 Tage exponiert.

2.4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen von Kollagenen

Die limitiert mit Pepsin verdauten (siehe 2.4.1.1) und über eine SDS-PAGE aufgetrennten (siehe 2.4.2) Proteinextrakte wurden in einigen Fällen mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Für die Bestimmung der einzelnen Proteinkomponenten ausgewählter SDS-Gelbanden wurden eine Flüssigchromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC MS/MS) durchgeführt. Die LC MS/MS Analyse wurden in der „zentralen Bioanalytik“ im „Zentrum für Molekulare Medizin in Köln“ (Deutschland) an einem „ESI-QUAD-TOF“ oder „ESI-TRAP“ Massenspektrometer durchgeführt.

Für die Erstellung von *Peak Listen* aus massenspektrometrischen Rohdaten wurden die Programme „Data Analysis“ (Bruker, Billerica, USA) und „MassLynx“ (Waters, Milford, USA) verwendet. Eine Auswertung der in diesem Verfahren detektierten Proteinfragmente wurde mit der Suchmaschine „Mascot Version 2.2“ (Matrix Science, Boston, USA) durchgeführt. In den durch „Mascot“ erstellten Ergebnislisten wurde für jedes detektierte Peptidfragment ein Wahrscheinlichkeitswert angegeben (*ions score*). Dieser *ions score* beruht auf der absoluten Wahrscheinlichkeit (P), dass eine beobachtete Übereinstimmung zwischen den experimentell ermittelten Daten und einer Sequenz der Proteindatenbanken zufällig ist. Der ermittelte *ions score* entspricht dann $-\text{Log}(P)$, wobei als Signifikanzgrenzwert $P < 0,05$ festgelegt wurde. Für die Erstellung einer Rangfolge der identifizierten Proteine wurde ein *protein score* aus der Summe der *ions scores* errechnet.

Zusätzlich zu der Auswertung mit „Mascot“ wurden die Aminosäuresequenzen der Peptidfragmente, die für Treffer mit einem niedrigen *protein score* angegeben wurden, durch den Autor dieser Arbeit über „Blast search“ (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) mit Proteindatenbanken verglichen. Für

die Sequenzsuche mit „Blast search“ wurde keine taxonomische Beschränkung vorgenommen.

2.4.6 Bestimmung der Molekularmassen von Proteinbanden

Um Molekularmassen aus der elektrophoretische Mobilität von Proteinbanden in SDS-Gelen oder Immunblots zu bestimmen, wurde die Laufstrecke der Banden des mitgeführten Molekulargewichtstandards (Precision Plus Dual Color standard, Bio-Rad, Hercules, USA) (Abbildung 2.2) gemessen. Anschließend wurde aus diesen Messwerten sowie dem Logarithmus der Molekularmassen des Standards eine Kalibrierungsgerade mit „Excel“ (Microsoft, Washington, USA) erstellt. Aus den Laufstrecken von Proteinbanden wurden mit Hilfe der Funktion der Kalibrierungsgeraden die Molekularmassen in kDa berechnet und auf den nächstliegenden 5er Wert gerundet. Für die Berechnung der Molekularmassen von Kollagene, die eine geringere elektrophoretische Mobilität als globuläre Proteine mit gleicher Größe aufweisen (Furthmayr und Timpl, 1971), wurden die ermittelten Molekularmassen mit dem Faktor 0,825 multipliziert (-17,5 %).

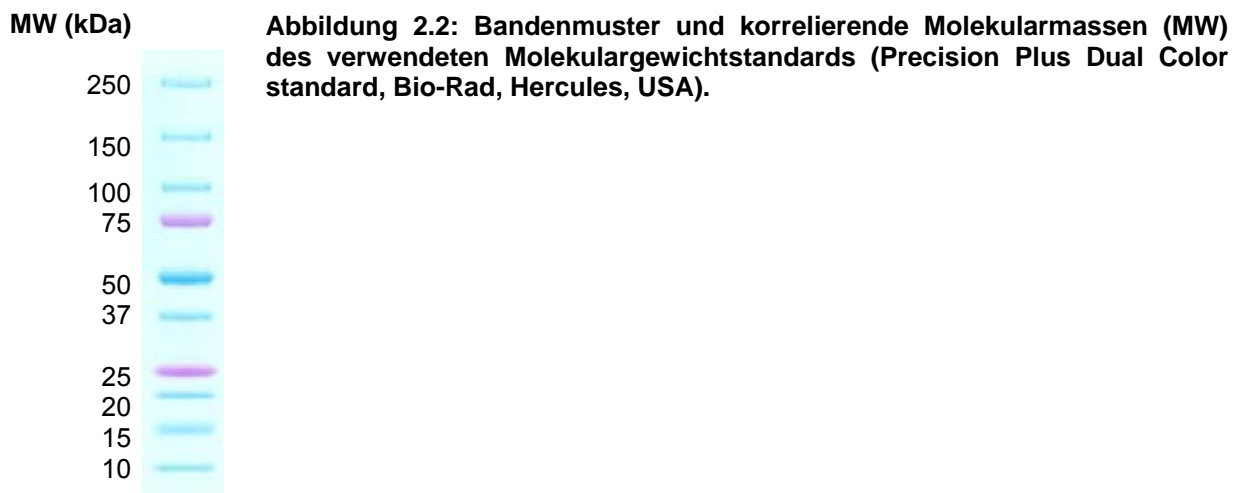


Abbildung 2.2: Bandenmuster und korrelierende Molekularmassen (MW) des verwendeten Molekulargewichtstandards (Precision Plus Dual Color standard, Bio-Rad, Hercules, USA).

2.4.7 Densitometrie von SDS-Gelen und Immunblots

Für eine quantitative Auswertung von Proteinbanden der SDS-PAGE oder Immunblots wurden densitometrische Messungen mit dem Programm „Image-J“ (National Institute of Mental Health, Bethesda, USA) durchgeführt. In Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen wurden dafür die Grauwerte der Proteinbanden zwischen 160 – 75 kDa gemessen. Die Grauwerte der $\alpha 2(V)$ -Kette konnten dabei auf Grund

der Überlagerung mit den Grauwerten der $\alpha 1(I)$ -Kette nicht bestimmt werden. Als Ladungskontrolle für die quantitative Bestimmung von α -Ketten des Kollagen V wurden die Grauwerte aus der densitometrischen Messung der Gesamtproteinmenge einer separaten SDS-PAGE mit geringeren Probenvolumina herangezogen. Die *Peaks* im Kurvenverlauf der Messungen von Grauwerten wurden durch manuell erstellte Basislinien begrenzt. Als Maß für die Quantität von Kollagen α -Ketten wurde das Verhältnis aus der Fläche einzelner *Peaks* zu der Summe der Flächen der *Peaks* aus der Bestimmung des Gesamtproteins ermittelt. Für die quantitative Auswertung von Immunblots wurden die durch densitometrische Messungen ermittelten Grauwerte in das Verhältnis zu den Grauwerten der Färbung des Gesamtproteins der Blotmembran gesetzt.

2.5 Histologie

2.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Das für histologische Untersuchungen verwendete Gewebe (humane Haut und Cornea sowie bovine Cornea) wurden in 8 mm² große Quadrate geschnitten, die sowohl Epidermis bzw. Epithel als auch Dermis bzw. Stroma (und Endothel im Fall der Cornea) enthielten. Für histologische Untersuchungen von Zellkulturmaterial wurden dreidimensional kultivierte Fibroblasten (siehe 2.3.3.2) als zusammenhängender Zellverband aus Zellkulturplatten herausgelöst und analog zu Gewebeproben behandelt. Die jeweiligen Gewebeproben wurden in „Neg 50“ Gefrierschnitt-Medium (Thermo Scientific, Rockford, USA) eingebettet und über einem Bad mit flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Anschließend wurde das eingebettete Gewebe bei -80 °C gelagert. Für die Anfertigung von 5 µm Gefrierschnitten wurden die Gewebe bei -20 °C mit einem Kryomikrotom geschnitten und auf „Super Frost Plus“ Objektträgern (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Immunhistochemie

2.5.2.1 Immunperoxidase-Verfahren

Die Gefrierschnitte wurden für die Präparation von immunhistochemischen Färbungen (ICH) für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Alle Schnitte wurden mit einem „Dako Pen“ (Dako, Glostrup, Dänemark) eingekreist und anschließend für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in technischem Methanol fixiert. Auf die Fixierung folgten 4 Waschschrte mit PBS (20 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,5). In einigen Fällen wurden die Schnitte für eine Demaskierung von Kollagen-Epitopen mit Trypsin, Pepsin, Kollagenase (siehe 2.5.2.2) oder für 15 min bei Raumtemperatur mit 0,1 M Essigsäure inkubiert. Für eine Blockierung der endogenen Peroxidase wurden alle Schnitte, nach 4-maligem Waschen mit PBS, mit 0,6 % (v/v) H_2O_2 in technischem Methanol für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die H_2O_2 /Methanol Lösung wurde durch erneutes 4-maliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur mit 2 % (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA) (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 2 % (v/v) Ziegenserum (Dako, Glostrup, Dänemark) in PBS blockiert.

Die verwendeten Primärantikörper (2.2 ,Tabelle 2.1, Tabelle 2.2, Tabelle 2.3) wurden in einer 1 % (w/v) BSA/PBS Lösung verdünnt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf die Schnitte gegeben. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut 4-mal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden mit Peroxidase (Horse-Radish-Peroxidase, HRP) konjugierte Sekundärantikörper (Tabelle 2.5) in 1 % (w/v) BSA/PBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Ungebundene Sekundärantikörper wurden danach ebenfalls durch 4-maliges Waschen mit PBS entfernt. Durch die Zugabe von „3,3'-Daminobenzidine Peroxidase Substrat“ (DAB, Vector Laboratories, Burlingam, USA) für 5 – 10 min wurde auf den Schnitten eine durch die HRP katalysierte Farbreaktion durchgeführt (DAB-Färbung). Anschließend wurden die Schnitte 4-mal mit deionisiertem H_2O gewaschen und für 1 min mit Hematoxilinslösung (Vector Laboratories, Burlingam, USA) inkubiert. Als nächstes folgten 4 Waschschrte mit deionisiertem H_2O . Zur Vorbereitung des Eindeckelns wurden die Schnitte in folgender Reihenfolge, für je 2 – 5 min in 70 % (v/v) Ethanol, 2 x 96 % (v/v) Ethanol, 2 x Isopropanol sowie 2 x für 5 – 10 min in Rotihistol dehydriert. Für das abschließende Eindeckeln der Schnitte wurde „Entellan“ (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen wurde an

einem „Olympus BX 60“ Lichtmikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) mit dem dazugehörigen „soft imaging systems analysis“ Programm durchgeführt.

Tabelle 2.5: Liste der für immunhistochemische Färbungen verwendeten Sekundärantikörper.

Firma	Konjugat	Wirtstier	Reaktivität	Verdünnung
Dako, Glostrup, Dänemark	HRP	Ziege	Maus IgG	1:500
Chemicon, Billerica, USA	HRP	Esel	Kaninchen IgG	1:500

2.5.2.2 Enzymatische Demaskierung von Epitopen

Für die Demaskierung von Kollagen-Epitopen wurde bakterielle Kollagenase (CLS-1, Worthington, Lakewood, USA) mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml in Neutralsalzpuffer (siehe 2.4.1), 1 mM CaCl₂ und Proteinaseinhibitoren (10 mM N-Ethylmaleimidin, 0,1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid) gelöst. Die Kollagenase-Lösung wurde anschließend für 30 min bei 37 °C auf Gefrierschnitte gegeben. Nach 4-maligem Waschen mit PBS wurde mit der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wie unter 2.5.2 beschrieben weiter fortgefahren.

Außerdem wurde für eine Demaskierung von Epitopen mit Trypsin (Serva, Heidelberg, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 1 % (w/v) in PBS (pH 7,4) für 20 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Nach 4-maligem Waschen der Schnitte mit PBS wurde wie unter 2.5.2 beschrieben mit der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen weiter fortgefahren.

Des Weiteren wurde Pepsin (Serva, Heidelberg, Deutschland) für die Demaskierung von Epitopen mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml in 0,05 M Essigsäure gelöst und für 20 min bei Raumtemperatur auf Gefrierschnitte gegeben. Durch 4-maliges Waschen mit PBS wurde die Pepsin-Lösung wieder entfernt. Alle weiteren Schritte wurden wie unter 2.5.2 beschrieben weiter durchgeführt.

2.5.2.3 Immunfluoreszenz

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenz (IF) wurden alle Gefrierschnitte (siehe 2.5.1), die zuvor bei -80 °C gelagert wurden, für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und nach dem Einkreisen mit einem „Dako Pen“ (Dako, Glostrup, Dänemark) für 10 min bei -20 °C in Methanol fixiert. Anschließend wurde das Methanol durch 4-maliges

Waschen mit PBS entfernt. Für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen von Antikörpern wurden die Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur mit 2 % (w/v) BSA/PBS blockiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit in 1 % (w/v) BSA/PBS verdünnten Primärantikörpern (2.2, Tabelle 2.1, Tabelle 2.2, Tabelle 2.3) inkubiert. Durch 4-maliges Waschen mit PBS wurde die Primärantikörperlösung anschließend entfernt. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.6) wurden ebenfalls in 2 % (w/v) BSA/PBS verdünnt und für 60 min auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem 4-maligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit „Fluoromount-G“ (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Dokumentation der Immunfluoreszenz wurde an einem „Axio Imager M1“ (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Bei der für die Dokumentation verwendeten Software handelte es sich um „Openlab“ (Improvision Inc. / Perkin Elmer, Waltham, USA).

Tabelle 2.6: Liste der für Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper

Firma	Artikel Nr.	Konjugat	Wirtstier	Reaktivität	Verdünnung
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A11001	Alexa 488	Ziege	Maus IgG	1:500
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A11008	Alexa 488	Ziege	Kaninchen IgG	1:500
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A11004	Alexa 568	Ziege	Maus IgG	1:500
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	A11011	Alexa 568	Ziege	Kaninchen IgG	1:500
Jakson Immuno Research, West Grove, USA	706-166-148	Cy TM 3	Esel	Meerschweinchen IgG	1:500

2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

2.6.1 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Elektronenmikroskopische (EM) Untersuchungen der humanen Haut und der bovinen Cornea wurden hier an Ultradünnschnitten durchgeführt. Für die Präparation von Ultradünnschnitten wurde ein Paraformaldehyd-unabhängiges Fixierungsverfahren

mit der Bezeichnung HOPE (*Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect*) (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) angewendet (Olert *et al.*, 2001). Frisch präpariertes Gewebe wurde dazu in ca. 6 x 3 mm große Streifen geschnitten und für 2 – 3 Tage bei 4 °C rotierend mit HOPE I Reagenz inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben in 5 ml einer auf Eis vorgekühlten HOPE II / Ethanol Lösung mit der Konzentration 1 µl/ml überführt. In dieser Lösung wurden die Proben für weitere 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3-mal für jeweils 2 h in technischem Ethanol auf Eis gelagert. Nach abgeschlossener Fixierung wurde „London Resin White“ (LR-White, Agar Scientific, Stansted, Großbritannien) in einem 2:1 Verhältnis mit technischem Ethanol gemischt und die Proben darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in reines LR-White überführt und bei 4 °C für 3 Tage inkubiert. Die LR-White Lösung wurde in diesem Zeitraum 6-mal gewechselt. Für die Einbettung der so vorbereiteten EM-Präparate wurden Gelatinekapseln mit LR-White befüllt und die zuvor mit LR-White inkubierten Gewebeblöckchen hinein gegeben. Durch eine Bestrahlung der befüllte Kapseln mit ultraviolettem Licht für 24 - 48 h wurde das Einbettungsmedium auspolymerisiert. Vor der Anfertigung von Ultradünnschnitten an einem Ultramikrotom wurden die fertig eingebetteten Gewebeblöcke zur Verflüchtigung von Lösungsmitteln unter einem Laborabzug gelagert. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden von HOPE-fixierten Präparaten 90 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Für Ultradünnschnitte wurden Nickel-Trägernetzchen (Plano, Wetzlar, Deutschland) verwendet, die zuvor mit Formvar (Formvar-Lösung: 0,3 % (w/v) Polyvinylformal in 1,2-Dichlorethan) befilmt und mit einer 10 – 20 nm dicken Kohleschicht in einem „EMS950X Turbo Evaporator“ (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) bedampft wurden.

2.6.2 Extraktion suprastruktureller Fragmente

Für Untersuchungen suprastruktureller Fragmente der extrazellulären Matrix, wurden Homogenate der Haut und der Cornea sowie von Zellkulturmaterial hergestellt (Mendler *et al.*, 1989; Kassner *et al.*, 2003). Hierfür wurde das verwendete Gewebe mit einer Schere in kleine Stück geschnitten und in Neutralsalzpuffer mit Proteaseinhibitoren analog zu 2.4.1 homogenisiert. Suspensionen von Fragmenten der Suprastrukturen wurden als Überstände nach Zentrifugation der Gewebehomogena-

te für 3 min bei 2500 x g gewonnen. Gegebenenfalls wurde die Extraktion mit dem verbleibenden Pellet (Gewebedebris) noch zwei weitere Male durchgeführt, so dass insgesamt drei sequenziell extrahierte Homogenate gewonnen wurden (Ü1, Ü2, Ü3).

2.6.2.1 Extraktion mit Essigsäure

Alternativ zu der Extraktion von Gewebeproben in Neutralsalzpuffer wurde 0,1 M Essigsäure als Extraktionspuffer verwendet. Das zuvor mit einer Schere zerkleinerte Gewebe wurde dafür ebenfalls mit einem Polytron für 20 s auf Eis homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat für 30 s auf Eis gekühlt. Diese beiden Schritte wurden 3-mal wiederholt. Im Gegensatz zu der Extraktion in Neutralsalzpuffer konnte in Essigsäure das gesamte eingesetzte Gewebe homogenisiert werden. Anschließend wurde das Homogenat durch die weitere Zugaben von 0,1 M Essigsäure verdünnt. Die Extrakte wurden ohne vorherige Zentrifugation wahlweise für 5, 15, 30 oder 60 min auf Eis gelagert und anschließend an Formvar / Kohle beschichtete Nickel-Trägernetzchen adsorbiert.

2.6.3 Immunogold-Elektronenmikroskopie

Für Untersuchungen von Matrix-Suprastrukturen wurde die Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Ultradünnschnitten (siehe 2.6.1) sowie mit Extrakten suprastruktureller Fragmente (siehe 2.6.2) durchgeführt. Die verwendeten Extrakte suprastruktureller Fragmente wurden dazu an Formvar / Kohle beschichtete Nickel-Trägernetzchen adsorbiert. Dazu wurden Tropfen der Extrakte mit einem Volumen von 10 µl auf Parafilm gegeben und jeweils mit einem Nickel-Trägernetzchen bedeckt. Nach einer Adsorptionszeit von 10 min wurden die Netzchen 3-mal mit PBS (siehe 2.5.2) gewaschen. In einigen Fällen wurde für die Demaskierung von Epitopen ein enzymatischer Verdau mit bakterieller Kollagenase (siehe 2.6.3.2) oder mit MMP-1 (siehe 2.6.3.3) durchgeführt.

Bezüglich der folgenden Schritte gab es keine Unterschiede in der Vorgehensweise für Immunogold-Markierungen von Ultradünnschnitten oder Extrakten suprastruktureller Fragmente. Um unspezifische Bindungsstellen von Antikörpern zu blockieren, wurden die Netzchen nach 4-maligem Waschen in PBS mit 2 % (w/v) BSA (Serva, Heidelberg, Deutschland), 2 % (v/v) Ziegen Serum (Dako, Glostrup Dänemark) in PBS

inkubiert. Die Blockierungslösung wurde vor der Verwendung zweimal bei 23.000 x g, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Nach einer Blockierungsdauer von 30 min wurden die Netzchen auf Tropfen von PBS, 2 % (v/v) azetyliertes BSA (BSA-c, Aurion, Wageningen, Niederlande), 0,1 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit verdünnten Primärantikörpern (2.2, Tabelle 2.1, Tabelle 2.2, Tabelle 2.3) überführt. Durch die Zugabe von BSA-c sollte eine ladungsbedingte, unspezifische Reaktivität von Immunreagenzien mit den Präparaten minimiert werden. Für die Anfertigung von Doppelmarkierungen wurden zwei verschiedene Primärantikörper aus unterschiedlichen Wirtstieren in einem gemeinsamen Ansatz verdünnt. Als nächstes wurden die Netzchen 4-mal mit PBS gewaschen und dann für 2 h mit Sekundärantikörpern (Tabelle 2.7) inkubiert, die mit kolloidalem Gold konjugiert waren. Die Sekundärantikörper waren entweder mit 12 nm oder 18 nm großen Goldpartikeln konjugierten und wurden ebenfalls in PBS mit 2 % (v/v) BSA-c, 0,1 % (v/v) Tween-20 verdünnt. Für Doppelmarkierungen wurden in einem Ansatz zweierlei Sekundärantikörper verdünnt, die sich durch die Größe ihrer konjugierten Goldpartikel sowie die Reaktivität mit Immunglobulinen unterschiedlicher Spezies unterschieden. Im Anschluss an diesen Inkubationsschritt wurden die Netzchen 4-mal mit deionisiertem H₂O gewaschen und auf Tropfen mit 2 % (w/v) Uranylacetat in H₂O für 7 min kontrastiert. Abschließend wurden die Netzchen einmal mit deionisiertem H₂O gewaschen und zum Trocknen und zur weiteren Verwahrung in Aufbewahrungsboxen für EM-Grids (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) gegeben.

Tabelle 2.7: Liste verwendeter Sekundärantikörper für die Immunogold-Elektronenmikroskopie.

Firma	Konjugat	Wirtstier	Reaktivität	Verdünnung
Jakson Immuno Research, West Grove, USA	kolloidales Gold 12 nm	Ziege	Kaninchen IgG	1:100
Jakson Immuno Research, West Grove, USA	kolloidales Gold 18 nm	Ziege	Maus IgG	1:100

2.6.3.1 Vorbehandlung von Ultradünnschnitten mit Ethanol

In einigen Fällen wurden HOPE-fixierte Ultradünnschnitte (siehe 2.6.1) vor der Durchführung einer Immunogold-Markierung (siehe 2.6.3) mit technischem Ethanol vorbehandelt, wodurch Einbettungsmedium aus dem Gewebe herausgelöst werden sollte. Dazu wurden die auf Trägernetzchen aufgezogenen Schnitte für 30 min in

einer Petrischale mit technischem Ethanol inkubiert. Für die anschließende Rehydrierung der Schnitte, wurden die Präparate für jeweils 5 min mit 70 % (v/v), 50 % (v/v), 30 % (v/v) -Ethanol, deionisiertem H₂O und zweimal mit PBS inkubiert. Die Antikörpermarkierung wurde auf den so vorbehandelten Präparaten anschließend analog zu 2.6.3 durchgeführt.

2.6.3.2 Demaskierung von Epitopen mit bakterieller Kollagenase

Für einen Teil der EM Untersuchungen von Extrakten suprastruktureller Fragmente (siehe 2.6.2) wurde eine enzymatische Vorbehandlung mit Kollagenase durchgeführt. Dafür wurde bakterielle Kollagenase (CLS-1, Worthington, Lakewood, USA) mit einer Konzentration von 0,5 µg/µl in Neutralsalzpuffer, 1 mM CaCl₂ und Proteinaseinhibitoren (10 mM N-Ethylmaleimidin, 0,1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid) gelöst. Die mit Extrakten suprastruktureller Fragmente inkubierten Trägernetzchen (siehe 2.6.3) wurden für 5, 15, 30 oder 60 min bei Raumtemperatur auf Tropfen der Kollagenaselösung gegeben. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde mit der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und allen darauf folgenden Schritten, wie unter 2.6.3 beschrieben, weiter fortgefahren.

2.6.3.3 Demaskierung von Epitopen mit MMP-1

Außerdem wurde für EM Untersuchungen von Extrakten suprastruktureller Fragmente eine enzymatische Vorbehandlung mit MMP-1 durchgeführt. Dafür wurden 5 ng/µl humanes MMP-1 (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland) in Neutralsalzpuffer, 1 mM CaCl₂ gelöst und für die Aktivierung von MMP-1 zusätzlich p-Aminophenyl-Quecksilberazetat mit einer Endkonzentration von 2 mM hinzugegeben. Nach einer Aktivierungsdauer von 1 h bei 37 °C wurden bereits mit Gewebeextrakten inkubierte Trägernetzchen (siehe 2.6.3) auf Tropfen mit MMP-1-Lösung gegeben. Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde mit der Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen sowie allen weiteren Schritten wie unter 2.6.3 beschrieben fortgefahren.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen fibrillärer Kollagene der Haut

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung von Matrix-Suprastrukturen, besonders von Kollagenfibrillen, in der adulten humanen Haut untersucht. Neben Kollagenfibrillen wurde hier auch die Lokalisation von Kollagen V in nichtfibrillären Matrix-Suprastrukturen sowie nicht quergestreiften Fibrillen untersucht. Dieses Protein wurde zuvor als Komponente dünner Fibrillen in der Nähe von Basalmembranen identifiziert (Fitch *et al.*, 1984; Modesti *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986). Darüber hinaus wurden hier weitere Matrix-Proteine untersucht, die potenziell Bestandteile gemeinsamer Suprastrukturen mit Kollagen V sind.

3.1.1 Lokalisation von Kollagen V

Um die Lokalisation von Kollagen V in der adulten humanen Haut zu untersuchen, wurden die Antikörper 18G5, 6A7 und 13F6 verwendet, die spezifisch gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette gerichtet sind (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Die $\alpha 1(V)$ -Kette wurde in Gefrierschnitten der humanen Haut im oberen Bereich der papillären Dermis entlang der gesamten Epidermis einschließlich aller Dermispapillen lokalisiert (Abbildung 3.1, A, B, C). Nur im Bereich der Kapillaren in der oberen papillären Dermis, die durch die hohe Dichte an blau gefärbten Zellkernen der Endothelzellen zu erkennen sind (Hämatoxylinfärbung), war die Kontinuität der mit Kollagen V-Antikörpern erzielten immunhistochemischen Färbung unterbrochen (Abbildung 3.1, A und B *Kp*). Die Intensität der Färbung nahm mit zunehmender Entfernung von der Epidermis kontinuierlich ab, wobei eine Färbung tiefer Dermis-schichten nicht zu erkennen war. Die $\alpha 1(V)$ -Kette konnte in weiteren Strukturen in der tiefen Dermis, wie zum Beispiel in Blutgefäßen, Schweißdrüsen oder Talgdrüsen, nicht lokalisiert werden.

Mit dem Antikörper MAB3393, der ein Epitop im langen tripelhelikalen Teil der $\alpha 2(V)$ -Kette erkennt (siehe 3.1.8, 3.3.3, 3.4.5), wurde keine Reaktion mit Kollagen V in Gefrierschnitten der humanen Haut beobachtet (Abbildung 3.1, D). Wie in der

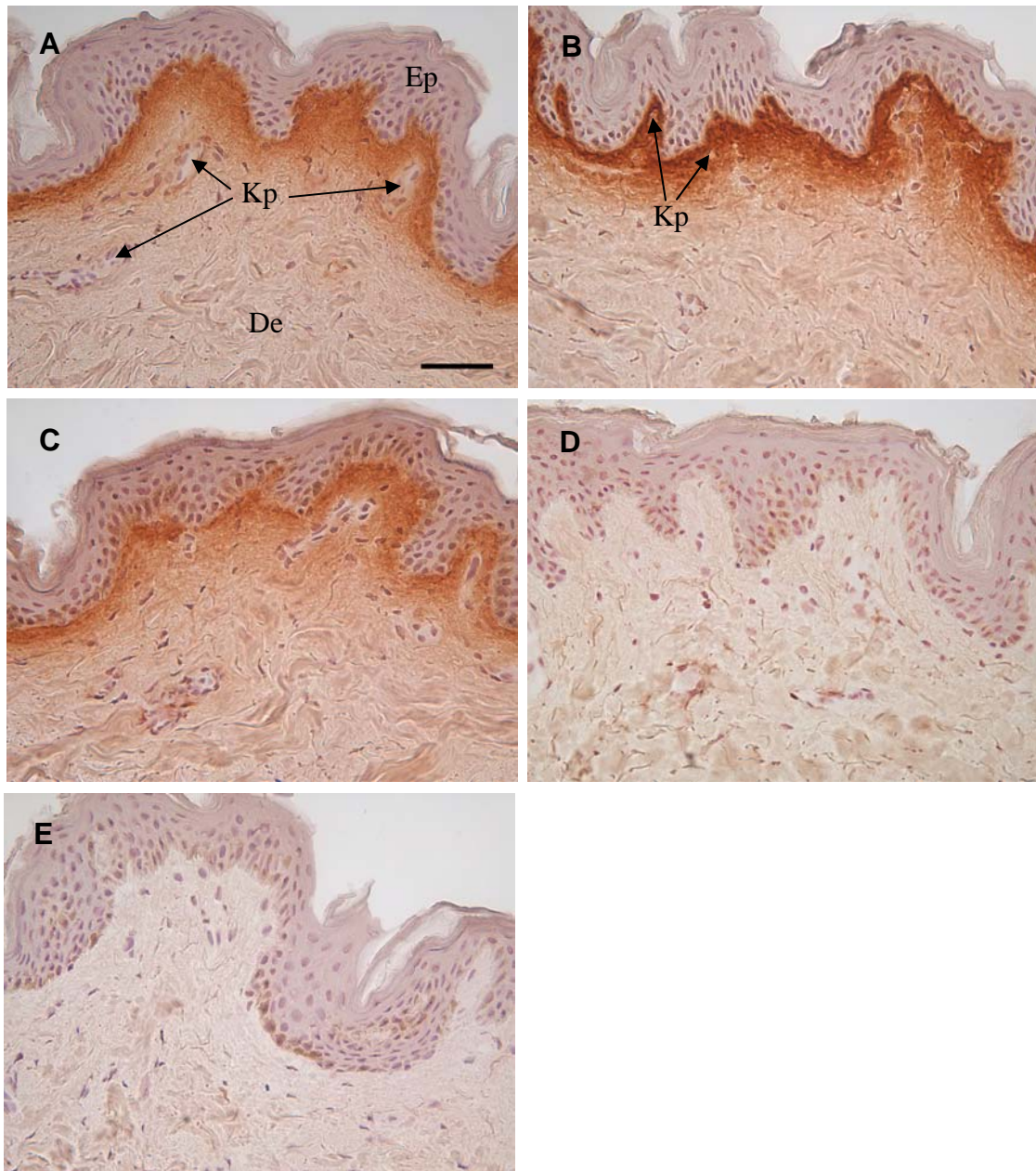


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten der humanen Haut mit Kollagen V-Antikörpern. Die abgebildeten Gefrierschnitte sind mit Hämatoxylin gegengefärbt. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper 18G5. **C:** Kollagen V-Antikörper 6A7. **D:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **E:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epidermis, De: Dermis, Kp: Kapillargefäß. Messbalken: 50µm.

Literatur beschrieben, werden Epitope in tripelhelikalen Domänen des Kollagen V durch eine Behandlung mit Essigsäure demaskiert (Fitch *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988; Fitch *et al.*, 1988; Linsenmayer *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurden auch hier Gefrierschnitte der humanen Haut für immunhistochemische Färbungen mit Essigsäure vorbehandelt (Abbildung 3.2). In Folge der Demaskierung

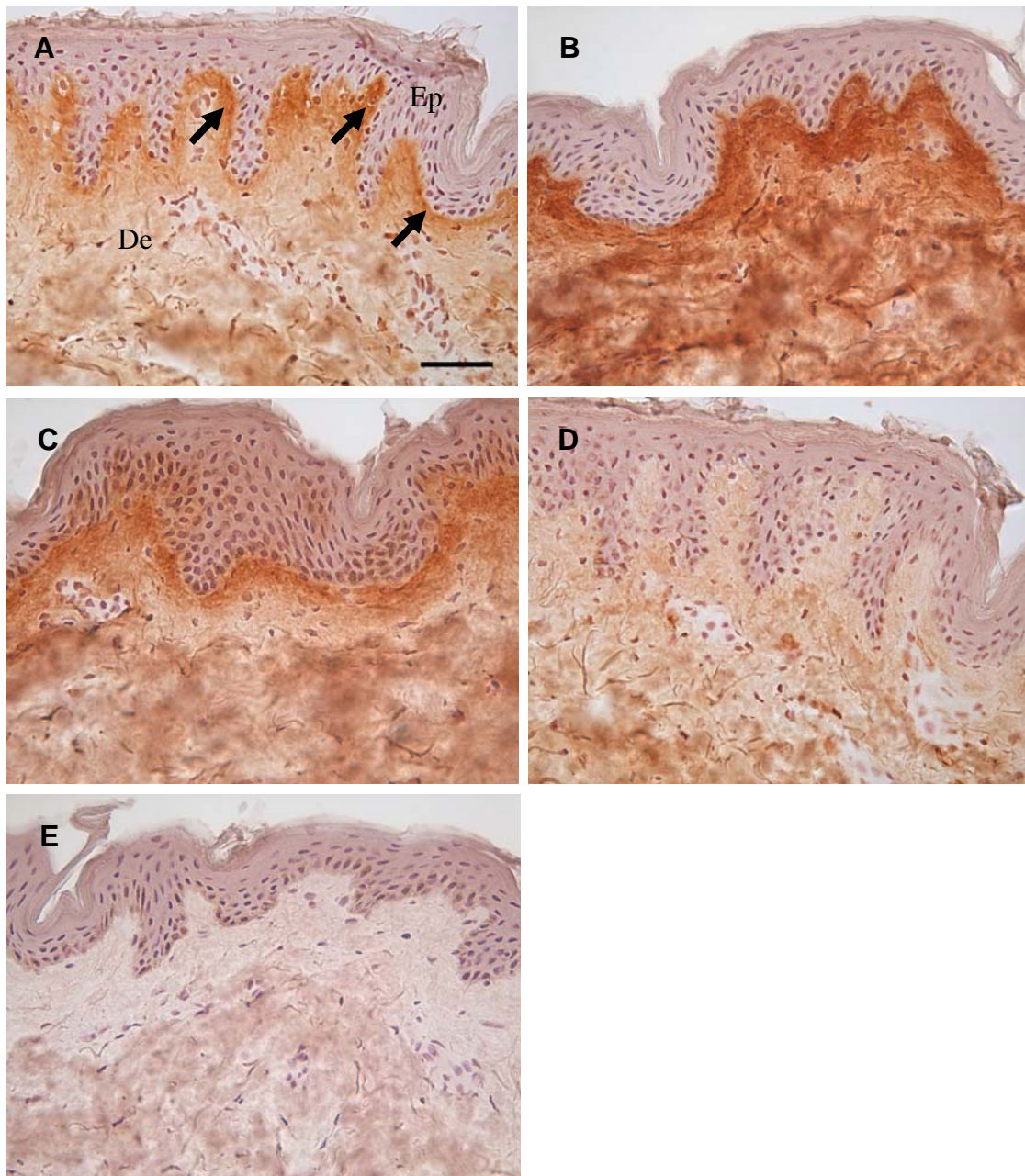


Abbildung 3.2: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten der humanen Haut mit Kollagen V-Antikörpern nach einer Vorbehandlung mit 0,1 M Essigsäure. Die abgebildeten Gefrierschnitte sind mit Hämatoxylin gegengefärbt. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper 18G5. **C:** Kollagen V-Antikörper 6A7. **D:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **E:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epidermis, De: Dermis, Blockpfeile: Intensive Immunreaktivität in der oberen papillären Dermis. Messbalken: 50 μ m.

mit Essigsäure konnte das N-terminale Propeptid der α 1(V)-Kette mit den Antikörpern 18G5, 6A7 und 13F6 in der gesamten Dermis detektiert werden (Abbildung 3.2, A, B, C). Die Reaktion war jedoch in der oberen papillären Dermis deutlich intensiver als in tieferen Dermissschichten (Abbildung 3.2, A Blockpfeile, B, C). Außerdem konnte nach einer Vorbehandlung mit Essigsäure die α 2(V)-Kette mit dem Antikörper

MAB3393 in allen Schichten der Dermis nachgewiesen werden (Abbildung 3.2, D). Im Gegensatz zu Antikörpern gegen die Propeptide zeigte der Antikörper MAB3393 gegen die lange Tripelhelix von Kollagen V mit der oberen papillären Dermis keine verstärkte Reaktion.

3.1.2 Lokalisation der Kollagene I, III, und IV sowie Tenascin-C und -X

Kollagen V ist ein Bestandteil heterotypischer Kollagenfibrillen der Haut (Keene *et al.*, 1997). Es wurde daher in dieser Arbeit die Lokalisation der Kollagene I und III vergleichend zu Kollagen V in der humanen Haut untersucht. Im Gegensatz zu Kollagen V-Antikörpern (Abbildung 3.1) reagieren sowohl der Kollagen I-Antikörper AF5610 (Abbildung 3.3, A) als auch der Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Abbildung 3.3, B) ohne vorherige Demaskierung von Epitopen mit der gesamten Dermis. Kollagen I ist im Bereich tieferer Schichten der Dermis gleichmäßig verteilt, wohingegen in der oberen papillären Dermis eine etwas intensivere immunhistochemische Färbung detektiert wurde (Abbildung 3.3, A Blockpfeile). Für Kollagen III, das ebenfalls homogen in der Dermis verteilt ist, wurde eine intensivere Färbung der oberen papillären Dermis jedoch kaum erzielt (Abbildung 3.3, B).

Auf Grund der Hinweise, wonach Kollagen V besonders in der Nähe von Basalmembranen vorkommt (Fitch *et al.*, 1984; Modesti *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986), wurden vergleichend zu Kollagen V immunhistochemische Färbungen der humanen Haut mit Kollagen IV-Antikörpern (MAB1910) durchgeführt. Im Gegensatz zu der Lokalisation von Kollagen V (3.1.1 ,Abbildung 3.1, A - C), beschränkt sich die Lokalisation von Kollagen IV auf die Basalmembranen der dermo-epidermalen Junctionszone sowie der Blutgefäße (Abbildung 3.3, C *BM Kp*). Dieser Vergleich zeigt, dass der durch Kollagen V-Antikörper markierte Bereich in der oberen papillären Dermis deutlich breiter als die dermo-epidermale Basalmembranzzone ist und vergleichsweise weit in tiefere Schichten der Dermis hineinragt. Außerdem wurde Kollagen V nicht in der Nähe von vaskulären Basalmembranen in der Haut lokalisiert.

Bindungsstudien mit rekombinanten Tenascin-X-Domänen zur Folge gibt es Hinweise, wonach Tenascin-X ein möglicher Interaktionspartner von Kollagen V ist (Lethias *et al.*, 2006). Daher wurde auch die Lokalisation von Tenascin-X sowie

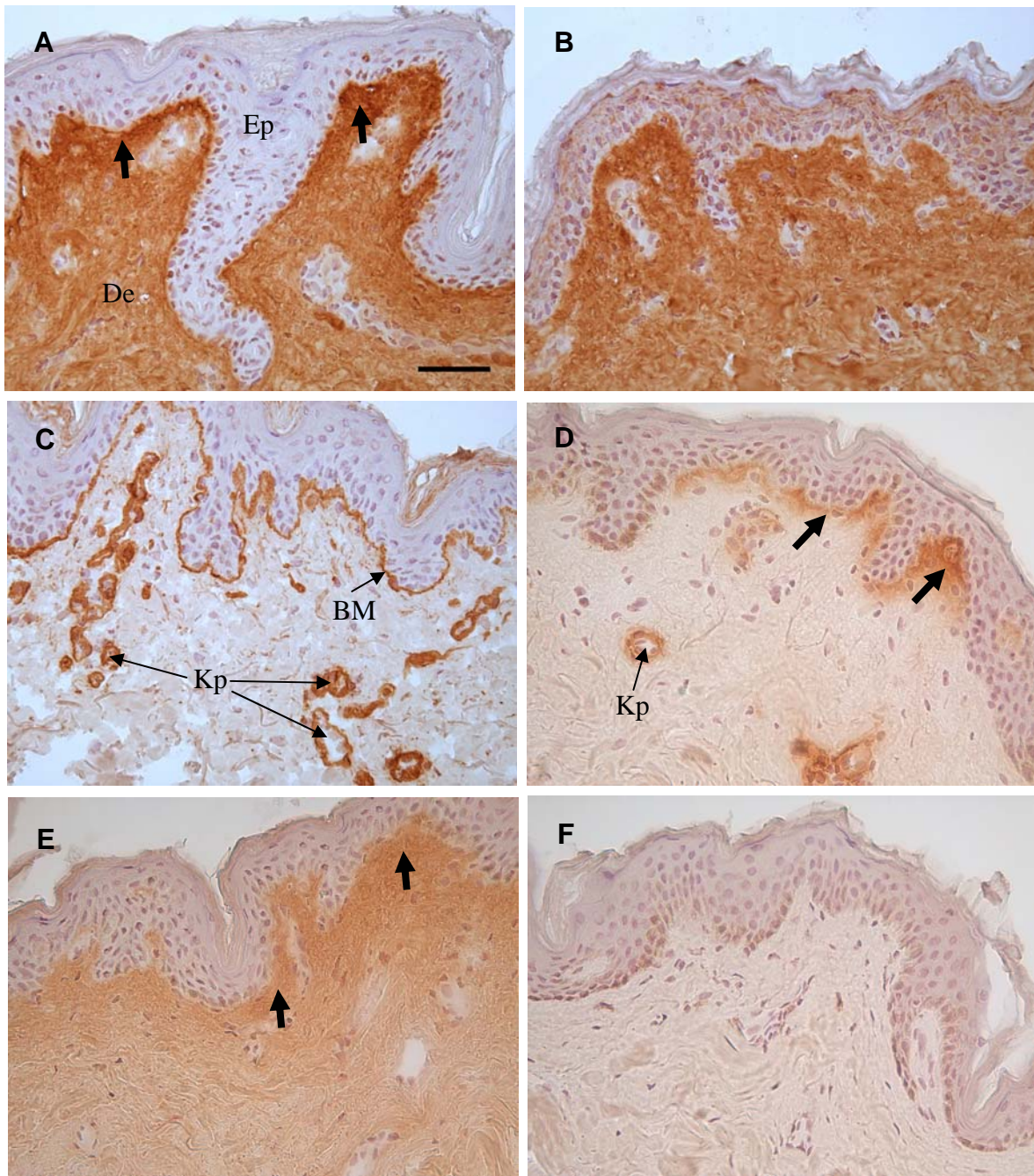


Abbildung 3.3: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten der humanen Haut mit Kollagen I-, III- und IV-, sowie Tenascin-C- und -X-Antikörpern. Die abgebildeten Gefrierschnitte sind mit Hämatoxylin gegengefärbt. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A:** Kollagen I-Antikörper AF5620. **B:** Kollagen III-Antikörper MAB3392. **C:** Kollagen IV-Antikörper MAB1910. **D:** Tenascin-C-Antikörper CP-100. **E:** Tenascin-X-Antikörper TNXB. **F:** Kontrolle ohne Primäntikörper. Ep: Epidermis, De: Dermis, Kp: Kapillare, BM: Basalmembran, Blockpfeile: Intensive Immunreaktivität in der oberen papillären Dermis. Messbalken: 50µm.

Tenascin-C in der humanen Haut vergleichend zu Kollagen V untersucht. Tenascin-C konnte vorwiegend in der oberen papillären Dermis lokalisiert werden (Abbildung 3.3, D). Im Gegensatz zu dem N-terminalen Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette (Abbildung 3.1, A, B, C), beschränkt sich die Lokalisation des Tenascin-C jedoch auf die distalen

Bereiche von Dermispapillen (Abbildung 3.3, D Blockpfeile). Zusätzlich wurde Tenascin-C im Bereich von Blutgefäßen detektiert (Abbildung 3.3, D *Kp*). Tenascin-X konnte hingegen in allen Schichten der Dermis lokalisiert werden (Abbildung 3.3, E), wobei eine intensivere immunhistochemische Färbung mit Tenascin-X-Antikörpern in der oberen papillären Dermis festgestellt wurde (Abbildung 3.3, E Blockpfeile). Tenascin-X zeigt somit eine immunhistochemisch nachweisbare Gewebsverteilung, welche derjenigen der Propeptide von Kollagen V ähnlich war.

3.1.3 Lokalisation von Kollagen V nach enzymatischer Demaskierung

Für die enzymatische Demaskierung der Epitope des Kollagen V in histologischen Schnitten der humanen Haut wurde bakterielle Kollagenase, Trypsin oder Pepsin verwendet (Abbildung 3.4). Auf Gefrierschnitten wurde Kollagen V mit dem Antikörper MAB3393 nach einer Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase nicht detektiert (Abbildung 3.4, A). Im Vergleich dazu konnte Kollagen IV im Bereich der dermo-epidermalen Basalmembran sowie den Basalmembranen von Blutgefäßen lokalisiert werden (Abbildung 3.4, B *BM Kp*). Auch nach der Vorbehandlung mit Trypsin wurden Kollagen V mit dem Antikörper MAB3393 nicht nachgewiesen (Abbildung 3.4, C), wohingegen Kollagen IV in Basalmembranen der dermo-epidermalen Junctionszone sowie der Blutgefäße detektiert wurde (Abbildung 3.4, D). Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper MAB3393 nach der Vorbehandlung mit Pepsin unterscheiden sich von Färbungen der Präparate, die mit Essigsäure ohne Pepsin vorbehandelt wurden (3.1.1 ,Abbildung 3.2, D), nur hinsichtlich der Färbung von Zellkernen (Abbildung 3.4, G *Zk*). Da es keine Hinweise für das Vorkommen von Kollagenen in Zellkernen gibt, handelt es sich bei Färbung von Zellkernen demnach um eine Kreuzreaktivität der Primärantikörper mit Neoepitopen in Folge der Pepsin-Behandlung. Bezüglich der Lokalisation von Kollagen IV nach der Vorbehandlung mit Pepsin konnte hingegen kein Unterschied zu unbehandelten, mit Kollagenase oder mit Trypsin vorbehandelten Schnitten festgestellt werden (Abbildung 3.4, H).

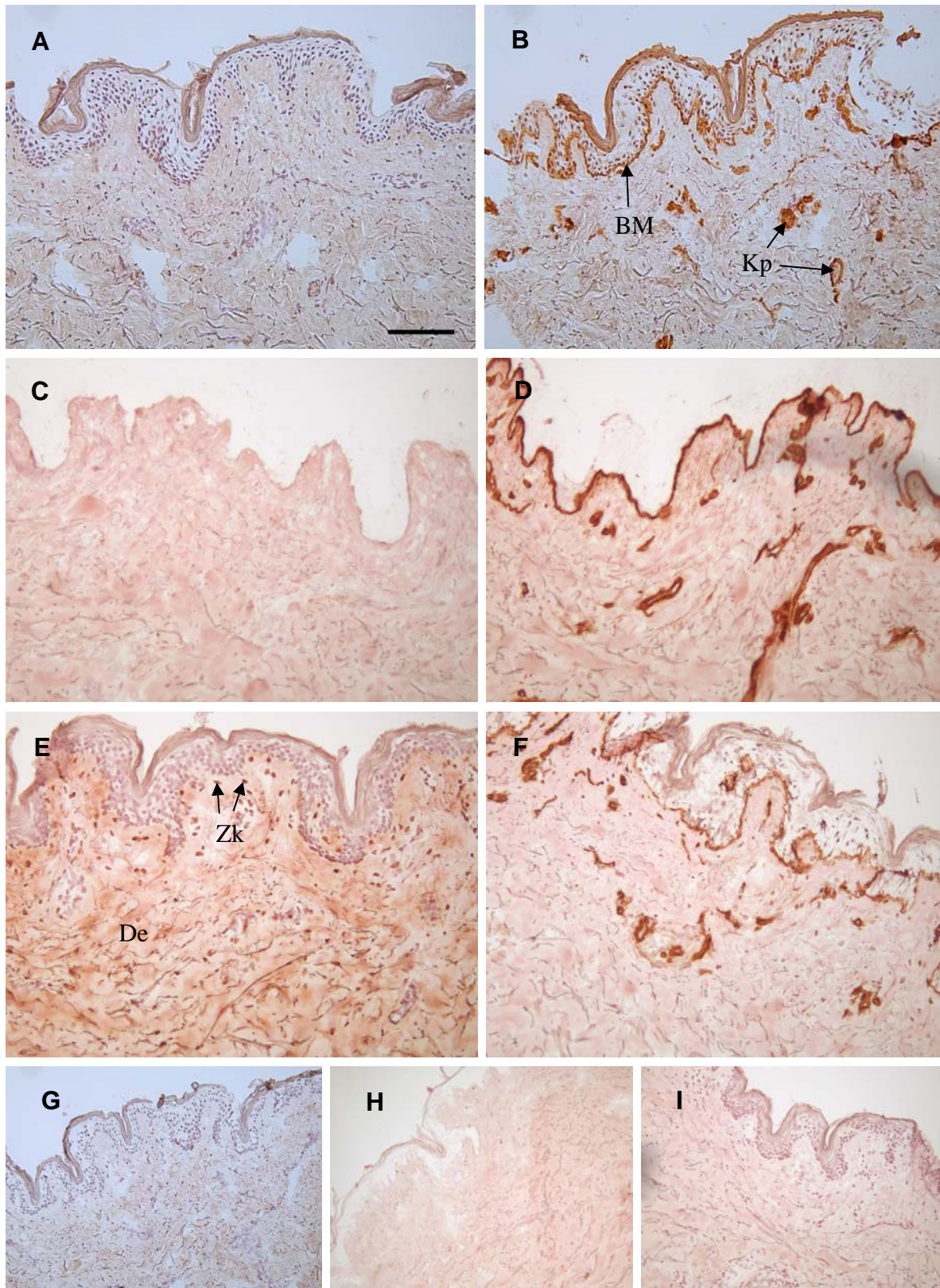


Abbildung 3.4: Immunhistochemische Färbung von Kollagen V und IV in der humanen Haut nach einer proteolytischen Demaskierung von Epitopen. Die abgebildeten Gefrierschnitte sind mit Hämatoxilin gegengefärbt. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A, B, G:** Vorbehandlung mit Kollagenase (CLS-1). **C, D, H:** Vorbehandlung mit Trypsin. **E, F, I:** Vorbehandlung mit Pepsin. **A, C, E:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **B, D, F:** Kollagen IV-Antikörper MAB1910. **G, H, I:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Kp: Kapillare, BM: Basalmembran, De: Dermis, Zk: Zellkern. Messbalken: 100µm (für A, B, C, D, E, F).

3.1.4 Kolokalisation der Kollagene V und IV

Um zu untersuchen, ob Kollagen V in der dermo-epidermalen Basalmembran lokalisiert ist, wurde hier die Lokalisation von Kollagen IV mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz vergleichend zu der $\alpha 1(V)$ -Kette untersucht (Abbildung 3.5). Mit dem Antikörper 13F6 wurde das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette in der oberen papillären Dermis entlang der Epidermis lokalisiert (Abbildung 3.5, A grün). Kollagen IV wurde im Bereich der Basalmembranen der dermo-epidermalen Junctionszone (BM) sowie der Blutgefäße (Kapillare: Kp) nachgewiesen (Abbildung 3.5, B rot). Durch die Überlagerung der mit Kollagen V-Antikörpern und Kollagen IV-Antikörpern erhaltenen Immunfluoreszenz konnte keine Kolokalisation von Kollagen V und Kollagen IV im Bereich der dermo-epidermalen Basalmembran festgestellt werden (Abbildung 3.5, C BM). Es war hingegen deutlich zu erkennen, dass die Lokalisation

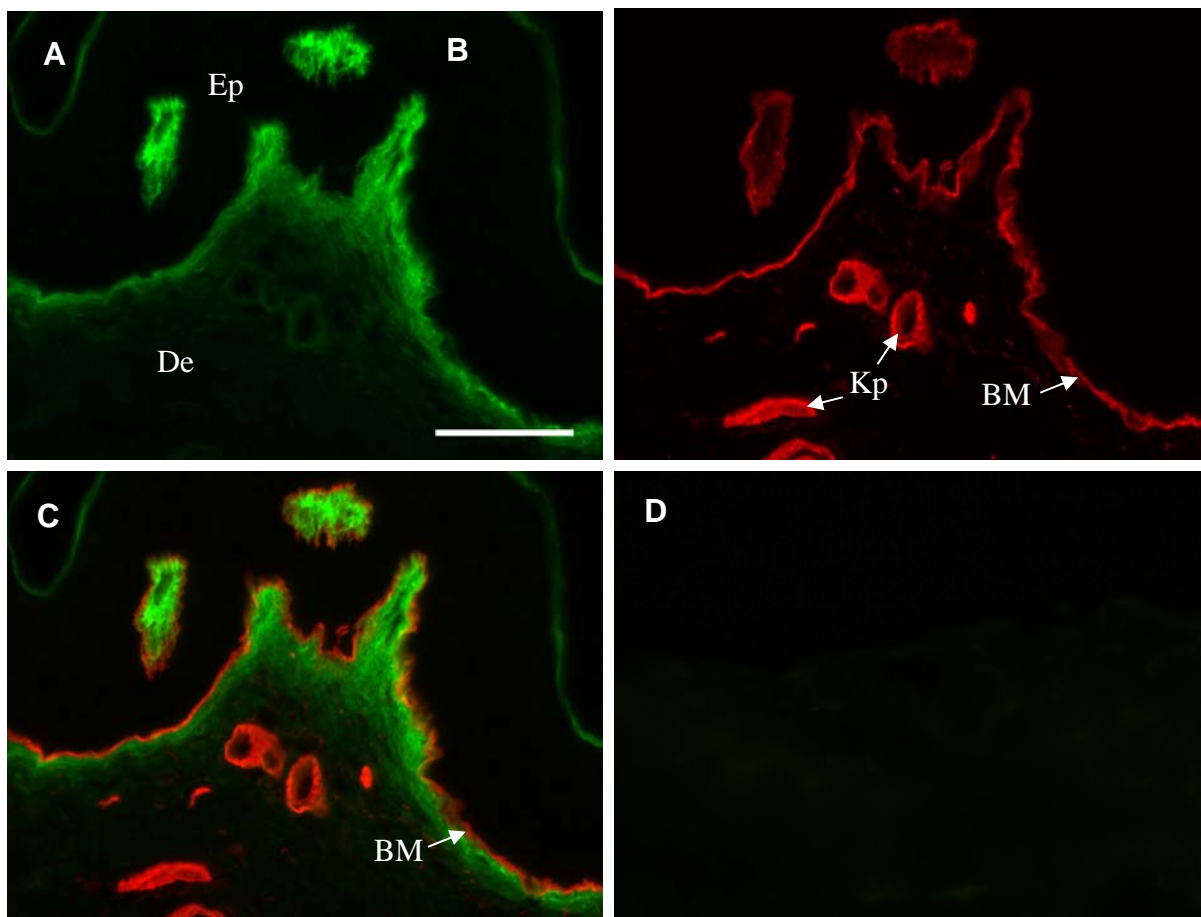


Abbildung 3.5: Doppelimmunfluoreszenz der humanen Haut mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ -Kette und Kollagen IV. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). B: Kollagen IV-Antikörper R1041 (rot). C: Überlagerung von A und B. D: Kontrolle ohne Primärantikörper. De: Dermis, Ep: Epidermis, BM: Basalmembran, Kp: Kapillare. Messbalken: 50 μm .

der $\alpha 1(V)$ -Kette auf der dermalen Seite bis an die dermo-epidermale Basalmembran heran reicht, sich aber nicht mit dieser überlagert.

Eine mögliche Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ -Kette und des Kollagen IV im Bereich der dermo-epidermale Basalmembran wurde außerdem nach einer Demaskierung der Epitope mit Essigsäure untersucht (Abbildung 3.6). Die $\alpha 1(V)$ -Kette konnte so in der gesamten Dermis detektiert werden (Abbildung 3.6, A grün), wohingegen Kollagen IV, wie zuvor in unbehandelten Präparaten, nur in den Basalmembranen der dermo-epidermalen Junctionszone sowie der Blutgefäße nachgewiesen wurde (Abbildung 3.6, B rot). Durch die Überlagerung der mit Kollagen V-Antikörpern und mit Kollagen IV-Antikörpern erhaltenen Immunfluoreszenz konnte nach Demaskierung mit Essigsäure keine Kolokalisation im Bereich der dermo-epidermalen Basalmembran festgestellt werden (Abbildung 3.6, C BM).

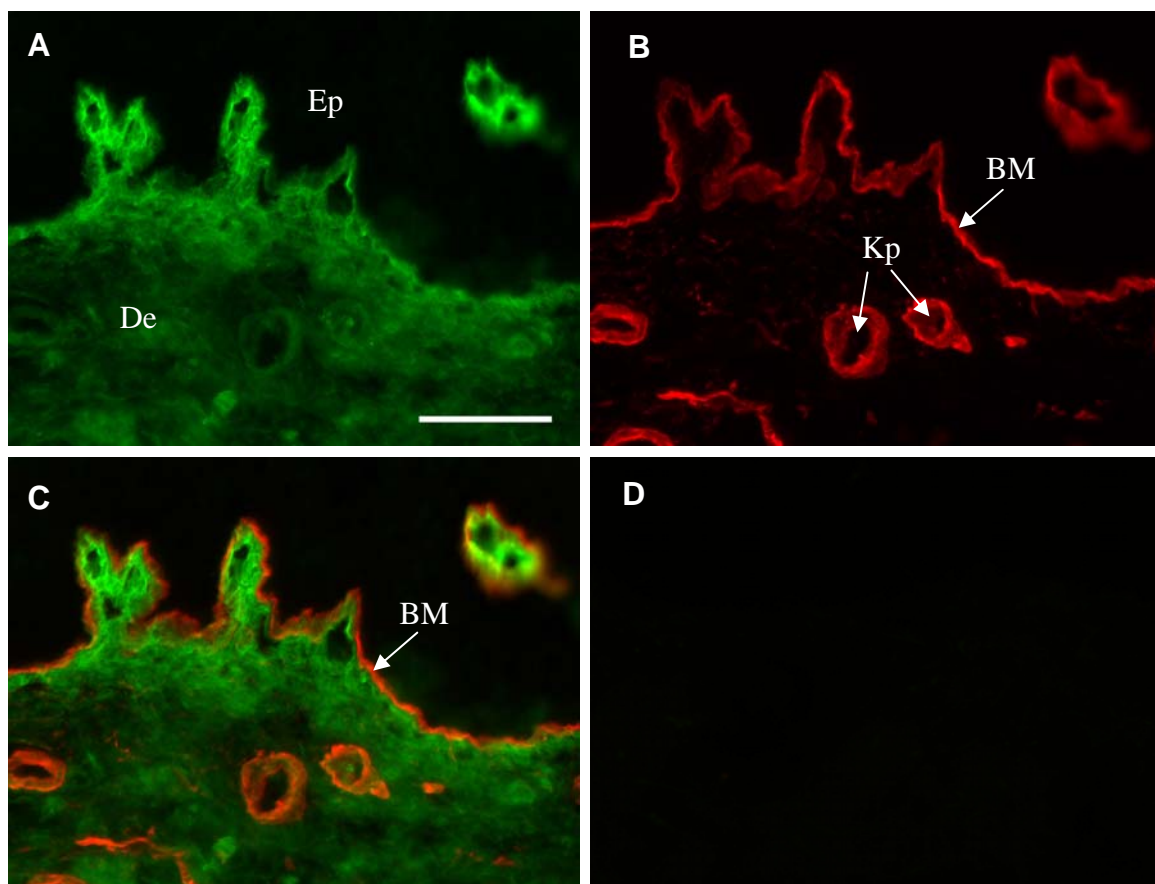


Abbildung 3.6: Doppelimmunfluoreszenz der humanen Haut mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ -Kette und Kollagen IV nach einer Vorbehandlung mit 0,1 M Essigsäure. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **B:** Kollagen IV-Antikörper R1041 (rot). **C:** Überlagerung von A und B. **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. De: Dermis; Ep: Epidermis; BM: Basalmembran; Kp: Kapillare. Messbalken: 50 μ m.

3.1.5 Kolokalisation der Kollagene V und I

Es wurde zusätzlich mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz untersucht, ob es Unterschiede in der Verteilung von Kollagen V und Kollagen I in der oberen papillären Dermis gibt (Abbildung 3.7). Durch die Überlagerung der mit dem Kollagen V Propeptid-Antikörpern (13F6) (Abbildung 3.7, A grün) und Kollagen I-Antikörpern (Abbildung 3.7, B rot) erhaltenen Immunfluoreszenzen wurde eine deutliche Kolokalisation der Kollagene I und V in der oberen papillären Dermis festgestellt (Abbildung 3.7, C Blockpfeile). Die Intensität der durch die Überlagerung verursachten gelben Immunfluoreszenz war jedoch nicht homogen in der oberen papillären Dermis verteilt. So wurde mit zunehmender Nähe zu der dermo-epidermalen Basalmembran ein stärkeres Signal für Kollagen V als für Kollagen I detektiert.

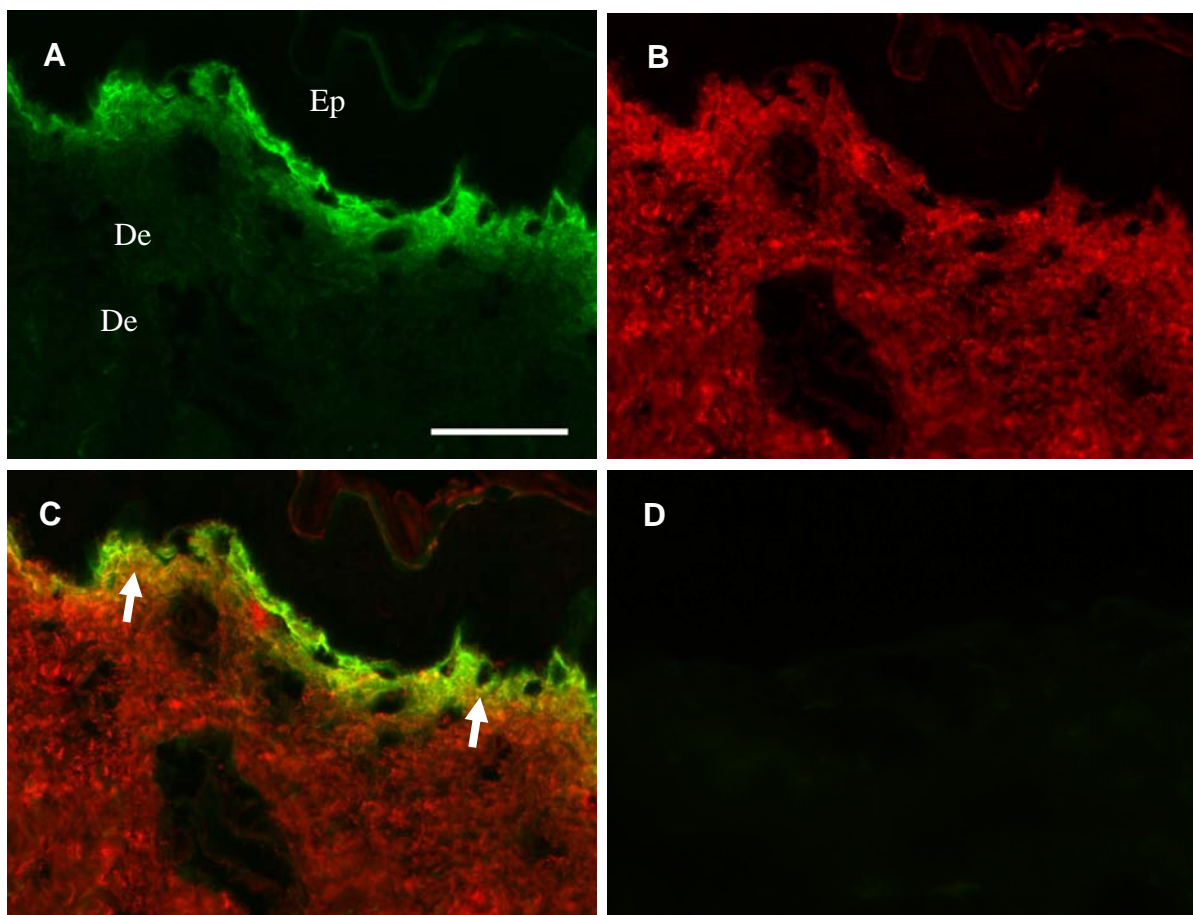


Abbildung 3.7: Doppelimmunfluoreszenz der humanen Haut mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ -Kette und Kollagen I. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). B: Kollagen I-Antikörper R1038 (rot). C: Überlagerung von A und B. D: Kontrolle ohne Primärantikörper. De: Dermis, Ep: Epidermis. Messbalken: 50 μ m.

3.1.6 Kolokalisation von Kollagen V und Fibrillin-1

Da es Hinweise gibt, wonach Kollagen V ein Bestandteil von Mikrofibrillen ist (Modesti *et al.*, 1984), wurde mit Doppelimmunfluoreszenz die Lokalisation von Kollagen V und Fibrillin-1 im oberen Bereich der papillären Dermis untersucht (Abbildung 3.8). Im Gegensatz zu der $\alpha 1(V)$ -Kette, die ohne eine Vorbehandlung mit demaskierenden Reagenzien mit dem Antikörper 13F6 nur in der oberen papillären Dermis nachgewiesen wurde, war Fibrillin-1 im Bereich der gesamten Dermis zu finden (Abbildung 3.8, B rot). Fibrillin-1 war jedoch nicht gleichmäßig in der Dermis verteilt, sondern konnte in distinkten, teilweise zusammenhängenden, faserartig angeordneten Bereichen lokalisiert werden. In den distalen Regionen der Dermispapillen war eine zur Basalmembranzzone senkrechte Orientierung der mit Fibrillin-1

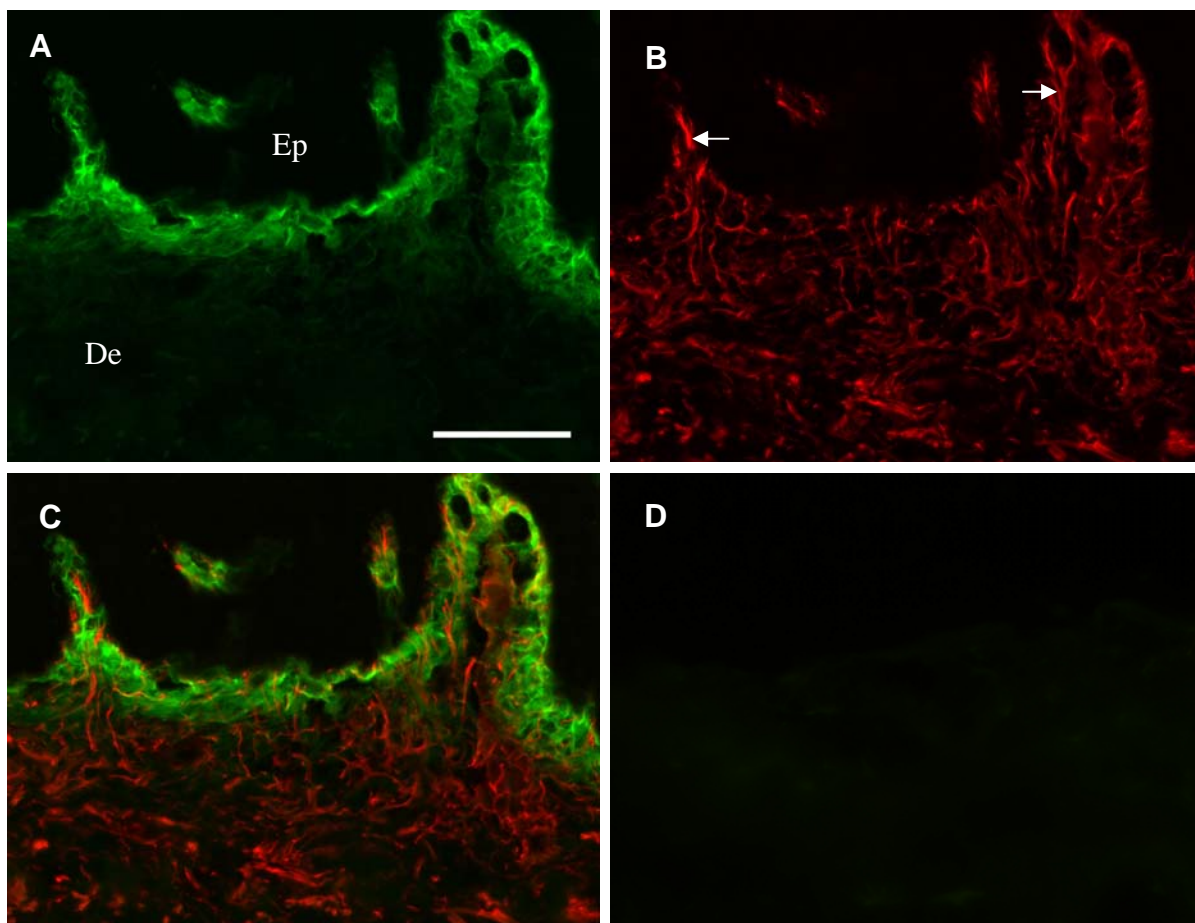


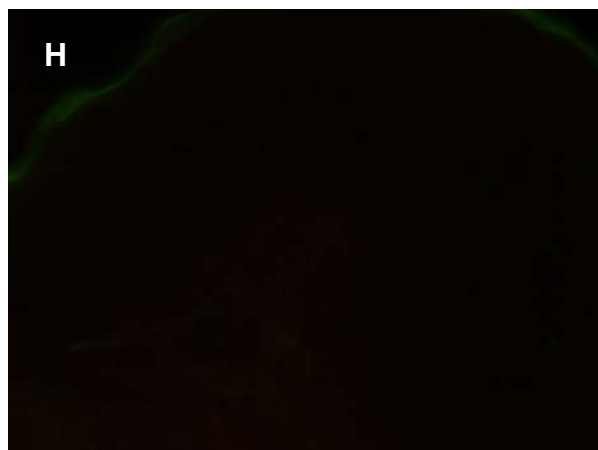
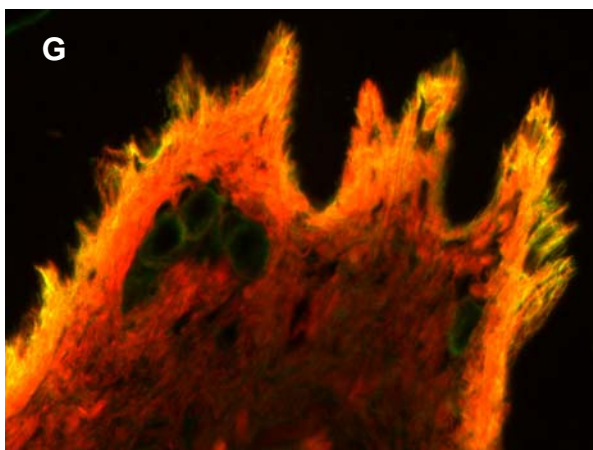
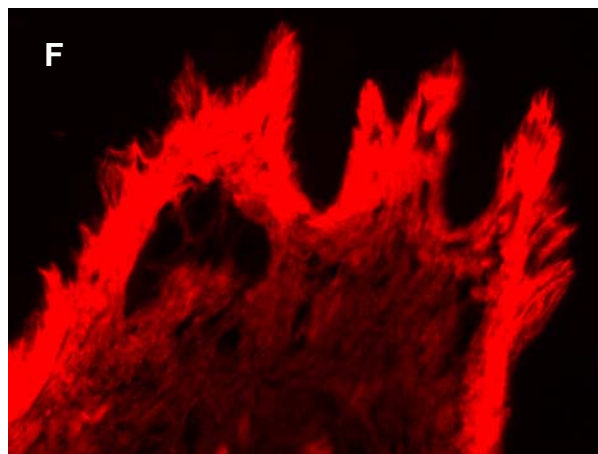
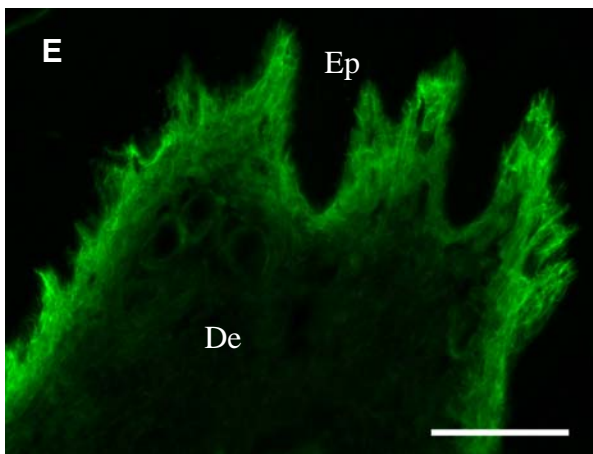
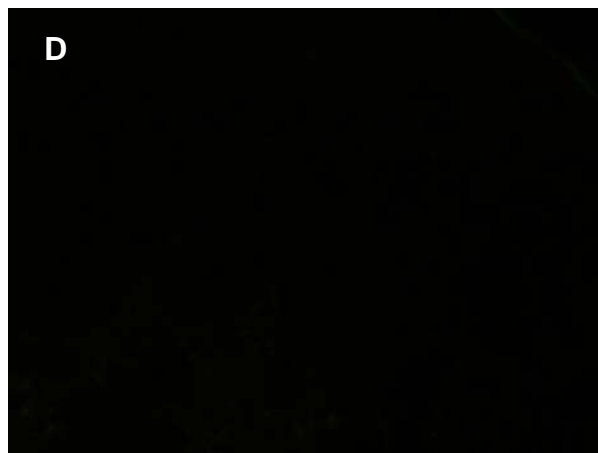
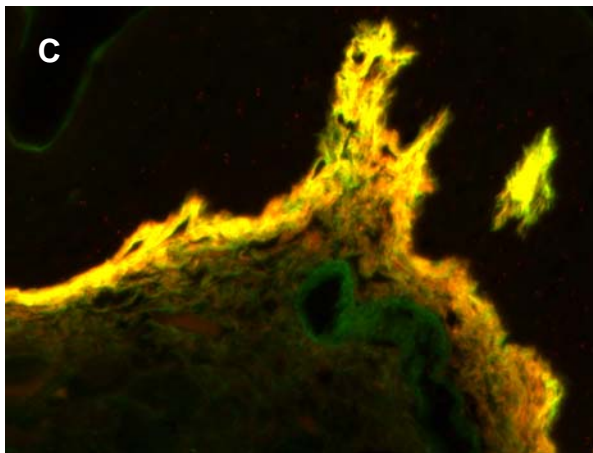
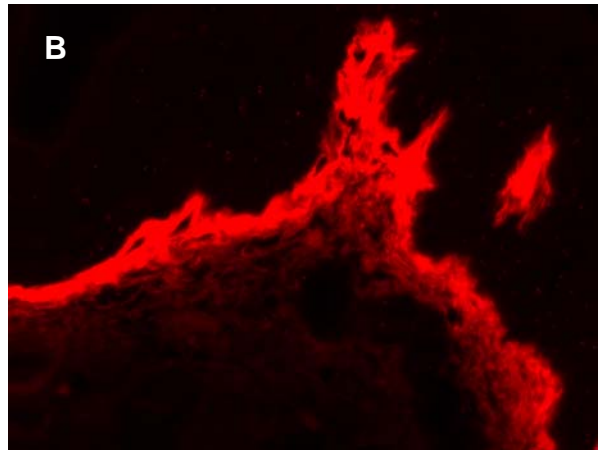
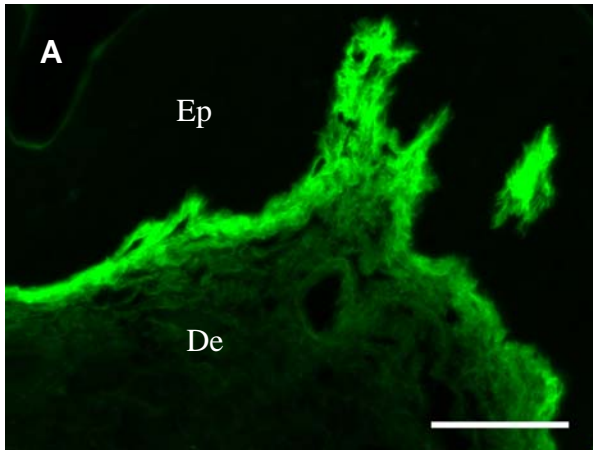
Abbildung 3.8: Doppelimmunfluoreszenz der humanen Haut mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ -Kette und Fibrillin-1. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). B: Fibrillin-1-Antikörper rF6H (rot). C: Überlagerung von A und B. D: Kontrolle ohne Primärantikörper. De: Dermis, Ep: Epidermis. Messbalken: 50 μm .

-Antikörpern markierten Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.8, B Pfeile). Durch die Überlagerung der Immunfluoreszenz von Kollagen V und Fibrillin-1 war zu erkennen, dass Kollagen V in diesen Strukturen nicht lokalisiert ist (Abbildung 3.8, C). Es konnte in der gesamten Dermis keine Kolokalisation von Kollagen V und Fibrillin-1 festgestellt werden.

3.1.7 Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette

Kürzlich wurde die Lokalisation der neuen α -Ketten des Kollagen VI, $\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$ und $\alpha 6(VI)$, in murinem Darm- und Muskelgewebe in der Nähe von Basalmembranen beschrieben (Gara *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2008). Auch in der humanen Haut kann die $\alpha 5(VI)$ -Kette in der oberen papillären Dermis entlang der Epidermis detektiert werden (unveröffentlichte Daten, Gara und Wagener, 2009). Hier wurde daher mit Doppelimmunfluoreszenz die $\alpha 1(V)$ -Kette (Antikörper 13F6, grün) sowie die $\alpha 5(VI)$ -Kette (Antikörper $\alpha 5(VI)RB$ und $\alpha 5(VI)GP$, jeweils rot) in der humanen Haut lokalisiert (Abbildung 3.9). Durch die Überlagerung der Immunfluoreszenzen konnte eine deutliche Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette in der oberen papillären Dermis nachgewiesen werden (Abbildung 3.9, C, G). In tieferen Schichten der Dermis wurde die $\alpha 5(VI)$ -Kette mit dem Antikörper $\alpha 5(VI)RB$ kaum, mit dem Antikörper $\alpha 5(VI)GP$ jedoch deutlich, wenn auch schwach detektiert (Abbildung 3.9, F).

Abbildung 3.9 (nächste Seite): Doppelimmunfluoreszenz der humanen Haut mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ - und die $\alpha 5(VI)$ -Kette. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **B:** Kollagen $\alpha 5(VI)$ -Antikörper $\alpha 5(VI)RB$ (aus Kaninchen) (rot). **C:** Überlagerung von A und B. **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper mit Sekundärantikörpern aus Kaninchen. **E:** Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **F:** Kollagen $\alpha 5(VI)$ -Antikörper $\alpha 5(VI)GP$ (aus Meerschweinchen) (rot). **G:** Überlagerung von E und F. **H:** Kontrolle ohne Primärantikörper mit Sekundärantikörpern aus Meerschweinchen. De: Dermis; Ep: Epidermis. Messbalken: 50 μm



3.1.8 Immunblots des Kollagen V in der Haut

Für die hier dargestellten Untersuchungen des Kollagen V wurden mehrere monoklonale Antikörper verwendet. Es handelte sich dabei um die Antikörper 13F6, 18G5 und 6A7 gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette (siehe 2.2). Zusätzlich wurde der monoklonale Antikörper MAB3393 gegen Kollagen V aus der humanen Plazenta verwendet (siehe 2.2). Mit Hilfe dieser Antikörper konnten α -Ketten des Kollagen V über Immunblots in Homogenaten der adulten humanen Haut nachgewiesen werden (Abbildung 3.10).

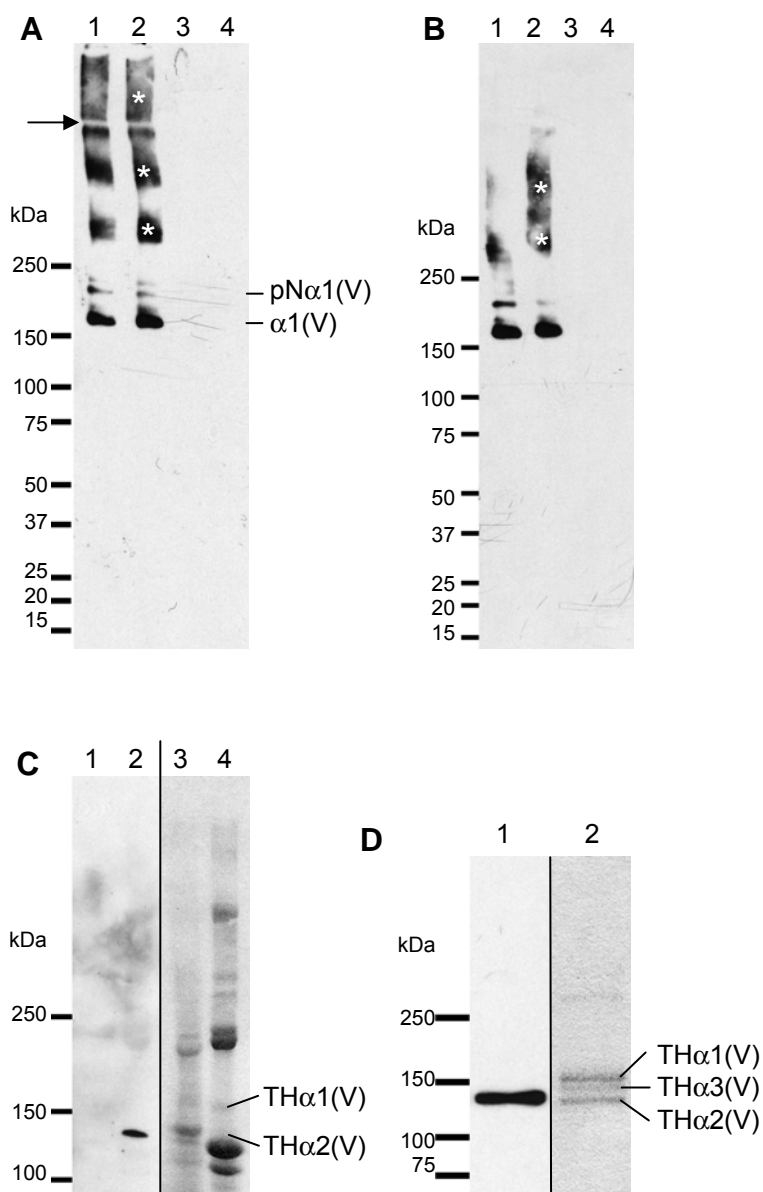


Abbildung 3.10: Immunblot mit Kollagen V-Antikörpern von Extrakten der humanen Haut sowie aufgereinigtem Kollagen V aus humaner Plazenta. A: Immunblot mit Kollagen $\alpha 1(V)$ -Antikörper 18G5. Pfeil: Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel. **B:** Immunblot mit Kollagen $\alpha 1(V)$ -Antikörper 13F6. **A und B:** 1: humaner Hautextrakt in Neutralsalzpuffer, 2: humaner Hautextrakt ohne Kollagenase bei 37 °C inkubiert, 3: humaner Hautextrakt mit Kollagenase (CLSPA) bei 37 °C inkubiert, 4: humaner Hautextrakt mit Pepsin bei 4 °C verdaut (SDS-PAGE: reduzierende Bedingungen). **C:** Immunblot mit Kollagen V-Antikörper MAB3393. 1: humaner Hautextrakt in Neutralsalzpuffer, 2: humaner Hautextrakt mit Pepsin bei 4 °C verdaut. Gesamtproteinfärbung der Blotmembran. 3: humaner Hautextrakt in Neutralsalzpuffer (analog zu 1), 4: humaner Hautextrakt mit Pepsin bei 4 °C verdaut (analog zu 2). (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen). **D:** Immunblot mit Kollagen V-Antikörper MAB3393. Probe: aufgereinigtes Kollagen V aus humaner Plazenta. 1: Immunblot. 2: Gesamtproteinfärbung der Blotmembran (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen).

Durch die Analyse humaner Haut, die in Neutralsalzpuffer [100 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl (siehe 2.4.1)] extrahiert und unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt wurde, konnte mit dem Antikörper 18G5 eine Proteinbande bei einer scheinbaren Molekularmasse von ca. 175 kDa detektiert werden (Abbildung 3.10, A 1). Auf Grund der im Vergleich zu globulären Proteinen geringeren elektrophoretischen Mobilität von Kollagenen (Furthmayr und Timpl, 1971) wurde die Molekularmasse durch die Addition eines Korrekturfaktors (0,825) von ca. 145 kD berechnet. Der elektrophoretischen Mobilität entsprechend, handelt es sich bei dieser Proteinbande um die reife $\alpha 1(V)$ -Kette mit einem vollständig prozessierten C-Propeptid und einem partiell prozessierten N-Propeptid (Imamura *et al.*, 1998; Unsöld *et al.*, 2002; Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde die $\alpha 1(V)$ -Kette auch in Bereichen mit niedriger Mobilität detektiert. Entsprechen der elektrophoretischen Mobilität konnte die $pN\alpha 1(V)$ -Kette, deren N-Propeptid unprozessiert und deren C-Propeptid vollständig prozessiert ist (Imamura *et al.*, 1998; Unsöld *et al.*, 2002; Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007), bei ca. 220 kDa (korrigiert 180 kDa) detektiert werden. In den Bereichen noch niedrigerer Mobilität konnte eine positive Immunreaktivität des Antikörpers 18G5 mit diffusen Banden festgestellt werden. Diese Signale erstrecken sich über das Sammelgel sowie den oberen Teil des Trenngels (Abbildung 3.10, A Sternchen). Der Antikörper 13F6 reagierte im Immunblot derselben Probe ebenfalls mit der reifen $\alpha 1(V)$ -Kette und der $pN\alpha 1(V)$ -Kette (Abbildung 3.10, B 1). In den Bereichen mit niedrigerer Mobilität als Standardproteine mit 250 kDa konnten schwache, diffuse Proteinbanden detektiert werden (Abbildung 3.10, B Sternchen).

Wie zuvor beschrieben wurde, reagieren die Antikörper 18G5 und 13F6 mit Epitopen die im Bereich der Kollagenase-sensitiven COL2-Domäne und der Pepsin-sensitiven NC2-Domäne des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette (siehe 2.2.1) (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Um auszuschließen, dass die Antikörper 18G5 und 13F6 mit nichtkollagenen Komponenten der humanen Haut reagieren, wurden Extrakte mit bakterieller Kollagenase verdaut (siehe 2.4.1.3) und in Immunblots analysiert (Abbildung 3.10, A 3, B 3). Dabei wurde deutlich, dass weder der Antikörper 18G5 noch der Antikörper 13F6 mit Hautextrakten nach einem Verdau mit bakterieller Kollagenase reagiert. Auch im Bereich von Molekularmassen zwischen 150 und 15 kDa konnte mit beiden Antikörpern keine Immunreaktivität festgestellt werden. Mit einem als Kontrolle untersuchten Hautextrakt, das bei 37 °C ohne die Zugabe von

Kollagenase inkubiert wurde, konnte hingegen eine deutliche Immunreaktivität detektiert werden (Abbildung 3.10, A 2, B 2). Zusätzlich wurden Hautextrakte nach einem limitierten Pepsin-Verdau untersucht (siehe 2.4.1.1). In Immunblots entsprechender Hautproben konnte keine positive Immunreaktivität der Antikörper 18G5 und 13F6 festgestellt werden (Abbildung 3.10, A 4, B 4).

Im Vergleich zu den Antikörpern 18G5 und 13F6 wies der Antikörper MAB3393 in Immunblots sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE keine Reaktivität mit Hautproben, die in Neutralsalzpuffer extrahiert wurden, auf (Abbildung 3.10, C 1). Hingegen konnte Kollagen V nach einem limitierten Pepsin-Verdau mit dem Antikörper MAB3393 in Proben der humanen Haut detektiert werden (Abbildung 3.10, C 2). Bei der Überlagerung des Röntgenfilms mit der Gesamtproteinfärbung der Blotmembran (Abbildung 3.10, C 2 rechte Seite) wurde festgestellt, dass der Antikörper MAB3393 in Immunblots der humanen Haut mit dem tripelhelikalen Abschnitt (TH) der $\alpha 2(V)$ -Kette reagiert. Zusätzliche Signale mit höherer oder niedrigerer Mobilität wurden nicht detektiert. In Immunblots von Kollagen V, das aus humaner Plazenta nach einem Verdau mit Pepsin aufgereinigt wurde, konnte ebenfalls eine Reaktivität des Antikörpers MAB3393 mit der $\alpha 2(V)$ -Kette festgestellt werden (Abbildung 3.10, D). Anhand der Gesamtproteinfärbung der entsprechenden Blotmembran ist zu sehen, dass das verwendete Kollagen V sowohl die $\alpha 1(V)$ -, die $\alpha 2(V)$ - als auch die $\alpha 3(V)$ -Kette enthält (Abbildung 3.10, D 2). Eine Immunreaktivität des Antikörpers MAB3393 mit der $\alpha 1(V)$ - oder $\alpha 3(V)$ -Kette konnte jedoch auch nach längerer Expositionszeit (15 - 30 min) des Röntgenfilmes nicht detektiert werden.

3.1.9 Untersuchung von α -Ketten des Kollagen V in unterschiedlichen Hautschichten

Wie durch immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz der humanen Haut gezeigt wurde, gibt es innerhalb der Dermis regionsabhängige Unterschiede in der Reaktivität von Kollagen V-Antikörpern (siehe 3.1.1, 3.1.4). Eine besonders starke Reaktivität zeigten Kollagen V-Antikörper beispielsweise in der oberen papillären Dermis. Um eine regionsabhängige Verteilung von Kollagen V in der Dermis zu untersuchen, wurden mit einem Dermatome von einer Hautprobe sukzessive Gewebsschichten abgetragen (siehe 2.1.1.1). Solche 250 μm dicken

Schichten der Dermis wurden limitiert mit Pepsin verdaut und die Protease-resistenten, tripelhelikalen Kollagendomänen mittels der SDS-PAGE analysiert. Es konnten sowohl die Kollagen $\alpha 1(V)$ -Kette als auch die Kollagen $\alpha 2(V)$ -Kette in allen Schichten der Dermis nachgewiesen werden (Abbildung 3.11, A). Bei einem Vergleich der Intensität von Coomassie-Blau gefärbten Banden der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 2(V)$ -Ketten aus Proben unterschiedlich tiefer Schichten der Dermis konnte kein

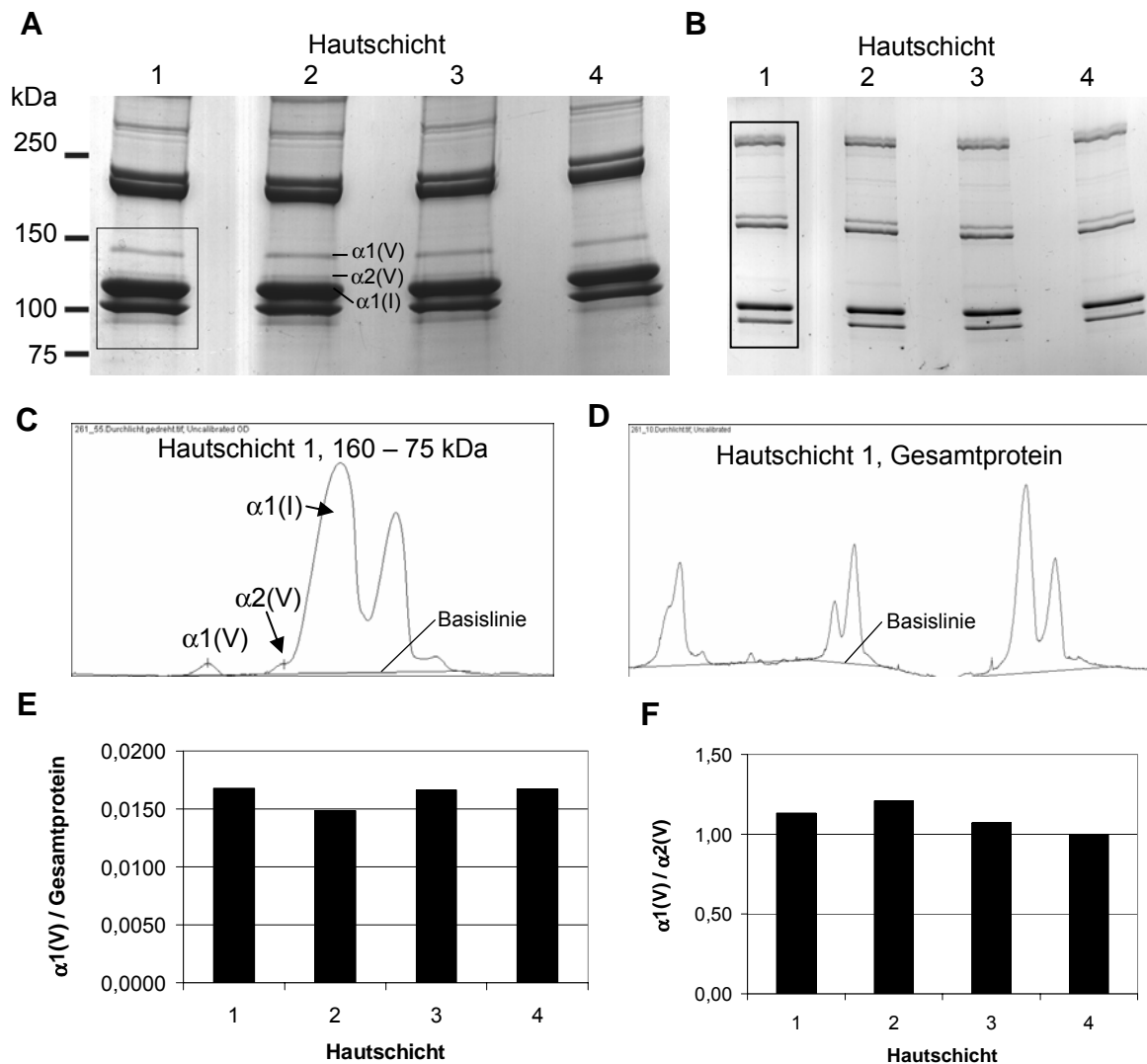


Abbildung 3.11: Quantitativer Vergleich von α -Ketten des Kollagen V aus Hautschichten unterschiedlicher Tiefe. Hautschichten: 1: bis 250 μm ; 2: 250 – 500 μm ; 3: 500 – 750 μm ; 4: 750 – 1000 μm . **A:** Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel von Pepsin-resistenten Kollagenen aus unterschiedlichen Hautschichten. 55 μg Protein pro Tasche. **B:** Analog zu A jedoch 10 μg Protein pro Tasche. **C:** Graphische Darstellung der densitometrisch ermittelten Grauwerte aus A, Hautschicht 1. **D:** Graphische Darstellung der densitometrisch ermittelten Grauwerte aus B, Hautschicht 1. **E:** Graphische Darstellung der Verhältnisse der Grauwerte von $\alpha 1(V)$ aus A zu dem Gesamtprotein aus B. **F:** Graphische Darstellung der maximalen Grauwerte für $\alpha 1(V)$ und $\alpha 2(V)$ aus A. (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen).

kein Unterschied festgestellt werden. Die grafische Darstellung des quantitativen Verhältnisses zwischen der $\alpha 1(V)$ -Kette und der Gesamtproteinmenge zeigt, dass kein signifikanter Unterschied in der Quantität der $\alpha 1(V)$ -Kette zwischen unterschiedlichen Schichten der Haut festzustellen war (Abbildung 3.11, E). Die Fläche unter den für die $\alpha 2(V)$ -Kette erhaltenen *Peaks* konnte auf Grund der Überlagerung mit dem $\alpha 1(I)$ -*Peak* nicht ermittelt werden. Im Bereich der Überlagerung der $\alpha 2(V)$ - und der $\alpha 1(I)$ -*Peaks* konnte jedoch ein Wendepunkt im Kurvenverlauf festgelegt werden. Um das relative Verhältnis der Quantität der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 2(V)$ -Kette zu vergleichen, wurde die Höhendifferenz zwischen der Basislinie und dem Maximalwert des $\alpha 1(V)$ -*Peaks* in das Verhältnis zu der Höhendifferenz zwischen der Basislinie und dem Wendepunkt am $\alpha 2(V)$ -*Peak* gesetzt (Abbildung 3.11, D). Bei einem Vergleich dieser Werte zwischen den Schichten unterschiedlicher Tiefen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.11, F). Demnach unterschied sich die Zusammensetzung der Kollagen V α -Ketten sowie deren Quantität in der Dermis in Abhängigkeit zu der Tiefe der Hautschicht nicht.

3.1.10 Nachweis der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette in unterschiedlichen Hautschichten

Wie zuvor durch immunhistologische Untersuchungen gezeigt wurde, besteht in der oberen papillären Dermis eine stärkere Reaktivität von Antikörpern gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette als in tieferen Schichten der Dermis (siehe 3.1.1). Die Verteilung der $\alpha 1(V)$ -Kette in der Haut in Abhängigkeit zur Tiefe der Dermis wurde daher mit Hilfe von Immunblots untersucht.

Durch Immunblots von vier Hautschichten aus einer Tiefe von 0 - 250 μm , 250 – 500 μm , 500 – 750 μm und 750 – 1000 μm , die in Neutralsalzpuffer extrahiert wurden, konnte die $\alpha 1(V)$ -Kette mit dem Antikörper 13F6 in jeder der untersuchten Schichten nachgewiesen werden (Abbildung 3.12, A). Es wurden sowohl die reife $\alpha 1(V)$ -Kette als auch die pN $\alpha 1(V)$ -Kette detektiert (Imamura *et al.*, 1998; Unsöld *et al.*, 2002; Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007) (Abbildung 3.12, A). In der obersten Schicht der Dermis konnte die $\alpha 1(V)$ -Kette mit dem Antikörper 13F6 zusätzlich oberhalb von 250 kDa in diffusen Banden detektiert werden (Abbildung 3.12, A Sternchen). Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Hautschichten war zu

erkennen, dass die Intensität der Signale besonders in diesen Molekulargewichtsbe-
reichen in Abhängigkeit zu der Tiefe der Hautschicht schwächer wurde. Durch
densitometrische Messungen war eine deutliche Abnahme der Intensität der mit dem
Antikörper 13F6 erhaltenen Signale in tieferen Schichten der Dermis zu erkennen
(Abbildung 3.12, C). Die stärkste Intensität wurde jedoch in der zweiten Hautschicht
ermittelt. Anhand der densitometrisch gemessenen Werte konnte eine Abnahme der

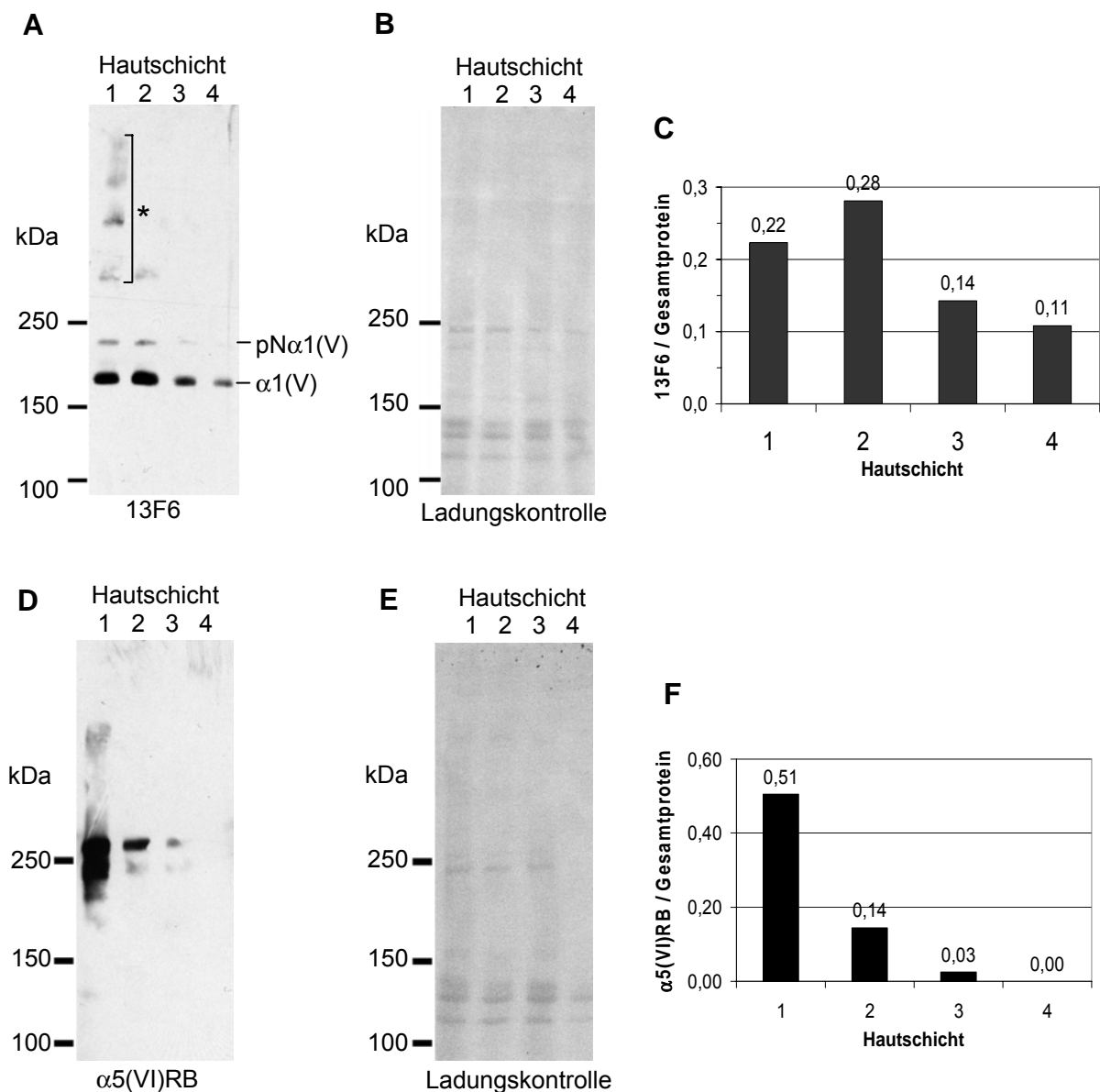


Abbildung 3.12: Immunblots von Hautschichten unterschiedlicher Tiefe mit Antikörpern gegen die $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 5(VI)$ -Kette. Hautschichten: 1: bis 250 μm ; 2: 250 – 500 μm ; 3: 500 – 750 μm ; 4: 750 – 1000 μm . **A:** Immunblot mit Kollagen $\alpha 1(V)$ -Antikörper 13F6. **B:** Ladungskontrolle: Gesamtproteinfärbung der Blotmembran von A. **C:** Graphische Darstellungen der densitometrisch ermittelten Intensität des Immunblots A. **D:** Immunblot mit Kollagen $\alpha 5(VI)$ -Antikörper $\alpha 5(IV)RB$. **E:** Ladungskontrolle: Gesamtproteinfärbung der Blotmembran von D. **F:** Graphische Darstellungen der densitometrisch ermittelten Intensität des Immunblots D. (SDS-PAGE: reduzierende Bedingungen).

Intensität zwischen der ersten und der vierten Hautschicht von 50 % ermittelt werden. Die Abnahme der Intensität zwischen der zweiten und der vierten Hautschicht betrug hingegen 60 %.

Wie zuvor gezeigt wurde, konnte eine Kollokalisierung der Kollagen $\alpha 1(V)$ -Kette und der $\alpha 5(VI)$ -Kette in der oberen papillären Dermis festgestellt werden (siehe 3.1.4). Um die Verteilung der $\alpha 5(VI)$ -Kette in der humanen Haut auch biochemisch zu verifizieren, wurden analog zu der $\alpha 1(V)$ -Kette Immunblots von Hautschichten aus unterschiedlichen Tiefen durchgeführt (Abbildung 3.12, D). Die $\alpha 5(VI)$ -Kette konnte mit dem Antikörper $\alpha 5(VI)RB$ in der ersten bis dritten Hautschicht bei einer Molekularmasse von ca. 285 kDa detektiert werden. Zusätzlich war eine zweite, jedoch schwächere Bande bei ca. 220 kDa sowie eine schwache Immunreaktivität oberhalb von 285 kDa zu erkennen. Die Signale in der obersten Hautschicht waren deutlich stärker als in den darunter liegenden Hautschichten. Im Gegensatz zu der $\alpha 1(V)$ -Kette, konnte die $\alpha 5(VI)$ -Kette jedoch in der vierten Hautschicht nicht detektiert werden. Auch bei einem Vergleich der densitometrisch ermittelten Intensität von Immunblot-Signalen war eine deutliche Abnahme in tieferen Schichten festzustellen (Abbildung 3.12, F). Die Abnahme der Intensität zwischen der ersten und der zweiten Hautschicht betrug 72 % beziehungsweise zwischen der ersten und der dritten Hautschicht 94 %.

3.1.11 Massenspektrometrische Analyse dermalen Kollagene

Um die Zusammensetzung der fibrillären Kollagene in der adulten humanen Haut zu analysieren, wurden massenspektrometrische Untersuchungen (LC MS/MS) mit Proben nach einem limitierten Pepsin-Verdau durchgeführt. Es sollte in diesem Zusammenhang überprüft werden, ob zusätzlich zu Kollagen I, III und V weitere fibrilläre Kollagene wie II oder XI in der adulten Haut nachgewiesen werden können. Die Hautproben wurden dazu unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden einzelne Proteinbanden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Auf Grund der elektrophoretischen Mobilität monomerer α -Ketten der fibrillären Kollagene, wurden Proteinbanden im Bereich zwischen 160 und 100 kDa untersucht (Abbildung 3.13, a - e).

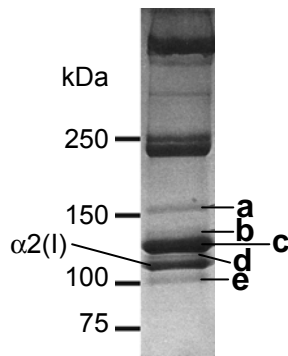


Abbildung 3.13: SDS-PAGE der humanen Haut nach einem limitierten Pepsin-Verdau (Coomassie-Blau Färbung). a, b, c, d, e: Proteinbanden die massenspektrometrisch untersucht wurden (Tabelle 3.2). (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen)

Tabelle 3.1: Verwendete Parameter für die Auswertung von Daten der LC MS/MS Analyse humaner Haut mit Mascot Version 2.2 (matrix sciences).

verwendetes Enzym	Trypsin (<i>Sus scrofa</i>)
Fixierte Modifikationen	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikationen	Oxidation (M), Oxidation (P)
Massentoleranz für Peptidionen	+/- 0,4 Da
Massentoleranz für Fragmentionen	+/- 0,4 Da
maximale Anzahl fehlender Spaltung	1
Datenbank	NCBI nr
taxonomische Beschränkung	<i>Homo sapiens</i>
Signifikanzgrenzwert	P<0,05
<i>Ion score cut-off</i>	20

In der Proteinbande a, die auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität der Kollagen $\alpha 1(V)$ -Kette zugeordnet wurde (Abbildung 3.13, a), konnten neben der humanen $\alpha 1(V)$ -Kette die Kollagen $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und $\alpha 1(III)$ -Kette nachgewiesen werden (Tabelle 3.2, a). Die Proteinbande b wurde entsprechend ihrer elektrophoretischen Mobilität der Kollagen $\alpha 2(V)$ -Kette zugeordnet (Abbildung 3.13, b). Auf Grund des geringen Unterschiedes in der elektrophoretischen Mobilität der $\alpha 2(V)$ - und der $\alpha 1(I)$ -Ketten in der SDS-PAGE, kann eine Kontamination der aus dem SDS-Gel ausgeschnittenen $\alpha 2(V)$ -Bande mit Bestandteilen der $\alpha 1(I)$ -Bande nicht ausgeschlossen werden. In der Proteinbande b wurden neben der humane Kollagen $\alpha 2(V)$ -Kette auch die humanen $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten identifiziert. (Tabelle 3.2, b). Für die $\alpha 1(III)$ -Kette wurden 3 homologe Peptidfragmente identifiziert, die jedoch nicht ausschließlich der $\alpha 1(III)$ -Kette zuzuordnen sind (nicht signifikant).

Tabelle 3.2: Identifizierte Proteinkomponenten aus der massenspektrometrischen Untersuchung von SDS-Gelbanden der humanen Haut (Abbildung 3.13).

Proteinbande	Identifizierte Proteine	Peptide	Peptide P<0,05	protein score
a	Collagen, type I, alpha 1 [Homo sapiens]	14	9	648
	prepro-alpha2(I) collagen [Homo sapiens]	11	7	520
	collagen alpha 1(V) chain precursor [Homo sapiens]	9	7	420
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	6	2	249
b	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	23	17	1189
	type V procollagen alpha 2 chain [Homo sapiens]	16	10	827
	prepro-alpha2(I) collagen [Homo sapiens]	8	4	429
	collagen type III alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	3	0	79
c	Collagen, type I, alpha 1 [Homo sapiens]	35	25	1706
	pre-pro-alpha-2 type I collagen [Homo sapiens]	1	1	88
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	2	0	50
d	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	30	21	1401
	prepro-alpha2(I) collagen [Homo sapiens]	14	12	774
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	3	1	136
e	prepro-alpha2(I) collagen [Homo sapiens]	18	10	932
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	8	2	265
	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	6	3	238

Die Proteinbande c wurde auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität der Kollagen $\alpha 1(I)$ -Kette zugeordnet (Abbildung 3.13, c). In dieser Proteinbande konnten die humanen Kollagen $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten identifiziert werden (Tabelle 3.2, c). Für die $\alpha 1(III)$ -Kette wurden hingegen 2 homologe Peptidfragmente identifiziert, die nicht ausschließlich der $\alpha 1(III)$ -Kette zuzuordnen sind (nicht signifikant) (Tabelle 3.2, c). In Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen von Hautproben, die limitiert mit Pepsin verdaut wurden, war zwischen der Kollagen $\alpha 1(I)$ -Bande und der Kollagen $\alpha 2(I)$ -Bande eine schwache jedoch distinkte Bande zu erkennen (Abbildung 3.13, d). In dieser Proteinbande d konnten die humanen Kollagen $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und die $\alpha 1(III)$ -Ketten identifiziert werden (Tabelle 3.2, d). Für die $\alpha 1(III)$ -Kette wurde hingegen nur für ein Peptidfragment eine signifikante Übereinstimmung festgestellt. Die Analyse dieses Peptidfragments (RGPPGPAGANGAPGLRG) über „Blast search“ konnte eine 100 %ige sequenzielle Übereinstimmung nur mit der $\alpha 1(III)$ -Kette

bestätigen. Unterhalb der $\alpha 2(I)$ -Bande wurde die Proteinbande e ausgeschnitten (Abbildung 3.13, e). Auch in dieser Proteinbande wurden die humanen Kollagen $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und die $\alpha 1(III)$ -Ketten identifiziert (Tabelle 3.2, e). In keiner der fünf untersuchten Proteinbanden der humanen Haut konnten jedoch zusätzlich zu der $\alpha 1(V)$ -, $\alpha 2(V)$ -, $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und $\alpha 1(III)$ -Kette weitere α -Ketten fibrillärer Kollagene identifiziert werden.

3.1.12 Immunogold-Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten

Um zu überprüfen ob Kollagen V in der Nähe der dermo-epidermalen Junctionszone in Kollagenfibrillen oder in extrafibrillären Suprastrukturen lokalisiert ist, wurde Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Kollagen I- (AF5610) und Kollagen V-Antikörpern (13F6 und 18G5) an Ultradünnschnitten der adulten humanen Haut durchgeführt. Um die Bildung von *cross links* und die daraus resultierende Veränderung von Epitopen durch Fixierungsreagenzien wie Paraformaldehyd und Glutaraldehyd zu vermeiden, wurden für die Fixierung von Hautproben „HOPE-Fixativ“ verwendet. Es konnte jedoch keine Immunreaktivität von Kollagen V-Antikörpern mit HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der Haut nachgewiesen werden. Um die Erreichbarkeit von Epitopen durch Antikörper zu verbessern, wurden HOPE-fixierte Ultradünnschnitte der Haut mit technischem Ethanol vorbehandelt, wodurch das Einbettungsmedium aus dem Gewebe herausgelöst wird. Eine Immunreaktivität von Kollagen V-Antikörpern mit entsprechenden Präparaten konnte jedoch ebenfalls nicht festgestellt werden.

Kollagen I wurde hingegen in den gleichen Präparaten in Kollagenfibrillen gefunden (Abbildung 3.14, A, B). In den distalen Bereichen der Einstülpungen der dermo-epidermalen Basalmembran in die Dermis, wo Netzwerke aus dünnen Fibrillen lokalisiert sind, wurde eine Markierung mit Kollagen I-Antikörpern nicht entdeckt (Abbildung 3.14, A Sternchen). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht in allen Abschnitten der Kollagenfibrillen, die als solche durch ihr charakteristisches Bänderungsmuster zu erkennen waren, Kollagen I nachgewiesen wurde (Abbildung 3.14, B Kreis). In HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der Haut, die mit Ethanol vorbehandelt wurden, war es möglich den Verlauf der Verankerungsfilamente zwischen der *Lamina densa* und den Hemidesmosomen sowie die mit der *Lamina*

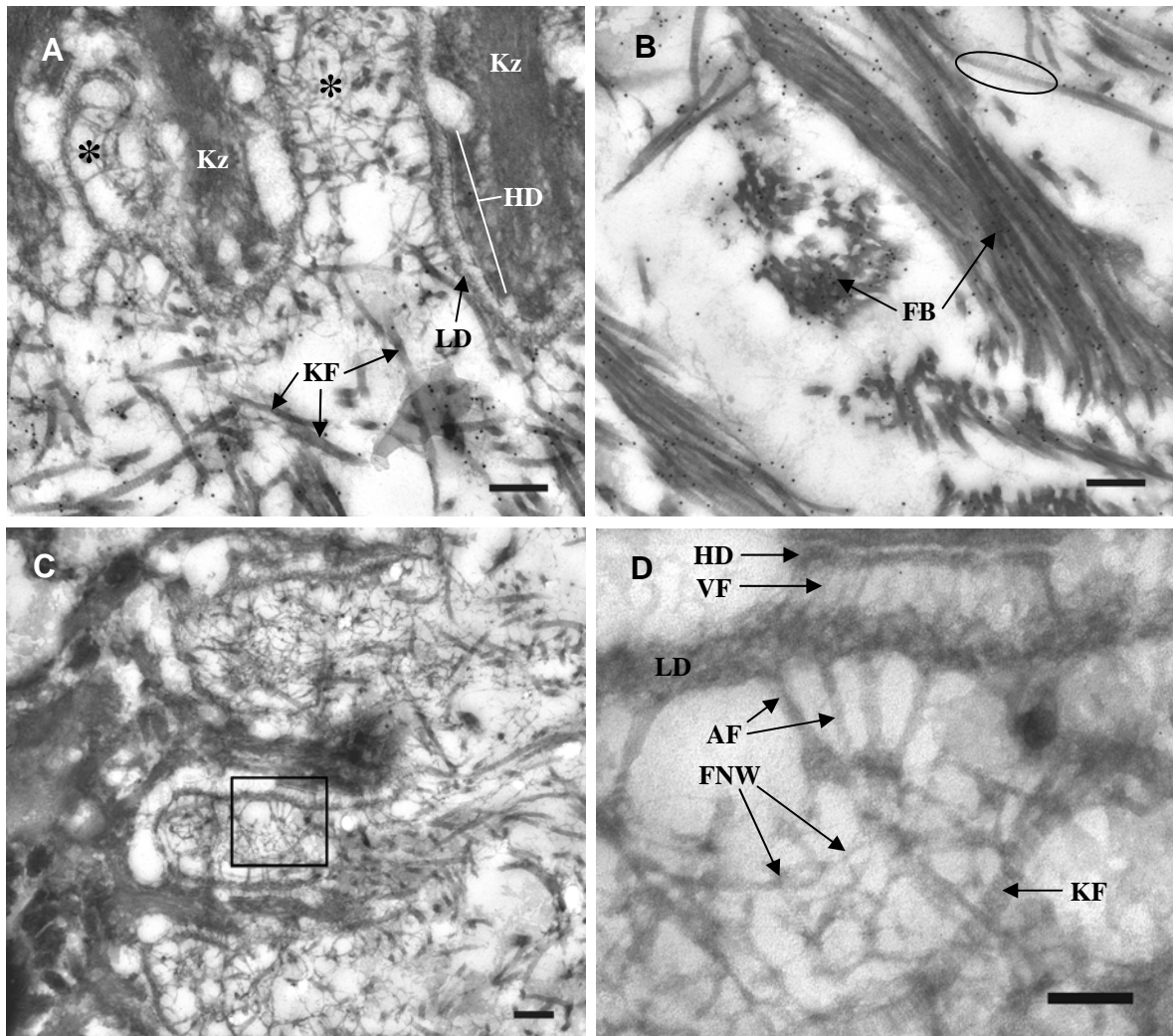


Abbildung 3.14: Immunogold-Elektronenmikroskopie von HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der adulten humanen Haut. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Immunogold-Markierung mit Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel) im oberen Teil der papillären Dermis. **B:** Immunogold-Markierung mit Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel) in der tiefen Dermis. **C:** Kontrolle ohne Primäntikörper. **D:** Kontrolle ohne Primäntikörper. Vergrößerung des in C markierten Bereiches. AF: Verankerungsfibrille, FB: Fibrillenbündel, FNW: fibrilläres Netzwerk, HD: Hemidesmosom, KF: Kollagenfibrille, Kz: Keratinozyt, LD: *Lamina densa*, VF: Verankerungsfilament. Messbalken: 200 nm (D: 100 nm).

densa assoziierten Verankerungsfibrillen (Abbildung 3.14, D AF) zu erkennen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass einige Verankerungsfibrillen auf der dermalen Seite mit einem Netzwerk aus dünnen Fibrillen (ca. 10 nm) interagieren (Abbildung 3.14, D FNW). Ein solches Netzwerk dünner Fibrillen erstreckt sich entlang der gesamten Basalmembran und ist in den distalen Bereichen der Einstülpungen der Basalmembran besonders dicht organisiert. Außerdem wurde beobachtet, dass dieses Netzwerk auch mit einzelnen quergestreiften Kollagenfibrillen assoziiert ist (Abbildung 3.14, D KF). Es war keine perlenschnurartige oder gebänderte Feinstruktur dünner Fibrillen zu erkennen. Dementsprechend konnte anhand morphologischer

Merkmale nicht gezeigt werden, ob es sich bei diesen dünnen Fibrillen um Fibrillin-haltige Mikrofibrillen, Kollagen VI-haltige Mikrofibrillen oder um Vorläufer von proteotypischen Kollagenfibrillen handelt. Eine Markierung dünner Fibrillen mit Kollagen I- oder Kollagen V-Antikörpern wurde nicht gefunden. Auf Grund der möglicherweise unzureichenden Demaskierung von Epitopen in HOPE-fixierten Ultradünnschnitten kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kollagen I und/oder Kollagen V Bestandteile dieser dünnen Fibrillen ist.

3.1.13 Immunogold-Elektronenmikroskopie suprastruktureller Fragmente

Da Kollagen V in Ultradünnschnitten der humanen Haut nicht lokalisiert werden konnte (siehe 3.1.12), wurde die Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Extrakten von suprastrukturellen Fragmenten der Haut durchgeführt (Abbildung 3.15). Neben Fragmenten von quergestreiften Kollagenfibrillen wurden in solchen Extrakten auch Fragmente von Mikrofibrillen sowie netzwerkartig oder elektronenoptisch amorphe

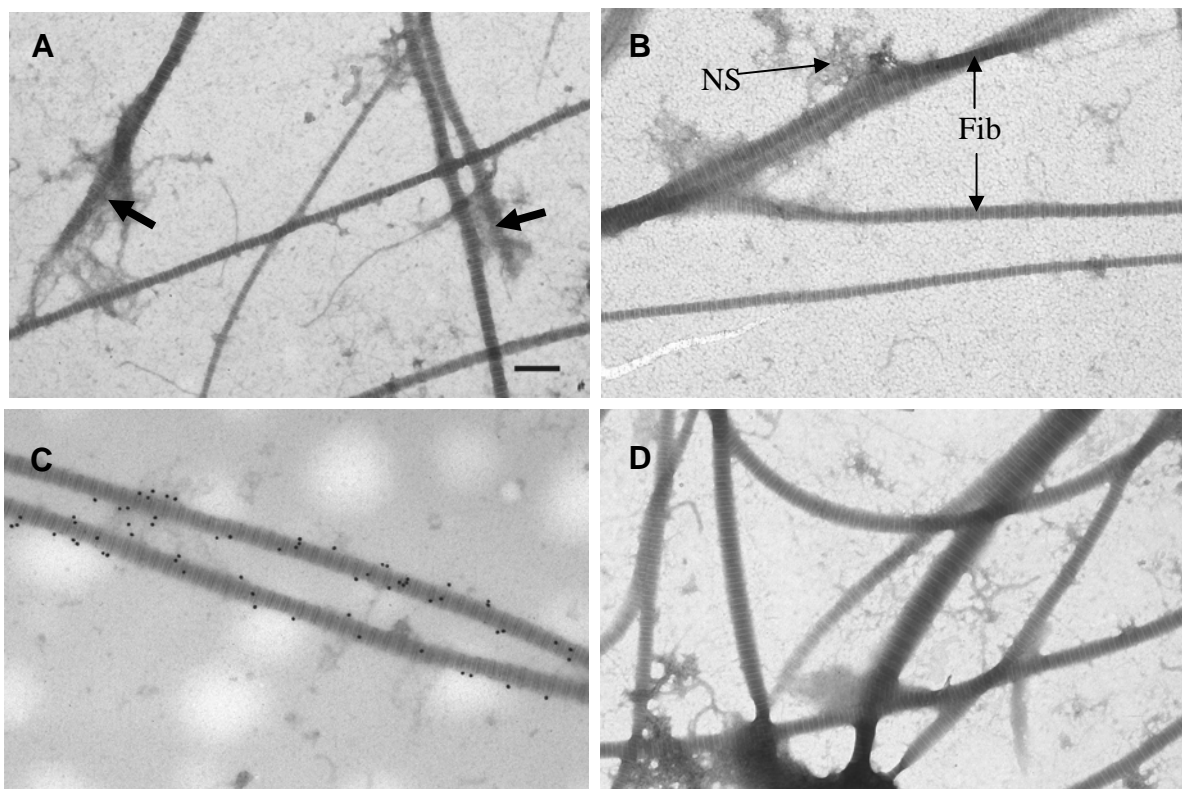


Abbildung 3.15: Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten der adulten humanen Haut in Neutralsatzpuffer. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **C:** Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Goldpartikel). **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. NS: nichtfibrilläre Suprastruktur; Fib: quergestreifte Kollagenfibrille; Blockpfeil: mechanisch generierte Fibrillenden. Messbalken: 200 nm

Suprastrukturen gefunden, wobei die quergestreiften Kollagenfibrillen am häufigsten zu beobachten waren (Abbildung 3.15, B *Fib ES*). Für die Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Extrakten der adulten humanen Haut wurden die Kollagen V-Antikörper 18G5, 13F6 und 6A7 gegen das N-terminale unprozessierte Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette verwendet. In vorherigen Arbeiten wurde beschrieben, dass für den immunchemischen Nachweis von tripelhelikalen Domänen des Kollagen V eine Demaskierung der Epitope notwendig ist (Linsenmayer *et al.*, 1993). Für den immunchemischen Nachweis des N-terminalen Propeptids ist eine entsprechende Demaskierung hingegen nicht notwendig. Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Immunreaktivität der Kollagen V-Antikörper 18G5, 13F6 und 6A7 mit gebänderten Kollagenfibrillen der Haut festgestellt werden (Abbildung 3.15, A). An den durch die Homogenisierung von Hautproben mechanisch generierten Enden von Fibrillenfragmenten, war die Störung der kompakten Fibrillenstruktur zu erkennen (Abbildung 3.15, A Blockpfeil). Auch solche Bereiche wurden jedoch durch Kollagen V-Antikörper nicht markiert. Zusätzlich gab es auch keine Hinweise für die Lokalisation von Kollagen V in Fragmenten nichtfibrillärer Suprastrukturen. Mit dem Kollagen V-Antikörper MAB3393 gegen die tripelhelikale Domäne der $\alpha 2(V)$ -Kette (siehe 3.1.8, 3.3.3, 3.4.5) wurde Kollagen V ebenfalls nicht in Extrakten suprastruktureller Fragmente der humanen Haut nachgewiesen (Abbildung 3.15, B). Kollagen III konnte hingegen (Antikörper: MAB3392) in denselben Extrakten in gebänderten Kollagenfibrillen lokalisiert werden (Abbildung 3.15, C).

3.1.14 Immunogold-Elektronenmikroskopie von Essigsäure-Extrakten

Für eine Demaskierung von Kollagen-Epitopen wurde die Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Essigsäure-Extrakten der humanen Haut durchgeführt (Abbildung 3.16). Vergleichbar mit Extrakten in Neutralsalzpuffer wurden in Essigsäure-Extrakten ebenfalls Fragmente quergestreifter Kollagenfibrillen gefunden. Neben fibrillären Fragmenten mit einer kompakten Struktur, die klar definierte Bänderungsmuster aufwiesen, wurden auch stark deformierte Kollagenfibrillen identifiziert. Die Deformation von Kollagenfibrillen ist im Wesentlichen durch die Dissoziation der Kollagenmoleküle aus der kompakten, D-periodischen Packung gekennzeichnet (Abbildung 3.16, A Blockpfeile). An einigen Stellen mit einer

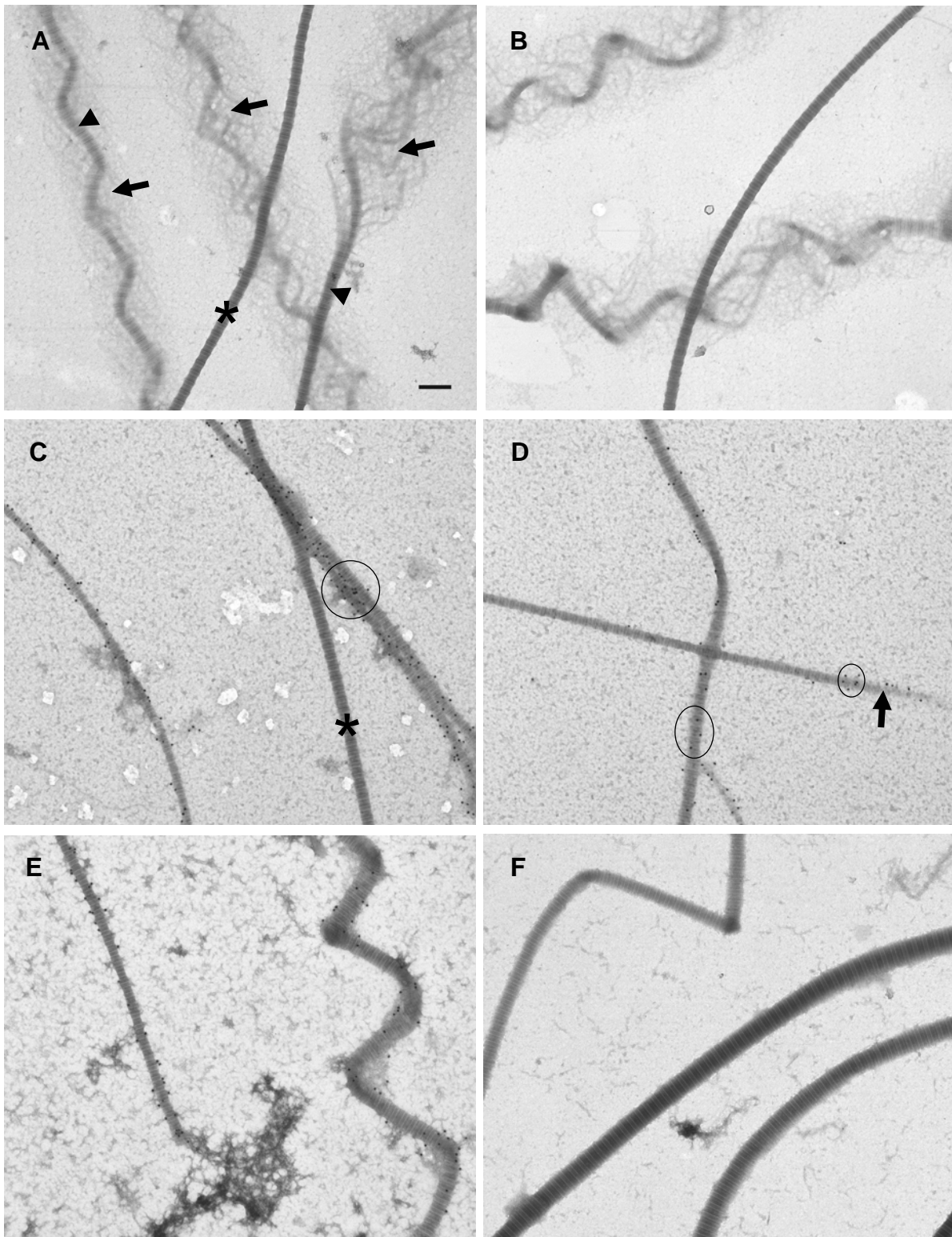


Abbildung 3.16: Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten der adulten humanen Haut in 0,1 M Essigsäure. Alle Extrakte wurden für 15 min mit Essigsäure inkubiert. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen (Kreise). **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. Blockpfeile: Fibrillenfragmente mit aufgelöster Fibrillenstruktur. Pfeilköpfe: kompakte Fibrillenabschnitte mit Bänderungsmuster. Sternchen: intakte Fibrille. **B:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **C:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). Sternchen: Fibrille ohne Immunogold-Markierung. **D:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). Blockpfeil: mechanisch generiertes Fibrillenende mit Immunogold-Markierung. **E:** Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Goldpartikel). **F:** Kontrolle ohne Primäntikörper. Messbalken: 200 nm

kompakten Fibrillenstruktur konnte dennoch das für Kollagenfibrillen typische Bänderungsmuster identifiziert werden (Abbildung 3.16, A Pfeilköpfe). Zusätzlich waren diese Fibrillen mechanisch flexibel, das heißt durch zahlreiche Knicke entlang ihrer Längsachse gekennzeichnet. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Extrakten, die sequenziell für 5, 15, 30 und 60 min mit Essigsäure inkubiert wurden, konnte kein Unterschied in der Intensität der Deformation oder in der Menge deformierter Kollagenfibrillen festgestellt werden.

Eine Immunogold-Markierung mit den Kollagen V-Antikörpern 18G5, 6A7 und 13F6 konnte weder in kompakten Kollagenfibrillen noch in Kollagenfibrillen mit aufgelöster Struktur detektiert werden (Abbildung 3.16, A). Auch der Antikörper MAB3393 gegen die $\alpha 2(V)$ -Kette produzierte keine Immunogold-Markierung von Kollagenfibrillen (Abbildung 3.16, B). Kollagen I konnte hingegen sowohl in Kollagenfibrillen mit einer intakten Fibrillenstruktur als auch in deformierten Kollagenfibrillen lokalisiert werden (Abbildung 3.16, C), wobei einige fibrilläre Fragmente mit einer kompakten Struktur keine Immunogold-Markierung mit Kollagen I-Antikörpern aufweisen (Abbildung 3.17, C Sternchen). An den mechanisch generierten Enden solcher Fibrillen, konnte hingegen eine Markierung mit Kollagen I-Antikörpern festgestellt werden (Abbildung 3.16, D Blockpfeil). Ebenfalls wurde die Immunogold-Elektronenmikroskopie von Essigsäure-Extrakten der Haut mit Kollagen III-Antikörpern durchgeführt. Auch bei der Verwendung von Kollagen III-Antikörpern konnte eine deutliche Markierung von Kollagenfibrillen festgestellt werden (Abbildung 3.16, E). Wie mit Kollagen I-Antikörpern waren auch mit Kollagen III-Antikörpern sowohl kompakte als auch deformierte Fibrillenabschnitte markiert.

3.1.15 Proteolytische Demaskierung dermalen Kollagenfibrillen

Zusätzlich zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Essigsäure-Extrakten der adulten humanen Haut wurde auch Immunogold-Elektronenmikroskopie mit Extrakten nach einer proteolytischen Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase oder MMP-1 durchgeführt (Abbildung 3.17). Durch die Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase konnte ein lateraler Abbau von Fibrillen festgestellt werden (Abbildung 3.17, A und B Blockpfeile). Bereiche, die durch die Einwirkung der bakteriellen Kollagenase im Durchmesser reduziert waren, blieben in ihrer Struktur dennoch

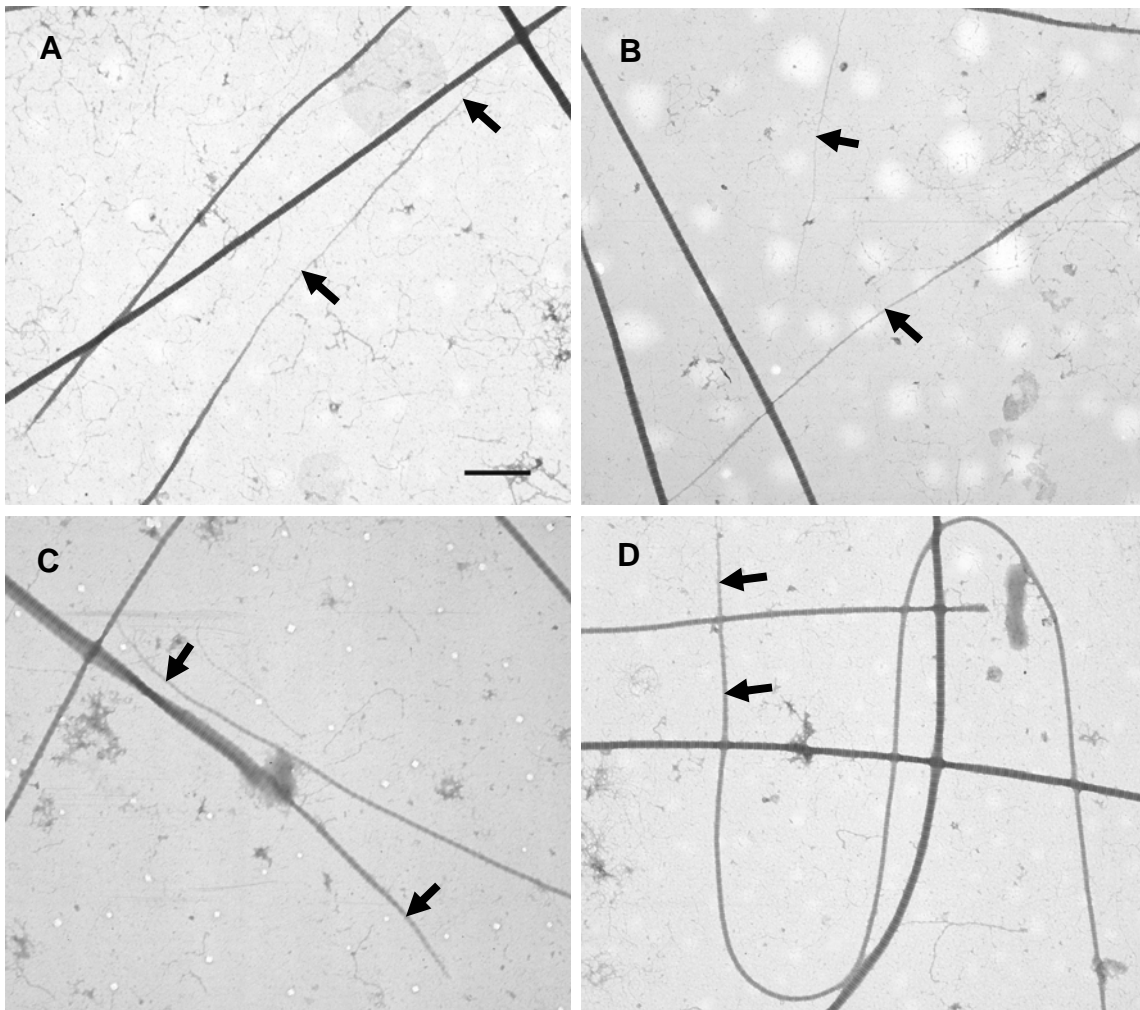


Abbildung 3.17: Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten der adulten humanen Haut nach enzymatischer Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase oder MMP-1. A und B: Enzymatische Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase (CLS-1). **C und D:** Enzymatische Vorbehandlung mit rekombinantem humanem MMP-1. **A und C:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B und D:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. Blockpfeile: Enzymatisch verdaute Fibrillenabschnitte. Messbalken: 500 nm

kompakt. Eine Markierung von Kollagenfibrillen mit den Kollagen V-Antikörpern 13F6 (Abbildung 3.17, A) oder MAB3393 (Abbildung 3.17, B) wurde weder an lateral verdauten noch an intakten Fibrillenabschnitten festgestellt. Ebenso konnte keine Immunogold-Markierung nichtfibrillärer Suprastrukturen festgestellt werden. Im Unterschied zu der Vorbehandlung mit bakterieller Kollagenase wurden Kollagenfibrillen durch rekombinant hergestelltes humanes MMP-1 nicht lateral abgebaut. Hingegen wurden Veränderungen an den mechanisch generierten Enden von Kollagenfibrillen beobachtet, die im Vergleich zu Extrakten suprastruktureller Fragmente ohne proteolytische Vorbehandlung (Abbildung 3.15, A Blockpfeile), spitz zulaufen (Abbildung 3.17, C und D Blockpfeile). Auch in diesen Abschnitten der Kollagenfibrillen wurde keine Immunogold-Markierung mit den Kollagen

V-Antikörpern 13F6 (Abbildung 3.17, C) und MAB3393 (Abbildung 3.17, D) festgestellt.

3.2 Untersuchungen fibrillärer Kollagene aus Wundgewebe und junger Haut

Es wurde hier auch untersucht, ob sich die Zusammensetzung der fibrillären Kollagene in Abhängigkeit zu der Entwicklung und dem Alter der Haut ändert. Da Kollagen V ein Nukleationskeim für die Fibrillogene heterotypischer Kollagenfibrillen ist (Adachi und Hayashi, 1986; Birk *et al.*, 1990b), wurde in den hier dargestellten Experimenten insbesondere die Zusammensetzung der α -Ketten des Kollagen V in der jungen Haut analysiert. Um eine altersabhängige Veränderung zu untersuchen, wurden die Vorhäute von Kindern im Alter zwischen 1 und 4 Jahren (siehe 3.2.1), Hautproben neugeborener Mäuse sowie Hautproben 14 Tage alten Mäusen desselben Wurfes (siehe 3.2.2, 3.2.3) vergleichend zur adulten Haut (siehe 3.1) untersucht. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, ist das Wundheilungs-Modell ein System, an dem die Neubildung von heterotypischen Kollagenfibrillen der Haut untersucht werden kann (Birk *et al.*, 1990b; White *et al.*, 2002). Außerdem gibt es Hinweise, wonach im Granulationsgewebe von Brandwunden eine größere Menge an Kollagen V als in unversehrter Haut vorkommt (Hashimoto *et al.*, 1986; Hashimoto *et al.*, 1988). Es wurde daher die Zusammensetzung der α -Ketten des Kollagen V in dem Granulationsgewebe excisionaler Hautwunden von 10 Wochen alten Mäusen untersucht (siehe 3.2.4).

3.2.1 Fibrilläre Kollagene in junger humaner Haut

Für die Untersuchung der Kollagene in junger humaner Haut wurden aus Vorhäuten von Kindern im Alter zwischen 1 und 4 Jahren die Kollagene nach limitiertem Verdau mit Pepsin isoliert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Wie zuvor in Proben der adulten humanen Haut (siehe 3.1.8, 3.1.11), kamen dabei die $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 2(V)$ -Kette in Vorhäuten von Kindern vor. Zusätzlich zu der $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 2(V)$ -Kette war jedoch auch die $\alpha 3(V)$ -Kette in Vorhautproben nachweisbar (Abbildung 3.18, A).

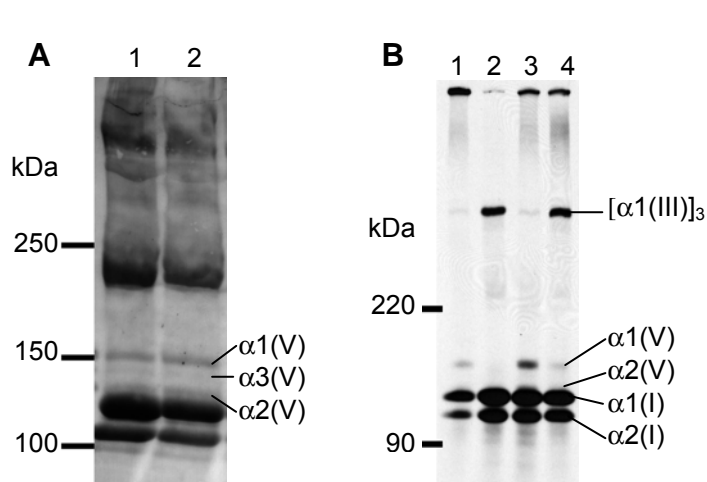


Abbildung 3.18: Analyse fibrillärer Kollagene aus jungen humanen Vorhäuten sowie aus kultivierten Fibroblasten junger humaner Vorhäute. **A:** Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel von humanen Vorhäuten nach limitiertem Verdau mit Pepsin (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen). 1: 1 Jahr und 6 Monate alter Proband; 2: 3 Jahre und 8 Monate alter Proband. **B:** Kollagen-Fluorogramm von Fibroblasten, die aus der Vorhaut eines 3 Jahre und 8 Monate alten Probanden gewonnen wurden. 1: Zellschicht ohne FKS; 2: Zellkulturmedium ohne FKS; 3: Zellschicht mit FKS; 4: Zellkulturmedium mit FKS.

Um zu überprüfen, ob die $\alpha 3(V)$ -Kette durch kultivierte Fibroblasten der Vorhäute 1- und 4-jähriger Kinder sezerniert wird, wurden Kollagen-Fluorogramme angefertigt (Abbildung 3.18, B). Dabei konnte sowohl die $\alpha 1(V)$ - als auch die $\alpha 2(V)$ -Kette anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität in den Zellschichten von Fibroblastenkulturen identifiziert werden. Die $\alpha 3(V)$ -Kette war hingegen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von FKS während der Kultivierung nicht zu finden (Abbildung 3.18, B). Im Gegensatz zu Fibroblastenkulturen ohne FKS wurde Kollagen V in geringen Mengen im Zellkulturmedium von Fibroblastenkulturen mit FKS gefunden (Abbildung 3.18, B 4). Die $\alpha 1(I)$ -Kette sowie die $\alpha 2(I)$ -Kette wurden in allen Kulturansätzen sowohl in den Zellschichten als auch in den Zellkulturmedien detektiert (Abbildung 3.18, B). Die $\alpha 1(III)$ -Kette war in Kollagen-Fluorogrammen hingegen nur in den Zellkulturmedien, nicht aber in den Zellschichten, nachweisbar (Abbildung 3.18, B 2 und 4).

3.2.2 Kollagen α -Ketten in junger muriner Haut

Um Änderungen in der Zusammensetzung von Kollagen α -Ketten in der postnatalen Entwicklung der Haut zu untersuchen, wurden Hautproben von neugeborenen Mäusen und 14 Tage alten Mäusen untersucht. Insbesondere sollte daher die Zusammensetzung der α -Ketten von Kollagen V untersucht werden (Abbildung 3.19, A). Für die elektrophoretische Auftrennung von Kollagen α -Ketten wurden die Hautproben junger Mäuse limitiert mit Pepsin verdaut. In der Haut von sowohl

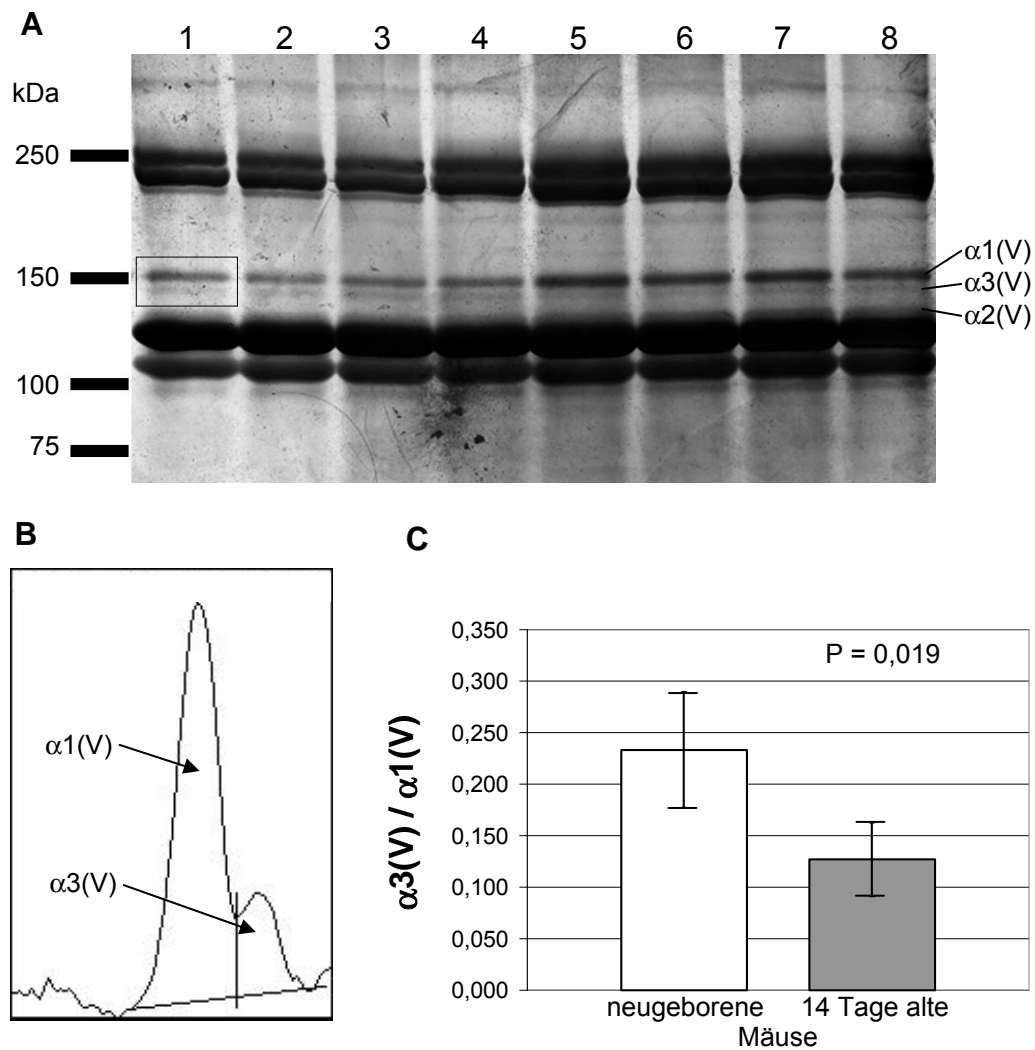


Abbildung 3.19: Vergleichende Analyse von Kollagenen der Haut neugeborener und 14 Tage alter Wildtypmäuse. A: Silbergefärbtes SDS-Gel von muriner Haut nach einem limitierten Pepsin-Verdau (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen). 1 - 4: neugeborene Mäuse eines Wurfes. 5-8: 14 Tage alte Mäuse desselben Wurfes wie 1 - 4. **B:** Graphische Darstellung der densitometrisch ermittelten Grauwerte aus A 1. **C:** Graphische Darstellung des Verhältnisses der für die $\alpha3(V)$ -Bande ermittelten Grauwerte zu der für die $\alpha1(V)$ -Bande ermittelten Grauwerte (n = 4). Weiße Säule: neugeborene Mäuse (1 - 4 in A); Graue Säule: 14 Tage alte Mäuse (5 - 8 in A).

neugeborenen als auch 14 Tage alten Mäusen konnten die $\alpha1(V)$ -, die $\alpha2(V)$ - sowie die $\alpha3(V)$ -Ketten detektiert werden. Bei einem Vergleich der in der SDS-PAGE detektierten α -Ketten von neugeborenen Mäusen (Abbildung 3.19, A 1 - 4) und deren 14 Tage alten Geschwistern (Abbildung 3.19, A 5 - 8) konnte festgestellt werden, dass die Intensität der $\alpha3(V)$ -Bande im Verhältnis zu der $\alpha1(V)$ -Bande in neugeborenen Mäusen höher ist.

Das densitometrisch ermittelte, quantitative Verhältnis der $\alpha3(V)$ -Kette zu der $\alpha1(V)$ -Kette in Proben neugeborener Mäuse betrug 0,233 mit einer über „Excel“ ermittelten Standardabweichung von 0,056. Das entsprechende Verhältnis für die 14

Tage alten Mäuse entsprach hingegen 0,127 mit einer Standardabweichung von 0,036. Ein Vergleich dieser Werte verdeutlicht, dass das Verhältnis der $\alpha 3(V)$ -Kette zu der $\alpha 1(V)$ -Kette in der Haut von neugeborenen Mäusen 1,83-fach höher ist als in der Haut von 14 Tage alten Mäusen (Abbildung 3.19, C). Der mit „Excel“ über einen zweiseitigen T-Test ermittelte P-Wert betrug 0,019.

3.2.3 Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen der jungen murinen Haut

In Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen von Hautproben 14 Tage alter Mäuse konnte im Bereich der Kollagen γ -Komponenten eine Doppelbande lokalisiert werden (Abbildung 3.20, 5 - 8). Auf Grund der fehlenden Markerbanden im Molekulargewichtsbereich oberhalb von 250 kDa konnten die Molekularmassen dieser Banden nicht verlässlich bestimmt werden. In Hautproben von neugeborenen Mäusen war hingegen auf der gleichen Höhe nur eine Proteinbande zu erkennen, die der oberen Proteinbande der γ -Komponenten entspricht (Abbildung 3.20, 1 - 4). Im Bandenmuster der Hautproben von 14 Tage alten Mäusen konnten außerdem zwischen den γ -Komponenten und den β -Komponenten drei weitere, schwach gefärbte Proteinbanden nachgewiesen werden (Abbildung 3.20, c, d, e). Auf der entsprechenden Höhe in Hautproben von neugeborenen Mäusen war die oberste dieser drei Banden nicht zu erkennen. Diese drei Proteinbanden (Abbildung 3.20, c - e) sowie die zwei Proteinbanden der γ -Komponenten von 14 Tage alten Mäusen (Abbildung 3.20, a, b) wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels der LC MS/MS analysiert.

In der Proteinbande a (Abbildung 3.20, a), die in Hautproben sowohl 14 Tage alter Mäuse als auch neugeborener Mäuse nachgewiesen werden konnte, wurde die $\alpha 1(III)$ -, $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und $\alpha 1(II)$ -Kette, identifiziert (Tabelle 3.4, a). Es wurden 3 Peptidfragmente detektiert, die eine signifikante Übereinstimmung mit der $\alpha 1(II)$ -Kette zeigen. Bei einem Vergleich eines dieser 3 Peptidfragmente (GIAGPQGPR) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ konnte eine 100 %ige und spezifische Übereinstimmung nur mit der Sequenz der $\alpha 1(II)$ -Kette der Maus nachgewiesen werden. Die Sequenzen der anderen beiden Peptidfragmente (GQPGVMGFPGPK und GFPGLPGPSGEPGK) weisen hingegen eine 100 %ige Übereinstimmung auch

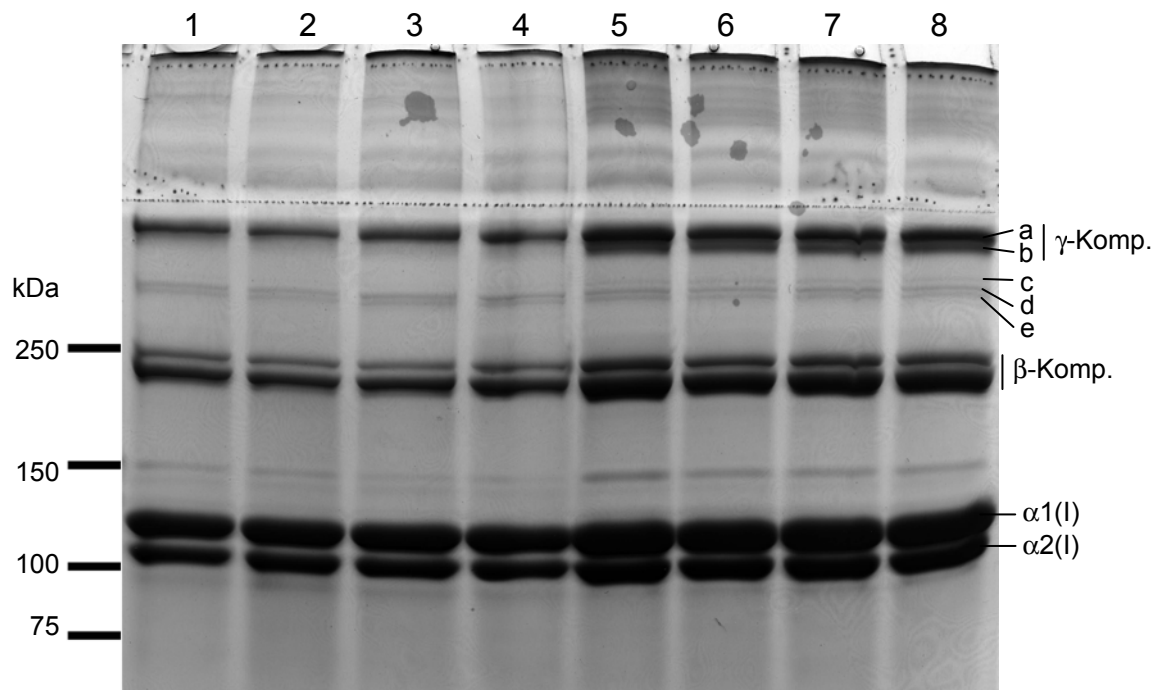


Abbildung 3.20: SDS-PAGE der jungen Mäusehaut nach einem limitiertem Pepsin-Verdau (Coomassie-Blau Färbung). 1 - 4: neugeborene Mäuse. 5 - 8: 14 Tage alte Mäuse. a,b,c,d,e: Proteinbanden die massenspektrometrisch untersucht wurden (Tabelle 3.4). (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen).

Tabelle 3.3: Verwendete Parameter für die Auswertung von Daten der LC MS/MS Analyse junger Mäusehaut mit Mascot Version 2.2 (matrix sciences).

verwendetes Enzym	Trypsin (<i>Sus scrofa</i>)
Fixierte Modifikationen	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikationen	Hydroxylation (P), Oxidation (M)
Massentoleranz für Peptidionen	+/- 0,3 Da
Massentoleranz für Fragmentionen	+/- 0,3 Da
maximale Anzahl fehlender Spaltung	1
Datenbank	Sprot 50.5
taxonomische Beschränkung	<i>Mus musculus</i>
Signifikanzgrenzwert	$P < 0,05$
<i>Ion score cut-off</i>	0

mit der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette beziehungsweise der $\alpha 1(\text{I})$ -Kette auf. In der Proteinbande b (Abbildung 3.20, b), die in Hautproben von neugeborenen Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die $\alpha 1(\text{III})$ - sowie die $\alpha 2(\text{I})$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.4, b). Demnach enthält die Proteinbande b Trimere der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette sowie Trimere der $\alpha 2(\text{I})$ - und $\alpha 1(\text{III})$ -Kette und/oder nur der $\alpha 2(\text{I})$ -Kette. Trimere der $\alpha 2(\text{I})$ -Kette, die im Gegensatz zu der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette keine inter-tripelhelikalen Cysteine aufweist, enthalten keine Disulfidbrücken. Die Identifizierung der $\alpha 2(\text{I})$ -Kette in der Proteinbande a durch eine Kontamination aus b kann nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Analyse der Proteinbande c (Abbildung 3.18, c), die ebenfalls nicht bei neugeborenen Mäusen nachgewiesen werden konnte, wurde die $\alpha 1(\text{I})$ -, $\alpha 1(\text{III})$ - sowie die $\alpha 2(\text{I})$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.4, c). Für die $\alpha 2(\text{I})$ -Kette wurde nur 1 Peptidfragment identifiziert, das eine signifikante Übereinstimmung zeigt. Bei einem Vergleich der Sequenz dieses Peptidfragments (GLPGEFGLPGPAGPR) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ konnte gezeigt werden, dass eine

Tabelle 3.4: Identifizierte Proteinkomponenten aus der massenspektrometrischen Untersuchung von SDS-Gelbanden der jungen Mäusehaut (Abbildung 3.20).

Proteinbande	Identifizierte Proteine	Peptide	Peptide P<0,05	protein score
a	Collagen alpha-1(III) chain precursor	49	35	1931
	Collagen alpha-1(I) chain precursor	16	11	607
	Collagen alpha-2(I) chain precursor	11	8	451
	Collagen alpha-1(II) chain precursor	3	3	101
b	Collagen alpha-1(III) chain precursor	15	9	565
	Collagen alpha-2(I) chain precursor	3	3	77
c	Collagen alpha-1(I) chain precursor	15	9	542
	Collagen alpha-1(III) chain precursor	8	5	250
	Collagen alpha-2(I) chain precursor	4	1	74
d	Collagen alpha-1(I) chain precursor	19	6	504
	Collagen alpha-2(I) chain precursor	11	4	274
	Collagen alpha-1(III) chain precursor	4	2	90
e	Collagen alpha-2(I) chain precursor	34	23	1316
	Collagen alpha-1(I) chain precursor	25	14	897
	Collagen alpha-1(III) chain precursor	21	9	607
	Collagen alpha-1(II) chain precursor	2	2	70

100 %ige Übereinstimmung nur mit der $\alpha 2(I)$ -Kette besteht. Auch in der Proteinbande d (Abbildung 3.18, d) konnten die $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und die $\alpha 1(III)$ -Ketten identifiziert werden (Tabelle 3.4, d). Für die $\alpha 1(III)$ -Kette wurden nur 2 Peptidfragmente mit einer signifikanten Übereinstimmung nachgewiesen. Bei einem Vergleich der Sequenz eines dieser Peptidfragmente (GEMGPAGIPGAPGLIGAR) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ erschien eine Übereinstimmung mit der $\alpha 1(III)$ -Kette aus unterschiedlichen Spezies. Eine Homologie mit anderen Proteinen wurde hingegen nicht festgestellt. Für das zweite Peptidfragment (GPAGPIGPPGPAGQPGDKGEGGSPGLPGIAGPR) konnte über „Blast search“ keine 100 %ige Übereinstimmung mit einer der über Proteindatenbanken zur Verfügung stehenden Sequenzen festgestellt werden. Bei der Analyse der Proteinbande e (Abbildung 3.18, e) wurden die $\alpha 2(I)$ -, $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 1(III)$ - und die $\alpha 1(II)$ -Ketten identifiziert (Tabelle 3.4, a). Es wurden 2 Peptidfragmente mit einer signifikanten Übereinstimmung mit der $\alpha 1(II)$ -Kette detektiert. Bei einem Vergleich eines dieser Peptidfragmente (GQPGVMGFPGPK) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ konnte eine 100 %ige Übereinstimmung sowohl mit der $\alpha 1(II)$ -Kette als auch mit der $\alpha 1(III)$ -Kette festgestellt werden. Der entsprechende Vergleich des zweiten Peptidfragments (GFPGLPGPSGEPGK) zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung sowohl mit der $\alpha 1(II)$ - als auch mit der $\alpha 1(I)$ -Kette der Maus. Demnach kann die Identifizierung der $\alpha 1(II)$ -Kette durch „Mascot“ in der Haut junger Mäuse nicht bestätigt werden.

Die Proteinbanden c, d und e, die sich bezüglich ihrer Zusammensetzung aus der $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - und $\alpha 1(III)$ -Kette nicht unterscheiden, können auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität weder den γ -Komponenten (Trimere) noch den β -Komponenten (Dimere) zugeordnet werden. Nichtkollagene (Pepsin-resistente) Proteine, deren Interaktion mit α -Ketten eine langsamere elektrophoretische Mobilität von β -Komponenten erklären würde, konnten in den Proteinbanden c, d und e nicht identifiziert werden.

3.2.4 α -Ketten des Kollagen V in dermalem Wundgewebe

Für vergleichende Untersuchungen von Kollagen α -Ketten zwischen normaler Haut und dermalem Wundgewebe, wurden Proben von 2 Wildtypmäusen einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen und in einer SDS-PAGE augetrennt (Abbildung 3.21, A).

Es konnten sowohl in Proben des Granulationsgewebes, das 8 Tage nach der Verwundung von 10 Wochen alten Mäusen gewonnen wurde (siehe 2.1.5) (in Kooperation mit Beate Eckes, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Köln, Deutschland), als auch in Proben normaler Haut derselben Tiere die $\alpha 1(V)$ -, $\alpha 2(V)$ - und $\alpha 3(V)$ -Kette identifiziert werden. Die Intensität der Coomassie-Blau

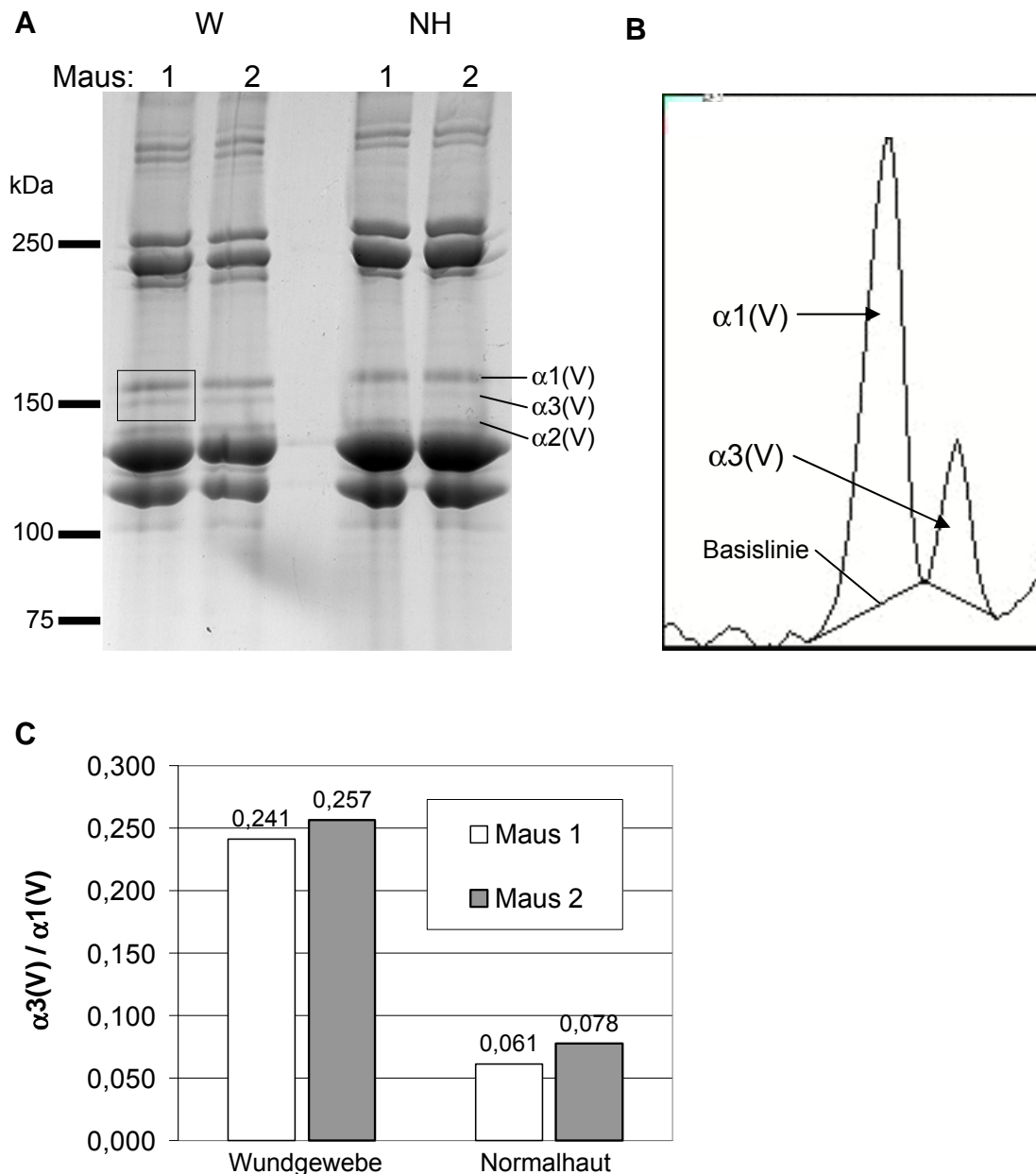


Abbildung 3.21: Quantitative Analyse von α -Ketten des Kollagen V in dermalem Wundgewebe im Vergleich zu normaler Haut. A: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit Wundgewebe (W) und normaler Haut (NH) zwei verschiedener Mäuse. Die Proben wurden einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen). **B:** Graphische Darstellung der densitometrisch ermittelten Grauwerte der $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 3(V)$ -Banden aus A, Wundgewebe, Maus 1. **C:** Graphische Darstellung des Verhältnisses der densitometrisch ermittelten Grauwerte der Kollagen $\alpha 3(V)$ - zu $\alpha 1(V)$ -Banden aus A.

gefärbten $\alpha 3(V)$ -Banden in Proben der normalen Haut (Abbildung 3.21, A *NH*) war im Vergleich zu den Proben des Granulationsgewebes (Abbildung 3.21, A *W*) schwächer. Bezüglich der Intensitäten Coomassie-Blau gefärbter $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 2(V)$ -Bande konnte hingegen kein Unterschied zwischen normaler Haut und dermalem Granulationsgewebe festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das densitometrisch ermittelte quantitative Verhältnis der $\alpha 3(V)$ -Kette zu der $\alpha 1(V)$ -Kette im Wundgewebe deutlich höher war als in Proben der normalen Haut (Abbildung 3.21, C). Dabei war das $\alpha 3(V)/\alpha 1(V)$ Verhältnis im Wundgewebe der ersten Maus 3,95-fach höher und in der zweiten Maus 3,29-fach als in der normalen Haut derselben Tiere.

3.3 Untersuchungen fibrillärer Kollagene aus Kulturen dermalen Fibroblasten

Vergleichend zu Suprastrukturen des dermalen Bindegewebes (siehe 3.1) wurden histologische (siehe 3.3.1), biochemische (siehe 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4) sowie elektronenmikroskopische (siehe 3.3.5) Analysen supramolekularer Aggregate aus Kulturen von humanen Hautfibroblasten durchgeführt. In diesen Kulturen wurde die Kollagensynthese durch die Zugabe von Ascorbinsäure (Vitamin-C) induziert, weil diese ein wichtiger Kofaktor der an der Kollagensynthese beteiligten Enzyme Prolylhydroxylase und Lysylhydroxylase ist. Es sollte einerseits die Kollagen-Zusammensetzung der Fibrillen analysiert und andererseits nach Kollagen V in extrafibrillären Suprastrukturen gesucht werden.

3.3.1 Lokalisation der Kollagene I und V

Kollagen I und V wurde in dreidimensional kultivierten Hautfibroblasten mit Doppelimmunfluoreszenz an Gefrierschnitten analysiert (Abbildung 3.22). In dem Zellverband solcher Kulturen, der aus mehreren Zellschichten aufgebaut ist, konnte sowohl Kollagen V (Abbildung 3.22, A grün) als auch Kollagen I nachgewiesen werden (Abbildung 3.22, B rot). Es war innerhalb des Zellverbandes eine Schicht zu beobachten, in der mit Antikörpern gegen Kollagen V oder Kollagen I eine intensivere

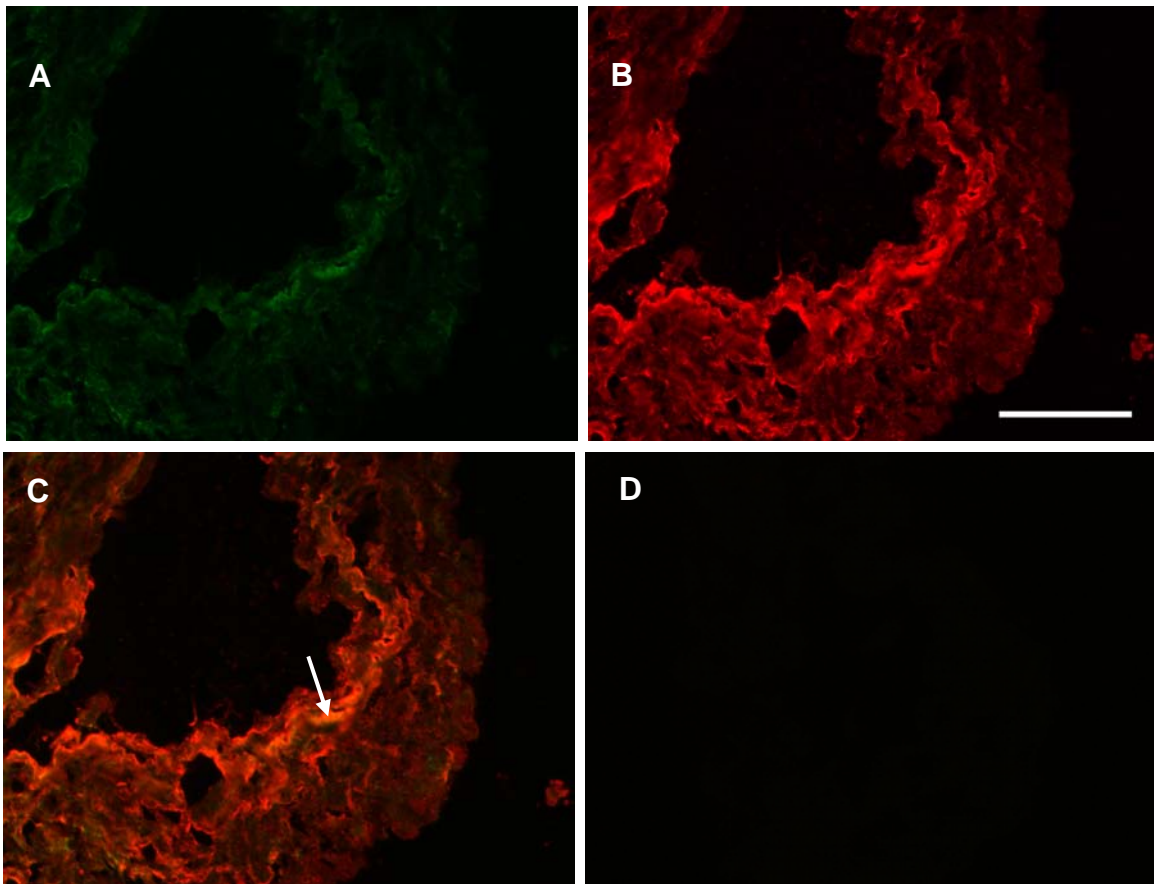


Abbildung 3.22: Doppelimmunfluoreszenz von dreidimensional kultivierten Fibroblasten, die aus adulter humaner Haut gewonnen wurden. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **B:** Kollagen I-Antikörper BP8082 (rot). **C:** Überlagerung von A und B. **D:** Kontrolle ohne Sekundärantikörper. Messbalken: 50 μm .

Immunfluoreszenz als in anderen Bereichen detektiert wurde (Abbildung 3.22, A Pfeil). Im Vergleich zu Kollagen V-Antikörpern konnte mit Kollagen I-Antikörpern allgemein jedoch eine intensivere Immunfluoreszenz detektiert werden. Im Bereich der besonders intensiven Immunfluoreszenz wurde eine Kolokalisation von Kollagen I und V beobachtet (Abbildung 3.22, C Pfeil), wohingegen in den übrigen Regionen vorwiegend Kollagen I vorkam.

Zur Demaskierung von Kollagen-Epitopen wurden die Gefrierschnitte mit 0,1 M Essigsäure vorinkubiert (Abbildung 3.23). Die Immunfluoreszenz mit dem Antikörper 13F6 gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette war in Gefrierschnitten mit Essigsäurevorbehandlung stärker als in solchen ohne Essigsäurevorbehandlung (Abbildung 3.23, A), wobei wiederum eine Schicht mit besonders intensiver Markierung zu erkennen war (Abbildung 3.23, A Pfeile). Mit Kollagen I-Antikörpern wurde hingegen dieser von der Essigsäurevorbehandlung abhängige Unterschied in

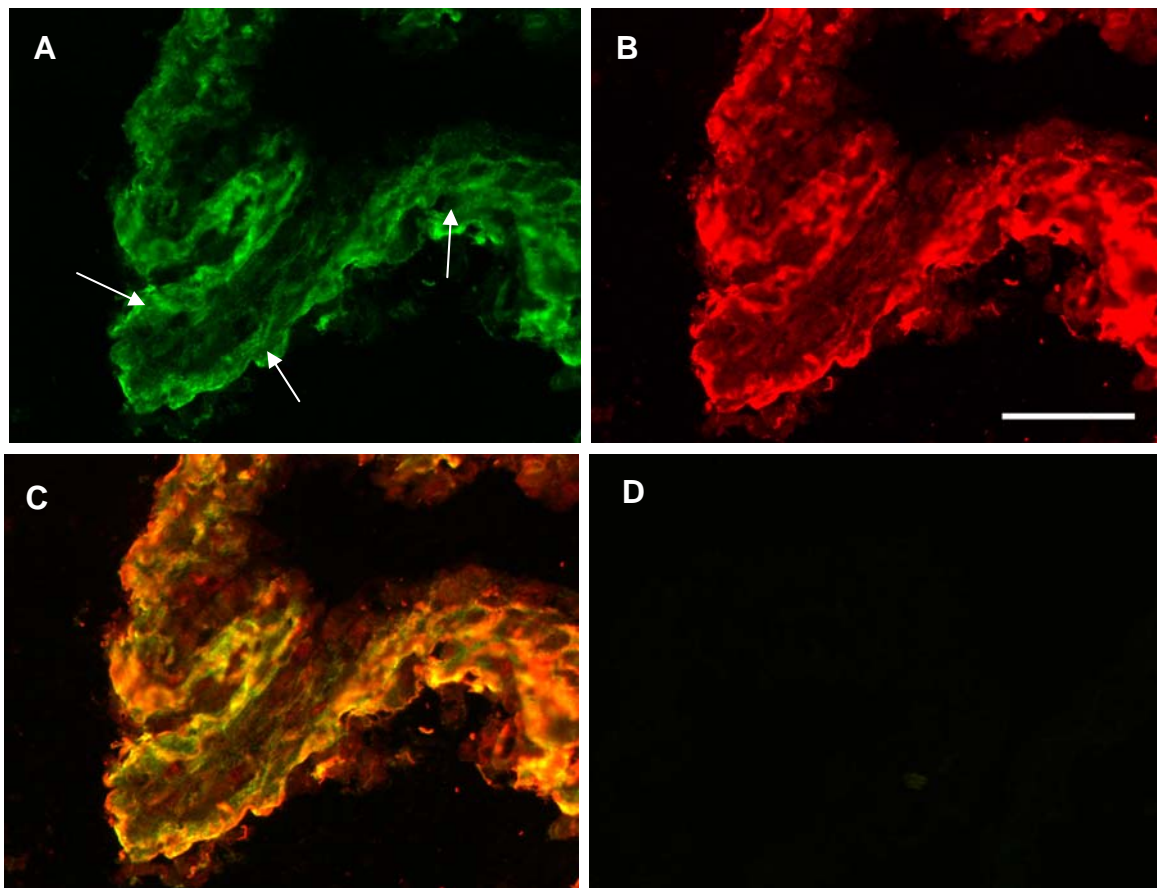


Abbildung 3.23: Doppelimmunfluoreszenz von Gefrierschnitten dreidimensional kultivierten Fibroblasten, die aus adulter humaner Haut gewonnen wurden, nach einer Vorbehandlung mit 0,1 M Essigsäure. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). B: Kollagen I-Antikörper BP8028 (rot). C: Überlagerung von A und B; D: Kontrolle ohne Sekundärantikörper. Messbalken: 50 μ m.

der Intensität der Immunfluoreszenz nicht festgestellt (Abbildung 3.23, B). Noch deutlicher als in histologischen Schnitten von Fibroblastenkulturen, die nicht mit Essigsäure vorbehandelt wurden, konnte nach einer Demaskierung von Epitopen eine Kolokalisation von Kollagen I und Kollagen V nachgewiesen werden (Abbildung 3.23, C). Demnach kommen Kollagen V und I in kultivierten Fibroblasten in einer gemeinsamen Matrix vor, wobei die Epitope des N-terminalen Propeptids von Kollagen V jedoch teilweise maskiert sind.

3.3.2 Kollagensynthese durch kultivierte Fibroblasten

Um Auskunft über die Kollagensynthese von adulten humanen Hautfibroblasten zu erhalten, wurden die Kulturen mit radioaktivem ^{14}C -Prolin metabolisch markiert, die Kollagene über einen limitierten Pepsin-Verdau gereinigt, durch SDS-PAGE mit nachfolgender Fluorographie nachgewiesen (Abbildung 3.24) (siehe 2.3.3.3, 2.4.4).

Sowohl die $\alpha 1(I)$ - als auch die $\alpha 2(I)$ -Kette wurden in der Zellschicht sowie im separierten Zellkulturmedium nachgewiesen. Die $\alpha 1(III)$ -Kette, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen im hochmolekularen Bereich als Trimer wandert, wurde im Gegensatz zu Kollagen I nur im Zellkulturmedium, nicht aber in der Zellschicht nachgewiesen (Abbildung 3.24, A 2 und 4, B 2 und 4). Um zu untersuchen, ob die fehlende Sezernierung von Kollagen III in die Zellschicht im Zusammenhang mit einer Inhibition von *cross links* durch BAPN steht, wurden Zellkulturansätze auch ohne Zugabe von BAPN kultiviert. Kollagen III wurde in entsprechenden Ansätzen ebenfalls ausschließlich im Medium nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen Fibroblastenkulturen mit und ohne BAPN wurde in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 200 und 300 kDa festgestellt. In Ansätzen ohne BAPN konnten drei Proteinbanden nachgewiesen werden, die bei der Zugabe von BAPN nicht detektiert wurden (Abbildung 3.24, B 3 Klammer).

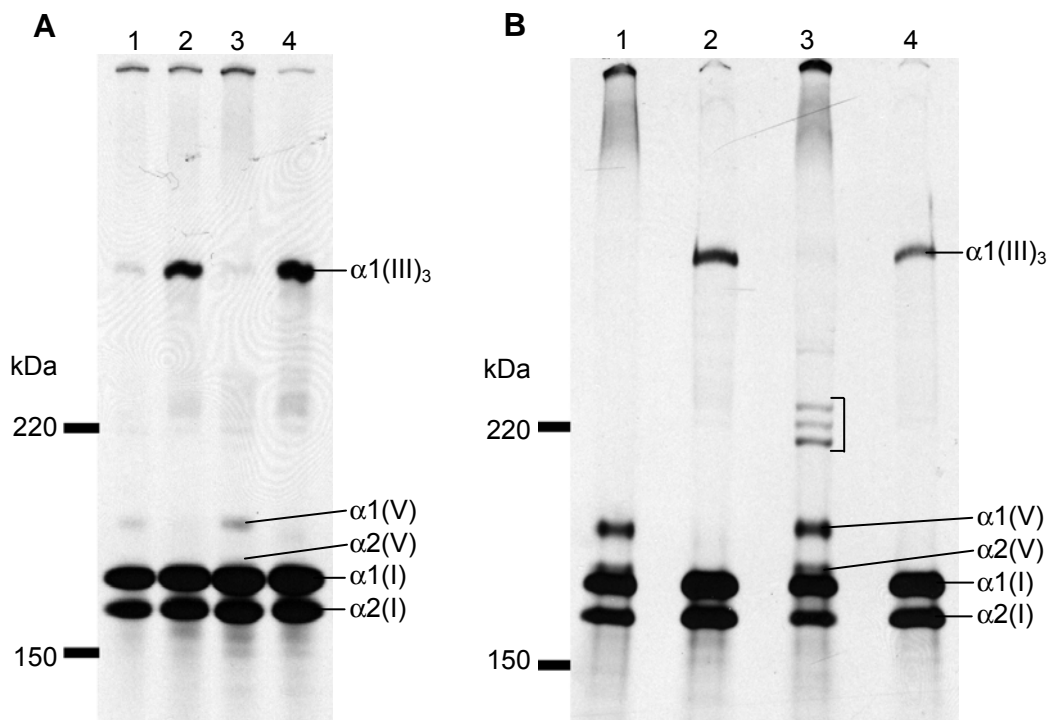


Abbildung 3.24: Kollagen-Fluorographie von Monolayerkulturen adulter humaner Hautfibroblasten. Alle Proben wurden einem limitierten Pepsin-Verdau unterzogen. **A:** Monolayerkulturen +/- FKS, +BAPN. 1: Zellschicht ohne FKS; 2: Zellkulturmedium ohne FKS; 3: Zellschicht mit FKS; 4: Zellkulturmedium mit FKS. **B:** Monolayerkulturen + FKS, +/- BAPN. 1: Zellschicht mit BAPN; 2: Zellkulturmedium mit BAPN; 3: Zellschicht ohne BAPN; 4: Zellkulturmedium ohne BAPN. (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen)

Im Gegensatz zu Kollagen III wurden die $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 2(V)$ -Ketten nur in den Zellschichten und nicht in den Medien identifiziert (Abbildung 3.24, A 1 und 3, B 1 und 3). Die $\alpha 3(V)$ -Kette kam in Fibroblastenkulturen nicht nachweisbar vor. Bezüglich der Sezernierung von Kollagen V in die Zellschicht oder das Medium wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen Kulturen mit oder ohne BAPN festgestellt (Abbildung 3.24, B 1 und 3). Um zu untersuchen, ob Faktoren von FKS in den Medien die Synthese einzelner α -Ketten induzieren, wurden Kulturen mit und ohne FKS angelegt. In der Zellschicht von Kulturen ohne FKS wurde ein schwächeres, aber deutliches Signal der α -Ketten des Kollagen V erhalten als in Gegenwart von FKS (Abbildung 3.24, A 1). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Synthese von Kollagen V und FKS konnte demnach nicht festgestellt werden. Demnach sezernieren kultivierte Fibroblasten Kollagen III hauptsächlich in löslicher Form, wohingegen Kollagen V vorwiegend in der Matrix der Zellschicht zu finden ist.

3.3.3 Immunblots der Kollagene III und V aus kultivierten Fibroblasten

Um Zusammenhänge zwischen der Prozessierung und der suprastrukturellen Organisation (siehe 3.3.5) von fibrillären Kollagenen zu untersuchen, wurden Immunblots mit Fibroblastenkulturen durchgeführt (Abbildung 3.25). Es sollte gezeigt werden, welche Teilprozessierungen des Kollagen V und des Kollagen III in Fibroblastenkulturen vorkommen. Mit dem Kollagen V-Antikörper 13F6, der gegen einen Teil der COL2 sowie der NC2 Domäne des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette gerichtet ist (siehe 2.2.1) (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007), konnten in Proteinextrakten aus Fibroblastenkulturen mehrere distinkte Proteinbanden detektiert werden (Abbildung 3.25, A). Die Reaktivität des Antikörpers 13F6 lässt die Detektion der Pro $\alpha 1(V)$ -, der pN $\alpha 1(V)$ - und der reifen $\alpha 1(V)$ -Kette jedoch nicht der pC $\alpha 1(V)$ -Kette oder des großen tripelhelikalen Abschnittes (COL1) zu (Imamura *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2001; Unsöld *et al.*, 2002; Gopalakrishnan *et al.*, 2004; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Mit der stärksten Intensität wurde im Extrakt der Zellschicht die pN $\alpha 1(V)$ -Kette mit einer Molekularmasse von ca. 220 kDa detektiert (Abbildung 3.25, A 1). Unter Einberechnung eines Korrekturfaktors (0,825) ergibt sich daraus eine Molekularmasse von ca. 180 kDa. Zusätzlich wurden in der Zellschicht weitere,

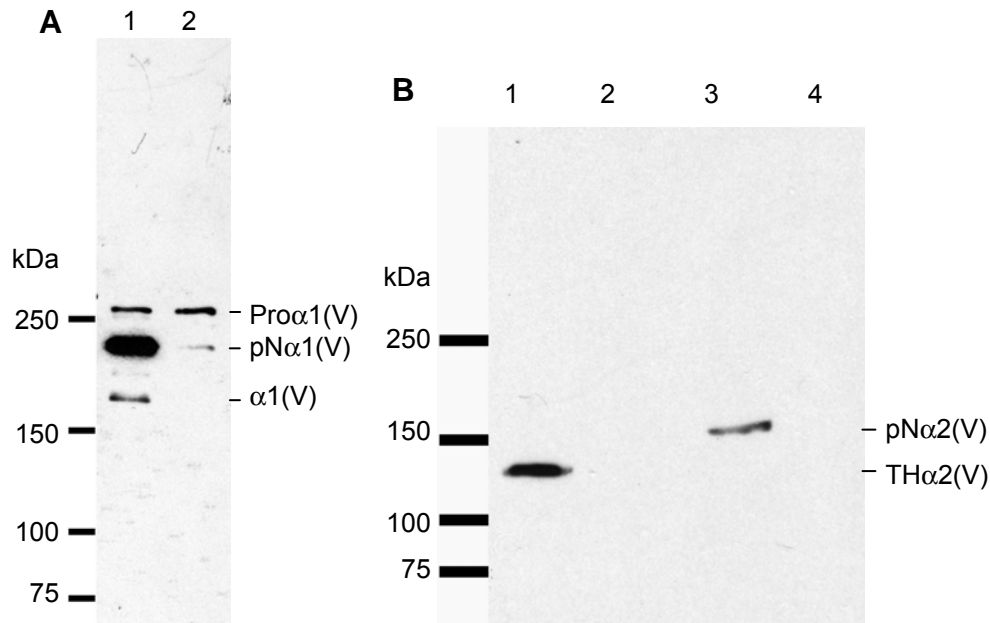


Abbildung 3.25: Immunblots von Kulturen adulter humaner Hautfibroblasten mit Kollagen V-Antikörpern. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. 1: Zellschicht mit FKS; 2: Zellkulturmedium mit FKS (SDS-PAGE: reduzierende Bedingungen). **B:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. 1 und 2: Ansätze nach limitiertem Pepsin-Verdau. 1: Zellschicht mit FKS; 2: Zellkulturmedium mit FKS. 3: Zellschicht mit FKS; 4: Zellkulturmedium mit FKS. (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen).

jedoch schwächere Banden der Pro α 1(V)-Kette bei ca. 285 kDa (korrigiert 235 kDa) sowie der reifen α 1(V)-Kette bei ca. 175 kDa (korrigiert 145 kDa) detektiert. In den Medien wurden mit demselben Antikörper die Pro α 1(V)- und die pN α 1(V)-Ketten identifiziert (Abbildung 3.25, A 2). Die reifen α 1(V)-Kette kam in den Medien hingegen nicht nachweisbar vor. Im Gegensatz zu den in der Zellschicht markierten Banden war die Intensität der pN α 1(V)-Kette im Zellkulturmedium schwächer als das der Pro α 1(V)-Kette.

Mit dem Kollagen V-Antikörper MAB3393, der spezifisch ein Epitop der großen Tripelhelix der α 2(V)-Kette erkennt (siehe 3.1.8), konnte Kollagen V ebenfalls in der Zellschicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.25, B 1 und 3). Im Zellkulturmedium war hingegen keine Immunreaktivität mit demselben Antikörper festzustellen (Abbildung 3.25, B 2 und 4). In der Zellschicht von Fibroblastenkulturen konnte mit dem Antikörper MAB3393 nach limitiertem Pepsin-Verdau die tripelhelikale Domäne (TH) der α 2(V)-Kette bei ca. 140 kDa (korrigiert 115 kDa) aufgefunden werden (Abbildung 3.25, B 1). In Homogenaten der Zellschicht, die in Neutralsalzpuffer

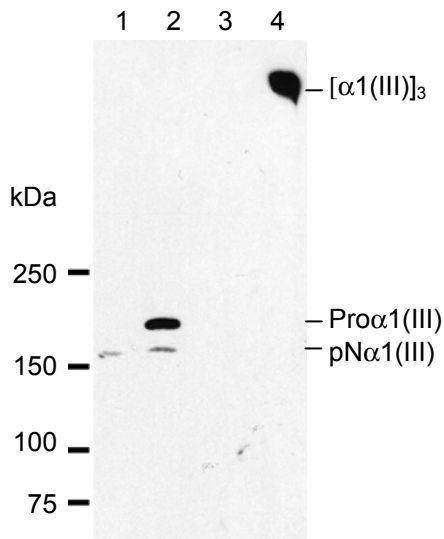


Abbildung 3.26: Immunblot von Kulturen adulter humaner Hautfibroblasten mit Kollagen III-Antikörpern. (Antikörper MAB3392). Kultivierung in Anwesenheit von FKS. 1: Zellschicht (reduzierende Bedingungen); 2: Zellkulturmedium (reduzierende Bedingungen); 3: Zellschicht (nicht-reduzierende Bedingungen); 4: Zellkulturmedium (nicht-reduzierende Bedingungen).

extrahiert wurden, war die $\alpha 2(V)$ -Kette bei einer Molekularmasse von ca. 170 kDa (korrigiert 140 kDa) lokalisiert, was der Größe der $pN\alpha 2(V)$ -Kette entspricht (Abbildung 3.25, B 3). Kollagen III, das mit Hilfe der Kollagen-Fluorographie im Zellkulturmedium von Fibroblastenkulturen nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3.2), wurde ebenfalls über Immunblots in Proteinextrakten aus Fibroblastenkulturen detektiert. Unter reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE wandert Kollagen III des Zellkulturmediums bei ca. 185 kDa (korrigiert 150 kDa) (Abbildung 3.26, 2). Zusätzlich zu dieser Proteinbande wurde eine zweite, jedoch schwächere Proteinbande bei ca. 165 kDa (korrigiert 135 kDa) detektiert. Entsprechend der elektrophoretischen Mobilität handelt es sich bei diesen Banden um die $Pro\alpha 1(III)$ -Kette sowie die $pN\alpha 1(III)$ -Kette (Krieg *et al.*, 1979; Fessler und Fessler, 1979; Hedman *et al.*, 1982). Im Gegensatz zu Kollagen-Fluorogrammen (siehe 3.3.2), in denen Kollagen III nicht in der Zellschicht lokalisiert wurde, konnte hingegen mit Immunblots ein schwaches Signal der $pN\alpha 1(III)$ -Kette in der Zellschicht detektiert werden (Abbildung 3.26, 1). Unter nicht reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE konnten Kollagen III-Trimere im Zellkulturmedium jedoch nicht in der Zellschicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.26, 4).

3.3.4 Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen kultivierter Fibroblasten

Um zu untersuchen ob neben Kollagen I, III und V weitere fibrilläre Kollagene wie Kollagen II und XI durch kultivierte dermale Fibroblasten synthetisiert werden, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die Zellschicht sowie das Zellkulturmedium von Monolayerkulturen limitiert mit Pepsin verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3.27).

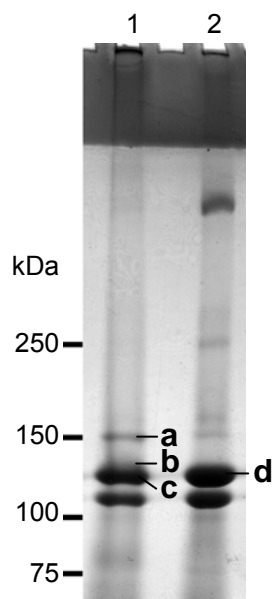


Abbildung 3.27: SDS-PAGE von Monolayerkulturen adulter humaner Hautfibroblasten nach einem limitiertem Pepsin-Verdau (Coomassie-Blau Färbung). a, b, c, d: Proteinbanden die massenspektrometrisch untersucht wurden (Tabelle 3.6). (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen)

Tabelle 3.5: Verwendete Parameter für die Auswertung von Daten der LC MS/MS Analyse von Kollagenen aus Fibroblastenkulturen mit Mascot Version 2.2 (matrix sciences).

verwendetes Enzym	Trypsin (<i>Sus scrofa</i>)
Fixierte Modifikationen	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikationen	Oxidation (M), Oxidation (P)
Massentoleranz für Peptidionen	+/- 0,3 Da
Massentoleranz für Fragmentionen	+/- 0,3 Da
maximale Anzahl fehlender Spaltung	1
Datenbank	NCBIInr
taxonomische Beschränkung	<i>Homo sapiens</i>
Signifikanzgrenzwert	P<0,05
<i>Ion score cut-off</i>	20

Entsprechend der elektrophoretischen Mobilität von Monomeren der fibrillären Kollagene in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden Proteinbanden aus einem Molekulargewichtsbereich zwischen 160 und 100 kDa ausgeschnitten und untersucht (Abbildung 3.27, a, b, c, d). Die für die Auswertung von LC MS/MS Daten mit „Mascot“ verwendeten Parameter sind in der Tabelle 3.5 dargestellt.

Die Proteinbande a (Abbildung 3.27, 1 a) der Zellschicht, wurde auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität der $\alpha 1(V)$ -Kette zugeordnet (Tabelle 3.6, a). In dieser Proteinbande konnte die humane Kollagen $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 1(V)$ - sowie die $\alpha 1(XI)$ -Kette identifiziert werden. Es wurde nur 1 Peptidfragment identifiziert, welches signifikant mit der Proteinsequenz der $\alpha 1(XI)$ -Kette übereinstimmte. Der Vergleich der Aminosäuresequenz dieses Peptidfragments (KLGVPGLPGYPGRQ) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ ergab jedoch eine komplette Übereinstimmung sowohl mit der $\alpha 1(XI)$ -Kette als auch der $\alpha 1(V)$ -Kette. Dementsprechend wurde kein Peptidfragment identifiziert, das nur der $\alpha 1(XI)$ -Kette zugeordnet werden kann. In der Proteinbande b der Zellschicht (Abbildung 3.27, 1 b), die auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität der $\alpha 2(V)$ -Kette zugeordnet wurde, konnten die humanen $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(V)$ - und die $\alpha 1(III)$ -Ketten identifiziert werden (Tabelle 3.6, b). Für die $\alpha 1(III)$ -Kette wurde nur 1 Peptidfragment mit einer signifikanten Übereinstimmung gefunden. Bei einem Vergleich der entsprechenden Aminosäuresequenz (RGPPGLAGAPGLRG)

Tabelle 3.6: Identifizierte Proteinkomponenten aus der massenspektrometrischen Untersuchung von SDS-Gelbanden kultivierter, humaner Hautfibroblasten (Abbildung 3.27).

Proteinbande	Identifizierte Proteine	Peptide	Peptide P<0,05	protein score
a	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	8	3	356
	collagen alpha 1(V) chain precursor [Homo sapiens]	8	6	350
	collagen type XI alpha-1 [Homo sapiens]	2	1	61
b	Collagen, type I, alpha 1 [Homo sapiens]	28	18	1360
	type V procollagen alpha 2 chain [Homo sapiens]	11	7	544
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	2	1	84
c	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	29	17	1336
	alpha-1 (III) collagen [Homo sapiens]	2	1	74
d	prepro-alpha1(I) collagen [Homo sapiens]	33	18	1613
	collagen type III alpha 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]	2	1	76

mit Proteindatenbanken über „Blast search“ ergab sich eine 100 %ige Übereinstimmung nur mit der Sequenz der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette des Menschen und des Schimpansen. In der Proteinbande c der Zellschicht (Abbildung 3.27, 1 c) wurden die humane $\alpha 1(\text{I})$ -Kette und die $\alpha 1(\text{III})$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.6, c). Für die $\alpha 1(\text{III})$ -Kette wurde nur 1 Peptidfragment mit einer signifikanten Übereinstimmung gefunden, dessen Aminosäuresequenz dem in der Proteinbande b identifizierten Peptidfragments entspricht. Die Proteinbande d des Zellkulturmediums wurde auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität der $\alpha 1(\text{I})$ -Kette zugeordnet (Abbildung 3.27, 2 d). Es konnten dabei die humane $\alpha 1(\text{I})$ -Kette und die $\alpha 1(\text{III})$ -Kette identifiziert werden (Tabelle 3.6, d). Für die $\alpha 1(\text{III})$ -Kette wurde 1 Peptidfragment mit einer signifikanten Übereinstimmung gefunden. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz (KGSPGAQGPPGAPGPLGIAGITGARG) mit Proteindatenbanken über „Blast search“ ergab sich eine 100 %ige Übereinstimmung nur mit der Kollagen $\alpha 1(\text{III})$ -Kette des Menschen und des Schimpansen. Demnach sezernieren kultivierte, dermale Fibroblasten außer den Kollagenen I, III und V keine weiteren fibrillären Kollagene wie Kollagen II oder X.

3.3.5 Bindegewebs-Suprastrukturen kultivierter Fibroblasten

Um zu bestimmen, ob Kollagen V außer in Kollagenfibrillen auch in extrafibrillären Suprastrukturen vorkommt, wurden Extrakte suprastruktureller Fragmente von dreidimensional kultivierten humanen Fibroblasten der Immunogold–Elektronenmikroskopie unterzogen. Die Zellschichten enthielten neben gebänderten Fibrillen und Mikrofibrillen (Abbildung 3.28, A Pfeile) große Aggregate von elektronendichten Netzwerken (Abbildung 3.28, A Sternchen). Im Zellkulturmedium kamen hingegen keinerlei Matrix-Suprastrukturen vor. Der Kollagen V-Antikörper 13F6 gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette reagierte mit vielen aber nicht allen Bereichen der Netzwerke aus der Zellschicht (Abbildung 3.28, B Sternchen) sowie mit einer Minderheit der quergestreiften Kollagenfibrillen (Abbildung 3.28, B Pfeile) und Mikrofibrillen (Abbildung 3.28, B Pfeilspitze). In dem größten Teil der Kollagenfibrillen, zu dem sowohl dicke als auch dünne Fibrillen zählen, konnte Kollagen V jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.28, C). Keinerlei suprastrukturelle Fragmente ergaben jedoch eine Immunreaktivität mit dem Kollagen V-Antikörper

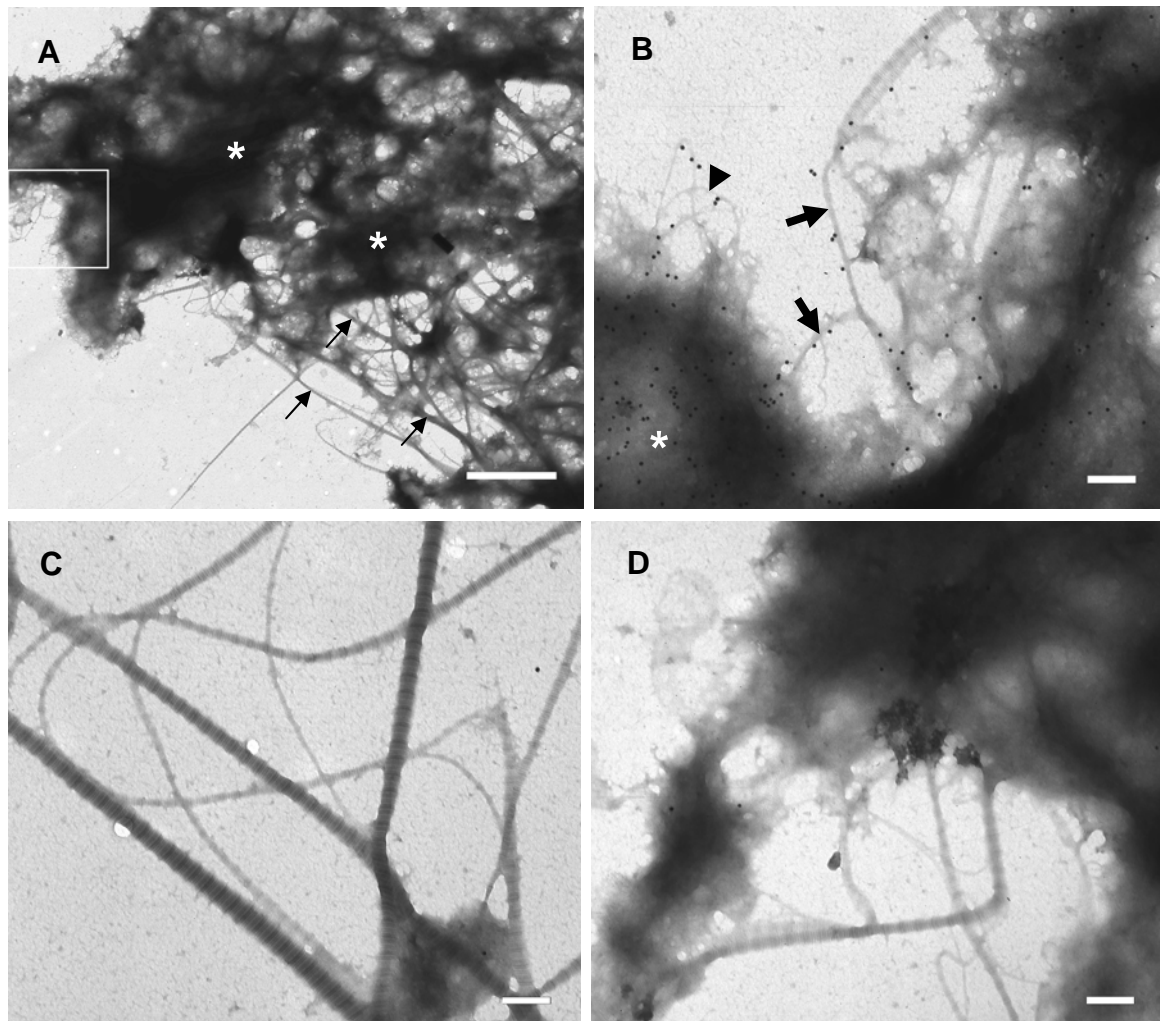


Abbildung 3.28: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Extrakten suprastruktureller Fragmente dreidimensional kultivierter humaner Hautfibroblasten (in Neutralsalzpuffer). Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A – C:** Kollagen V-Antikörper 13F6 (Goldpartikel). **B:** Vergrößerung des eingerahmten Bereiches aus A. **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Sternchen: Elektronendichte Netzwerke; Pfeile: Kollagenfibrillen; Blockpfeile: Kollagenfibrillen mit Kollagen V-Markierung; Pfeilspitze: Mikrofibrillen mit Kollagen V-Markierung. Messbalken: 2 μm (A), 200 nm (B,C,D).

MAB3393 gegen die $\alpha 2(\text{V})$ -Kette. Analog zu Kollagen V wurden auch die Immunogold-Elektronenmikroskopie von kultivierten Fibroblasten mit Antikörpern gegen Kollagen I (AF5610) und III (MAB3392) durchgeführt. Kollagen I wurde in allen quergestreiften Kollagenfibrillen solcher Extrakte lokalisiert (Abbildung 3.29, A). Kollagen III wurde hingegen weder in Kollagenfibrillen noch in extrafibrillären Suprastrukturen nachgewiesen (Abbildung 3.29, B).

Ferner wurden suprastrukturelle Fragmente aus Fibroblastenkulturen zur Demaskierung der Epitope mit Essigsäure vorbehandelt. In den entsprechenden Extrakten konnten neben netzwerkartig organisierten suprastrukturellen Fragmenten auch

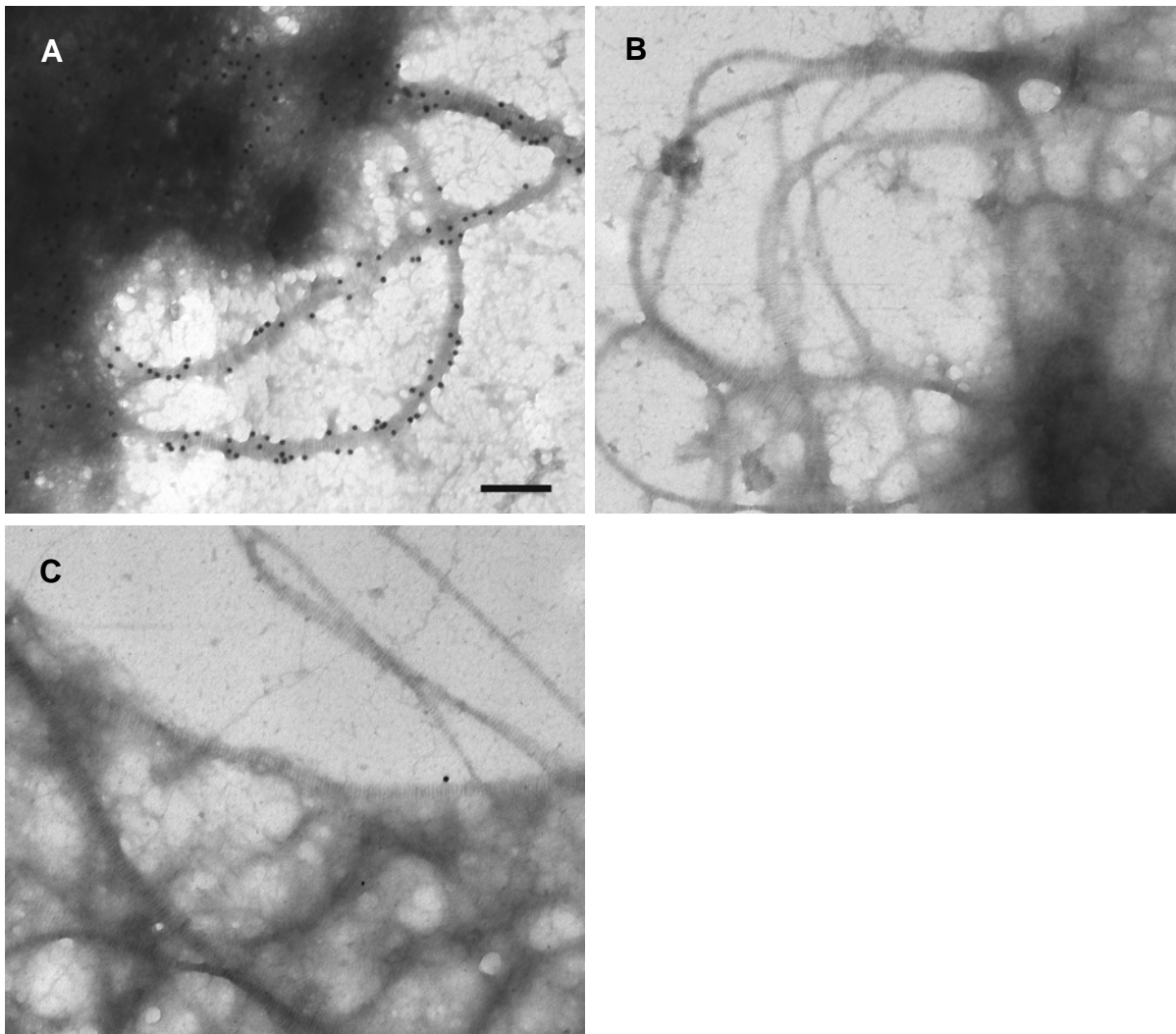


Abbildung 3.29: Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten dreidimensional kultivierter humaner Hautfibroblasten (in Neutralsalzpuffer). Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). **B:** Kollagen III-Antikörper MAB3392. **C:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Messbalken: 200 nm.

Fragmente von Kollagenfibrillen gefunden werden, deren Struktur im Vergleich zu Extrakten ohne Essigsäurevorbehandlung durch Knicke gestört war. Im Bereich dieser Knicke war eine aufgelockerte Fibrillenstruktur zu erkennen. Kollagen V wurde mit dem Antikörper 13F6 in solchen Extrakten in einigen Kollagenfibrillen nachgewiesen (Abbildung 3.30, A Pfeile), wohingegen andere Kollagenfibrillen keine Immunogold-Markierung aufweisen (Abbildung 3.30, A Pfeilspitzen). Eine intensivere Immunogold-Markierung im Bereich der Knicke wurde jedoch nicht gefunden. Wie zuvor die Extrakte von Fibroblastenkulturen in Neutralsalzpuffer ergaben auch Essigsäure-Extrakte keine Reaktivität mit dem Antikörper MAB3393 (Abbildung 3.30, B).

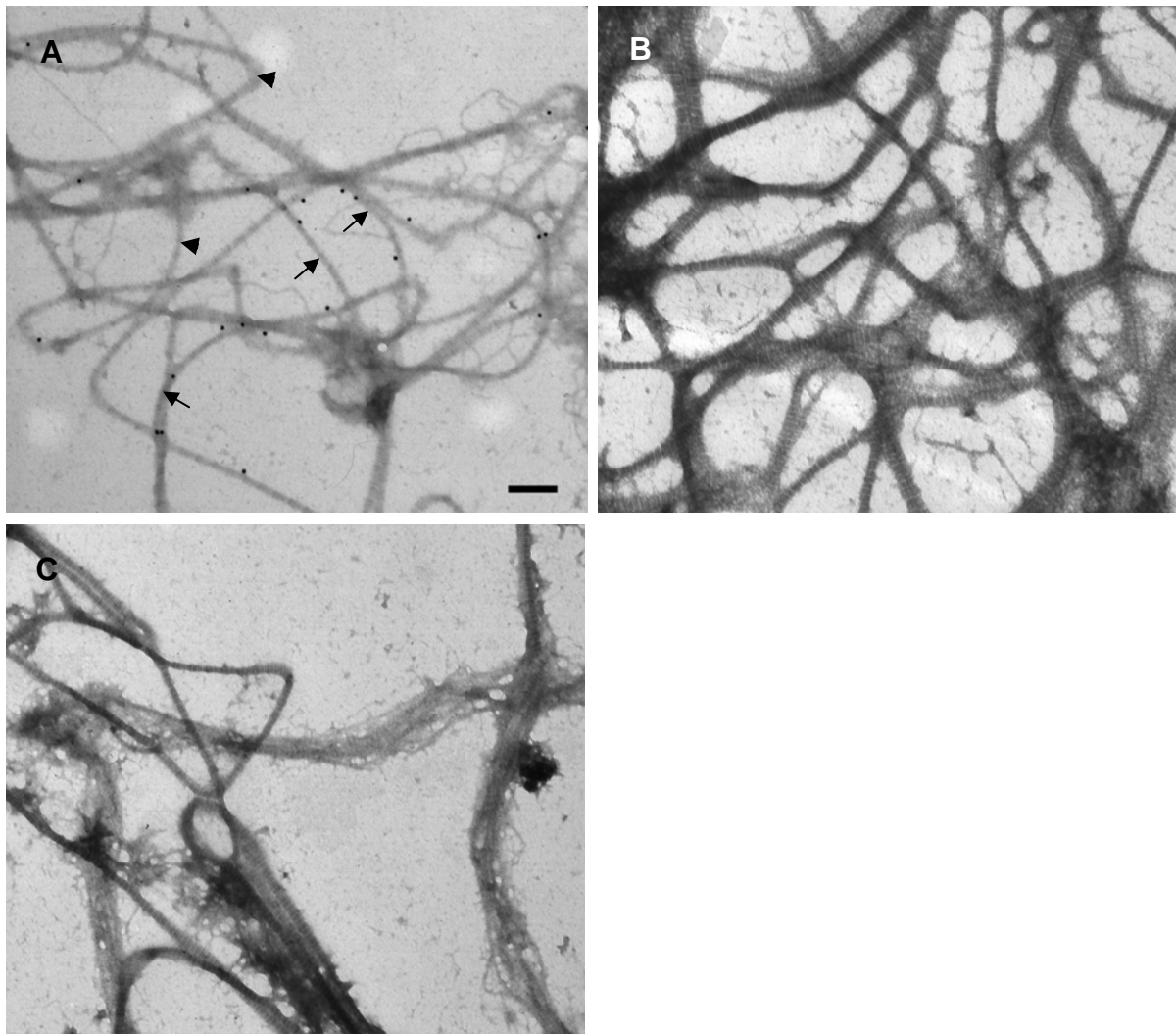


Abbildung 3.30: Immunogold-Elektronenmikroskopie dreidimensional kultivierter humaner Hautfibroblasten in 0,1 M Essigsäure. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6 (Goldpartikel). **B:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **C:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Pfeilspitzen: Fibrillen ohne Kollagen V-Markierung; Pfeile: Fibrillen mit Kollagen V-Markierung. Messbalken: 200 nm.

3.4 Untersuchungen fibrillärer Kollagene der Cornea

Wie in der Literatur bereits beschrieben wurde, bestehen Kollagenfibrillen der Cornea zum größten Teil aus Kollagen I und V (Birk, 2001). Da Kollagen V hier nicht in Kollagenfibrillen der adulten humanen Haut detektiert werden konnte (siehe 3.1.12, 3.1.13, 3.1.14, 3.1.15), wurden zusätzlich Kollagenfibrillen der adulten bovinen Cornea untersucht. Verschiedenen Hinweisen zu Folge werden Kollagen II (Hendrix *et al.*, 1982; Fitch *et al.*, 1995) und Kollagen III (Schmut, 1977; Tseng *et al.*, 1982; Lee und Davison, 1984) transient in der Cornea exprimiert. Daher wurde ebenfalls untersucht, ob die Kollagene II und III Bestandteile von Kollagenfibrillen der adulten Cornea sind.

3.4.1 Lokalisation von Kollagen V

Um Kollagen V in der adulten bovinen Cornea zu lokalisieren wurden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern 13F6 und 18G5 gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette durchgeführt. Das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette konnte in der Bowman's Schicht entlang des gesamten Epithels lokalisiert werden (Abbildung 3.31, A, B). Im tieferen Stroma der Cornea wurde hingegen keine Immunreaktivität der Antikörper 13F6 und 18G5 festgestellt. Mit dem Antikörper MAB3393, der mit der tripelhelikalen Domäne der $\alpha 2(V)$ -Kette reagiert (siehe 3.1.8, 3.3.3, 3.4.5), konnte in der gesamten bovinen Cornea kein Kollagen V lokalisiert werden (Abbildung 3.31, C).

Nach einer Demaskierung von Epitopen mit 0,1 M Essigsäure wurde die $\alpha 1(V)$ -Kette mit den Antikörpern 13F6 und 18G5 im gesamten cornealen Stroma lokalisiert (Abbildung 3.32, A, B). Im Gegensatz zu Befunden mit der humanen Haut, in welcher eine intensiver markierte Region in der oberen papillären Dermis zu erkennen war

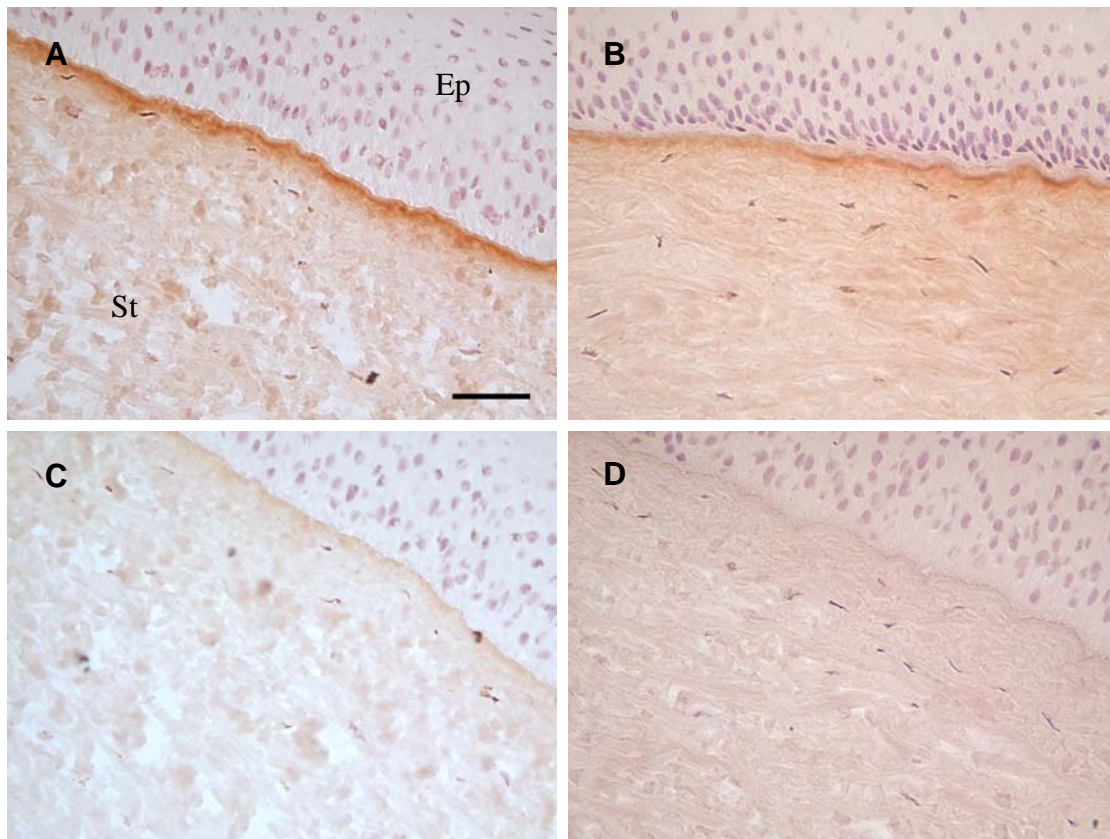


Abbildung 3.31: Immunhistochemische Färbungen der bovinen Cornea mit Kollagen V-Antikörpern. Die abgebildeten Gefrierschnitte zeigen eine Hämatoxylin-Gegenfärbung. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper 18G5. **C:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **E:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma. Messbalken: 50 μ m.

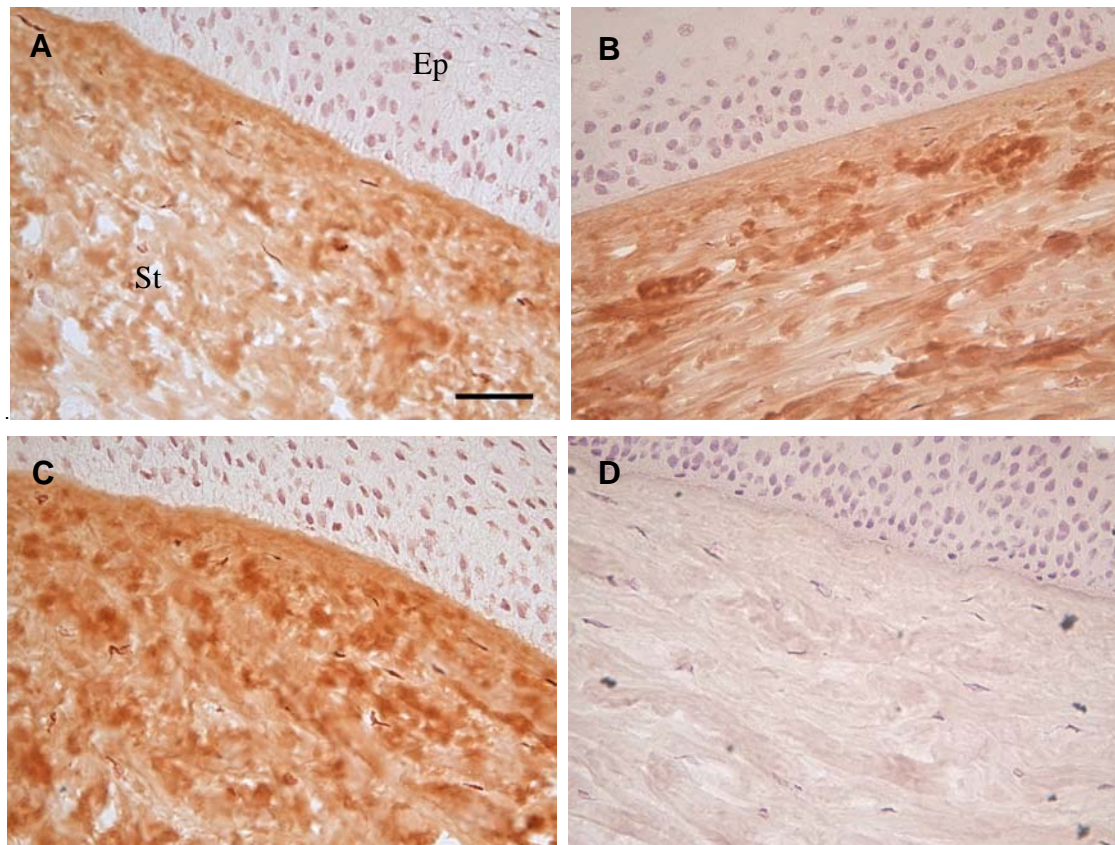


Abbildung 3.32: Immunhistochemische Färbungen der bovinen Cornea mit Kollagen V-Antikörpern nach einer Vorbehandlung mit 0,1 M Essigsäure. Die abgebildeten Gefrierschnitte zeigen eine Hämatoxylin-Gegenfärbung. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper 18G5. **C:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **E:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma. Messbalken: 50µm.

(siehe 3.1.1), konnte in der bovinen Cornea nach Essigsäurevorbehandlung keine intensiver markierte Region festgestellt werden. Außerdem war nach Essigsäurevorbehandlung im gesamten cornealen Stroma eine homogene Verteilung der $\alpha 2(V)$ -Kette mit dem Antikörper MAB3393 erkennbar (Abbildung 3.32, C)

3.4.2 Lokalisation der Kollagene I und II

Um Kollagen II in der adulten bovinen Cornea nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Da Kollagen I die Hauptkomponente von cornealen Kollagenfibrillen ist, wurde die Lokalisation von Kollagen I in der Cornea vergleichend zu Kollagen V (siehe 3.4.1) und Kollagen II untersucht. Sowohl Kollagen I (Abbildung 3.33, A, B) als auch Kollagen II (Abbildung 3.33, C, D) wurde im gesamten Stroma der adulten bovinen Cornea lokalisiert, wohingegen keine

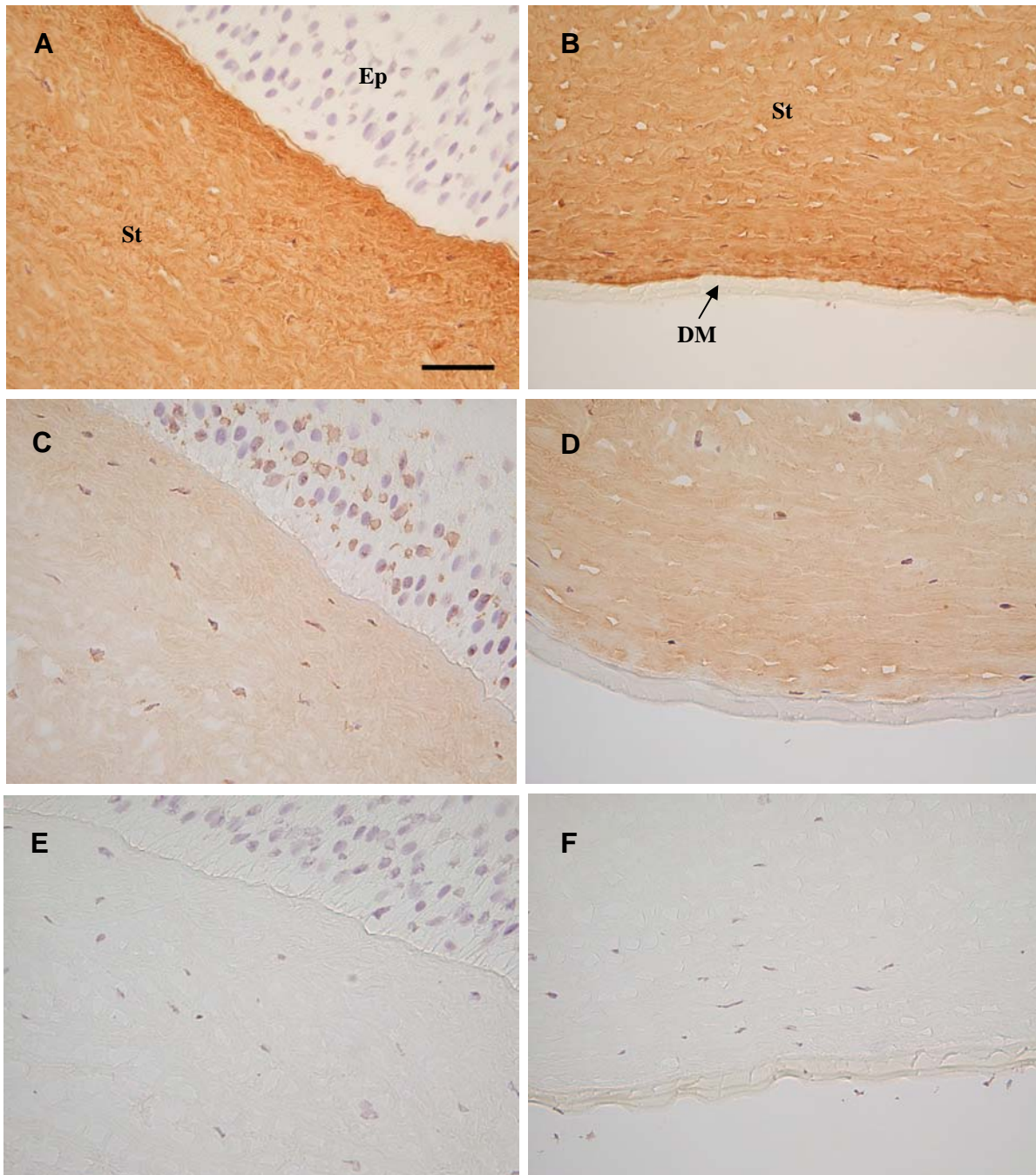


Abbildung 3.33: Immunhistochemische Färbungen der bovinen Cornea mit Kollagen I- und Kollagen II-Antikörpern. Die abgebildeten Gefrierschnitte zeigen eine Hämatoxylin-Gegenfärbung. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A - B:** Kollagen I-Antikörper AF5610. **C - D:** Kollagen II-Antikörper MAB8887. **E - F:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma; DM: Descemet-Membran. Messbalken: 50µm.

Markierung des Epithels oder der Descemet-Membran detektiert wurde. Die immunhistochemische Reaktivität war mit Kollagen II-Antikörpern jedoch schwächer als mit Kollagen I-Antikörpern.

3.4.3 Lokalisation der Kollagene I und III

Weil der Kollagen III-Antikörper MAB3392 nicht mit dem bovinem Protein reagiert (siehe 2.2.3), wurde die Lokalisation von Kollagen III in der Cornea an histologischen Schnitten humaner Gewebe untersucht. Wie zuvor in der bovinen Cornea (siehe

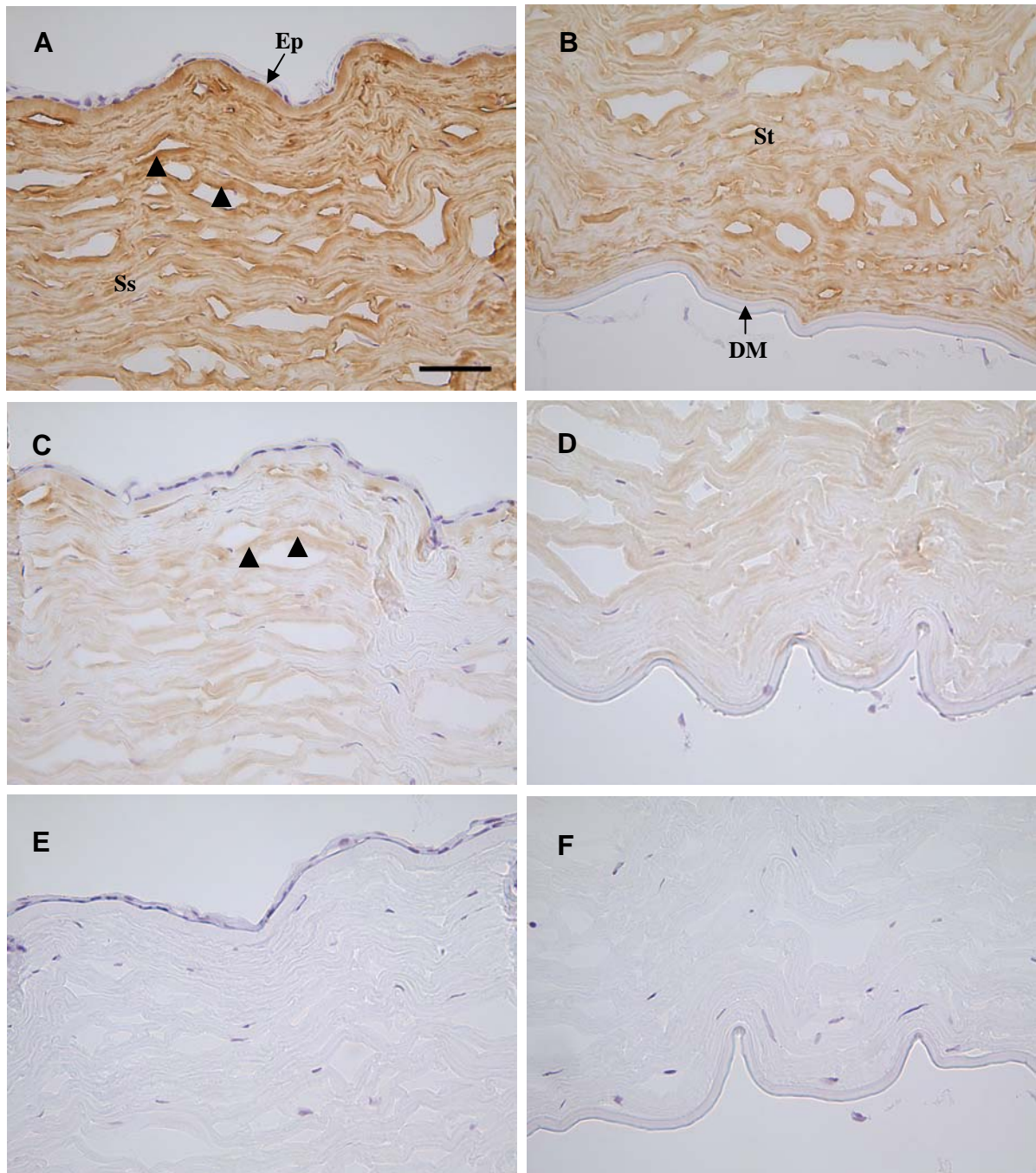


Abbildung 3.34: Immunhistochemische Färbungen der humanen Cornea mit Kollagen I- und Kollagen III-Antikörpern. Die abgebildeten Gefrierschnitte zeigen eine Hämatoxylin-Gegenfärbung. Eine positive Immunreaktivität ist an der Braunfärbung (DAB-Färbung) zu erkennen. **A - B:** Kollagen I-Antikörper AF5610. **C - D:** Kollagen III-Antikörper MAB3393. **E - F:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma; DM: Descemet-Membran. Messbalken: 50µm.

3.4.2) wurde Kollagen I im gesamten Stroma der humanen Cornea gefunden (Abbildung 3.34, A, B), wobei auch hier das Epithel oder die Descement-Membran nicht angefärbt wurden. Kollagen III konnte in der humanen Cornea wie Kollagen I im gesamten cornealen Stroma, jedoch deutlich schwächer als Kollagen I detektiert werden (Abbildung 3.34, C, D). Im Bereich von artifiziellen Spalten zwischen cornealen Lamellen in Folge des schlechteren Gewebeerhalts bei Gefrierschnitten der humanen Cornea wurde sowohl mit Kollagen III-Antikörpern als auch mit Kollagen I-Antikörpern eine intensivere Braunfärbung als in benachbarten Bereichen festgestellt (Abbildung 3.34, A und C Pfeilspitzen).

3.4.4 Kolokalisation der Kollagene IV und V

Wie zuvor gezeigt wurde, liegt das N-Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette in Bowman's Schicht der bovinen Cornea entlang des Epithels unmaskiert vor (siehe 3.4.1). Um zu untersuchen, ob Kollagen V in der epithelialen Basalmembran der Cornea lokalisiert ist, wurde die Doppelimmunfluoreszenz mit Antikörpern gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette (Antikörper: 13F6) und mit Antikörpern gegen Kollagen IV (Antikörper: R1041) durchgeführt (Abbildung 3.35). Das N-Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette wurde durch Immunfluoreszenz ohne eine Demaskierung von Epitopen in der Bowman's Schicht entlang des Epithels gefunden (Abbildung 3.35, A). Kollagen IV wurde hingegen in der epithelialen Basalmembran und der Basalmembran stromaler Blutgefäße nachgewiesen (Abbildung 3.35, B). In der Überlagerung der Immunfluoreszenz von Kollagen V und Kollagen IV konnte keine Kolokalisation in der epithelialen Basalmembran festgestellt werden (Abbildung 3.35, C *eBM*). Es wurde hingegen gezeigt, dass der mit Kollagen V-Antikörpern markierte Bereich auf der Seite des Stromas an die epitheliale Basalmembran angrenzt.

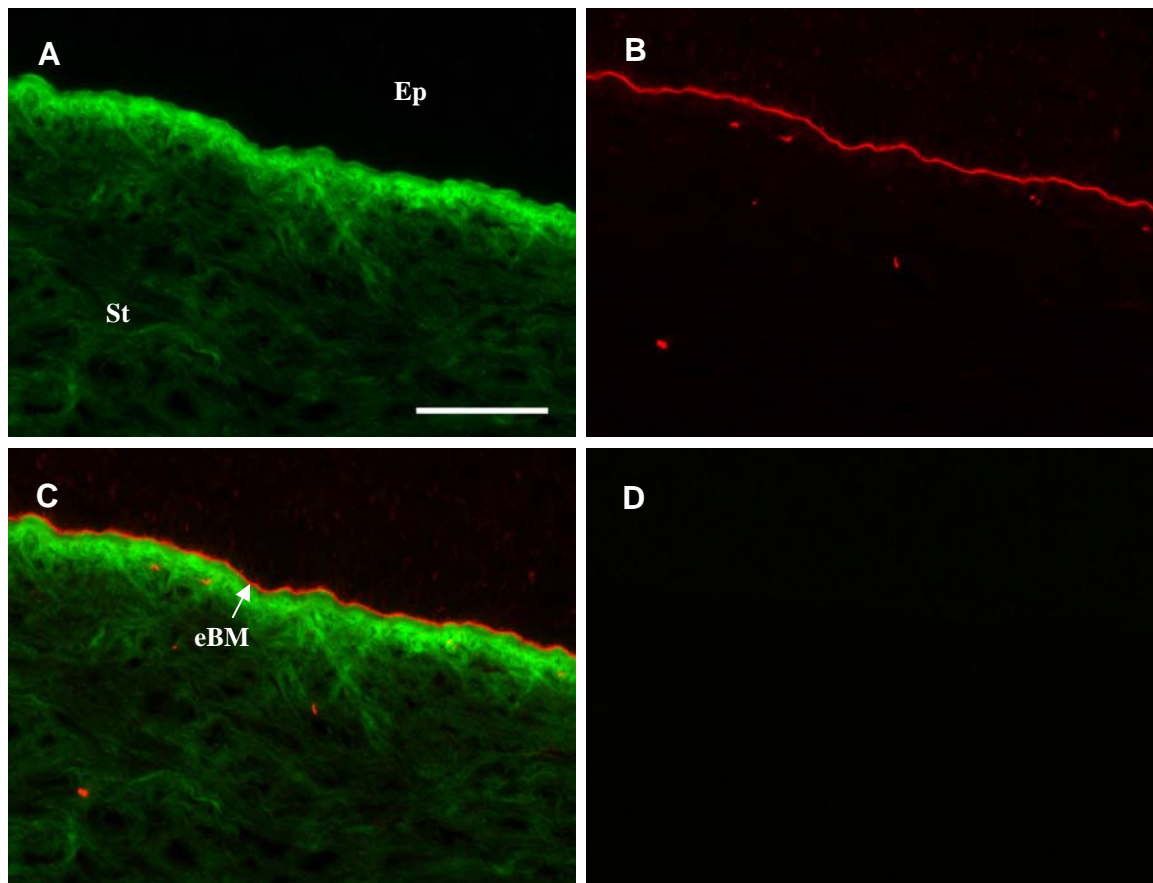


Abbildung 3.35: Doppelimmunfluoreszenz von Gefrierschnitten der bovinen Cornea. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **B:** Kollagen IV-Antikörper R1041 (rot). **C:** Überlagerung aus A und B. **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma; eBM: epitheliale Basalmembran. Messbalken: 50 µm.

Die Kolokalisation von Kollagen V und Kollagen VI wurde auch nach einer Demaskierung von Epitopen mit 0,1 M Essigsäure untersucht (Abbildung 3.36). Die $\alpha 1(V)$ -Kette wurde nach Essigsäurevorbehandlung im gesamten Stroma der Cornea gefunden (Abbildung 3.36, A). Die Verteilung von Kollagen IV beschränkte sich wiederum auf die epitheliale Basalmembran sowie die Basalmembranen von Blutgefäßen im Stroma (Abbildung 3.36, B). In der Überlagerung der Immunfluoreszenz wurde keine Kolokalisation von Kollagen V und Kollagen VI festgestellt (Abbildung 3.36, C). Die Lokalisation der $\alpha 1(V)$ -Kette in der epithelialen Basalmembran der Cornea kann demnach ausgeschlossen werden.

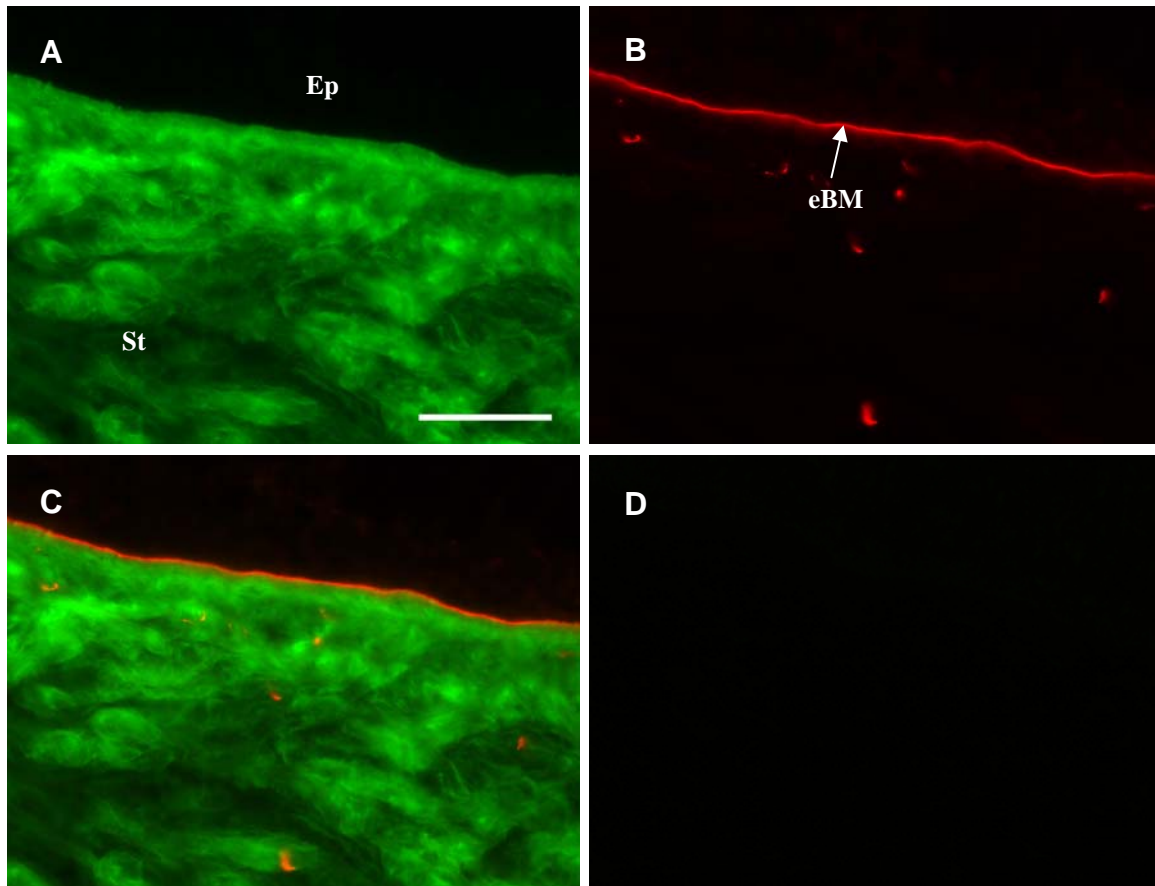


Abbildung 3.36: Doppelimmunfluoreszenz vom Gefrierschnitten der bovinen Cornea nach einer Vorbehandlung mit 0,1 M Essigsäure. A: Kollagen V-Antikörper 13F6 (grün). **B:** Kollagen IV-Antikörper R1041 (rot). **C:** Überlagerung aus A und B. **D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithel; St: Stroma; eBM: epitheliale Basalmembran. Messbalken: 50 μ m.

3.4.5 Immunblots des Kollagen V

Bezüglich der Prozessierung von Kollagen V im Gewebe gibt es aus vorherigen Untersuchungen unterschiedliche Daten zu einer partiellen Prozessierung des N-terminalen Propeptids (Bächinger *et al.*, 1982; Niyibizi *et al.*, 1984; Niyibizi und Eyre, 1993; Moradi-Ameli *et al.*, 1994). Um zu untersuchen, welche Prozessierungsvarianten des Kollagen V in der adulten Cornea vorkommen, wurden hier Immunblots mit Antikörpern gegen das N-terminale Propeptid der α 1(V)-Kette (Antikörper: 13F6 und 6A7) durchgeführt (Abbildung 3.37). Der Antikörper 13F6 reagiert sowohl mit einem Teil der COL2- als auch der NC2 Domäne. Der Antikörper 6A7 reagiert hingegen mit der variablen (VR) Domäne des N-terminalen Propeptids der α 1(V)-Kette (siehe 2.2.1) (Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Beide Antikörper erkennen daher sowohl die Pro α 1(V)-Kette, die pN α 1(V)-Kette als auch die reife α 1(V)-Kette,

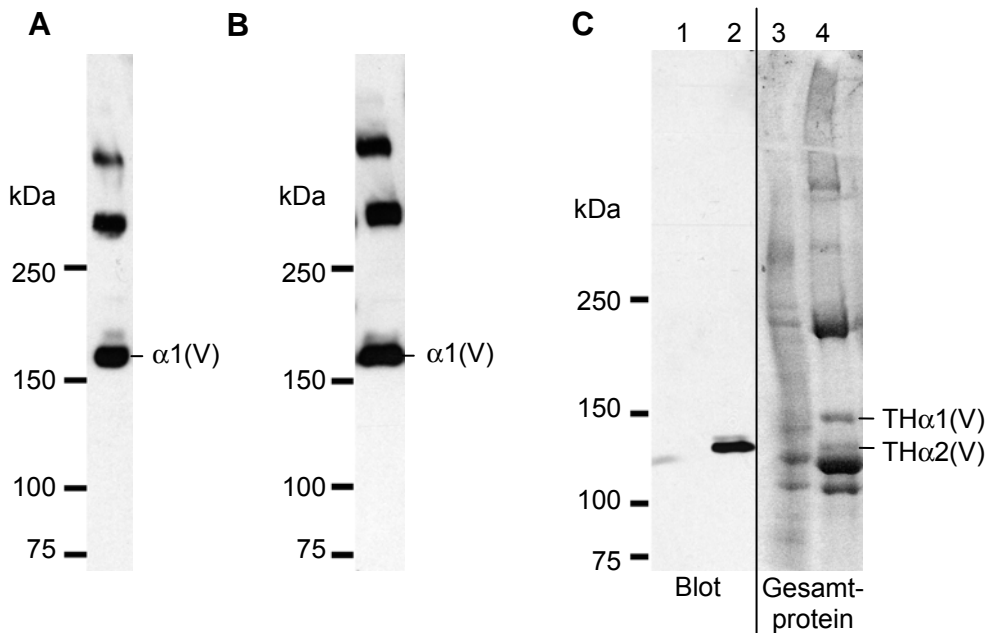


Abbildung 3.37: Immunblots mit Kollagen V-Antikörpern von Extrakten der bovinen Cornea in Neutralsalzpuffer sowie nach einem limitierten Pepsin-Verdau. **A:** Immunblot von einem Neutralsalz-Extrakt mit dem Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Immunblot von einem Neutralsalz-Extrakt mit dem Kollagen V-Antikörper 6A7. **C:** Immunblot mit dem Kollagen V-Antikörper MAB3393, 1: Neutralsalz-Extrakt, 2: Pepsin-Verdau. 1 und 2: Blot, 3 und 4: Gesamtproteinfärbung der Blotmembran von 1 und 2. (SDS-PAGE: A – B reduzierende Bedingungen; C nicht-reduzierende Bedingungen)

jedoch nicht die $pC\alpha 1(V)$ -Kette und die Pepsin-lösliche große tripelhelikale Domäne der $\alpha 1(V)$ -Kette (Imamura *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2001; Unsöld *et al.*, 2002; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007).

In Proben der Cornea, die in Neutralsalzpuffer [10 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl (siehe 2.4.1)] homogenisiert wurden, konnte mit den Antikörpern 13F6 und 6A7 die reife $\alpha 1(V)$ -Kette bei ca. 175 kDa (korrigiert 145 kDa) detektiert werden (Abbildung 3.37, A, B). Zusätzlich wurden zwei weitere Proteinbanden oberhalb von 300 kDa nachgewiesen. Im Gegensatz zu Proben der Haut (siehe 3.1.8, 3.1.10), konnte in Proben der Cornea die $pN\alpha 1(V)$ -Kette nicht nachgewiesen werden. Weitere Unterschiede zwischen Immunblots der $\alpha 1(V)$ -Kette aus der Cornea und der Haut konnten in Bereichen mit Molekularmassen größer als 250 kDa festgestellt werden. In der Cornea wurden oberhalb von 300 kDa zwei distinkte Banden dokumentiert (Abbildung 3.37, A, B), wohingegen in der Haut diffuse Immunblot-Signale gefunden wurden (siehe 3.1.8, 3.1.10).

Die $\alpha 2(V)$ -Kette konnte in Proben der bovinen Cornea mit dem Antikörper MAB3393 nachgewiesen werden (Abbildung 3.37, C). Wie zuvor für Hautproben gezeigt (siehe 3.1.8), konnte in Immunblots der bovinen Cornea, die in Neutralsalzpuffer extrahiert

wurden, keine Immunreaktivität des Antikörpers MAB3393 detektiert werden (Abbildung 3.37, C 1). In Immunblots von Proteinextrakten der bovinen Cornea nach limitiertem Pepsin-Verdau war eine Immunreaktivität des Antikörpers MAB3393 mit dem tripelhelikalen Abschnitt (TH) der $\alpha 2(V)$ -Kette festzustellen. (Abbildung 3.37, C 2). Zusätzliche Proteinbanden wurden in solchen Extrakten jedoch nicht markiert.

3.4.6 Immunblots der Kollagene I und II

Um die Kollagene I und II auch mit biochemischen Methoden in der bovinen Cornea nachzuweisen, wurden Immunblots von Proteinen nach einem limitierten Pepsin-Verdau der Gewebeproben durchgeführt. Mit dem monoklonalen Kollagen I-Antikörper AF5610 konnten in Proben der Cornea mehrere distinkte Proteinbanden detektiert werden. Mit diesem Antikörper wurde die monomere $\alpha 2(I)$ -Kette bei ca. 105 kDa (korrigiert 85 kDa) detektiert, wohingegen keine Immunreaktivität mit der monomeren $\alpha 1(V)$ -Kette festgestellt wurde (Abbildung 3.38, A 2). Auf der Höhe der dimeren $\beta(I)$ -Ketten (β -Komponenten) wurde eine weitere Proteinbande bei ca. 220 kDa (korrigiert 180 kDa) gefunden (Abbildung 3.38, A 1). Außerdem waren drei weitere distinkte Proteinbanden oberhalb von 300 kDa Kollagen I-positiv, deren Molekulargewicht auf Grund der in diesem Größenbereich fehlenden Markerbanden

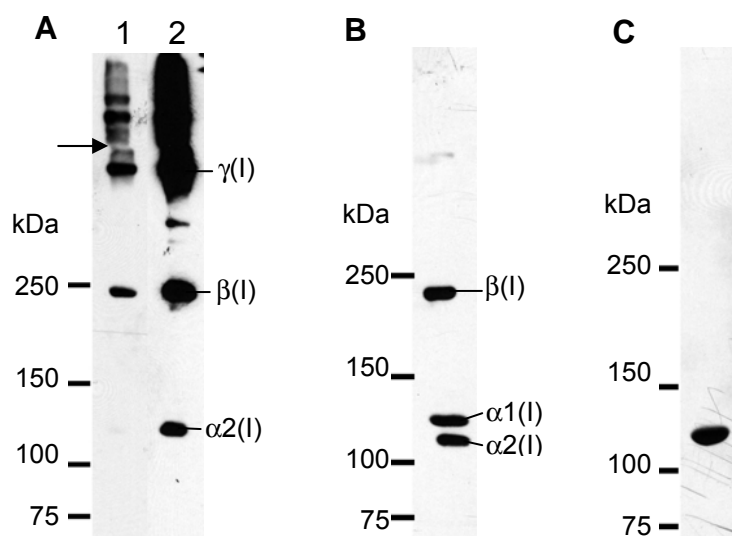


Abbildung 3.38: Immunblots von Extrakten der bovinen Cornea nach einem limitierten Pepsin-Verdau. **A:** Kollagen I-Antikörper AF5610. 1: Expositionszeit 15 sec, 2: Expositionszeit 5 min. **B:** Kollagen I-Antikörper BP8028. **C:** Kollagen II-Antikörper MAB8887. Pfeil: Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel. (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen).

nicht verlässlich bestimmt werden konnte. Bei der untersten dieser drei Proteinbanden handelt es sich um trimere γ (I)-Ketten (γ -Komponenten). An einer Unterbrechung der Signale im Bereich der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel (Abbildung 3.38, A 1 Pfeil) war zu erkennen, dass es sich bei den oberen beiden Banden um hochmolekulare Aggregate handelt, die in der elektrophoretischen Auftrennung auf Grund ihrer Größe nicht in den Bereich des Trenngels migrieren. Im Gegensatz zu Immunblots mit dem Antikörper AF5610 konnte mit dem polyklonalen Kollagen I-Antikörper BP8028 sowohl die monomere α 1(I)-Kette bei ca. 120 kDa (korrigiert 95 kDa) als auch die monomere α 2(I)-Kette bei ca. 110 kDa (korrigiert 90 kDa) detektiert werden (Abbildung 3.38, B). Wie zuvor mit dem Antikörper AF5610 wurden mit dem Antikörper BP8028 dimere β (I)-Ketten (β -Komponenten) bei einer Molekularmasse von ca. 230 kDa (korrigiert 190 kDa) detektiert. Im hochmolekularen Bereich oberhalb von 300 kDa konnte hingegen keine Immunreaktivität gefunden werden (Abbildung 3.38, B).

Außerdem wurden Immunblots von Proteinextrakten der bovinen Cornea mit dem monoklonalen Kollagen II-Antikörper MAB8887 durchgeführt (Abbildung 3.38, C). Dieser Antikörper reagiert mit einer distinkten Proteinbande bei ca. 120 kDa (korrigiert 95 kDa). Auf Grund der vergleichbaren elektrophoretischen Mobilität der tripelhelikalen Domänen werden die α 1(I)-Kette und der α 1(II)-Kette in Immunblots in der gleichen Proteinbande detektiert.

3.4.7 Massenspektrometrische Analyse von Kollagenen der bovinen Cornea

Um zu untersuchen, ob neben den Kollagenen I und V weitere fibrilläre Kollagene wie Kollagen II, III und XI in der adulten Cornea vorkommen, wurden zusätzlich zu Immunblots (siehe 3.4.5, 3.4.6) massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden Proben der bovinen Cornea nach einem limitierten Pepsin-Verdau unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden einzelne Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mittels der LC MS/MS weiter analysiert (Abbildung 3.39). Für den Nachweis von Kollagen III, das auf Grund von Disulfidbrücken innerhalb des tripelhelikalen Abschnittes unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE als Trimer migriert, wurden

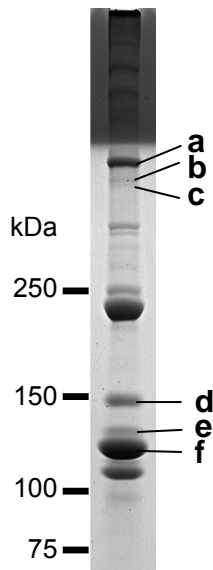


Abbildung 3.39: SDS-PAGE der bovinen Cornea nach einem limitierten Pepsin-Verdau (Coomassie-Blau Färbung). a, b, c, d, e: Proteinbanden, die massenspektrometrisch untersucht wurden (Tabelle 3.8). (SDS-PAGE: nicht-reduzierende Bedingungen)

Tabelle 3.7: Verwendete Parameter für die Auswertung von Daten der LC MS/MS Analyse boviner Cornea mit Mascot Version 2.2 (matrix sciences).

verwendetes Enzym	Trypsin (<i>Sus scrofa</i>)
Fixierte Modifikationen	Carbamidomethyl (C)
Variable Modifikationen	Oxidation (M), Oxidation (P)
Massentoleranz für Peptidionen	+/- 0,3 Da
Massentoleranz für Fragmentionen	+/- 0,3 Da
maximale Anzahl fehlender Spaltung	2
Datenbank	Banden a-c: SwissProt 57.7 Banden d-f: NCBIInr
taxonomische Beschränkung	Mammalia
Signifikanzgrenzwert	P<0,05
<i>Ion score cut-off</i>	15 (Banden a-c); 0 (Banden d-f)

Proteinbanden zwischen 400 und 300 kDa analysiert (Abbildung 3.39, a - c). Für den Nachweis von Kollagen II und Kollagen XI wurden hingegen Proteinbanden zwischen 200 und 100 kDa untersucht (Abbildung 3.39, e - f). Die für die Auswertung von LC MS/MS Daten mit „Mascot“ verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.7 dargestellt. In den Proteinbanden a, b und c (Abbildung 3.39, a b c) wurden jeweils die bovine $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.8, a b c). Durch die hier dargestellten massenspektrometrischen Untersuchungen wurde die $\alpha 1(III)$ -Kette in Proben der Cornea demnach nicht entdeckt. Bei der Analyse der Proteinbande d

Tabelle 3.8: Identifizierte Proteinkomponenten aus der massenspektrometrischen Untersuchung von SDS-Gelbanden der bovinen Cornea (Abbildung 3.39).

Protein- bande	Identifizierte Proteine	Peptide	Peptide P<0,05	protein score
a	Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus	3	3	121
	Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus	3	1	83
b	Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus	3	1	101
	Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus	2	1	60
c	Collagen alpha-2(I) chain OS=Bos taurus	5	4	233
	Collagen alpha-1(I) chain OS=Bos taurus	3	2	129
d	alpha 1 type V collagen [Sus scrofa]	12	1	305
	collagen, type I, alpha 1 [Bos taurus]	4	1	148
	collagen, type I, alpha 2 [Bos taurus]	3	1	101
	Collagen alpha-1(XI) chain; Flags: Precursor	4	0	100
	alpha-2 type XI collagen	3	0	68
e	type V procollagen alpha 2 chain [Homo sapiens]	13	3	446
	collagen, type I, alpha 1 [Bos taurus]	10	1	286
	alpha-1 (type XI) collagen precursor	3	0	50
f	collagen, type I, alpha 1 [Bos taurus]	31	6	977

(Abbildung 3.39, d) wurden die $\alpha 1(V)$ -, $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ -, $\alpha 1(XI)$ - sowie die $\alpha 2(XI)$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.8, d). Es wurden über „Mascot“ jedoch keine Peptidfragmente mit einer signifikanten Übereinstimmung mit der $\alpha 1(XI)$ - oder $\alpha 2(XI)$ -Kette nachgewiesen. Durch einen Sequenzvergleich eines der zur $\alpha 1(XI)$ -Kette homologen Peptidfragmente (KTGPPGPGGVVGPQGPTG-ETGPIGERG) über „Blast search“ konnte eine 100 %ige Homologie jedoch nur mit der $\alpha 1(XI)$ -Kette unterschiedlicher Spezies nachgewiesen werden, was ein deutlicher Hinweis für das Vorkommen der $\alpha 1(XI)$ -Kette in der adulten Cornea ist. In der Proteinbande e (Abbildung 3.39, e), die elektrophoretisch mit der $\alpha 2(V)$ -Kette migriert, konnte die $\alpha 2(V)$ -, $\alpha 1(I)$ - sowie die $\alpha 1(XI)$ -Kette identifiziert werden (Tabelle 3.8, e). Es konnte jedoch in dieser Proteinbande für kein Peptidfragment eine signifikante Übereinstimmung mit der $\alpha 1(XI)$ -Kette festgestellt werden. In der Proteinbande f (Abbildung 3.39, f), die elektrophoretisch mit der $\alpha 1(I)$ -Kette migriert, wurde die $\alpha 1(I)$ -Kette identifiziert (Tabelle 3.8, f). Die $\alpha 1(II)$ -Kette wurde hingegen in keiner der untersuchten

Proteinbanden identifiziert. Auf Grund ihrer elektrophoretischen Mobilität wäre die $\alpha 1(\text{II})$ -Kette in der Proteinbande f zu erwarten gewesen (Tabelle 3.8, f).

3.4.8 Immunogold-Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten

Die ultrastrukturelle Lokalisation der Kollagene I und V wurde an HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der bovinen Cornea durchgeführt. Eine Reaktivität von Kollagen V-Antikörpern (13F6, 18G5 und MAB3393) mit der Cornea war nicht festzustellen. Im Gegensatz zu Kollagen V wurde Kollagen I (Antikörper: AF5610) in HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der bovinen Cornea in Kollagenfibrillen nachgewiesen (Abbildung 3.40, A, B). Eine schwache jedoch eindeutige Immunogold-Markierung war sowohl in

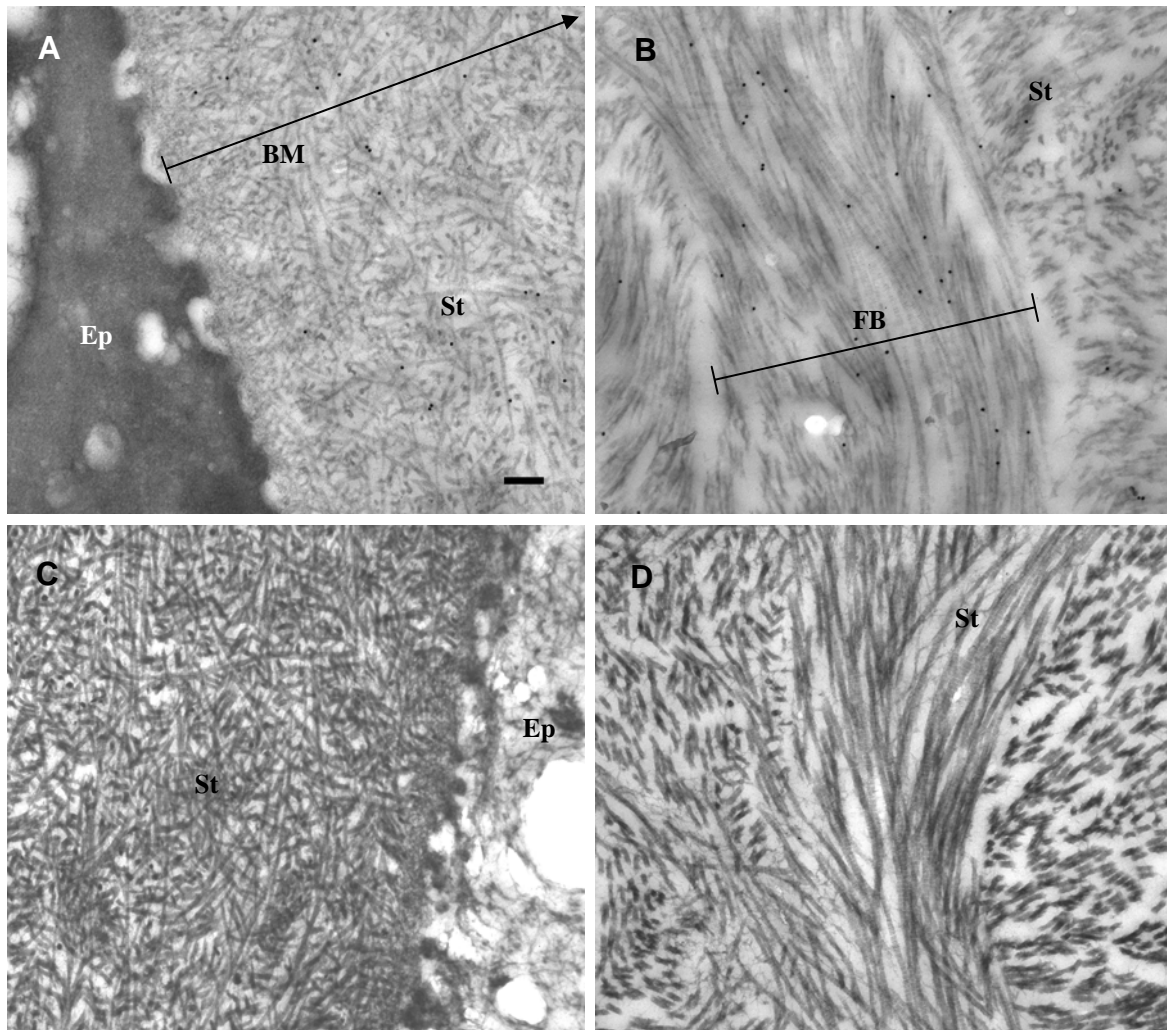


Abbildung 3.40: Immunogold-Elektronenmikroskopie von HOPE-fixierten Ultradünnschnitten der bovinen Cornea. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A – B:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). **C – D:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Ep: Epithelzelle; St: Stroma; BM: Bowman's Schicht; FB: Fibrillenbündel. Messbalken 200 nm.

der Bowman's Schicht (Abbildung 3.40, A *BM*) als auch im tieferen Stroma der Cornea zu finden (Abbildung 3.40, B).

Des Weiteren wurde die Immunogold-Elektronenmikroskopie nach einer Vorbehandlung von HOPE-fixierten Ultradünnschnitten mit technischem Ethanol durchgeführt, wodurch Einbettungsmedien aus den Präparaten herausgelöst werden sollte. Es wurde jedoch nach der Ethanolvorbehandlung keine Immunreaktivität von Kollagen V-Antikörper mit der bovinen Cornea festgestellt.

3.4.9 Extrakte suprastruktureller Fragmente der bovinen Cornea

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, konnte Kollagen V nicht in suprastrukturellen Fragmenten aus Extrakten der humanen Haut nachgewiesen werden (siehe 3.1.12). Für eine Charakterisierung von Kollagen V-haltigen Suprastrukturen wurden zusätzlich suprastrukturelle Fragmente der bovinen Cornea, die in Neutralsalzpuffer extrahiert wurden, immunelektronenmikroskopisch untersucht. Kollagen V konnte (Antikörper: 13F6, 18G5, 6A7 und MAB3393) jedoch nicht in suprastrukturellen Fragmenten der Cornea gefunden werden (Abbildung 3.41, A). Außerdem sollte an Extrakten suprastruktureller Fragmente untersucht werden, ob Kollagen II ein Bestandteil von Kollagenfibrillen der adulten Cornea ist. Quergestreifte Kollagenfibrillen in diesen Extrakten besitzen homogene dünne Durchmesser von ca. 27,7 nm ($n = 46$, Standardabweichung: 4,8). Neben diesen typischerweise in der Cornea vorkommenden dünnen Kollagenfibrillen konnten jedoch auch dicke Kollagenfibrillen nachgewiesen werden. Diese Kollagenfibrillen sind zwar selten, wegen ihrer großen Durchmesser aber relativ leicht zu identifizieren (Abbildung 3.41, C und D Blockpfeil). Der Durchmesser dieser dicken Fibrillen liegt zwischen 40 und 100 nm mit einem Durchschnitt von ca. 64,3 nm ($n = 42$, Standardabweichung: 17,6). Durch Immunogold-Elektronenmikroskopie mit dem Kollagen I-Antikörper AF5610 wurde Kollagen in dünnen aber nicht in dicken Kollagenfibrillen detektiert (Abbildung 3.41, B). Zusätzlich zu dünnen Kollagen I-haltigen Fibrillen, konnten einige dünne Kollagenfibrillen identifiziert werden, die nicht mit Kollagen I-Antikörpern markiert wurden (Abbildung 3.41, C Blockpfeil). Durch die Immunogold-Elektronenmikroskopie mit dem Antikörper MAB8887 konnte gezeigt werden, dass dicke (Abbildung 3.41, D Blockpfeil) sowie eine kleine Population von dünnen cornealen Kollagenfibrillen (Abbildung 3.41, D Pfeilspitze) Kollagen II enthalten.

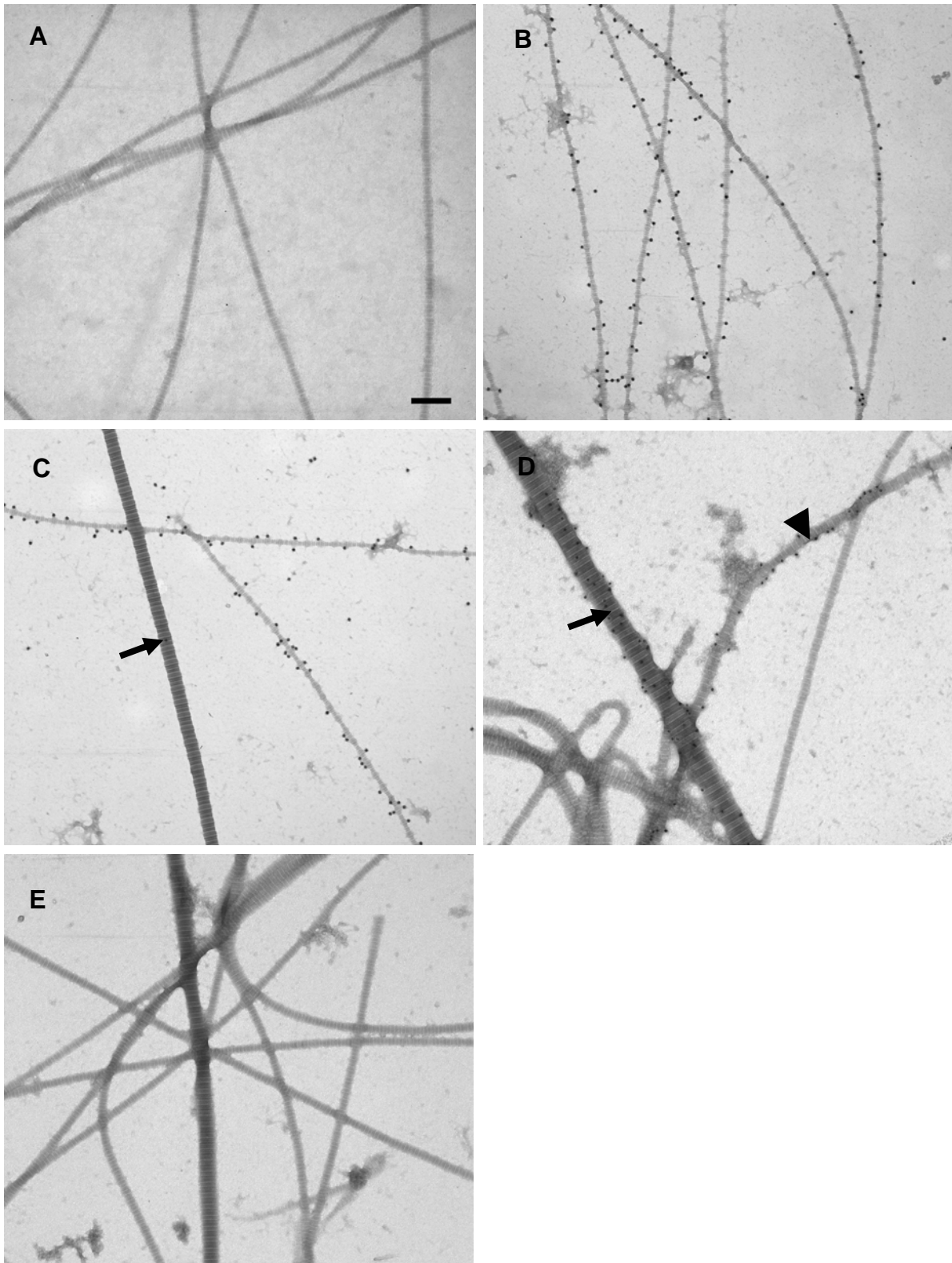


Abbildung 3.41: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Extrakten suprastruktureller Fragmente der bovinen Cornea (in Neutralsalzpuffer). Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). **C:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). **D:** Kollagen II-Antikörper MAB8887 (Goldpartikel). **E:** Kontrolle ohne Primäntikörper. Messbalken: 200 nm.

Um zu überprüfen, ob Kollagen II-haltige corneale Kollagenfibrillen auch Kollagen I enthalten, wurden Doppelmarkierungen mit den Antikörpern BP8028 (Kollagen I) und MAB8887 (Kollagen II) durchgeführt. Mit Neutralsalzpuffer extrahierte Fibrillen weisen unabhängig von ihren Durchmessern keine Kollagen I-Markierung auf, wenn sie Kollagen II-positiv waren (Abbildung 3.42, A und B Blockpfeil). Dünne Kollagen I-haltige Fibrillen, welche die quantitativ größte Population cornealer Kollagenfibrillen ausmachen, wurden hingegen nicht mit Kollagen II-Antikörpern markiert (Abbildung 3.42, A und B Pfeilspitze). Es konnte demnach festgestellt werden, dass Kollagen I und Kollagen II in unterschiedlichen Populationen der heterotypischen Kollagen-

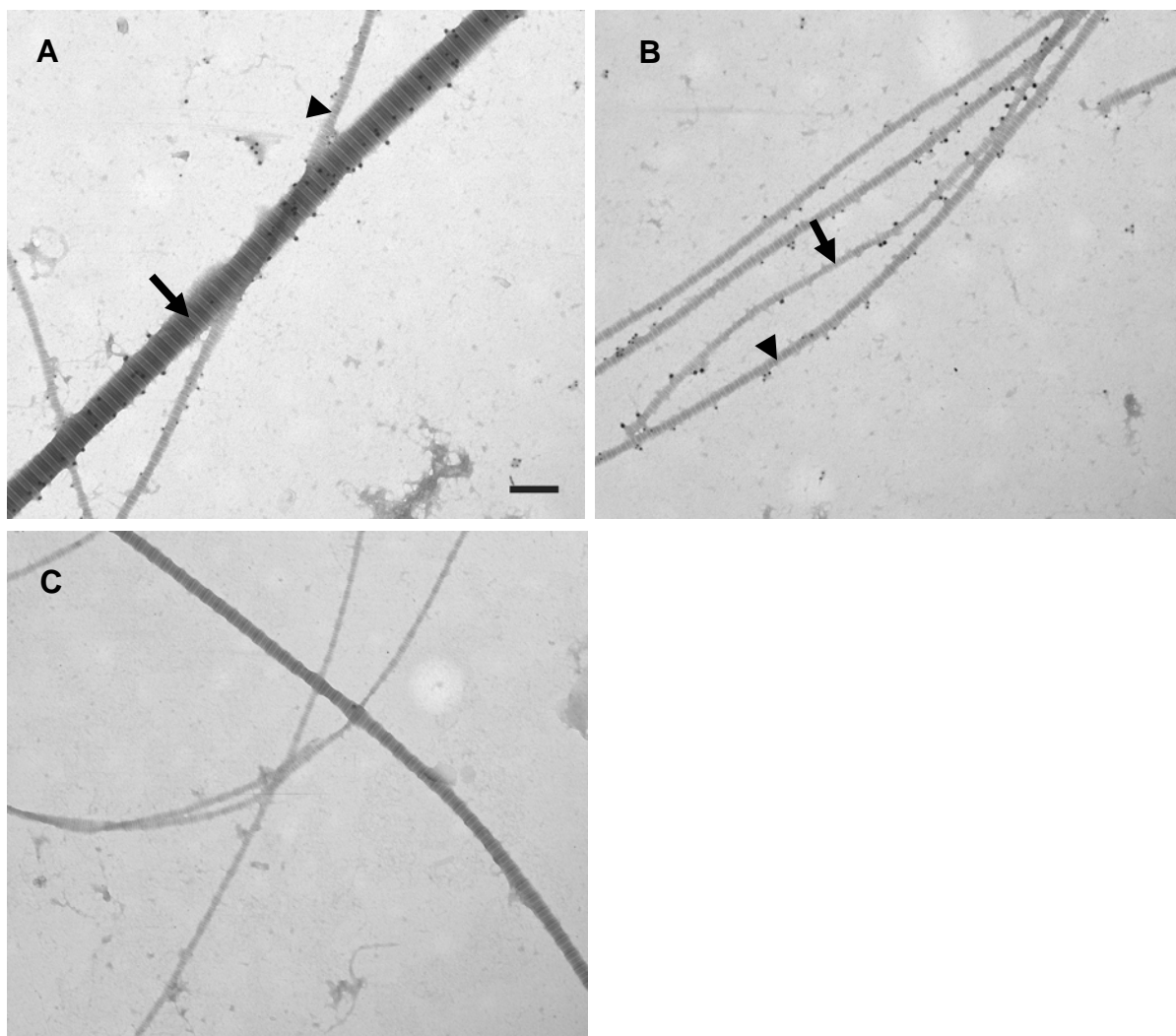


Abbildung 3.42: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Neutralsalz-Extrakten suprastruktureller Fragmente der bovinen Cornea mit Doppelmarkierungen. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen I-Antikörper BP8028 (kleine Goldpartikel [12 nm]) und Kollagen II-Antikörper MAB8887 (große Goldpartikel [18 nm]). **B:** Kollagen I-Antikörper BP8028 (kleine Goldpartikel [12 nm]) und Kollagen II-Antikörper MAB8887 (große Goldpartikel [18 nm]). **C:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Pfeilspitze: Kollagen I-haltige Fibrille; Blockpfeil: Kollagen II-haltige Fibrille. Messbalken 200 nm.

fibrillen der adulten Cornea vorkommen (Abbildung 3.42, B). Es kann dabei zwischen Populationen dünner Kollagen I-haltiger, dünner Kollagen II-haltiger sowie dicker Kollagen II-haltiger Fibrillen unterschieden werden.

3.4.10 Demaskierung suprastruktureller Fragmente der Cornea

Für die suprastrukturelle Zuordnung des Kollagen V in Extrakten cornealer Fibrillenfragmente wurde eine Demaskierung von Epitopen mit Essigsäure durchgeführt. Dazu wurden Proben der bovinen Cornea direkt in Essigsäure homogenisiert. Wie auch in entsprechenden Präparaten der humanen Haut (siehe 3.1.12), konnten in Essigsäure-Extrakten der bovinen Cornea Kollagenfibrillen

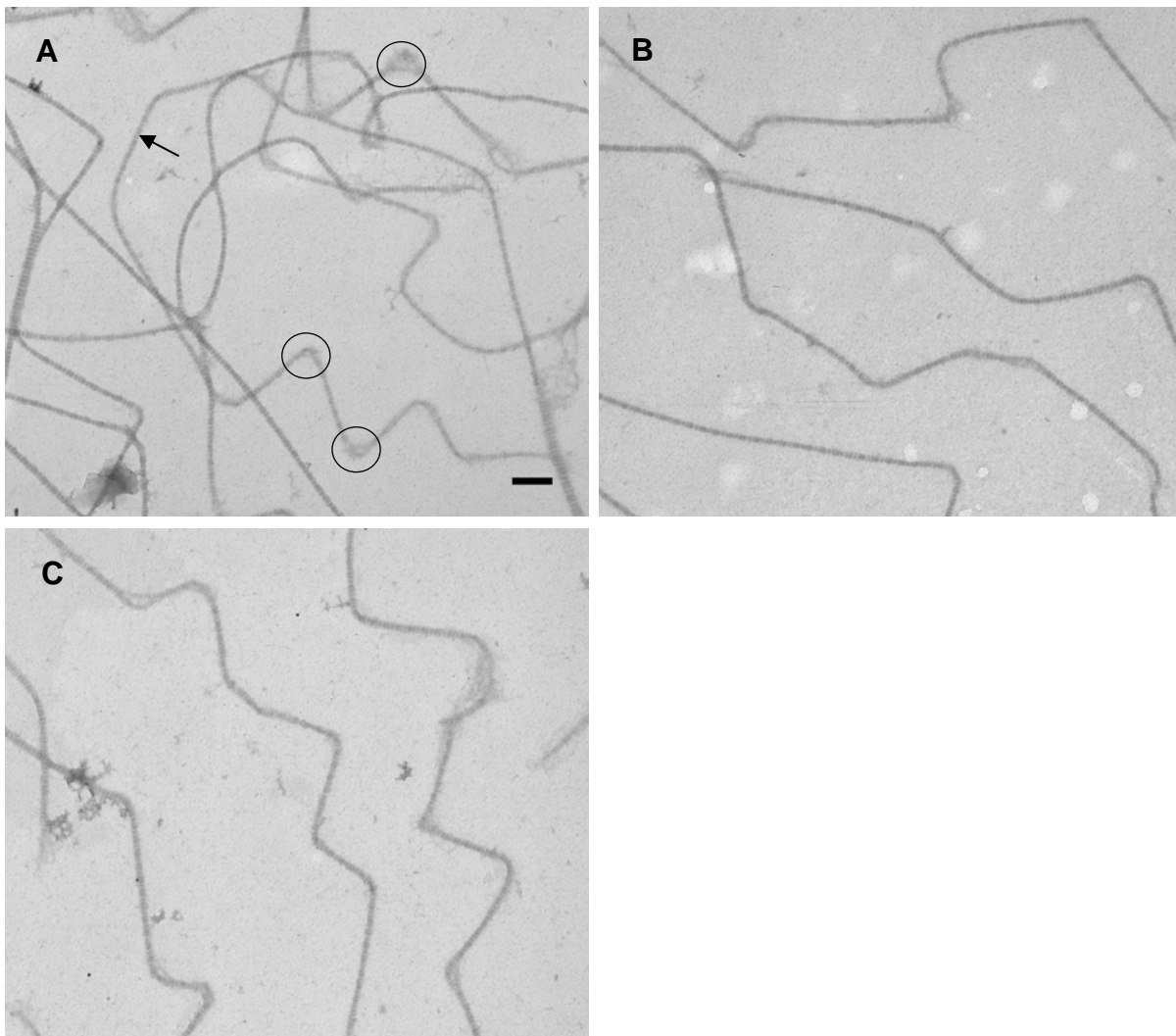


Abbildung 3.43: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Extrakten der bovinen Cornea in 0,1 M Essigsäure. Alle Extrakte wurden für 15 min mit Essigsäure inkubiert. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen V-Antikörper MAB3393. **C:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Kreise: Knicke mit aufgelöster Fibrillenstruktur; Pfeil: Abschnitte mit intakter Fibrillenstruktur. Messbalken 200 nm.

gefunden werden, deren Struktur durch die Einwirkung der Essigsäure verändert war (Abbildung 3.43). Solche Fibrillen zeichneten sich durch viele Knicke entlang ihrer Längsachse aus, an denen die Struktur durch die Dissoziation der Kollagenmoleküle aus der kompakten D-periodischen Packung aufgelöst ist (Abbildung 3.43, A Kreise). Zwischen diesen Knicken konnte jedoch das charakteristische Bänderungsmuster gut identifiziert werden (Abbildung 3.43, A Pfeil). Im Gegensatz zu Präparaten der Haut, wurden in Präparaten der Cornea nur wenige Fibrillenfragmente gefunden, deren Struktur unverändert erschien. Mit der Immunogold-Elektronenmikroskopie konnte keine Kollagen V-Markierung (Antikörper: 13F6, 18G5, 6A7 und MAB3393) von suprastrukturellen Fragmenten in solchen Extrakten gefunden werden (Abbildung 3.43, A, B). Auch an Kollagenfibrillenenden, deren Struktur durch die Einwirkung der Essigsäure gestört war, konnte keine Markierung mit Kollagen V-Antikörpern nachgewiesen werden.

3.4.11 Extrakte suprastruktureller Fragmente der humanen Cornea

Auf Grund der fehlenden Reaktivität des Antikörpers MAB3392 mit dem bovinen Protein wurden ultrastrukturelle Untersuchungen des Kollagen III an Extrakten der humanen Cornea durchgeführt. Die Proben der humanen Cornea stammen von Organspendern im Alter zwischen 50 und 60 Jahren, wohingegen bovine Corneaprobe von Tieren im Alter zwischen 1 und 2 Jahren verwendet wurden. In Extrakten der humanen Cornea wurden Fragmente von Kollagenfibrillen gefunden, die sich durch homogene dünne Durchmesser von durchschnittlich 24,7 nm ($n = 43$, Standardabweichung: 4,1) auszeichnen (Abbildung 3.44, A und B Pfeile). Durch die Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde Kollagen I (Antikörper: AF5610) in dünnen Fibrillen, die die quantitativ größte Population cornealer Kollagenfibrillen darstellen, nachgewiesen (Abbildung 3.44, B). Kollagen V war hingegen (Antikörper: 13F6, 18G5, 6A7 und MAB3393) nicht nachweisbar (Abbildung 3.44, A).

Zusätzlich zu dünnen Kollagenfibrillen wurden dicke Kollagenfibrillen gefunden, die einen Durchmesser zwischen 40 und 80 nm mit einem Durchschnitt von 54,9 nm ($n = 42$, Standardabweichung: 11,7) aufwiesen (Abbildung 3.44, A und B Pfeilspitze). Wie zuvor für die bovine Cornea gezeigt wurde (siehe 3.4.2) handelte es sich dabei auch in der humanen Cornea um eine quantitativ kleine Population. Im Gegensatz zu

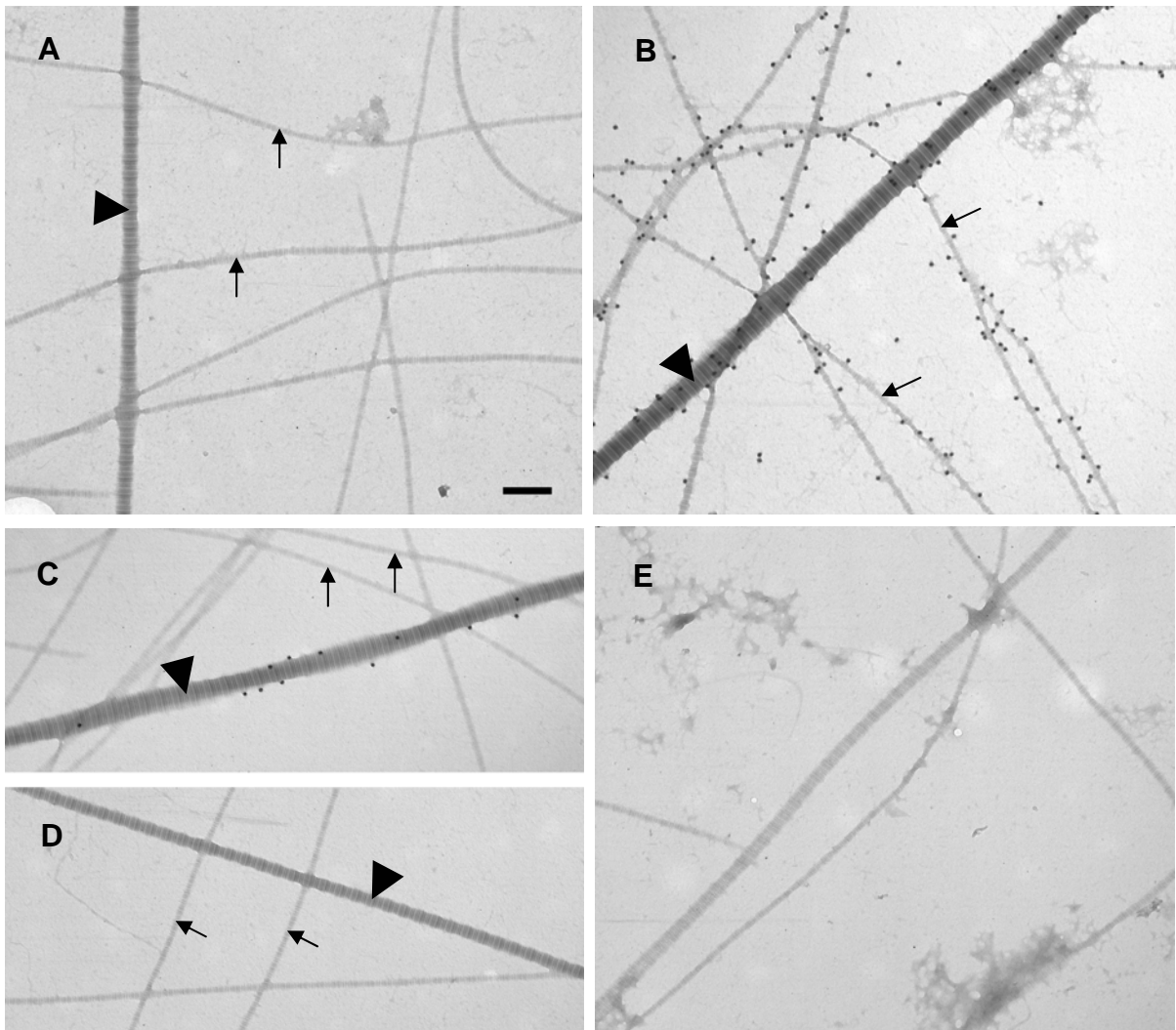


Abbildung 3.44: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Neutralsalz-Extrakten suprastruktureller Fragmente der humanen Cornea. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen V-Antikörper 13F6. **B:** Kollagen I-Antikörper AF5610 (Goldpartikel). **C:** Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Goldpartikel). **D:** Kollagen III-Antikörper MAB3392 (Goldpartikel). **E:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Pfeile: dünne Fibrillen mit homogenen Durchmessern; Pfeilspitzen: dicke Fibrillen mit heterogenen Durchmessern. Messbalken 200 nm.

der bovinen Cornea (siehe 3.4.2) wurde in der humanen Cornea Kollagen I (Antikörper: AF5610) in einigen jedoch nicht allen dicke Kollagenfibrillen nachgewiesen (Abbildung 3.44, B Pfeilspitze). Außerdem enthielten einige dicke Fibrillen Kollagen III (Abbildung 3.44, C Pfeilspitze), wohingegen andere keine Immunreaktivität mit Kollagen III-Antikörpern (Antikörper: MAB3392) aufwiesen (Abbildung 3.44, D Pfeilspitze). Kollagen III war hingegen nicht in dünnen Kollagenfibrillen nachweisbar (Abbildung 3.44, C und D Pfeile). Um zu untersuchen, ob Kollagen I und Kollagen III gemeinsam in heterotypischen, cornealen Kollagenfibrillen vorkommen, wurden

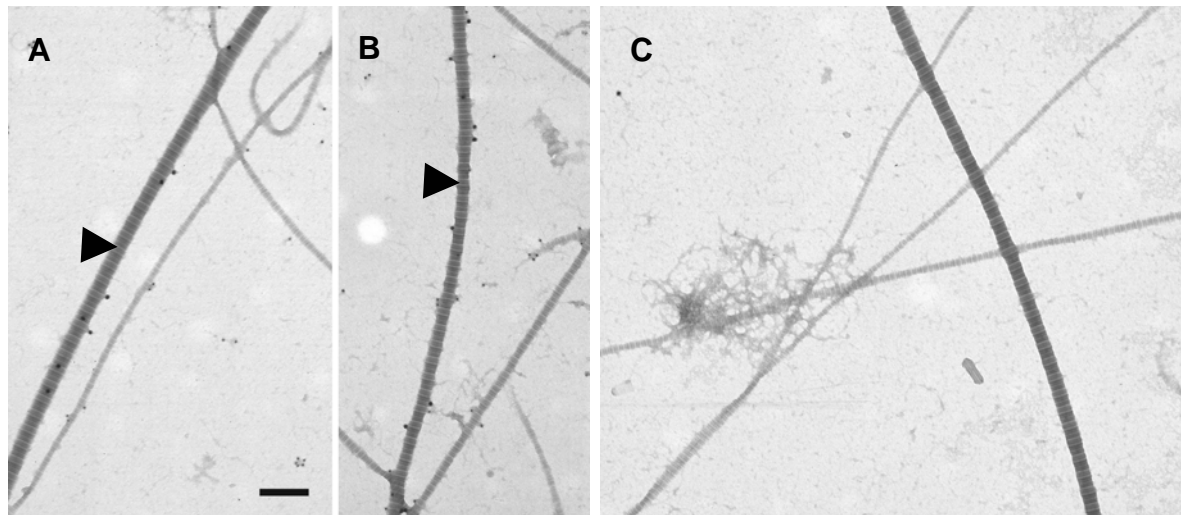


Abbildung 3.45: Immunogold-Elektronenmikroskopie von Neutralsalz-Extrakten suprastruktureller Fragmente der humanen Cornea mit Doppelmarkierungen. Die Immunogold-Markierung ist an schwarzen Punkten zu erkennen. **A:** Kollagen I-Antikörper BP8028 (kleine Goldpartikel [12 nm]) und Kollagen III-Antikörper MAB3392 (große Goldpartikel [18 nm]). **B:** Kollagen I-Antikörper BP8028 (kleine Goldpartikel [12 nm]) und Kollagen III-Antikörper MAB3392 (große Goldpartikel [18 nm]). **C:** Kontrolle ohne Primärantikörper. Pfeilspitzen: dicke Fibrillen mit Kollagen III Markierung. Messbalken 200 nm.

Doppelmarkierungen durchgeführt. Einige dicke Kollagenfibrillen, die Kollagen III (Antikörper: MAB3392) enthalten, waren jedoch nicht Kollagen I-positiv (Antikörper: BP8028) (Abbildung 3.45, A Pfeilspitze). Andere Kollagen III-haltige Fibrillen weisen hingegen eine Kollagen I-Markierung auf (Abbildung 3.45, B Pfeilspitze).

4 Diskussion

4.1 Kollagen V in extrafibrillären Suprastrukturen

Es wird angenommen, dass Kollagen V das laterale Wachstum von Kollagenfibrillen durch eine räumliche Störung der Anlagerung weiterer Kollagenmoleküle über sein unprozessiertes N-terminales Propeptid limitiert (Adachi und Hayashi, 1986; Adachi und Hayashi, 1987; Linsenmayer *et al.*, 1993). So wird die Assemblierung der dünnen cornealen Kollagenfibrillen (25 nm) zumindest teilweise auf die relativ hohe Menge an Kollagen V (15 - 20 %) in der Cornea zurückgeführt (Birk, 2001). Im Zusammenhang mit älteren Befunde wurde hingegen angenommen, dass Kollagen V eine Komponente von Basalmembranen der Haut, der Lunge, der Cornea sowie der glomerulären Basalmembran der Niere ist und zusammen mit Kollagen IV ein Teil der netzwerkbildenden Komponenten der *Lamina densa* darstellt (Roll *et al.*, 1980; Konomi *et al.*, 1984). Außerdem wurde Kollagen V in der Nähe von Basalmembranen in dünnen (12 nm) nicht gebänderten Filamenten sowie in dünnen gebänderten Fibrillen nachgewiesen (Fitch *et al.*, 1984; Modesti *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986). Auf Grund dieser unterschiedlichen Daten bezüglich der suprastrukturellen Zuordnung und Funktion wird angenommen, dass Kollagen V sowohl ein Bestandteil heterotypischer Kollagenfibrillen als auch ein Bestandteil dünner fibrillärer Strukturen ist, denen eine wichtige Rolle im Verankerungsapparat von Basalmembranen zugesprochen wird (Adachi *et al.*, 1997).

4.1.1 Maskierung des N-Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette

In Untersuchungen der embryonalen Hühner-Cornea wurde Kollagen V sowohl in der Bowman's Schicht als auch dem tieferen Stroma gefunden (Linsenmayer *et al.*, 1983; Fitch *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986; Fitch *et al.*, 1988). Dabei ist für den immunhistologischen Nachweis im tieferen Stroma eine Demaskierung von Epitopen notwendig (Birk *et al.*, 1988). Die eingeschränkte Erreichbarkeit der Epitope erklären Linsenmayer *et al.* (1993) durch eine starke Maskierung der tripelhelikalen Abschnitte des Kollagen V in heterotypischen Kollagenfibrillen. Das N-terminale Propeptid ist hingegen an die Oberfläche von Kollagenfibrillen exponiert und daher

für Antikörper ohne vorherige Demaskierung zugänglich (Birk *et al.*, 1986; Linsenmayer *et al.*, 1993). Die große tripelhelikale Domäne des Kollagen V ist in der Bowman's Schicht ebenfalls ohne vorherige Demaskierung immunchemisch nachweisbar, was Birk *et al.* (1986) auf die charakteristischen kleinen Fibrillendurchmesser (20 nm) in dieser Region und einer daraus resultierenden schwachen Maskierung zurückführen.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen an der embryonalen Hühner-Cornea, konnte das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette hier nicht ohne eine vorherige Demaskierung von Epitopen in der tiefen Dermis und im tiefen cornealen Stroma immunchemisch detektiert werden. Auch durch Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten der Haut und der Cornea war das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette an der Fibrillenoberfläche nicht nachweisbar (siehe 3.1.13, 3.4.9). Diese Befunde bestätigen demnach eine Projektion der N-terminalen globulären Propeptide von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren an die Oberfläche heterotypischer Kollagenfibrillen im tiefen Stroma nicht. Vielmehr wurde gezeigt, dass sowohl der tripelhelikale Abschnitt als auch das N-terminale Propeptid von Kollagen V in diesen Regionen stark maskiert vorliegen. In früheren Studien an humaner, boviner und muriner Cornea ist beschrieben worden, dass die variable Domäne des N-Propeptids in adultem im Gegensatz zu jungem Gewebe (Cornea 5 bis 6 Monate alter Mäuse) maskiert vorliegt (Peters *et al.*, 1996). Peters *et al.* nehmen an, dass die Maskierung des N-terminalen Propeptids ein Prozess der Reifung von cornealen Kollagenfibrillen beziehungsweise der cornealen Matrix ist. Eine reifungsabhängige Maskierung wie in der Cornea ist auch eine mögliche Erklärung für die Maskierung des N-terminalen Propeptids der adulten Haut.

Zusätzlich zu den Befunden von Peters *et al.* konnte hier gezeigt werden, dass das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette in der oberen papillären Dermis sowie der Bowman's Schicht adulter Gewebe unmaskiert ist. Ferner wurde gezeigt, dass auch der tripelhelikale Abschnitt der $\alpha 2(V)$ -Kette in der Bowman's Schicht und der oberen papillären Dermis maskiert vorliegt. Da geeignete Antikörper nicht verfügbar waren, wurde jedoch nicht untersucht, ob das N-terminale Propeptid der $\alpha 2(V)$ -Kette in der oberen papillären Dermis und der Bowman's Schicht ebenfalls unmaskiert vorliegt. Demnach gibt es keine Hinweise, ob es sich bei Kollagen V-Molekülen der oberen papillären Dermis und der Bowman's Schicht um $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere oder möglicherweise um $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimere handelt.

Die regionsabhängige immunchemische Verfügbarkeit des N-terminalen Propeptids deutet auf Unterschiede in der suprastrukturellen Organisation des Kollagen V in unterschiedlichen Geweben und Gewebeschichten hin. Wenn die $\alpha 1(V)$ -Kette in der oberen papillären Dermis und der Bowman's Schicht eine Komponente von Kollagen I-haltigen Kollagenfibrillen ist, besteht demnach in diesen Regionen eine andere Fibrillenorganisation beziehungsweise eine andere Fibrillenzusammensetzung als in tieferen Gewebeschichten. Da Kollagen V wohl aber Kollagen I hier nicht in heterotypischen Kollagenfibrillen (siehe 3.1.13, 3.1.14, 3.1.15, 3.4.9, 3.4.10) detektiert, durch immunhistologische (siehe 3.1.1, 3.4.1), proteinchemische (siehe 3.1.8, 3.1.9, 3.4.5) und massenspektrometrische (siehe 3.1.11, 3.4.7) Untersuchungen jedoch nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass Kollagen V keine Komponente der Kollagenfibrillen, sondern mikrofibrillärer oder netzwerkartig organisierter Suprastrukturen in diesen Regionen ist. Unterschiede in der Maskierung des N-terminalen Propeptids von Kollagen V stehen möglicherweise im Zusammenhang mit Unterschieden in der Prozessierung dieser Domäne (siehe auch 4.1.3). Dementsprechend kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kollagen V auf Grund einer stärkeren Prozessierungen des N-terminalen Propeptids in tieferen Gewebeschichten stärker maskiert wird. Unter Berücksichtigung der Befunde an embryonaler Hühner-Cornea (Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988) muss angenommen werden, dass diese Prozessierung entwicklungsabhängig ist. Möglicherweise ist die unterschiedliche Prozessierung des N-terminalen Propeptids in der Hühner-Cornea und in boviner Cornea jedoch speziesbedingt.

4.1.1.1 Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen

Wie in früheren Veröffentlichungen gezeigt wurde, gibt es Hinweise auf eine Kolo-kalisation von Kollagen V und Kollagen IV in Basalmembranen der humanen Cornea, Lunge und Haut (Konomi *et al.*, 1984) sowie der murinen glomerulären Basalmembran (Roll *et al.*, 1980). Nach eigenen immunhistologischen Ergebnissen, über das Vorkommen des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette (siehe 3.1.1, 3.4.1), sowie nach Ergebnissen anderer über die Hühner-Cornea (Fitch *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986) und die humane Amnionmembran (Modesti *et al.*, 1984), kommt Kollagen V in unmittelbarer Nähe von, aber nicht in Basalmembranen der humanen Haut oder der bovinen Cornea vor (siehe 3.1.4, 3.4.4). Diese Daten bestätigen

demnach die durch Konomi *et al.* (1984) beschriebene Kollokalisierung von Kollagen V und IV in Basalmembranen der Haut und der Cornea nicht, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die verbesserte örtliche Auflösung des hier verwendeten Fluoreszenzmikroskops gegenüber der Analyse von Konomi *et al.* zurückzuführen ist. Es konnte hingegen gezeigt werden, dass die mit Kollagen V-Antikörpern markierten Regionen auf der dermalen beziehungsweise stromalen Seite unmittelbar unterhalb der epithelialen Basalmembranen liegen.

Die vorliegenden Resultate unterstützen daher die Annahme, dass Kollagen V zusätzlich zu interstitiellen Kollagenfibrillen möglicherweise ein Bestandteil epithelialer Verankerungsapparate ist (Adachi *et al.*, 1997). Adachi *et al.* postulieren, dass Kollagen V in dünnen gebänderten Fibrillen in der oberen papillären Dermis vorkommt, die durch Verzweigungen gekennzeichnet sind und an der Verankerung der Basalmembran mit der darunter liegenden interstitiellen Matrix beteiligt sind (Adachi *et al.*, 1997). Da es jedoch auch Hinweise für die Lokalisation von Kollagen V in Mikrofibrillen gibt (Modesti *et al.*, 1984), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kollagen V ein Bestandteil von Mikrofibrillen ist, die Fibrillin oder Kollagen VI enthalten (siehe dazu auch 4.1.1.2), und die beide ebenfalls in epithelialen Verankerungszonen vorkommen. In der Niere von Ratten wurde die $\alpha 1(V)$ -Kette durch Immunelektronenmikroskopie an Kollagenfibrillen, auf der stromalen Seite von vaskulären Basalmembranen und weit verbreitet im renalen Interstitium in granulösen, mitunter filamentösen Suprastrukturen gefunden (Martinez-Hernandez *et al.*, 1982). Martinez-Hernandez *et al.* nehmen an, dass Kollagen V eine Verbindungsfunktion für Basalmembranen mit Kollagenfibrillen hat. Eine ähnliche Funktion des Kollagen V kann auch in der Haut und der Cornea in Betracht gezogen werden. Nichtsdestotrotz wurde an der Niere gezeigt, dass Kollagen V keine integrale Komponente der Verankerungsapparate epithelialer oder glomerulärer Basalmembranen ist (Martinez-Hernandez *et al.*, 1982), wohingegen die $\alpha 1(V)$ -Kette in der Haut und der Cornea vor allem entlang der Epithelien und nicht um Blutgefäße gefunden wurde (siehe 3.1.1, 3.1.4, 3.4.1, 3.4.4). Diese Unterschiede müssen auf organspezifische Funktionen vaskulärer sowie epithelialer Basalmembranen zurückzuführen sein. Demnach ist Kollagen V offensichtlich kein Bestandteil der Verankerungszonen aller Basalmembranen sondern nur spezialisierter Basalmembranen.

4.1.1.2 Kolokalisation der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 5(VI)$ -Kette

In der oberen papillären Dermis kann zwischen verschiedenen Verbindungssystemen unterschieden werden, die die Basalmembran in der darunter liegenden interstitiellen Matrix verankern (Adachi *et al.*, 1997). Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Kollagen VII-haltigen Verankerungsfibrillen, die durch ihre Verknüpfung zwischen Komponenten der Basalmembran und Kollagen I-haltigen Kollagenfibrillen Verankerungselemente der dermo-epidermalen Junctionszone darstellen (Holbrook und Smith, 2002; Villone *et al.*, 2008). Außerdem sind in dieser Region Netzwerke aus Fibrillin-haltigen, Fibronektin-haltigen und perlenschnurartig organisierten Kollagen VI-haltigen Mikrofibrillen sowie Proteoglykan-haltigen Mikrofasern lokalisiert (Adachi *et al.*, 1997). Wie hier gezeigt wurde, ist auch Kollagen V in der Verankerungszone der Epidermis lokalisiert (siehe 4.1.1). Da es Hinweise gibt, wonach Kollagen V in dünnen Fibrillen lokalisiert ist (Modesti *et al.*, 1984), wurden Kolokalisationen von Kollagen V mit Fibrillin-1 sowie mit Kollagen VI in der oberen papillären Dermis untersucht. In der adulten humanen Haut kommen Fibrillin-1 und Kollagen V jedoch nicht überlappend, und somit in gemeinsamen Mikrofibrillen vor (siehe 3.1.6).

Kollagen VI, das eine wichtige Komponente sowohl des Bindegewebes der Haut (Hessle und Engvall, 1984; Keene *et al.*, 1988) als auch der Cornea (Linsenmayer *et al.*, 1986) darstellt, bildet suprastrukturelle Aggregate, die in Form von perlenschnurartigen Mikrofibrillen im Bindegewebe vorkommen und mit quergestreiften Kollagenfibrillen verwoben sind. Kollagen VI setzt sich typischerweise aus Heterotrimeren der $\alpha 1(VI)$ -, $\alpha 2(VI)$ - und $\alpha 3(VI)$ -Kette im Verhältnis 1:1:1 zusammen, die in Form von Tetrameren zu Mikrofibrillen assemblieren (Furthmayr *et al.*, 1983). Kollagen VI-haltige Mikrofibrillen sind in allen Schichten der Dermis lokalisiert, wo sie ein stark verzweigtes, offenes und filamentöses Netzwerk bilden (Keene *et al.*, 1988). Keene *et al.* konnten durch Immunogold-Elektronenmikroskopie zeigen, dass Kollagen VI auch in der Nähe der Basalmembranen von Nerven, Blutgefäßen und Fettzellen der Haut lokalisiert ist. Eine Markierung mit Kollagen VI-Antikörpern im Bereich der Verankerungszone der dermo-epidermalen Basalmembran war hingegen deutlich reduziert (Keene *et al.*, 1988). Erst kürzlich wurden jedoch drei weitere Untereinheiten des Kollagen VI [$\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$, $\alpha 6(VI)$] identifiziert, zu deren suprastruktureller Organisation bisher wenig bekannt ist (Gara *et al.*, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2008). Durch immunhistologische Untersuchungen von murinem Darm- und Muskelgewebe

konnte gezeigt werden, dass die $\alpha 4(\text{VI})$ -, $\alpha 5(\text{VI})$ - und $\alpha 6(\text{VI})$ -Ketten in unmittelbarer Nähe von Basalmembranen lokalisiert sind (Gara *et al.*, 2008). In bisher unveröffentlichten immunhistologischen Untersuchungen der humanen Haut durch Gara *et al.* konnte die $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette unterhalb der dermo-epidermalen Basalmembran nachgewiesen werden.

Es wurde hier die Kolo-kalisation der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette und der $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette in der adulten humanen Haut untersucht. Entsprechende Untersuchungen mit histologischen Schnitten der adulten bovinen Cornea wurden wegen fehlender Reaktivität von Antikörpern gegen humane $\alpha 5(\text{VI})$ -Ketten mit bovinen Protein nicht durchgeführt. Jedoch konnten in der humanen Haut mit Antikörpern gegen die N2-N6 Domänen der humanen $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette und Antikörpern gegen das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette eine deutliche Kolo-kalisation in der oberen papillären Dermis entlang der gesamten Epidermis nachgewiesen werden (siehe 3.1.7). Die nahezu identische Verteilung der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette und der $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette in der oberen papillären Dermis lässt die Hypothese zu, dass Kollagen V und Kollagen VI in dieser Region Komponenten gemeinsamer Suprastrukturen sind. Durch Immunblots von Hautschichten unterschiedlicher Tiefe konnte die $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette im Gegensatz zu der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette jedoch nur in den obersten dermalen Hautschichten nachgewiesen werden (siehe 3.1.10). Damit kommt deren suprastrukturelle Vergesellschaftung nur in der papillären Dermis in Frage, wo sie allerdings für die Verankerung der Epidermis mit dem darunter liegenden dermalen Bindegewebe eine wichtige Rolle spielen könnten.

Bereits vor der Entdeckung der neuen Kollagen VI-Ketten wurde beschrieben, dass Kollagen V und Kollagen VI in der humanen Haut die Räume zwischen Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Basalmembranen ausfüllen (Kobayasi und Karlsmark, 2006). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Kollagen V, außer als Bestandteil von Kollagenfibrillen auch netzwerkartig mit Kollagen VI-haltigen Mikrofibrillen verwoben organisiert sein kann. Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit folgt jedoch, dass die Suprastrukturen der Kollagene V und VI in der dermo-epidermalen Verankerungszone sich von denjenigen der tieferen Dermis in ihrer Kollagen-Zusammensetzung unterscheiden. Einerseits kommt die $\alpha 5(\text{VI})$ -Kette in tieferen Schichten der Dermis nicht vor (siehe 3.1.7, 3.1.10), andererseits ist das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(\text{V})$ -Kette nur in der tieferen Dermis immunchemisch stark maskiert.

4.1.1.3 Suprastrukturen der Kollagene V und I

Durch Immunogold-Elektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten konnten hier keine Kollagen V-haltigen Suprastrukturen in der humanen Haut und der bovinen Cornea identifiziert werden, wohingegen Kollagenfibrillen schwach Kollagen I-positiv waren (siehe 3.1.12, 3.4.8). Selbst corneale Kollagenfibrillen, für die eine sehr homogene Zusammensetzung aus Kollagen I und Kollagen V bekannt ist (Fitch *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988; Linsenmayer *et al.*, 1990), wurden nur schwach mit Kollagen I-Antikörpern markiert (siehe 3.4.8). Kollagenfibrillen in suprastrukturellen Extrakten der Cornea, weisen hingegen eine intensive und homogene Kollagen I- aber keine Kollagen V-Markierung entlang der gesamten Fibrillenfragmente auf (siehe 3.4.9). Diese Unterschiede der Kollagen I-Markierung zwischen Ultradünnschnitten und suprastrukturellen Extrakten deuten eine offensichtlich stärkere Maskierung von Epitopen in Ultradünnschnitten an, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Aufbereitung und die Einbettung des Gewebes zurückzuführen ist. Auch durch das Herauslösen von Einbettungsmedium mit Ethanol wurde Kollagen V, dessen Epitope ohnehin größtenteils durch Matrix-Proteine maskiert sind, nicht nachgewiesen (siehe 3.1.12). In mit Ethanol behandelten Ultradünnschnitten war im Bereich der dermo-epidermalen Verankerungszone ein Netzwerk aus Mikrofibrillen zu erkennen, dass sowohl mit den Verankerungsfibrillen der Basalmembran als auch mit Basalmembran-nahen Kollagenfibrillen verwoben ist. Auf Grund einer fehlenden Immunogold-Markierung konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob es sich bei diesem Netzwerk um Kollagen V-haltige Suprastrukturen handelt.

Entgegen den Erwartungen auf der Grundlage immunhistologischer Untersuchungen (siehe 4.1.1) konnten in suprastrukturellen Extrakten der Haut und der Cornea keine Kollagen V-haltigen Suprastrukturen identifiziert werden. Somit wurden mit Antikörpern gegen das N-Propeptid auch keine extrafibrillären, Kollagen V-haltigen Suprastrukturen identifiziert, die Bestandteile epithelialer Verankerungsapparate sein könnten. Diese Befunde stehen jedoch im Widerspruch zu Immunblots des Kollagen V, die zeigten, dass zumindest ein Teil der $\alpha 1(V)$ -haltigen Aggregate unter neutralen Pufferbedingungen löslich und biochemisch nachweisbar ist (siehe 3.1.8, 3.4.5). Eine Ursache dafür könnte sein, dass Epitope des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette unter denaturierenden Pufferbedingungen, wie bei Immunblots, und nicht

unter nativen Pufferbedingungen, wie bei der Immunogold-Elektronenmikroskopie, für Antikörper zugänglich sind.

4.1.2 Kollagen V in tieferen Schichten der Haut und der Cornea

Kollagen V ist eine Komponente Kollagen I- und III-haltiger Fibrillen der Haut (Lapiere *et al.*, 1977; Adachi und Hayashi, 1986; Keene *et al.*, 1997). Für den hier dargestellten immunhistologischen Nachweis der Kollagene I und III, die in der gesamten Dermis vorkommen, war eine Demaskierung der Epitope nicht notwendig (siehe 3.1.2). Dieser Nachweis bestärkt die Annahme, dass die Kollagene I, III und V in der gesamten Dermis in gemeinsamen heterotypischen Kollagenfibrillen lokalisiert sind (Adachi und Hayashi, 1986; Keene *et al.*, 1987; Keene *et al.*, 1997), in denen das Kollagen V durch die Anlagerung der Kollagene I und III maskiert ist (Linsmayer *et al.*, 1993). Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei Untersuchungen der Kollagene I und V an der bovinen Cornea erzielt (siehe 3.4.1, 3.4.2). Da jedoch nicht nur der tripelhelikale Abschnitt des Kollagen V sondern auch das unprozessierte Propeptid in der tiefen Dermis und dem tiefen cornealen Stroma maskiert vorliegt (siehe auch 4.1.1), ist nicht klar, ob Kollagen V ausschließlich durch die Kollagene I oder I und III maskiert wird, oder ob andere Matrix-Proteine im Bereich des N-terminalen Propeptids an Kollagen V gebunden sind.

4.1.2.1 Kollagen V und Tenascin-X

Die klassischen Typen I und II des Ehlers-Danlos Syndroms (EDS), deren Symptome hypermobile Gelenke, hyperelastische Haut, leichte Verletzlichkeit der Haut und eine atrophe Narbenbildung sind, können in 50 % der Fälle auf Kollagen V-Defekte zurückgeführt werden (Loughlin *et al.*, 1995; Burrows *et al.*, 1996; Michalickova *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1998). Nach neueren Untersuchungen können Defekte im Tenascin-X-Gen ebenfalls Ursache der EDS Typen I und II sein (Burch *et al.*, 1997; Schalkwijk *et al.*, 2001). Es ist bisher nicht klar, ob Kollagen V und Tenascin-X funktionelle Gemeinsamkeiten im dermalen Bindegewebe aufweisen, wohingegen eine direkte Interaktion von Tenascin-X und Kollagen XII bekannt ist (Veit *et al.*, 2006a). Bindungsstudien von rekombinanten Tenascin-X-Domänen mit den fibrillären Kollagenen I, III und V zeigen jedoch, dass Tenascin-X möglicherweise ein

Interaktionspartner des Kollagen V ist (Lethias *et al.*, 2006; Egging *et al.*, 2007). Tenascin-X wurde in dieser Arbeit wie auch Kollagen V in der gesamten Dermis gefunden, während Tenascin-C nur in den distalen Bereichen der Dermispapillen und um Blutgefäße vorkam (siehe 3.1.2). Die hier dargestellte immunhistologische Lokalisation von Tenascin-X und Tenascin-C in der humanen Haut stimmt mit früheren Beobachtungen überein (Schalkwijk *et al.*, 2001). Für Tenascin-X wird angenommen, dass es entweder über eine direkte Bindung an fibrilläre Kollagene (Minamitani *et al.*, 2004), Fibrillen-assoziiertes Kollagen XII (Veit *et al.*, 2006a) oder Decorin (Elefteriou *et al.*, 2001) an der Organisation von Kollagenfibrillen des dermalen Bindegewebes beteiligt ist. Mit Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass Tenascin-X auf der Oberfläche von Kollagenfibrillen der humanen Haut lokalisiert ist (Bristow *et al.*, 2005). Diese Annahme wird auch hier durch die Detektion von Tenascin-X in Dermis unterstützt. Wenn Tenascin-X ein Bindungspartner von Kollagen V in der tiefen Dermis ist, muss das N-terminale Propeptid an der Fibrilloberfläche an dieser Bindung beteiligt sein, weil die tripelhelikalen Kollagen V-Abschnitte im Fibrillinneren dafür unzugänglich sind. Dies könnte eine Erklärung für die immunchemische Maskierung des Propeptids in tiefen Schichten der Haut und der Cornea sein, wohingegen im oberen Bereich der papillären Dermis und der Bowman's Schicht keine Maskierung vorliegt.

4.1.2.2 Demaskierung von Kollagen V-Epitopen

Kollagene sind bei niedrigen pH-Werten im Vergleich zu neutralen Pufferbedingungen gut löslich. Für eine Demaskierung von Epitopen des Kollagen V durch die Kollagene I oder III werden daher in der Immunhistologie und Immunogold-Elektronenmikroskopie schwache Säuren verwendet (Fitch *et al.*, 1984; Birk *et al.*, 1988; Fitch *et al.*, 1988; Keene *et al.*, 1997). Hier wurde für die Demaskierung von Kollagen V neben Essigsäurebehandlung auch die limitierte Proteolyse durch bakterielle Kollagenase, MMP-1, Trypsin oder Pepsin verwendet (siehe 3.1.3, 3.1.15). Die Freilegung tripelhelikaler Epitope des Kollagen V gelang zwar durch Pepsin, jedoch nicht durch bakterielle Kollagenase, MMP-1 oder Trypsin.

Pepsin aus dem Magensaft von Vertebraten besitzt eine breite Substratspezifität. Jedoch sind tripelhelikale Abschnitte von Kollagenen im Gegensatz zu den nichthelikalen Propeptiden und Telopeptiden einem limitierten Verdau mit Pepsin gegenüber resistent (Miller, 1972). Da Pepsin die für die Quervernetzung von

fibrillären Kollagenen wichtigen Telopeptide spaltet, wird die kompakte Struktur von Kollagenfibrillen durch einen Verdau mit Pepsin gelockert. Die Reaktivität von Antikörpern gegen den tripelhelikalen Abschnitt der $\alpha 2(V)$ -Kette (Antikörper: MAB3393) nach Pepsin-Behandlung kann daher sowohl ein Hinweis auf eine Maskierung des Kollagen V durch weitere Kollagene als auch durch andere Matrix-Proteine in der tiefen Dermis sein (siehe 3.1.3).

Im Gegensatz zur Immunhistologie war Kollagen V durch Immunogold-Elektronenmikroskopie von suprastrukturellen Extrakten in der Haut und in der Cornea nach Essigsäurebehandlung nicht nachweisbar (siehe 3.1.14, 3.4.10). Die Kollagene I und III wurden hingegen mit und ohne Essigsäurebehandlung in Kollagenfibrillen detektiert, wobei nicht alle Fibrillenfragmente Kollagen I- oder Kollagen III-positiv waren. An den mechanisch generierten Enden von sonst Kollagen I-negativen Fibrillenfragmenten war hingegen eine Immunogold-Markierung mit Kollagen I-Antikörpern festzustellen. Demnach ist Kollagen I im Kern in der dichten Packung solcher Kollagenfibrillen, der an den Enden durch die Homogenisierung freigelegt wurde, lokalisiert und liegt im Bereich intakter Fibrillenabschnitte maskiert vor. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse früherer Untersuchungen, wonach Kollagen III in den äußeren Schichten von Kollagen I-haltigen Fibrillen lokalisiert sein soll (Keene *et al.*, 1987; Fleischmajer *et al.*, 1990a; Keene *et al.*, 1997). Durch Immunogold-Markierungen an den Enden mechanisch generierter Fibrillenfragmente konnte in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass Kollagen XI eine Komponente heterotypischer Knorpelfibrillen ist (Mendler *et al.*, 1989). Kollagen V konnte hier jedoch nicht, analog zu der Lokalisation von Kollagen XI in Knorpelfibrillen, an den Enden mechanisch generierter Fibrillenfragmente der Haut oder der Cornea nachgewiesen werden.

4.1.3 Prozessierung und Ketten-Zusammensetzung des Kollagen V

Wie oben beschrieben sind Unterschiede in der Maskierung des Kollagen V auch als Hinweise für dessen unterschiedliche suprastrukturelle Organisation in distinkten Regionen der Haut und der Cornea zu verstehen (siehe 4.1.1). Außerdem könnte es regionsabhängig in der Haut und in der Cornea eine unterschiedliche Zusammensetzung und Prozessierung der α -Ketten des Kollagen V geben. In unterschiedlich tiefen Schichten der Dermis konnte jedoch keine Änderung im Verhältnis der Gesamtmen-

ge des Kollagen V zu der Gesamtmenge fibrillärer Kollagene festgestellt werden (siehe 3.1.9). Ebenso war das Mengenverhältnis der $\alpha 1(V)$ - zu der $\alpha 2(V)$ -Kette in allen Schichten gleich. Auf der Grundlage früherer Untersuchungen, wonach Kollagen V im Gewebe überwiegend als $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimer vorkommt (Burgeson *et al.*, 1976; Bentz *et al.*, 1978; Niyibizi *et al.*, 1984), sowie auf der Grundlage der hier dargestellten Untersuchungen muss angenommen werden, dass Kollagen V in allen Hautschichten in Form von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren ohne Beteiligung der $\alpha 3(V)$ -Kette organisiert ist.

Im Vergleich zu anderen fibrillären Kollagenen (I, II und III) ist Kollagen V wie Kollagen XI im Gewebe durch ein teilweise oder gar nicht prozessiertes N-terminales Propeptid charakterisiert (Bächinger *et al.*, 1982; Niyibizi *et al.*, 1984; Niyibizi und Eyre, 1993; Moradi-Ameli *et al.*, 1994). Für die Kollagene I, II und III wurde gezeigt, dass die N-terminalen sowie die C-terminalen Propeptide durch Zn^{2+} -abhängige Metalloendoproteinasen (Prokollagen N- und C-Proteinase) prozessiert werden (Prockop *et al.*, 1998), wobei die Prokollagen C-Proteinase auch als *bone morphogenic protein-1* (BMP-1) bekannt ist (Wozney *et al.*, 1988; Kessler *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996). Die Sequenzen der $\alpha 1(V)$ - und $\alpha 2(V)$ -Ketten weisen ebenfalls Schnittstellen für BMP-1 im Bereich der C-terminalen Propeptide auf. In Untersuchungen der biosynthetischen Prozessierung von rekombinant hergestellten humanen $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren und $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren wurde jedoch gezeigt, dass das C-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette im Gegensatz zu dem C-terminalen Propeptid der $\alpha 2(V)$ -Kette durch *Furin-like proteases* gespalten wird (Imamura *et al.*, 1998; Unsöld *et al.*, 2002). Andere Studien belegen hingegen sehr wohl die Prozessierung des C-Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette durch BMP-1 (Kessler *et al.*, 2001). Im Bereich des N-terminalen Propeptids der $\alpha 1(V)$ -Kette konnte eine proteolytische Spaltung durch BMP-1 zwischen der TSPN- (*Thrombospondin-1 N-terminal domain -like*) und der VR-Domäne (variable Domäne) nachgewiesen werden (Imamura *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2001; Unsöld *et al.*, 2002; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007). Es wird daher angenommen, dass es sich bei der reifen Form der $\alpha 1(V)$ -Kette nicht um die $pN\alpha 1(V)$ -Kette handelt, die sich durch ein vollständig prozessiertes C-Propeptid und ein unprozessiertes N-Propeptid auszeichnet, sondern um eine Variante der $pN\alpha 1(V)$ -Kette, bei der das N-Propeptid durch die Abspaltung der TSPN-Domäne nur partiell entfernt wird (Unsöld *et al.*, 2002; Bonod-Bidaud *et al.*, 2007).

4.1.3.1 Prozessierungsvarianten der $\alpha 1(V)$ -Kette in der Haut und der Cornea

In der humanen Haut konnten durch diese Arbeit die pN $\alpha 1(V)$ -Kette und die reife $\alpha 1(V)$ -Kette identifiziert werden (siehe 3.1.10). In der bovinen Cornea wurden hingegen die reife Form der $\alpha 1(V)$ -Kette jedoch nicht die pN $\alpha 1(V)$ -Kette nachgewiesen (siehe 3.4.5). Wie bereits beschrieben wurde, wird die Assemblierung homogener dünner Kollagenfibrillen in der Cornea auf die verhältnismäßig große Menge an Kollagen V (15 – 20%) zurückgeführt (Birk, 2001). Dermale Kollagenfibrillen zeichnen sich hingegen durch dickere und heterogenere Fibrillendurchmesser als corneale Kollagenfibrillen aus, was möglicherweise zusätzlich zu der geringeren Menge an Kollagen V auch auf Unterschiede in der Prozessierung des Kollagen V zurückzuführen ist. Bisher wurde in diesem Zusammenhang nicht beschrieben, ob an der Regulation der Fibrillendurchmesser, die durch eine räumliche Störung der lateralen Anlagerung von Kollagenen limitiert werden (Linsenmayer *et al.*, 1993), die pN $\alpha 1(V)$ -Kette oder die reife $\alpha 1(V)$ -Kette beteiligt ist. Da die pN $\alpha 1(V)$ -Kette in der adulten bovinen Cornea nicht nachweisbar vorkam (siehe 3.4.5), muss angenommen werden, dass die dünnen Fibrillendurchmesser in der Cornea durch die reife $\alpha 1(V)$ -Kette und/oder weitere Faktoren reguliert werden. Allerdings könnte in der adulten Cornea die TSPN-Domäne erst im Anschluss an die Fibrillogenese prozessiert werden. In früheren Untersuchungen der Assemblierung von Kollagen I und V mit rekombinant hergestellten [$\alpha 1(V)$]₂ $\alpha 2(V)$ Heterotrimeren, deren terminale Regionen durch einen Verdau mit Pepsin entfernt wurden, konnte für den tripelhelikalen Abschnitt des Kollagen V ebenfalls eine regulierende Funktion der Fibrillendurchmesser nachgewiesen werden (Adachi und Hayashi, 1986; Chanut-Delalande *et al.*, 2001). Dennoch bleibt unklar, in wie weit die Organisation von Kollagenfibrillen durch die Prozessierung der $\alpha 1(V)$ -Kette beeinflusst wird.

4.1.3.2 Kovalente Quervernetzungen des Kollagen V

Die $\alpha 1(V)$ -Kette wurde in Immunblots von humaner Haut in Bereichen mit Molekularmassen von mehr als 300 kDa in mehreren diffusen Banden detektiert. Es handelt sich dabei um hochmolekulare Aggregate, die möglicherweise über nicht-reduzierbare kovalente Bindungen an weitere Matrix-Proteine gekoppelt und daher für eine effiziente elektrophoretische Auftrennung ungeeignet sind. Für die $\alpha 1(V)$ -, $\alpha 2(V)$ und $\alpha 1(XI)$ -Kette aus bovinem Knochen konnten *cross links* nachgewiesen

werden, wodurch die α -Ketten des Kollagen V und XI in einer Schwanz zu Kopf Anordnung linear polymerisieren (Niyibizi und Eyre, 1994). Zusätzlich wurden kovalente Bindungen zwischen tripelhelikalen Abschnitten lateral angeordneter $\alpha 1(V)$ - beziehungsweise $\alpha 1(XI)$ -Ketten und dem C-terminalen Telopeptid der $\alpha 1(I)$ -Kette beschrieben. Untersuchungen der Rhabdomyosarcoma-Zelllinie A204 führten Transglutaminase-abhängige *cross links* im Bereich der nicht-tripelhelikalen Abschnitte der N-terminalen Propeptide der Kollagene V und XI zu Tage (Kleman *et al.*, 1995). Es ist daher wahrscheinlich, dass auch in Hautproben heterotypische *cross links* der $\alpha 1(V)$ -Kette mit Kollagen I das Auftreten von hochmolekularen Kollagen V-haltigen Aggregaten in Immunblots erklären könnte. Zusätzlich kann intermolekulare Quervernetzung der $\alpha 1(V)$ -Kette mit anderen kollagenen oder nichtkollagenen Matrix-Proteinen stattfinden. Zum Beispiel ist das Glykoprotein Tenascin-X ein möglicher Bindungspartner des Kollagen V mit kovalenten Quervernetzungen (siehe auch 4.1.2.1) (Lethias *et al.*, 2006; Egging *et al.*, 2007).

In Immunblots der bovinen Cornea wurde im Gegensatz zur humanen Haut die $\alpha 1(V)$ -Kette in Bereichen mit Molekularmassen von mehr als 300 kDa in distinkten Banden detektiert (siehe 3.4.5). Dies deutet auf eine bessere elektrophoretische Auftrennung hochmolekularer Kollagen V-haltiger Aggregate in Proben der bovinen Cornea hin. Offensichtlich kommen in der bovinen Cornea Quervernetzungen der $\alpha 1(V)$ -Kette weniger als in menschlicher Haut vor, möglicherweise weil die menschlichen Probanden erheblich älter sind als die Rinder zum Zeitpunkt ihrer Schlachtung. Mit der unterschiedlichen Lebensdauer ist auch ein Unterschied im Ausmaß der Quervernetzungen zu erwarten, weil Kollagene extrem langlebige Proteine und somit der post-sekretorischen Quervernetzung lange ausgesetzt sind. Deshalb könnten in der bovinen Cornea, aber nicht in menschlicher Haut distinkte Kollagen V-haltige, hochmolekulare Proteinbanden vorkommen.

4.1.3.3 Aggregate der $\alpha 1(V)$ -Kette in unterschiedlichen Hautschichten

Die reife Form der $\alpha 1(V)$ -Kette war in Immunblots in allen Schichten der Dermis nachweisbar, wohingegen die pN $\alpha 1(V)$ -Kette sowie hochmolekulare $\alpha 1(V)$ -haltige Aggregate in oberen Hautschichten stärker detektiert wurden (siehe 3.1.10). Wie zuvor bei der Untersuchung von Pepsin-löslichen α -Ketten gezeigt wurde, ändert sich die Gesamtmenge des Kollagen V sowie das Verhältnis der $\alpha 1(V)$ -Kette zu der

$\alpha 2(V)$ -Kette mit zunehmender Tiefe in der Haut jedoch nicht (siehe 3.1.9). Demnach sind in den oberen Hautschichten supramolekulare Aggregate lokalisiert, die Varianten der $\alpha 1(V)$ -Kette enthalten, die unter physiologischen Pufferbedingungen besser löslich sind als diejenigen aus tieferen Schichten. Möglicherweise handelt es sich dabei um Aggregate der oberen papillären Dermis, in denen die N-terminale Domäne der $\alpha 1(V)$ -Kette unmaskiert vorliegt (siehe 4.1.1).

Die verhältnismäßig gute Löslichkeit der $\alpha 1(V)$ -Kette in den oberen Schichten der Dermis ist wahrscheinlich auf eine weniger intensive Quervernetzung des Kollagen V zurückzuführen, was ein zusätzlicher Hinweis für Unterschiede in der suprastrukturellen Organisation im Vergleich zu tieferen Hautschichten ist. Da die $\alpha 2(V)$ -Kette im Vergleich zu der $\alpha 1(V)$ -Kette aus den oberen Hautschichten eine geringere Löslichkeit aufweist, ist nicht klar, ob supramolekulare Aggregate, die aus den oberen Schichten der Haut extrahiert wurden, anstelle von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimern $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimere enthalten. Diese Annahme korreliert jedoch nicht mit den ähnlichen Mengenverhältnissen der $\alpha 1(V)$ - zu der $\alpha 2(V)$ -Kette in oberen und tiefen Hautschichten. Da die pN $\alpha 1(V)$ -Kette in tiefen Schichten der Dermis nicht oder nur schwach detektiert wurde, muss angenommen werden, dass Kollagenfibrillen der tieferen Hautschichten $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere enthalten in denen hauptsächlich die reife $\alpha 1(V)$ -Kette eingebaut ist. Wie in vorherigen Untersuchungen beschrieben wurde, ist das N-terminale Propeptid des Kollagen V möglicherweise an der Ausbildung von *cross links* beteiligt (Niyibizi und Eyre, 1994) (siehe auch 4.1.3.2). Die Ausbildung von *cross links* durch das partiell prozessierte N-Propeptid der reifen $\alpha 1(V)$ -Kette könnte eine Erklärung für die starke Maskierung dieser Domäne in tieferen Hautschichten sein.

4.1.4 Transiente Synthese der $\alpha 3(V)$ -Kette

Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in fötaler humaner Haut Kollagen V 6 – 8 % des Gesamtkollagens darstellt, wohingegen in adulter humaner Haut ein Anteil von 2 – 4 % ermittelt wurde (Smith *et al.*, 1986). Um Hinweise für die Rolle des Kollagen V bei der Entwicklung des dermalen Bindegewebes zu erhalten, wurde hier die Zusammensetzung fibrillärer Kollagene in junger humaner Haut und junger muriner Haut sowie murinem Wundgewebe untersucht. Im

Vergleich zu Hautproben von Erwachsenen (siehe 3.1.9, 3.1.11) konnte in Vorhäuten von 1 – 3 Jahre alten Kindern zusätzlich zu der $\alpha 1(V)$ - und der $\alpha 2(V)$ -Kette auch die $\alpha 3(V)$ -Kette identifiziert werden (siehe 3.2.1). Es muss in diesem Zusammenhang jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchten Hautproben adulter Spender vorwiegend vom Bauch oder Oberschenkel und nicht von Vorhäuten entnommen wurden. Das Auftreten der $\alpha 3(V)$ -Ketten in Vorhäuten könnte daher gewebespezifisch und nicht altersbedingt sein. Die $\alpha 3(V)$ -Kette wurde außerdem in der Haut neugeborener Mäuse sowie in der Haut deren 14 Tage alten Geschwister gefunden (siehe 3.2.2). Dabei waren die Mengenverhältnisse $\alpha 3(V) / \alpha 1(V)$ in neugeborenen Mäusen ungefähr doppelt so hoch wie in 14 Tage alten Mäusen. Daraus lässt sich schließen, dass die $\alpha 3(V)$ -Kette transient exprimiert wird und in adulter Haut nicht mehr vorliegt. Auch in der dermalen Wundheilung kann die Neubildung von Kollagen I- und III-haltigen Fibrillen untersucht werden kann (Birk *et al.*, 1990a; White *et al.*, 2002). Es gibt Hinweise darauf, dass das Mengenverhältnis zwischen Kollagen V und Kollagen I in humanem Granulationsgewebe von Brandwunden, das ebenfalls die $\alpha 3(V)$ -Kette enthält, im Vergleich zu normaler Haut deutlich erhöht ist (Hashimoto *et al.*, 1986; Hashimoto *et al.*, 1988; Birk *et al.*, 1990a). Sowohl in der normalen Haut als auch in dem 8 Tage alten Granulationsgewebe von 10 Wochen alten Mäusen wurden hier die $\alpha 1(V)$ -, $\alpha 2(V)$ - und $\alpha 3(V)$ -Ketten identifiziert (siehe 3.2.4). Das Mengenverhältnis $\alpha 3(V) / \alpha 1(V)$ in den untersuchten Granulationsgeweben war im Vergleich zur normalen Haut derselben Tiere 3 – 4-fach erhöht. Eine erhöhte Gesamtmenge des Kollagen V im Granulationsgewebe wurde hingegen nicht festgestellt.

Ursprünglich wurde die $\alpha 3(V)$ -Kette in der Plazenta nachgewiesen, wo sie in $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ Heterotrimeren vorkommt, deren Funktion und suprastrukturelle Organisation bisher noch wenig bekannt ist (Rhodes und Miller, 1981; Niyibizi *et al.*, 1984). Zusätzlich zu der Plazenta konnte die $\alpha 3(V)$ -Kette auch im Uterus und synovialen Membranen sowie in embryonalen oder fötalen Stadien in der Haut, dem Knochen und entstehenden Muskeln oder Gelenken identifiziert werden (Brown *et al.*, 1978; Abedin *et al.*, 1982; Elstow und Weiss, 1983; van der Rest und Garrone, 1991; Imamura *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2005). Der Nachweis der $\alpha 3(V)$ -Kette in vorwiegend embryonalen Geweben sowie in der jungen Haut ist ein Hinweis auf eine Funktion der $\alpha 3(V)$ -Kette in Entwicklungsprozessen eines funktionellen

Bindegewebes. Diese Annahme wird auch durch den Nachweis der $\alpha 3(V)$ -Kette im Granulationsgewebe von Hautwunden bekräftigt, das kompositionelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit embryonaler Haut aufweist. Dabei ist jedoch nicht klar, ob $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ Heterotrimere an der Assemblierung von Kollagenfibrillen beteiligt sind, wie es bisher nur für $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere beschrieben wurde (Birk *et al.*, 1990a; Linsenmayer *et al.*, 1993). Da die $\alpha 3(V)$ -Kette in der adulten humanen Haut sowie der adulten bovinen Cornea nicht nachgewiesen wurde (siehe 3.1.8; 3.1.9; 3.1.11; 3.4.5; 3.4.7), können $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ Heterotrimere an der Assemblierung von Kollagenfibrillen adulter Gewebe nicht mehr beteiligt sein. Es gibt Hinweise, wonach das N-terminale Propeptid der $\alpha 3(V)$ -Kette adhesive Eigenschaften gegenüber Osteoblasten jedoch nicht Chondroblasten besitzt und so vermutlich die Knochbildung beeinflusst (Birk *et al.*, 1990a; Yamaguchi *et al.*, 2005). In der Haut kann sich daher eine Interaktion der $\alpha 3(V)$ -Kette mit Fibroblasten möglicherweise regulatorisch auf die Bildung des dermalen Bindegewebes auswirken.

In Fibroblastenkulturen, die aus Vorhäuten 1 – 3 Jahre alter Kinder hergestellt und sowohl mit als auch ohne FKS kultiviert wurden, konnte die Synthese der $\alpha 3(V)$ -Kette nicht nachgewiesen werden (3.2.1, Abbildung 3.18). Demnach sind für die Expression der $\alpha 3(V)$ -Kette Faktoren notwendig, die unter unseren Zellkulturbedingungen nicht vorhanden sind. Epitheliale-mesenchymale Interaktionen spielen sowohl in der Entwicklung des dermalen Bindegewebes als auch in der Wundheilung eine wichtige Rolle. In Kokulturen von Fibroblasten und Keratinozyten, die als Modell für die Untersuchung Entwicklungs- und Wundheilungs-relevanter Prozesse verwendet werden, konnte eine 5-fache Hochregulation der $\alpha 3(V)$ -Kette auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Shephard *et al.*, 2004). Diese und eigene Befunde deuten an, dass Entwicklungs- und / oder Wundheilungs-spezifische Faktoren die Expression der $\alpha 3(V)$ -Kette induzieren.

4.1.5 Transiente Synthese von Kollagen I- und III-Multimeren

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Mengenverhältnissen $\alpha 3(V) / \alpha 1(V)$ konnten in der Haut neugeborener und 14 Tage alter Mäuse auch unterschiedliche Multimere der fibrillären Kollagene I und III gefunden werden (siehe 3.2.3). In der Proteinbande der γ -Komponenten (Trimere) mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität

wurden in muriner Haut die $\alpha 1(\text{III})$ -, $\alpha 1(\text{I})$ - und $\alpha 2(\text{I})$ -Kette identifiziert. Es muss daher angenommen werden, dass hier $[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$ Heterotrimere mit inter-tripelhelikalen *cross links* sowie über Disulfidbrücken stabilisierte $[\alpha 1(\text{III})]_3$ Homotrimere vorkommen. Die Detektion der $\alpha 1(\text{III})$ -Kette in der Proteinbande der γ -Komponenten mit einer höheren elektrophoretischen Mobilität zeigt, dass in der Haut 14 Tage alter Mäuse eine zusätzliche Variante von $[\alpha 1(\text{III})]_3$ Homotrimeren vorkommt, die in der Haut neugeborener Mäuse nicht in nachweisbaren Mengen vorhanden war. Durch die Analyse derselben Proteinbande wurde außerdem gezeigt, dass in der Haut 14 Tage alter Mäuse zusätzlich Trimere mit inter-tripelhelikalen *cross links* vorkommen, die die $\alpha 2(\text{I})$ -Kette aber nicht die $\alpha 1(\text{I})$ -Kette enthalten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die $\alpha 2(\text{I})$ -Kette auf Grund einer Kontamination durch die darüber liegende, langsamer migrierende Proteinbande hier nachgewiesen wurde.

Zwischen den γ -Komponenten und den β -Komponenten migrieren in der SDS-PAGE drei weitere Proteinbanden, von denen diejenige mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität in der Haut neugeborener Mäuse nicht nachweisbar vorkam (siehe 3.2.3). In jeder dieser Proteinbanden wurden die $\alpha 1(\text{I})$ -, $\alpha 2(\text{I})$ - und $\alpha 1(\text{III})$ -Kette identifiziert. Es ist jedoch nicht klar, ob die hier identifizierten Kollagene in Form von kovalent stabilisierten Dimeren oder Trimeren vorliegen. Wie zuvor beschrieben wurde sind die tripelhelikalen Abschnitte der Kollagene einem limitierten Verdau mit Pepsin gegenüber resistent, wohingegen nicht-tripelhelikale Domänen wie die Propeptide und Teloepptide durch Pepsin proteolytisch degradiert werden (Miller, 1972). Dementsprechend liegen die hier untersuchten Kollagene nur in Form der tripelhelikalen Domänen vor. Es muss daher angenommen werden, dass es sich bei diesen Proteinbanden um hydrodynamische Äquivalente von Trimeren handelt, in denen sich kovalente *cross links* nicht am Ende (wie bei den γ -Komponenten) sondern in der Mitte der jeweiligen α -Untereinheiten befinden, was zu einer höheren elektrophoretischen Mobilität führt. Eine weitere Erklärung für die elektrophoretische Mobilität dieser Kollagene könnten Pepsin-resistente, nichtkollagene Proteine sein, die über Aldehyd-abhängige *cross links* an α -Ketten gebunden sind. Entsprechende nichtkollagene Proteine konnten hier jedoch nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Das Auftreten zusätzlicher Varianten von Kollagen-Trimeren und -Dimeren in der Haut 14 Tage alter Mäuse gegenüber der Haut neugeborener Mäuse zeigt die Zunahme von *cross links* im Verlauf der postnatalen Hautentwicklung, was

wiederum auf das Ausmaß der post-sekretorischen Quervernetzung der langlebigen Kollagene zurückzuführen ist.

4.1.6 Kollagen V-haltige Suprastrukturen kultivierter Fibroblasten

Humane Hautfibroblasten synthetisieren unter Zellkulturbedingungen neben verschiedenen anderen Bindegewebs-Proteinen große Mengen der fibrillären Kollagene I, III und V (Tajima und Pinnell, 1981). Auf Grund der Expression dieser Bindegewebs-Komponenten werden Fibroblastenkulturen als Modell für die Untersuchung des dermalen Bindegewebes sowie für die Untersuchung von Bindegewebs-Defekten wie die klassischen Typen des Ehlers-Danlos Syndroms verwendet (Superti-Furga und Steinmann, 1988; Wenstrup *et al.*, 2004b). Kollagen V konnte auf Grund einer intensiven Maskierung durch andere Matrix-Proteine in Bindegewebs-Suprastrukturen der humanen Haut und der bovinen Cornea durch Immunogold-Elektronenmikroskopie nicht nachgewiesen werden (siehe 4.1.1.3). Die Zusammensetzung von Suprastrukturen des Bindegewebes, vor allem der Kollagenfibrillen, wurde daher auch an kultivierten humanen Hautfibroblasten untersucht.

In Kulturen dermalen Fibroblasten, die Kollagen I, III und V synthetisieren, ist Kollagen V in der Zellschicht, die Matrix-Suprastrukturen enthält, jedoch nicht im Zellkulturmedium nachweisbar (Tajima und Pinnell, 1981). Durch eigene Untersuchungen wurde metabolisch markiertes Kollagen V nur in sehr geringen Mengen im Zellkulturmedium gefunden, wobei durch die Inhibition von Quervernetzungen mit BAPN nicht mehr Kollagen V in das Zellkulturmedium abgegeben wurde (siehe 3.3.2, 3.3.3). Ein Zusammenhang zwischen der Sekretion von Kollagen V in das Zellkulturmedium mit dessen Lysylhydroxylase-vermittelten Quervernetzungen wurde daher nicht bestätigt. Das Beispiel der Rhabdomyosarcoma-Zelllinie A204 zeigt, dass Kollagen V im Bereich der N-Propeptide Transglutaminase-vermittelte Quervernetzungen ausbildet, die dessen Löslichkeit herabsetzen (Kleman *et al.*, 1992; Kleman *et al.*, 1995). Zusätzlich verringert die Inhibition der Transglutaminase eine Kontamination durch Kollagen I bei der Isolation des Kollagen V aus Kulturen von Fibroblasten der Hühner-Cornea (Wang, 2007). Ob jedoch in Kulturen dermalen Fibroblasten ebenfalls Transglutaminase-vermittelte *cross links* die Löslichkeit von Kollagen V herabsetzen bleibt unklar. Gegen eine kovalente Quervernetzung von

α -Ketten des Kollagen V mit Matrix-Proteinen der Zellschicht von kultivierten Fibroblasten spricht hingegen das Fehlen von hochmolekularen, Kollagen V-haltigen Aggregaten (siehe 3.3.3). Demnach wird Kollagen V unter Zellkulturbedingungen ohne die Ausbildung umfassender Quervernetzungen in Matrix-Suprastrukturen dermalen Fibroblasten eingebaut.

In Kulturen dermalen Fibroblasten wurden die $\alpha 1(V)$ - und die $\alpha 2(V)$ -Kette, jedoch nicht die $\alpha 3(V)$ -Kette identifiziert, weshalb angenommen werden muss, dass Kollagen V unter Zellkulturbedingungen hauptsächlich in Form von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren sezerniert wird (siehe 3.3.2, 3.3.3, 3.3.4). Dennoch kann die Bildung von $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren nicht ausgeschlossen werden. Hinweise für die Assemblierung von $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren in Fibroblastenkulturen gibt es im Zusammenhang mit homozygoten $\alpha 2(V)$ -Mutationen (pN/pN) (Chanut-Delalande *et al.*, 2004). Im Vergleich zu humanen Hautproben, in denen die $\alpha 1(V)$ -Kette vorwiegend in ihrer reifen Form (partiell prozessiertes N-Propeptid, vollständig prozessiertes C-Propeptid) vorkommt, wird in Zellkulturen neben der Pro $\alpha 1(V)$ -Kette und der reifen $\alpha 1(V)$ -Kette hauptsächlich die pN $\alpha 1(V)$ -Kette sezerniert (siehe 3.3.3). Da die pN $\alpha 2(V)$ -Kette ebenfalls in der Zellschicht vorkommt, muss angenommen werden, dass sich der quantitativ bedeutendste Teil des Kollagen V in der Zellkultur-Matrix aus $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimer mit unprozessierten N-terminalen Propeptiden zusammensetzt. In das Zellkulturmedium wird hingegen nur eine geringe Menge der Pro $\alpha 1(V)$ -Kette abgegeben (siehe 3.3.3).

Kollagen V, das mit Kollagen I kolokalisiert ist, wurde in dreidimensional kultivierten Fibroblasten ohne die Demaskierung von Epitopen nachgewiesen (siehe 3.3.1). Eine Essigsäurebehandlung zeigt jedoch, dass das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette auch in Fibroblastenkulturen teilweise maskiert vorliegt. Durch Immunogold-Elektronenmikroskopie war Kollagen V mit und ohne Essigsäurebehandlung in einigen quergestreiften Kollagenfibrillen nachweisbar, wohingegen andere Fibrillen unabhängig vom Durchmesser Kollagen V-negativ waren (siehe 3.3.5). Eine deutlich intensivere Kollagen V-Markierung weisen jedoch netzwerkartig organisierte Suprastrukturen und Mikrofibrillen auf. Diese Befunde zeigen eindeutig, dass Kollagen V neben Kollagenfibrillen ein Bestandteil extrafibrillärer Suprastrukturen ist, was die Annahme unterstützt, dass es auch in der Haut in extrafibrillären Suprastrukturen vorkommen könnte (siehe auch 4.1.1). Kollagen V wurde in Kulturen von

pN/pN-Fibroblasten in dünnen Filamenten, die an Kollagenfibrillen assoziiert sind, gefunden (Chanut-Delalande *et al.*, 2001). Chanut-Delalande *et al.* erklären die Sezernierung dünner Kollagen V-haltiger Filamente durch die Assemblierung von $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren, die auf die fehlende Sekretion der $\alpha 2(V)$ -Kette und damit auf die fehlende Assemblierung von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren zurückzuführen ist. In den durch pN/pN-Fibroblasten sezernierten Kollagenfibrillen wurde Kollagen V hingegen nicht gefunden, woraus geschlossen wurde, dass $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimere im Gegensatz zu $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimeren nicht in Kollagenfibrillen eingebaut werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kollagen V-haltige Mikrofibrillen normaler Fibroblasten, in denen die $\alpha 2(V)$ -Kette nicht gefunden wurde, ebenfalls $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimere enthalten. Die Reaktivität von Kollagen V-Antikörpern mit suprastrukturellen Fragmenten kultivierter Fibroblasten im Gegensatz zu Gewebeproben (siehe 3.1.13, 3.1.14) ist vermutlich auf eine weniger starke Quervernetzungen des Kollagen V unter Zellkulturbedingungen zurückzuführen. Außerdem wird das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette auf Grund der weniger intensiven Prozessierung der TSPN-Domäne in Fibroblastenkulturen möglicherweise schwächer maskiert als in Gewebeproben (siehe auch 4.1.3.2).

4.1.6.1 Sekretion von Prokollagen III durch kultivierte Fibroblasten

Die Kollagene I und III kommen sowohl im Zellkulturmedium als auch in der Zellschicht dermalen Fibroblastenkulturen vor (Tajima und Pinnell, 1981). Auch hier wurden $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten im Zellmedium und in der Zellschicht detektiert (siehe 3.3.2). Kollagen III war hingegen nur in sehr geringen Mengen in der Zellschicht aber in größten Anteilen im Zellkulturmedium nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen anderer Studien überein, wonach Kollagen III im Gegensatz zu Kollagen I in dermalen Fibroblastenkulturen nicht prozessiert wird und deshalb als lösliches Prokollagen III in das Zellkulturmedium sezerniert wird (Goldberg, 1977). Hier wurde die $\text{Pro}\alpha 1(\text{III})$ -Kette ebenfalls im Zellkulturmedium gefunden, wohingegen in der Zellschicht nur geringe Mengen der $\text{pN}\alpha 1(\text{III})$ -Kette vorkamen (siehe 3.3.3). Die Sekretion von löslichem Prokollagen III durch Fibroblastenkulturen konnte auch durch Immunogold-Elektronenmikroskopie bestätigt werden (siehe 3.3.5). So wurden in den Kollagenfibrillen der Zellschicht Kollagen I und in einigen Kollagenfibrillen Kollagen V lokalisiert, während Kollagen III-haltige Fibrillen weder in der Zellschicht

noch in dem Zellkulturmedium nachweisbar waren. Es muss daher angenommen werden, dass Kollagen III auf Grund der fehlenden Prozessierung der Propeptide nicht in Kollagenfibrillen eingebaut wird. Diese Befunde zeigen, dass Kollagenfibrillen, die von dermalen Fibroblasten unter den hier dargestellten Zellkulturbedingungen synthetisiert wurden, ein Modell für die Assemblierung von Kollagen I/IV-Fibrillen, jedoch nicht für die in der Haut typischen Kollagen I/III/V-Fibrillen darstellen. Der Grund für eine intensivere Prozessierung des Kollagen I im Vergleich zu Kollagen III, deren C-Propeptide beide durch BMP-1 prozessiert werden (Kessler *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996), ist bisher nicht bekannt.

4.1.7 Schlussfolgerung I.

Es konnte gezeigt werden, dass Kollagen V in der adulten Haut und der adulten Cornea zusätzlich zu dem fibrillären Bindegewebe, wo es an der Organisation von Kollagenfibrillen beteiligt ist, im Bereich epithelialer Verankerungsapparate lokalisiert ist (siehe 4.1.1). Auf Grund vorheriger Untersuchungen, in denen Kollagen V als Komponente von Mikrofibrillen identifiziert wurde (Modesti *et al.*, 1984), und auf Grund einer markanten Kolo-kalisation der $\alpha 1(V)$ -Kette mit der $\alpha 5(VI)$ -Kette (siehe 4.1.1.2) nehme ich an, dass Kollagen V und Kollagen VI in diesen Bereichen möglicherweise in einem gemeinsamen Netzwerk aus Mikrofibrillen organisiert sind. Einen weiteren Hinweis für diese Annahme gibt auch die Lokalisation von Kollagen V in Mikrofibrillen, die durch Fibroblastenkulturen sezerniert werden (siehe 4.1.6) (Chanut-Delalande *et al.*, 2004). Unklar ist jedoch ob solche Mikrofibrillen $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere oder $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimere enthalten. Da es keine Hinweise für Unterschiede in der Stöchiometrie der α -Ketten des Kollagen V in der obersten Schicht der adulten humanen Haut im Vergleich zu tieferen Schichten gibt, schließe ich, dass Kollagen V-haltige Suprastrukturen der oberen papillären Dermis ebenfalls $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere enthalten (siehe 4.1.3). Für eine wichtige Funktion der $\alpha 2(V)$ -Kette in der oberen papillären Dermis sowie bei der Organisation der epidermalen Basalmembran sprechen Befunde aus Untersuchungen $\alpha 2(V)$ -defizienter Mäuse (pN/pN-Mäuse), in denen eine reduzierte Dicke der dermo-epidermalen Basalmembran und eine verstärkte Apoptose stromaler Fibroblasten festgestellt wurde (Chanut-Delalande *et al.*, 2004).

Die schlechte Löslichkeit in physiologischen Kochsalzlösungen und die starke immunchemische Maskierung von Kollagen V-haltigen Suprastrukturen legen nahe, dass in adulten Geweben eine intensive kovalente Quervernetzung von Kollagen V mit anderen Bindegewebs-Komponenten vorliegt. Es wurden in dieser Arbeit jedoch Unterschiede in der Löslichkeit der $\alpha 1(V)$ -Kette sowie der Maskierung des N-terminalen Propeptids in Abhängigkeit zu der Tiefe der Hautschichten festgestellt, was ein Hinweis auf Unterschiede in der suprastrukturellen Organisation ist (siehe 4.1.3). Möglicherweise ist Kollagen V an wichtigen Quervernetzungen unterschiedlicher Suprastrukturen, wie zum Beispiel Kollagenfibrillen mit Mikrofibrillen oder Kollagenfibrillen mit Teilen epithelialer Verankerungsapparate, beteiligt. Hinweise für eine entsprechende Funktion gibt es auch durch Untersuchungen der Niere von Ratten (Martinez-Hernandez *et al.*, 1982). Im fibrillären Bindegewebe, in dem Kollagen V über seine tripelhelikale Domäne in heterotypischen Kollagenfibrillen verankert ist, treten kovalente Quervernetzungen mit weiteren Bindegewebs-Komponenten wahrscheinlich im Bereich des N-terminalen Propeptids auf. Für kovalente Bindungen des Kollagen V spielt möglicherweise der Grad der Prozessierung des N-Propeptids eine wichtige Rolle.

4.2 Kollagenfibrillen der adulten Cornea

Das corneale Stroma enthält dünne, lamellar organisierte Kollagenfibrillen deren Hauptbestandteile die Kollagene I und V sind (Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988; Fitch *et al.*, 1988; Linsenmayer *et al.*, 1993). Es gibt bisher keine Hinweise dafür, dass die fibrillären Kollagene II oder III ebenfalls Fibrillenbestandteile der adulten Cornea sind. Im primären Stroma der embryonalen Hühner-Cornea wurden die Kollagene I und II allerdings gemeinsam in heterotypischen Kollagenfibrillen lokalisiert (Hendrix *et al.*, 1982). In der adulten Hühner-Cornea ist hingegen Kollagen II immunhistologisch nur in der Descement-Membran jedoch nicht im cornealen Stroma nachgewiesen worden. Für Kollagen II in der Cornea von adulten Säugetieren gibt es bisher keine Hinweise. Hier wurde Kollagen II sowohl durch Immunblots (siehe 3.4.6) als auch durch Immunhistochemie (siehe 3.4.2) und Immunogold-Elektronenmikroskopie (siehe 3.4.9) in der adulten bovinen Cornea aufgefunden. Wie auch Kollagen I wurde Kollagen II im gesamten Stroma der bovinen Cornea lokalisiert, wohingegen keine

Reaktivität der Kollagen II-Antikörper mit dem Epithel oder der Descement-Membran festgestellt wurde (siehe 3.4.2).

Neben Hinweisen für die Lokalisation von Kollagen III im cornealen Epithel der embryonalen Hühner-Cornea (von der Mark *et al.*, 1977; Conrad *et al.*, 1980) sowie im Endothel und der entwickelnden Descement-Membran der Kaninchen-Cornea (Cintron *et al.*, 1988), konnte Kollagen III im Stroma der embryonalen humanen Cornea nachgewiesen werden (Ben-Zvi *et al.*, 1986). Durch immunhistologische Untersuchungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Kollagen III auch im Stroma der adulten humanen Cornea vorkommt (siehe 3.4.3). Auf Grund einer fehlenden Reaktivität von Kollagen III-Antikörpern mit dem bovinen Protein konnten entsprechende Untersuchungen an der bovinen Cornea nicht durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz ist in früheren Arbeiten das bloße Vorhandensein aber nicht die supramolekulare Organisation von Kollagen III in der bovinen Cornea nachgewiesen worden (Praus *et al.*, 1979). Andere Veröffentlichungen konnten die Lokalisation von Kollagen III in der bovinen Cornea nicht bestätigen (Davison *et al.*, 1979). Durch biochemische Untersuchungen der bovinen Cornea gibt es Hinweise auf eine transiente Expression von Kollagen III in der Cornea, wonach Kollagen III weniger als 1 – 2% des gesamten Kollagens der adulten Cornea ausmacht. Hingegen sind in der 3 Monate alten fötalen Cornea 4,5 % Kollagen III nachweisbar (Schmut, 1977; Tseng *et al.*, 1982; Lee und Davison, 1984). Ähnliche Befunde (2 % der Cornea-Kollagene bei Neugeborenen, kein Kollagen III in der adulten Cornea) wurden auch für die Kaninchen-Cornea veröffentlicht (Lee und Davison, 1981).

4.2.1 Dicke Kollagenfibrillen in der Cornea

Entgegen früherer Befunde, wonach fibrilläre Kollagene neben dem cornealen Stroma auch im Epithel oder in der Descement-Membran lokalisiert wurden (von der Mark *et al.*, 1977; Conrad *et al.*, 1980; Hendrix *et al.*, 1982; Ben-Zvi *et al.*, 1986; Cintron *et al.*, 1988), konnten hier die Kollagene I, II, III und V ausschließlich im Stroma der bovinen beziehungsweise der humanen Cornea gefunden werden (siehe 3.4.2, 3.4.3). Da Kollagenfibrillen ein Hauptbestandteil des Stromas sind und nicht im Epithel oder der Descement-Membran vorkommen, korrelieren die hier dargestellten immunhistologischen Befunde mit der Annahme, dass die Kollagene I, II, III und V Komponenten heterotypischer Kollagenfibrillen sind. In Extrakten suprastruktureller

Fragmente, die unter physiologischen Pufferbedingungen aus der bovinen oder humanen Cornea extrahiert wurden, konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen die für die Cornea typischen dünnen Kollagenfibrillen identifiziert werden (siehe 3.4.9, 3.4.11). Durch Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde Kollagen I in diesen Fibrillen nachgewiesen, die sich durch homogene Durchmesser von durchschnittlich 27,7 nm in der bovinen Cornea sowie 24,7 nm in der humanen Cornea auszeichnen. Die vorliegenden Befunde stimmen bezüglich der Zusammensetzung und morphologischen Eigenschaften von cornealen Kollagenfibrillen mit früheren Untersuchungen der Hühner-Cornea (Durchmesser von Kollagenfibrillen: 24 nm) überein (Craig und Parry, 1981; Birk *et al.*, 1986; Birk *et al.*, 1988; Fitch *et al.*, 1988; Linsenmayer *et al.*, 1993).

Zusätzlich zu dünnen Kollagenfibrillen wurden aber auch dicke Kollagenfibrillen in der Cornea identifiziert, die einen Durchmesser von durchschnittlich 64,3 nm in der bovinen Cornea oder von 54,9 nm in der humanen Cornea aufweisen (siehe 3.4.9, 3.4.11). Im Vergleich zu dünnen Kollagenfibrillen zeichnen sich die dicken Kollagenfibrillen jedoch durch heterogenere Durchmesser aus, die in der bovinen Cornea zwischen 40 und 100 nm und in der humanen Cornea zwischen 40 und 80 nm liegen. Bei dicken Fibrillen in der Cornea handelt es sich jedoch um quantitativ seltene Suprastrukturen, die auf Grund ihrer vergleichsweise großen Durchmesser und starken Querstreifung leicht aufzufinden sind. Da dicke Kollagenfibrillen bisher in der Cornea noch nicht beschrieben wurden und die Lichtstreuung von Kollagenfibrillen in Abhängigkeit zum Durchmesser zunimmt, ist der Nachweis dicker Fibrillen in der Cornea unerwartet. Offenbar beeinflussen die geringen Mengen an dicken Kollagenfibrillen die optischen Eigenschaften der Cornea nur unwesentlich.

4.2.2 Kollagen II in dicken Fibrillen der bovinen Cornea

Dicke Kollagenfibrillen der bovinen Cornea enthalten Kollagen II (siehe 3.4.9). Im Gegensatz dazu findet sich in den typischen dünnen Kollagenfibrillen Kollagen I. Die Kollagene I und II wurden durch Doppelmarkierungen jedoch nicht in gemeinsamen heterotypischen Kollagenfibrillen der adulten bovinen Cornea gefunden (siehe 3.4.9), was auch auf in der Cornea seltenen dünnen Kollagen II-haltigen Fibrillen zutrifft. Im Gegensatz zu heterotypischen Kollagenfibrillen des primären Stromas der embryonalen Hühner-Cornea (Hendrix *et al.*, 1982) ist daher nicht klar, ob es sich bei dicken

Kollagenfibrillen der adulten bovinen Cornea um heterotypische Kollagen I/II-Fibrillen handelt. Eine fehlende Markierung solcher Fibrillen mit Kollagen I-Antikörpern könnte durch eine Maskierung der Kollagen I-Epitope durch Kollagen II zu erklären sein. Eine solche Maskierung von Antigenen in heterotypischen Kollagenfibrillen wurde zuvor bereits für Kollagen XI durch Kollagen II (Mendler *et al.*, 1989), für Kollagen V durch Kollagen I (Linsenmayer *et al.*, 1983; Birk *et al.*, 1988; Fitch *et al.*, 1988; Peters *et al.*, 1996) und für Kollagen I durch Kollagen III (Fleischmajer *et al.*, 1990a; Fleischmajer *et al.*, 1990b) beobachtet. Für die Maskierung von Kollagen I durch Kollagen II in Fibrillen der bovinen Cornea gibt es bisher jedoch keine Hinweise.

4.2.3 Kollagen I und III in dicken Fibrillen der humanen Cornea

Kollagen III wurde wie zuvor Kollagen II in der bovinen Cornea in dicken Kollagenfibrillen der adulten humanen Cornea nachgewiesen, wohingegen dünne Kollagen I-haltige Fibrillen kein Kollagen III enthalten (3.4.11, Abbildung 3.44). Auf Grund einer fehlenden Reaktivität von Kollagen III-Antikörper mit dem bovinen Protein konnte nicht überprüft werden, ob Kollagen III auch in dicken Fibrillen der bovinen Cornea lokalisiert ist. Es bleibt daher unklar, ob es sich bei dicken Kollagenfibrillen in der adulten Cornea um heterotypische Kollagenfibrillen handelt, die Kollagen II und III oder möglicherweise Kollagen I, II und III enthalten. Im Gegensatz zu Kollagen II in der bovinen Cornea wurde Kollagen III jedoch nicht in allen dicken Fibrillen der humanen Cornea lokalisiert. Ein deutlicher Unterschied zwischen boviner und humaner Cornea bestand darin, dass Kollagen I in der humanen Cornea ebenfalls in dicken Kollagenfibrillen nachgewiesen wurde (siehe 3.4.11). Mit Hilfe von Doppelmärkungen konnte Kollagen I dabei gemeinsam mit Kollagen III in einem Teil der dicken Fibrillen nachgewiesen werden, wohingegen andere dicke Fibrillen entweder Kollagen I oder Kollagen III enthalten (siehe 3.4.11).

Der Nachweis von Kollagen I-haltigen dicken Fibrillen in der humanen im Gegensatz zur bovinen Cornea ist möglicherweise auf speziesbedingte Unterschiede zurückzuführen. Weil aber die Proben der bovinen Cornea von 1 bis 2 Jahre alten Rindern und diejenigen der humanen Cornea von zwischen 50- und 60-jährigen Spendern stammen, kommen auch alterungsbedingte Unterschiede in Frage. Eine transiente Expression von Kollagen III mit abnehmenden Mengen in der sich entwickelnden Cornea wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Schmut,

1977; Tseng *et al.*, 1982; Lee und Davison, 1984). Auch für das adulte Gewebe ist daher eine Abnahme der Menge des Kollagen III in der Cornea nicht auszuschließen. Möglicherweise enthalten dicke Kollagenfibrillen der jungen Cornea hauptsächlich die Kollagene II und III, wohingegen diese Kollagene in der gealterten Cornea durch Kollagen I ersetzt wurden.

4.2.4 Kollagen II und XI in der bovinen Cornea

Dass Kollagen II ein Bestandteil der adulten bovinen Cornea ist, konnte zusätzlich zu immunhistologischen und immunelektronenmikroskopischen Daten durch Immunblots bestätigt werden (siehe 3.4.6). Im Vergleich zu Kollagen I-Antikörpern, die sowohl mit der monomeren $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Kette als auch mit Dimeren (β -Komponenten) und Trimeren (γ -Komponenten) reagieren, konnte mit Kollagen II-Antikörpern nur die monomere Form der $\alpha 1(II)$ -Kette detektiert werden. Diese Befunde zeigen, dass Kollagen II im Gegensatz zu Kollagen I keine kovalenten intertripelhelikalen Quervernetzungen in der Cornea aufweist. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich die trimeren γ -Komponenten in Proben der bovinen Cornea hauptsächlich aus der $\alpha 1(I)$ -Kette und der $\alpha 2(I)$ -Kette zusammensetzen (siehe 3.4.7). Demnach gibt es keine Hinweise für heterotypische Quervernetzungen von fibrillären Kollagenen der Cornea innerhalb der tripelhelikalen Domänen.

Durch massenspektrometrische Analysen konnten Kollagen II und III jedoch nicht in der bovinen adulten Cornea identifiziert werden (siehe 3.4.7). Wie anhand von immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen bereits gezeigt wurde, handelte es sich bei Kollagen II- und III-haltigen Fibrillen in der adulten Cornea um quantitativ seltene Suprastrukturen (siehe 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3). Es muss daher angenommen werden, dass die Proteinmengen der Kollagene II und III in der adulten Cornea ebenfalls sehr gering sind und daher in den massenspektrometrisch untersuchten Proben unterhalb des Detektionslimits liegen. Die Annahme, dass es sich bei Kollagen III um eine quantitative Minderheiten-Komponente der adulten Cornea handelt, wird durch die Befunde anderer über die bovine Cornea bestätigt, wonach Kollagen III 1 – 2% des Kollagens der adulten Cornea ausmachen (Schmut, 1977; Tseng *et al.*, 1982; Lee und Davison, 1984).

In Proben der adulten bovinen Cornea wurde ein Peptidfragment identifiziert, für das über „Blast search“ eine 100 %ige Übereinstimmung nur mit der Sequenz der $\alpha 1(XI)$ -Kette festgestellt wurde (siehe 3.4.7). Wie in früheren Arbeiten gezeigt wurde, ist Kollagen XI ein Bestandteil heterotypischer Kollagen II-haltiger Fibrillen des Knorpels (Mendler *et al.*, 1989). Zusätzlich dazu gibt es jedoch Hinweise dafür, dass die $\alpha 1(XI)$ -Kette zusammen mit α -Ketten des Kollagen V Heterotrimere im Knochen und dem Glaskörper bildet (Niyibizi und Eyre, 1989; Mayne *et al.*, 1993). Es besteht daher sowohl die Möglichkeit, dass Kollagen XI ein Bestandteil dicker Kollagen II-haltiger als auch dünner Kollagen I- und V-haltiger Fibrillen der adulten bovinen Cornea ist.

4.2.5 Schlussfolgerung II.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu dünnen Kollagenfibrillen, die sich durch homogene Durchmesser und homogene interfibrilläre Abstände auszeichnen, auch dicke jedoch seltene Kollagenfibrillen mit heterogenen Durchmessern in der adulten Cornea vorkommen (siehe 4.2.1). Da dicke Kollagenfibrillen sowohl in der Cornea älterer humaner Spender als auch junger adulter Rinder nachgewiesen wurden, nehme ich an, dass dicke Fibrillen für die Integrität der adulten Cornea wichtig sind. Neben den dünnen cornealen Kollagenfibrillen, die durch ihre lamellare Anordnung sowohl für die Lichtdurchlässigkeit der Cornea als auch für Zugfestigkeit sorgen, ist die Anwesenheit dicker Kollagenfibrillen möglicherweise für die Stabilisierung cornealer Lamellen untereinander von Bedeutung. Da die lichtstreuenden Eigenschaften dicker Fibrillen deutlich höher sind als die dünner Fibrillen, muss angenommen werden, dass die Transparenz der Cornea entweder durch eine vertikale Orientierung oder durch die geringe Menge dicker Fibrillen nur unwesentlich beeinträchtigt wird.

Ferner unterscheiden sich dicke Kollagenfibrillen nicht nur hinsichtlich morphologischer Eigenschaften von dünnen Fibrillen. So zeigt die Lokalisation von Kollagen II und III in dicken Fibrillen, dass deutliche kompositionelle Unterschiede zwischen dicken und dünnen Fibrillen der Cornea bestehen (siehe 4.2.2, 4.2.3). In der adulten humanen Cornea wurden in früheren Arbeiten bereits Kollagen III-haltige Kollagenfibrillen nachgewiesen, die ebenfalls nur einen geringen Teil der cornealen Kollagenfibrillen ausmachen (Keene *et al.*, 1987). Hinweise auf morphologische

Besonderheiten, Orientierung oder Funktion solcher Kollagen III-haltiger Fibrillen wurden durch Keene *et al.* jedoch nicht geschildert. Kollagen II-haltige Fibrillen wurde in der Cornea bisher nur im primären Stroma der embryonalen Hühner-Cornea dokumentiert (Hendrix *et al.*, 1982). Ich nehme daher an, dass die Kollagen II-haltigen Fibrillen in der Cornea junger adulter Rinder wegen ihrer langen Lebensdauer Reste aus früheren Entwicklungsstadien der Cornea sind. Die Untersuchungen der Cornea älterer humaner Spender zeigen, dass es möglicherweise im Gegensatz zu dünnen cornealen Fibrillen zu einer alterungsbedingten Änderung in der Zusammensetzung dicker cornealer Fibrillen kommt, wobei Kollagen III durch Kollagen I ersetzt wird (siehe 4.2.3).

4.3 Experimenteller Ausblick

4.3.1 Funktion von Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen

Das N-terminale Propeptid der $\alpha 1(V)$ -Kette liegt im Bereich epithelialer Verankerungszonen der Haut und der Cornea unmaskiert vor, wohingegen der tripelhelikale Abschnitt der $\alpha 2(V)$ -Kette maskiert ist (siehe 4.1.1). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern könnte daher überprüft werden, ob das N-Propeptid der $\alpha 2(V)$ -Kette im Bereich epithelialer Verankerungszonen ebenfalls unmaskiert vorliegt. Aus der Kolo-kalisation unmaskierter N-Propeptide der $\alpha 1(V)$ -Kette und der $\alpha 2(V)$ -Kette, müsste geschlossen werden, dass Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen in Form von $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ Heterotrimere und nicht in Form von $[\alpha 1(V)]_3$ Homotrimeren vorliegt.

Durch immunhistologische und biochemische Untersuchungen gibt es Hinweise auf Unterschiede in der suprastrukturellen Organisation des Kollagen V in epithelialen Verankerungszonen im Vergleich zu tieferen Regionen des dermalen und cornealen Stromas (siehe 4.1.1, 4.1.3). Für die ultrastrukturelle Lokalisation sowie die suprastrukturelle Zuordnung des Kollagen V in diesen Bereichen sollten daher immunelektronenmikroskopische Verfahren angewandt werden. Um zu vermeiden, dass Epitope durch die Quervernetzungen mit Fixierungsreagenzien wie Paraformaldehyd oder Glutaraldehyd für Antikörper unzugänglich werden, sollte das Gewebe vor der Fixierung *en bloc* mit Primär- sowie Sekundärantikörpern inkubiert werden (Keene *et al.*, 1987; Keene *et al.*, 1997). Wie in der vorliegenden Arbeit (siehe 4.1.1)

sowie in bereits veröffentlichten Untersuchungen (Birk *et al.*, 1986; Linsenmayer *et al.*, 1993; Keene *et al.*, 1997) beschrieben wurde, ist für die Detektion von Kollagen V in tieferen Schichten der Haut und der Cornea eine Demaskierung von Epitopen notwendig. Keene *et al.* (1987) konnten zeigen, dass elektronenmikroskopische Präparate vor einer *en bloc* Inkubation mit Antikörpern für eine Demaskierung der Epitope mit Essigsäure inkubiert werden können. Eine entsprechende Demaskierung sollte auch für Untersuchungen des Kollagen V durchgeführt werden. Zusätzlich sollte bei immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen durch Doppelmarkierungen überprüft werden, ob die $\alpha 1(V)$ -Kette und die $\alpha 5(VI)$ -Kette, wie hier vorgeschlagen, in gemeinsamen Suprastrukturen in der humanen Haut lokalisiert sind. Um Hinweise für die Zusammensetzung von Kollagen V-Trimeren zu erhalten sollte überprüft werden, ob Mikrofibrillen von dermalen Fibroblasten in Kultur neben der $\alpha 1(V)$ -Kette auch die $\alpha 2(V)$ -Kette enthalten.

Da es Hinweise auf eine reifungsbedingte Maskierung N-terminaler Propeptide des Kollagen V in der Cornea gibt (Peters *et al.*, 1996), sollte überprüft werden, ob auch in der humanen Haut solche reifungsbedingten Prozesse stattfinden. Diese Fragestellung könnte durch vergleichende immunhistologische Untersuchungen von adulten humanen Hautproben und Vorhäuten junger humaner Spender mit Antikörpern gegen das N-terminale Propeptid des Kollagen V beantwortet werden.

Um Hinweise für die Funktion der $\alpha 3(V)$ -Kette im jungen Bindegewebe zu erhalten, sollten immunhistologische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an Vorhäuten junger humaner Spender mit Antikörpern gegen die $\alpha 3(V)$ -Kette durchgeführt werden. Mit Hilfe von Wundheilungsstudien an Mäusen könnte in diesem Zusammenhang auch überprüft werden, in welchen Regionen des dermalen Gewebes die $\alpha 3(V)$ -Kette im Verlauf der Bindegewebsbildung synthetisiert wird und welche Funktion sie dabei ausübt. Für diese Untersuchungen sollten das Granulationsgewebe sowie die normale Haut derselben Versuchstiere sowohl immunhistologisch als auch immunelektronenmikroskopisch zu unterschiedlichen Stadien der Wundheilung analysiert werden.

4.3.2 Funktion dicker Fibrillen in der Cornea

Hinweise für die Anordnung und somit für die Funktion dicker Fibrillen in der Cornea könnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Ultradünnschnitten

gewonnen werden. Um zu überprüfen, ob dicke Fibrillen in der Cornea horizontal oder vertikal angeordnet sind, sollten elektronenmikroskopische Präparate angefertigt werden, in denen das corneale Stroma sowohl im Querschnitt als auch apikal dargestellt wird. Die Cornea von Patienten mit dem „vaskulären Typ“ des Ehlers-Danlos Syndroms (Typ VI), die kein Kollagen III synthetisieren, könnten auf etwaige Phänotypen hin untersucht werden, aus denen Hinweise auf die Funktion von Kollagen III in dicken Fibrillen gewonnen werden können.

Durch immunelektronenmikroskopische Untersuchungen könnte mit Doppelmarkierungen gezeigt werden, ob Kollagen II und Kollagen III in extrahierten Fragmenten dicker Fibrillen der Cornea gemeinsam vorkommen. Da es Hinweise für die transiente Expression von Kollagen II und III in der Cornea gibt (Schmut, 1977; Lee und Davison, 1981; Tseng *et al.*, 1982; Hendrix *et al.*, 1982), sollte die Zusammensetzung dicker Fibrillen in der bovinen Cornea zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersucht werden. Es könnte so überprüft werden, ob es sich bei Kollagen II-haltigen Fibrillen in der adulten Cornea um Reste früherer Entwicklungsstadien handelt und ob die Kollagene II und III in dicken Fibrillen alterungsbedingt durch Kollagen I ersetzt werden.

Durch die Verwendung demaskierender Reagenzien wie Essigsäure kann durch Immunogold-Elektronenmikroskopie an mechanisch erzeugten Fibrillenfragmenten zusätzlich überprüft werden, ob Kollagen I in der Cornea jüngerer Spender eine Komponente dicker Kollagenfibrillen ist und durch Kollagen II oder Kollagen III maskiert wird. Da es Hinweise für Lokalisation von Kollagen XI in der Cornea gibt (siehe 4.2.4), sollte mit Hilfe von Immunblots, Immunhistologie und Immunogold-Elektronenmikroskopie überprüft werden, ob Kollagen XI ein Bestandteil des cornealen Stromas ist.

Um Hinweise für mögliche heterotypische *cross links* zwischen den verschiedenen fibrillären Kollagenen in der Cornea zu erhalten, sollten Immunblots von Proteinextrakten durchgeführt werden, die ohne den Verdau von Propeptiden und Telopeptiden durch Pepsin gewonnen wurden.

5 Anhang

5.1 Zusätzlich getestete Kollagen V-Antikörper

Tabelle 5.1: Liste von Kollagen V-Antikörpern, die hier zusätzlich getestet wurden. Alle aufgelisteten Antikörper zeigen eine deutlich eingeschränkte Spezifität, die über Immunhistochemie (IHC), Immunogold-Elektronenmikroskopie (EM) oder Immunblots (IB) nachgewiesen wurde.

Reaktivität	Artikel Nr.	Herkunft	Klonalität Wirtstier	Problembeschreibung
Kollagen V	MAB3302 (Chemicon) AF6110 (acris)	Chemicon Billerica USA	monoklonal Maus (V-3C9)	IB: starke Kreuzreaktivität mit Kollagen I und anderen Proteinen der humanen Haut
Kollagen V	01-MUR-5	BioMarket Turku Finnland	monoklonal Maus (C5H5)	IB: starke Kreuzreaktivität mit Kollagen I der humanen Haut, keine Reaktivität mit Kollagen V aus humaner Plazenta
Kollagen V	MON4008 (Biozol) ab19812 (abcam)	Biozol Eching Deutschland	monoklonal Maus (MC5-HA)	IB: starke Kreuzreaktivität mit Proteinen der humanen Haut vor allem Kollagen I
Kollagen $\alpha 3(V)$	H00050509 -M01 (Abnova)	tebu-bio Offenbach Deutschland	monoklonal Maus (4B8)	IB: keine Reaktivität mit Extrakten junger humaner Vorhäute
Kollagen $\alpha 1(V)$ N-terminales Propeptid	H-200	Santa Cruz Biotech. Santa Cruz USA	polyklonal Kaninchen	IB: starke Kreuzreaktivität mit unterschiedlichen Proteinen aus Fibroblastenkulturen
Kollagen $\alpha 1(V)$ C-terminales Telopeptid	C-19	Santa Cruz Biotech. Santa Cruz USA	polyklonal Ziege	IB: keine Reaktivität mit Proteinen aus Fibroblastenkulturen
Kollagen $\alpha 2(V)$ N-terminale Propeptid	G-15	Santa Cruz Biotech. Santa Cruz USA	polyklonal Ziege	IB: keine Reaktivität mit Proteinen aus Fibroblastenkulturen
Maus Kollagen $\alpha 1(V)$	Col5a1	D. Birk Tampa USA	polyklonal Kaninchen	ICH: starke Kreuzreaktivität mit der Epidermis
Maus Kollagen $\alpha 2(V)$	Col5a2	D. Birk Tampa USA	polyklonal Kaninchen	ICH: starke Kreuzreaktivität mit der Epidermis

humanes Kollagen V	AB763	Chemicon Billerica USA	polyklonal Kaninchen	EM: starke Kreuzreaktivität mit Fibrillin-Mikrofibrillen der humanen Haut IB: starke Kreuzreaktivität mit rekombinanten Fibrillin-Domänen, keine Reaktivität mit Kollagen V aus humaner Plazenta
humanes Kollagen V	ab24123	Abcam Cambridge UK	polyklonal Kaninchen	ICH: starke Kreuzreaktivität mit dermalen Basalmembranen IB: starke Kreuzreaktivität mit rekombinanten Fibrillin-Domänen, keine Reaktivität mit Kollagen V aus humaner Plazenta
humanes Kollagen V	20511	Novotec St. Martin La Garenne Frankreich	polyklonal Kaninchen	IB: Reaktivität mit hochmolekularen Proteinkomponenten der humanen Haut (Bandenmuster passt nicht zu Kollagen V)
Kollagen $\alpha 1(V)$ N-terminales Propeptid	NHa1VRB1	AG Bruckner Münster Deutschland	polyklonal Kaninchen	Antikörpertiter des Immunsersums war zu niedrig
Kollagen $\alpha 1(V)$ N-terminales Propeptid	NHa1VRB2	AG Bruckner Münster Deutschland	polyklonal Kaninchen	IB: realistisches Signal in Fibroblastenkulturen, starke Kreuzreaktivität mit Epidermisextrakten
Kollagen $\alpha 1(V)$ N-terminales Propeptid	NHa1VGP	AG Bruckner Münster Deutschland	polyklonal Meerschweinchen	IB: starke Kreuzreaktivität mit Epidermisextrakten, starke Kreuzreaktivität mit Kollagen I in GuHCl Extrakt der Haut, Kreuzreaktivität mit 60 kDa Bande in PBS-Extrakten der Haut

5.2 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
BAPN	β -Aminopropionitril
BSA	bovines Serumalbumin
BSA-c	acetyliertes bovines Serumalbumin
cpm	<i>counts per minute</i>
COL	<i>collageneous domain</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECL	enzymatisch katalysierte Chemolumineszenz
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDS	Ehlers-Danlos Syndrom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EM	Elektronenmikroskopie
GAG	Glycosaminoglycan
HOPE	<i>Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect</i>
HRP	<i>Horse-Redish-Peroxidase</i>
IB	Immunblot
ICH	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FKS	fötales Kälberserum
Fn	<i>fibronectin domain</i>
LC MS/MS	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LR-White	<i>London Resin White</i>
mAB	<i>monoclonal antibody</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MW	<i>molecular weight</i>
NC	<i>non collageneous domain</i>
PARP	<i>proline- / arginine-rich protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

SDS-PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate-polyacrylamid-gelelectrophoresis</i>
SLRP	<i>small leucine rich proteoglycan</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS/T	<i>tris buffered saline / Tween 20</i>
TH	<i>Tripelhelix</i>
TSPN	<i>Thrombospondin-1 N-terminal domain-like</i>
VR	<i>variable domain</i>
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität

5.3 Literaturverzeichnis

Abedin, M. Z., Ayad, S., Weiss, J. B., (1982). Isolation and native characterization of cysteine-rich collagens from bovine placental tissues and uterus and their relationship to types IV and V collagens. *Biosci.Rep.* 2, 493-502.

Adachi, E., Hayashi, T., (1985). In vitro formation of fine fibrils with a D-periodic banding pattern from type V collagen. *Coll.Relat Res.* 5, 225-232.

Adachi, E., Hayashi, T., (1986). In vitro formation of hybrid fibrils of type V collagen and type I collagen. Limited growth of type I collagen into thick fibrils by type V collagen. *Connect.Tissue Res.* 14, 257-266.

Adachi, E., Hayashi, T., (1987). Comparison of axial banding patterns in fibrils of type V collagen and type I collagen. *Coll.Relat Res.* 7, 27-38.

Adachi, E., Hayashi, T., Hashimoto, P. H., (1991). A comparison of the immunofluorescent localization of collagen types I, III, and V with the distribution of reticular fibers on the same liver sections of the snow monkey (*Macaca fuscata*). *Cell Tissue Res.* 264, 1-8.

Adachi, E., Hopkinson, I., Hayashi, T., (1997). Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int.Rev.Cytol.* 173, 73-156.

Ala-Kokko, L., Kontusaari, S., Baldwin, C. T., Kuivaniemi, H., Prockop, D. J., (1989). Structure of cDNA clones coding for the entire prepro alpha 1 (III) chain of human type III procollagen. Differences in protein structure from type I procollagen and conservation of codon preferences. *Biochem.J.* 260, 509-516.

Alexander, R. A., Garner, A., (1983). Elastic and precursor fibres in the normal human eye. *Exp.Eye Res.* 36, 305-315.

Aumailley, M., Gayraud, B., (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J.Mol.Med.* 76, 253-265.

Bächinger, H. P., Doege, K. J., Petschek, J. P., Fessler, L. I., Fessler, J. H., (1982). Structural implications from an electronmicroscopic comparison of procollagen V with procollagen I, pC-collagen I, procollagen IV, and a *Drosophila* procollagen. *J.Biol.Chem.* 257, 14590-14592.

Beighton, P., De, P. A., Steinmann, B., Tsipouras, P., Wenstrup, R. J., (1998). Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am.J.Med.Genet.* 77, 31-37.

Ben-Zvi, A., Rodrigues, M. M., Krachmer, J. H., Fujikawa, L. S., (1986). Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea. *Curr.Eye Res.* 5, 105-117.

Bentz, H., Bächinger, H. P., Glanville, R., Kuhn, K., (1978). Physical evidence for the assembly of A and B chains of human placental collagen in a single triple helix. *Eur.J.Biochem.* 92, 563-567.

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., Robey, P. G., (1990). Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J.Histochem.Cytochem.* 38, 1549-1563.

Birk, D. E., (2001). Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron.* 32, 223-237.

Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Doane, K. J., Linsenmayer, T. F., (1990a). Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J.Cell Sci.* 95 (Pt 4), 649-657.

Birk, D. E., Fitch, J. M., Babiarz, J. P., Linsenmayer, T. F., (1988). Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. *J.Cell Biol.* 106, 999-1008.

Birk, D. E., Fitch, J. M., Linsenmayer, T. F., (1986). Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 27, 1470-1477.

Birk, D. E., Zycband, E. I., Winkelmann, D. A., Trelstad, R. L., (1990b). Collagen fibrillogenesis in situ. Discontinuous segmental assembly in extracellular compartments. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 580, 176-194.

Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J., Galla, H. J., Bruckner, P., (2000). Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J.Biol.Chem.* 275, 10370-10378.

Blochberger, T. C., Cornuet, P. K., Hassell, J. R., (1992). Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J.Biol.Chem.* 267, 20613-20619.

Bonod-Bidaud, C., Beraud, M., Vaganay, E., Delacoux, F., Font, B., Hulmes, D. J., Ruggiero, F., (2007). Enzymatic cleavage specificity of the pro α 1(V) chain processing analysed by site-directed mutagenesis. *Biochem.J.* 405, 299-306.

Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F., Poulson, R., (2003). A novel and highly conserved collagen (pro α 1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J.Biol.Chem.* 278, 31067-31077.

Briggaman, R. A., Wheeler, C. E., Jr., (1975). The epidermal-dermal junction. *J.Invest Dermatol.* 65, 71-84.

Bristow, J., Carey, W., Egging, D., Schalkwijk, J., (2005). Tenascin-X, collagen, elastin, and the Ehlers-Danlos syndrome. *Am.J.Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 139C, 24-30.

- Brown, R. A., Shuttleworth, C. A., Weiss, J. B., (1978). Three new alpha-chains of collagen from a non-basement membrane source. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 80, 866-872.
- Bruckner, P., (2010). Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res.* 339, 7-18.
- Bruckner, P., Eikenberry, E. F., Prockop, D. J., (1981). Formation of the triple helix of type I procollagen in cellulo. A kinetic model based on cis-trans isomerization of peptide bonds. *Eur.J.Biochem.* 118, 607-613.
- Bruckner, P., Prockop, D. J., (1981). Proteolytic enzymes as probes for the triple-helical conformation of procollagen. *Anal.Biochem.* 110, 360-368.
- Burch, G. H., Bedolli, M. A., Mc Donough, S., Rosenthal, S. M., Bristow, J., (1995). Embryonic expression of tenascin-X suggests a role in limb, muscle, and heart development. *Dev.Dyn.* 203, 491-504.
- Burch, G. H., Gong, Y., Liu, W., Dettman, R. W., Curry, C. J., Smith, L., Miller, W. L., Bristow, J., (1997). Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome. *Nat.Genet.* 17, 104-108.
- Burgeson, R. E., (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J.Invest Dermatol.* 101, 252-255.
- Burgeson, R. E., El Adli, F. A., Kaitila, I. I., Hollister, D. W., (1976). Fetal membrane collagens: identification of two new collagen alpha chains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73, 2579-2583.
- Burgeson, R. E., Hollister, D. W., (1979). Collagen heterogeneity in human cartilage: identification of several new collagen chains. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 87, 1124-1131.
- Burrows, N. P., Nicholls, A. C., Yates, J. R., Gatward, G., Sarathachandra, P., Richards, A., Pope, F. M., (1996). The gene encoding collagen alpha1(V)(COL5A1) is linked to mixed Ehlers-Danlos syndrome type I/II. *J.Invest Dermatol.* 106, 1273-1276.
- Byrne, C., Hardman, M., (2002). Integumentary Structures. In: Rossant, J., Tam, P. P. L. (Eds.), *Mouse Development*. Academic Press, pp. 567-589.
- Canty, E. G., Kadler, K. E., (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J.Cell Sci.* 118, 1341-1353.
- Chanut-Delalande, H., Bonod-Bidaud, C., Cogne, S., Malbouyres, M., Ramirez, F., Fichard, A., Ruggiero, F., (2004). Development of a functional skin matrix requires deposition of collagen V heterotrimers. *Mol.Cell Biol.* 24, 6049-6057.
- Chanut-Delalande, H., Fichard, A., Bernocco, S., Garrone, R., Hulmes, D. J., Ruggiero, F., (2001). Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. *J.Biol.Chem.* 276, 24352-24359.

- Chen, Q., Fitch, J. M., Gibney, E., Linsenmayer, T. F., (1993). Type II collagen during cartilage and corneal development: immunohistochemical analysis with an anti-telopeptide antibody. *Dev.Dyn.* 196, 47-53.
- Chernousov, M. A., Fogerty, F. J., Koteliansky, V. E., Mosher, D. F., (1991). Role of the I-9 and III-1 modules of fibronectin in formation of an extracellular fibronectin matrix. *J.Biol.Chem.* 266, 10851-10858.
- Chiquet-Ehrismann, R., (1995). Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia* 51, 853-862.
- Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M., (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J.Pathol.* 200, 488-499.
- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K., Chiquet, M., (1988). Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53, 383-390.
- Cintron, C., Hong, B. S., Covington, H. I., Macarak, E. J., (1988). Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 29, 767-775.
- Colombatti, A., Bonaldo, P., Ainger, K., Bressan, G. M., Volpin, D., (1987). Biosynthesis of chick type VI collagen. I. Intracellular assembly and molecular structure. *J.Biol.Chem.* 262, 14454-14460.
- Conrad, G. W., Dessau, W., von der Mark, K., (1980). Synthesis of type III collagen by fibroblasts from the embryonic chick cornea. *J.Cell Biol.* 84, 501-512.
- Craig, A. S., Parry, D. A., (1981). Collagen fibrils of the vertebrate corneal stroma. *J.Ultrastruct.Res.* 74, 232-239.
- Davison, P. F., Hong, B. S., Cannon, D. J., (1979). Quantitative analysis of the collagens in the bovine cornea. *Exp.Eye Res.* 29, 97-107.
- De Paepe, A., Nuytinck, L., Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., Naeyaert, J. M., (1997). Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II. *Am.J.Hum.Genet.* 60, 547-554.
- Deutzmann, R., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., (2007). Binde- und Stützgewebe. In: Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. (Eds.), *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch, pp. 716-754.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., Worch, H., (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules.* 7, 2388-2393.
- Durbeej, M., (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* 339, 259-268.
- Dzamba, B. J., Wu, H., Jaenisch, R., Peters, D. M., (1993). Fibronectin binding site in type I collagen regulates fibronectin fibril formation. *J.Cell Biol.* 121, 1165-1172.
- Egging, D., van den Berkmoortel, F., Taylor, G., Bristow, J., Schalkwijk, J., (2007). Interactions of human tenascin-X domains with dermal extracellular matrix molecules. *Arch.Dermatol.Res.* 298, 389-396.

- Ehnis, T., Dieterich, W., Bauer, M., Kresse, H., Schuppan, D., (1997). Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin). *J.Biol.Chem.* 272, 20414-20419.
- Elefteriou, F., Exposito, J. Y., Garrone, R., Lethias, C., (2001). Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett.* 495, 44-47.
- Elstow, S. F., Weiss, J. B., (1983). Extraction, isolation and characterization of neutral salt soluble type V collagen from fetal calf skin. *Coll.Relat Res.* 3, 181-193.
- Engvall, E., Hessel, H., Klier, G., (1986). Molecular assembly, secretion, and matrix deposition of type VI collagen. *J.Cell Biol.* 102, 703-710.
- Epstein, E. H. Jr., (1974). (Alpha1(3))3 human skin collagen. Release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J.Biol.Chem.* 249, 3225-3231.
- Exposito, J. Y., Larroux, C., Cluzel, C., Valcourt, U., Lethias, C., Degnan, B. M., (2008). Demosponge and sea anemone fibrillar collagen diversity reveals the early emergence of A/C clades and the maintenance of the modular structure of type V/XI collagens from sponge to human. *J.Biol.Chem.* 283, 28226-28235.
- Fessler, J. H., Shigaki, N., Fessler, L. I., (1985). Biosynthesis and properties of procollagens V. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 460, 181-186.
- Fessler, L. I., Fessler, J. H., (1979). Characterization of type III procollagen from chick embryo blood vessels. *J.Biol.Chem.* 254, 233-239.
- Fichard, A., Kleman, J. P., Ruggiero, F., (1995). Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biol.* 14, 515-531.
- Fitch, J. M., Birk, D. E., Mentzer, A., Hasty, K. A., Mainardi, C., Linsenmayer, T. F., (1988). Corneal collagen fibrils: dissection with specific collagenases and monoclonal antibodies. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 29, 1125-1136.
- Fitch, J. M., Gordon, M. K., Gibney, E. P., Linsenmayer, T. F., (1995). Analysis of transcriptional isoforms of collagen types IX, II, and I in the developing avian cornea by competitive polymerase chain reaction. *Dev.Dyn.* 202, 42-53.
- Fitch, J. M., Gross, J., Mayne, R., Johnson-Wint, B., Linsenmayer, T. F., (1984). Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea: monoclonal antibody studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 2791-2795.
- Fitzgerald, J., Rich, C., Zhou, F. H., Hansen, U., (2008). Three novel collagen VI chains, alpha4(VI), alpha5(VI), and alpha6(VI). *J.Biol.Chem.* 283, 20170-20180.
- Fleischmajer, R., Mac Donald, E. D., Perlish, J. S., Burgeson, R. E., Fisher, L. W., (1990a). Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J.Struct.Biol.* 105, 162-169.
- Fleischmajer, R., Olsen, B. R., Timpl, R., Perlish, J. S., Lovelace, O., (1983). Collagen fibril formation during embryogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 80, 3354-3358.

Fleischmajer, R., Perlish, J. S., Burgeson, R. E., Shaikh-Bahai, F., Timpl, R., (1990b). Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 580, 161-175.

Fleischmajer, R., Perlish, J. S., Olsen, B. R., (1987). The carboxylpropeptide of type I procollagen in skin fibrillogenesis. *J.Invest Dermatol.* 89, 212-215.

Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisher, L., Wiestner, M., Perlish, J. S., Graves, P. N., (1981). Ultrastructural identification of extension aminopropeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78, 7360-7364.

Font, B., Eichenberger, D., Rosenberg, L. M., van der, R. M., (1996). Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* 15, 341-348.

Francomano, C. A., Mc Intosh, I., Wilkin, D. J., (1996). Bone dysplasias in man: molecular insights. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 6, 301-308.

Furthmayr, H., Timpl, R., (1971). Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal.Biochem.* 41, 510-516.

Furthmayr, H., Wiedemann, H., Timpl, R., Odermatt, E., Engel, J., (1983). Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. *Biochem.J.* 211, 303-311.

Gara, S. K., Grumati, P., Urciuolo, A., Bonaldo, P., Kobbe, B., Koch, M., Paulsson, M., Wagener, R., (2008). Three novel collagen VI chains with high homology to the alpha3 chain. *J.Biol.Chem.* 283, 10658-10670.

Giunta, C., Nuytinck, L., Raghunath, M., Hausser, I., De Paepe, A., Steinmann, B., (2002). Homozygous Gly530Ser substitution in COL5A1 causes mild classical Ehlers-Danlos syndrome. *Am.J.Med.Genet.* 109, 284-290.

Goldberg, B., (1977). Kinetics of processing of type I and type III procollagens in fibroblast cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 3322-3325.

Gopalakrishnan, B., Wang, W. M., Greenspan, D. S., (2004). Biosynthetic processing of the Pro-alpha1(V)Pro-alpha2(V)Pro-alpha3(V) procollagen heterotrimer. *J.Biol.Chem.* 279, 30904-30912.

Gordon, M. K., Hahn, R. A., (2010). Collagens. *Cell Tissue Res.* 339, 247-257.

Greenspan, D. S., Cheng, W., Hoffman, G. G., (1991). The pro-alpha 1(V) collagen chain. Complete primary structure, distribution of expression, and comparison with the pro-alpha 1(XI) collagen chain. *J.Biol.Chem.* 266, 24727-24733.

Hagg, R., Bruckner, P., Hedbom, E., (1998). Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J.Cell Biol.* 142, 285-294.

Handford, P. A., Downing, A. K., Reinhardt, D. P., Sakai, L. Y., (2000). Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly. *Matrix Biol.* 19, 457-470.

- Haralson, M. A., Mitchell, W. M., Rhodes, R. K., Kresina, T. F., Gay, R., Miller, E. J., (1980). Chinese hamster lung cells synthesize and confine to the cellular domain a collagen composed solely of B chains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 77, 5206-5210.
- Haralson, M. A., Mitchell, W. M., Rhodes, R. K., Miller, E. J., (1984). Evidence that the collagen in the culture medium of Chinese hamster lung cells contains components related at the primary structural level to the alpha1(V) collagen chain. *Arch.Biochem.Biophys.* 229, 509-518.
- Hardingham, T. E., Muir, H., (1972). The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim.Biophys.Acta* 279, 401-405.
- Hashimoto, Y., Kobayashi, K., Hoshino, T., Aoyama, H., Hayakawa, T., (1988). Distinction between two molecular species of type V collagen from human post-burn granulation tissues. *J.Invest Dermatol.* 91, 238-242.
- Hashimoto, Y., Shieh, T. Y., Aoyama, H., Izawa, Y., Hayakawa, T., (1986). Isolation and characterization of type V collagen from human post-burn granulation tissues. *J.Invest Dermatol.* 87, 540-543.
- Hata, R., Kurata, S., Shinkai, H., (1988). Existence of malfunctioning pro alpha2(I) collagen genes in a patient with a pro alpha 2(I)-chain-defective variant of Ehlers-Danlos syndrome. *Eur.J.Biochem.* 174, 231-237.
- Hausser, I., Anton-Lamprecht, I., (1994). Differential ultrastructural aberrations of collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome types I-IV as a means of diagnostics and classification. *Hum.Genet.* 93, 394-407.
- Hay, E. D., Revel, J. P., (1969). Fine structure of the developing avian cornea. *Monogr Dev.Biol.* 1, 1-144.
- Hedbom, E., Heinegard, D., (1993). Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J.Biol.Chem.* 268, 27307-27312.
- Hedman, K., Alitalo, K., Lehtinen, S., Timpl, R., Vaheri, A., (1982). Deposition of an intermediate form of procollagen type III (pN-collagen) into fibrils in the matrix of amniotic epithelial cells. *EMBO J.* 1, 47-52.
- Heinegard, D., (2009). Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int.J.Exp.Pathol.* 90, 575-586.
- Hendrix, M. J., Hay, E. D., von der Mark, K., Linsenmayer, T. F., (1982). Immunohistochemical localization of collagen types I and II in the developing chick cornea and tibia by electron microscopy. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 22, 359-375.
- Henkel, W., Glanville, R. W., (1982). Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. The involvement of the N-terminal, nonhelical regions of the alpha 1 (I) and alpha 1 (III) chains in the formation of intermolecular crosslinks. *Eur.J.Biochem.* 122, 205-213.
- Hessle, H., Engvall, E., (1984). Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies. *J.Biol.Chem.* 259, 3955-3961.

Hjorten, R., Hansen, U., Underwood, R. A., Telfer, H. E., Fernandes, R. J., Krakow, D., Sebald, E., Wachsmann-Hogiu, S., Bruckner, P., Jacquet, R., Landis, W. J., Byers, P. H., Pace, J. M., (2007). Type XXVII collagen at the transition of cartilage to bone during skeletogenesis. *Bone* 41, 535-542.

Holbrook, K. A., Smith, L. T., (2002). Morphology and Chemical Composition of Connective Tissue: Structure of the Skin and Tendon. In: Royce, P. M., Steinmann, B. (Eds.), *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, Inc., pp. 19-39.

Hsia, H. C., Schwarzbauer, J. E., (2005). Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J.Biol.Chem.* 280, 26641-26644.

Hynes, R. O., (1990). *Fibronectins*. Springer, Berlin; Heidelberg; New York.

Hynes, R. O., (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Hynes, R. O., (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216-1219.

Imamura, Y., Scott, I. C., Greenspan, D. S., (2000). The pro-alpha3(V) collagen chain. Complete primary structure, expression domains in adult and developing tissues, and comparison to the structures and expression domains of the other types V and XI procollagen chains. *J.Biol.Chem.* 275, 8749-8759.

Imamura, Y., Steiglit, B. M., Greenspan, D. S., (1998). Bone morphogenetic protein-1 processes the NH₂-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase processes the COOH-terminal propeptide of pro-alpha1(V) collagen. *J.Biol.Chem.* 273, 27511-27517.

Iozzo, R. V., (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu.Rev.Biochem.* 67, 609-652.

Iozzo, R. V., Murdoch, A. D., (1996). Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 10, 598-614.

Jimenez, S. A., Bashey, R. I., Benditt, M., Yankowski, R., (1977). Identification of collagen alpha1(I) trimer in embryonic chick tendons and calvaria. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 78, 1354-1361.

Jones, P. L., Jones, F. S., (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biol.* 19, 581-596.

Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., Chapman, J. A., (1996). Collagen fibril formation. *Biochem.J.* 316 (Pt 1), 1-11.

Kalamajski, S., Oldberg, A., (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.*

Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D. P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., Grässel, S., (2003). Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 22, 131-143.

- Keene, D. R., Engvall, E., Glanville, R. W., (1988). Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J.Cell Biol.* 107, 1995-2006.
- Keene, D. R., Marinkovich, M. P., Sakai, L. Y., (1997). Immunodissection of the connective tissue matrix in human skin. *Microsc.Res.Tech.* 38, 394-406.
- Keene, D. R., Sakai, L. Y., Bächinger, H. P., Burgeson, R. E., (1987). Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J.Cell Biol.* 105, 2393-2402.
- Kessler, E., Fichard, A., Chanut-Delalande, H., Brusel, M., Ruggiero, F., (2001). Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) mediates C-terminal processing of procollagen V homotrimer. *J.Biol.Chem.* 276, 27051-27057.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., Greenspan, D. S., (1996). Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 271, 360-362.
- Kielty, C. M., (2006). Elastic fibres in health and disease. *Expert.Rev.Mol.Med.* 8, 1-23.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Marson, A., Baldock, C., (2005). Fibrillin microfibrils. *Adv.Protein Chem.* 70, 405-436.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Shuttleworth, C. A., (2002). Elastic fibres. *J.Cell Sci.* 115, 2817-2828.
- Kleman, J. P., Aeschlimann, D., Paulsson, M., van der Rest, M., (1995). Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry* 34, 13768-13775.
- Kleman, J. P., Hartmann, D. J., Ramirez, F., van der Rest, M., (1992). The human rhabdomyosarcoma cell line A204 lays down a highly insoluble matrix composed mainly of alpha 1 type-XI and alpha 2 type-V collagen chains. *Eur.J.Biochem.* 210, 329-335.
- Kobayasi, T., Karlsmark, T., (2006). Type V and VI collagen for cohesion of dermal fibrillar structures. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 38, 103-108.
- Koch, M., Laub, F., Zhou, P., Hahn, R. A., Tanaka, S., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R., Ramirez, F., Gordon, M. K., (2003). Collagen XXIV, a vertebrate fibrillar collagen with structural features of invertebrate collagens: selective expression in developing cornea and bone. *J.Biol.Chem.* 278, 43236-43244.
- Konomi, H., Hayashi, T., Nakayasu, K., Arima, M., (1984). Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am.J.Pathol.* 116, 417-426.
- Kresse, H., Schönherr, E., (2001). Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J.Cell Physiol* 189, 266-274.

Krieg, T., Timpl, R., Alitalo, K., Kurkinen, M., Vaheri, A., (1979). Type III procollagen is the major collageneous component produced by a continuous rhabdomyosarcoma cell line. *FEBS Lett.* 104, 405-409.

Kuivaniemi, H., Tromp, G., Prockop, D. J., (1991). Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* 5, 2052-2060.

Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lapiere, C. M., Nusgens, B., Pierard, G. E., (1977). Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect.Tissue Res.* 5, 21-29.

Lee, R. E., Davison, P. F., (1981). Collagen composition and turnover in ocular tissues of the rabbit. *Exp.Eye Res.* 32, 737-745.

Lee, R. E., Davison, P. F., (1984). The collagens of the developing bovine cornea. *Exp.Eye Res.* 39, 639-652.

Lethias, C., Carisey, A., Comte, J., Cluzel, C., Exposito, J. Y., (2006). A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Lett.* 580, 6281-6285.

Li, S. W., Sieron, A. L., Fertala, A., Hojima, Y., Arnold, W. V., Prockop, D. J., (1996). The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5127-5130.

Li, W., Vergnes, J. P., Cornuet, P. K., Hassell, J. R., (1992). cDNA clone to chick corneal chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan reveals identity to decorin. *Arch.Biochem.Biophys.* 296, 190-197.

Lillie, J. H., Wootton, J. A., Mac Callum, D. K., Mc Kelvey, S. W., Minor, R. R., (1987). Electrophoretic isolation and peptide mapping of collagen types from microsamples of tissue. *Methods Enzymol.* 145, 171-183.

Linsenmayer, T. F., Bruns, R. R., Mentzer, A., Mayne, R., (1986). Type VI collagen: immunohistochemical identification as a filamentous component of the extracellular matrix of the developing avian corneal stroma. *Dev.Biol.* 118, 425-431.

Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., Birk, D. E., (1990). Heterotypic collagen fibrils and stabilizing collagens. Controlling elements in corneal morphogenesis? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 580, 143-160.

Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., Gordon, M. K., Cai, C. X., Igoe, F., Marchant, J. K., Birk, D. E., (1998). Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog.Retin.Eye Res.* 17, 231-265.

Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., Schmid, T. M., Zak, N. B., Gibney, E., Sanderson, R. D., Mayne, R., (1983). Monoclonal antibodies against chicken type V collagen: production, specificity, and use for immunocytochemical localization in embryonic cornea and other organs. *J.Cell Biol.* 96, 124-132.

- Linsenmayer, T. F., Gibney, E., Igoe, F., Gordon, M. K., Fitch, J. M., Fessler, L. I., Birk, D. E., (1993). Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis. *J.Cell Biol.* 121, 1181-1189.
- Linsenmayer, T. F., Hendrix, M. J., (1980). Monoclonal antibodies to connective tissue macromolecules: type II collagen. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 92, 440-446.
- Linsenmayer, T. F., Smith, G. N. Jr., Hay, E. D., (1977). Synthesis of two collagen types by embryonic chick corneal epithelium in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 39-43.
- Loughlin, J., Irlen, C., Hardwick, L. J., Butcher, S., Walsh, S., Wordsworth, P., Sykes, B., (1995). Linkage of the gene that encodes the alpha 1 chain of type V collagen (COL5A1) to type II Ehlers-Danlos syndrome (EDS II). *Hum.Mol.Genet.* 4, 1649-1651.
- Low, F. N., (1962). Microfibrils: fine filamentous components of the tissue space. *Anat.Rec.* 142, 131-137.
- Madri, J. A., Foellmer, H. G., Furthmayr, H., (1982). Type V collagens of the human placenta: trimer alpha-chain composition, ultrastructural morphology and peptide analysis. *Coll.Relat Res.* 2, 19-29.
- Mao, J. R., Taylor, G., Dean, W. B., Wagner, D. R., Afzal, V., Lotz, J. C., Rubin, E. M., Bristow, J., (2002). Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat.Genet.* 30, 421-425.
- Martinez-Hernandez, A., Gay, S., Miller, E. J., (1982). Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. *J.Cell Biol.* 92, 343-349.
- Matsumoto, K., Saga, Y., Ikemura, T., Sakakura, T., Chiquet-Ehrismann, R., (1994). The distribution of tenascin-X is distinct and often reciprocal to that of tenascin-C. *J.Cell Biol.* 125, 483-493.
- Mayne, R., Brewton, R. G., Mayne, P. M., Baker, J. R., (1993). Isolation and characterization of the chains of type V/type XI collagen present in bovine vitreous. *J.Biol.Chem.* 268, 9381-9386.
- Mayne, R., Mayne, P. M., Ren, Z., Accavitti, M. A., Gurusiddappa, S., Scott, P. G., (1994). Monoclonal antibody to the aminotelopeptide of type II collagen: loss of the epitope after stromelysin digestion. *Connect.Tissue Res.* 31, 11-21.
- Mendler, M., Eich-Bender, S. G., Vaughan, L., Winterhalter, K. H., Bruckner, P., (1989). Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J.Cell Biol.* 108, 191-197.
- Michalickova, K., Susic, M., Willing, M. C., Wenstrup, R. J., Cole, W. G., (1998). Mutations of the alpha2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce ehlers-danlos syndrome type I. *Hum.Mol.Genet.* 7, 249-255.

Miller, E. J., (1972). Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry* 11, 4903-4909.

Minamitani, T., Ikuta, T., Saito, Y., Takebe, G., Sato, M., Sawa, H., Nishimura, T., Nakamura, F., Takahashi, K., Ariga, H., Matsumoto, K., (2004). Modulation of collagen fibrillogenesis by tenascin-X and type VI collagen. *Exp.Cell Res.* 298, 305-315.

Mithieux, S. M., Weiss, A. S., (2005). Elastin. *Adv.Protein Chem.* 70, 437-461.

Modesti, A., Kalebic, T., Scarpa, S., Togo, S., Grotendorst, G., Liotta, L. A., Triche, T. J., (1984). Type V collagen in human amnion is a 12 nm fibrillar component of the pericellular interstitium. *Eur.J.Cell Biol.* 35, 246-255.

Moradi-Ameli, M., Rousseau, J. C., Kleman, J. P., Champliand, M. F., Boutillon, M. M., Bernillon, J., Wallach, J., (1994). Diversity in the processing events at the N-terminus of type-V collagen. *Eur.J.Biochem.* 221, 987-995.

Morla, A., Ruoslahti, E., (1992). A fibronectin self-assembly site involved in fibronectin matrix assembly: reconstruction in a synthetic peptide. *J.Cell Biol.* 118, 421-429.

Moro, L., Smith, B. D., (1977). Identification of collagen alpha1(I) trimer and normal type I collagen in a polyoma virus-induced mouse tumor. *Arch.Biochem.Biophys.* 182, 33-41.

Morris, N. P., Bächinger, H. P., (1987). Type XI collagen is a heterotrimer with the composition (1 alpha, 2 alpha, 3 alpha) retaining non-triple-helical domains. *J.Biol.Chem.* 262, 11345-11350.

Myllyharju, J., Kivirikko, K. I., (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33-43.

Mythreye, K., Blobel, G. C., (2009). Proteoglycan signaling co-receptors: roles in cell adhesion, migration and invasion. *Cell Signal.* 21, 1548-1558.

Nah, H. D., Barembaum, M., Upholt, W. B., (1992). The chicken alpha 1 (XI) collagen gene is widely expressed in embryonic tissues. *J.Biol.Chem.* 267, 22581-22586.

Nakayasu, K., Tanaka, M., Konomi, H., Hayashi, T., (1986). Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res.* 18, 1-10.

Nareyeck, G., Seidler, D. G., Troyer, D., Rauterberg, J., Kresse, H., Schönherr, E., (2004). Differential interactions of decorin and decorin mutants with type I and type VI collagens. *Eur.J.Biochem.* 271, 3389-3398.

Newsome, D. A., Foidart, J. M., Hassell, J. R., Krachmer, J. H., Rodrigues, M. M., Katz, S. I., (1981). Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 20, 738-750.

Nicholls, A. C., Osse, G., Schloon, H. G., Lenard, H. G., Deak, S., Myers, J. C., Prockop, D. J., Weigel, W. R., Fryer, P., Pope, F. M., (1984). The clinical features of

homozygous alpha 2(I) collagen deficient osteogenesis imperfecta. *J.Med.Genet.* 21, 257-262.

Niyibizi, C., Eyre, D. R., (1989). Identification of the cartilage alpha 1(XI) chain in type V collagen from bovine bone. *FEBS Lett.* 242, 314-318.

Niyibizi, C., Eyre, D. R., (1993). Structural analysis of the extension peptides on matrix forms of type V collagen in fetal calf bone and skin. *Biochim.Biophys.Acta* 1203, 304-309.

Niyibizi, C., Eyre, D. R., (1994). Structural characteristics of cross-linking sites in type V collagen of bone. Chain specificities and heterotypic links to type I collagen. *Eur.J.Biochem.* 224, 943-950.

Niyibizi, C., Fietzek, P. P., van der Rest, M., (1984). Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule. *J.Biol.Chem.* 259, 14170-14174.

Njieha, F. K., Morikawa, T., Tuderman, L., Prockop, D. J., (1982). Partial purification of a procollagen C-proteinase. Inhibition by synthetic peptides and sequential cleavage of type I procollagen. *Biochemistry* 21, 757-764.

Olert, J., Wiedorn, K. H., Goldmann, T., Kuhl, H., Mehraein, Y., Scherthan, H., Niketeghad, F., Vollmer, E., Müller, A. M., Müller-Navia, J., (2001). HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol.Res.Pract.* 197, 823-826.

Olsen, B. R., (1995). New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7, 720-727.

Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., (2000). Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp.Cell Res.* 261, 104-110.

Orgel, J. P., Eid, A., Antipova, O., Bella, J., Scott, J. E., (2009). Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS.One.* 4, e7028.

Oxford, J. T., Doege, K. J., Horton, W. E., Jr., Morris, N. P., (1994). Characterization of type II and type XI collagen synthesis by an immortalized rat chondrocyte cell line (IRC) having a low level of type II collagen mRNA expression. *Exp.Cell Res.* 213, 28-36.

Peters, D. M., Kintner, R. L., Steger, C., Bultmann, K., Brandt, C. R., (1996). Maturation of collagen fibrils in the corneal stroma results in masking of tyrosine-rich region of type V procollagen. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 37, 2047-2059.

Petruska, J. A., Hodge, A. J., (1964). A subunit model for the tropocollagen macromolecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 51, 871-876.

Plumb, D. A., Dhir, V., Mironov, A., Ferrara, L., Poulosom, R., Kadler, K. E., Thornton, D. J., Briggs, M. D., Boot-Handford, R. P., (2007). Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillar structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *J.Biol.Chem.* 282, 12791-12795.

Praus, R., Brettschneider, I., Adam, M., (1979). Heterogeneity of the bovine corneal collagen. *Exp.Eye Res.* 29, 469-477.

Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu.Rev.Biochem.* 64, 403-434.

Prockop, D. J., Sieron, A. L., Li, S. W., (1998). Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.* 16, 399-408.

Reinhardt, D. P., Chalberg, S. C., Sakai, L. Y., (1995). The structure and function of fibrillin. *Ciba Found.Symp.* 192, 128-143.

Rhodes, R. K., Miller, E. J., (1981). Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule in human placental tissue. *Coll.Relat Res.* 1, 337-343.

Richards, A. J., Martin, S., Nicholls, A. C., Harrison, J. B., Pope, F. M., Burrows, N. P., (1998). A single base mutation in COL5A2 causes Ehlers-Danlos syndrome type II. *J.Med.Genet.* 35, 846-848.

Ritvaniemi, P., Korkko, J., Bonaventure, J., Vikkula, M., Hyland, J., Paassilta, P., Kaitila, I., Kaariainen, H., Sokolov, B. P., Hakala, M., ., (1995). Identification of COL2A1 gene mutations in patients with chondrodysplasias and familial osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 999-1004.

Roll, F. J., Madri, J. A., Albert, J., Furthmayr, H., (1980). Codistribution of collagen types IV and AB2 in basement membranes and mesangium of the kidney. an immunoferritin study of ultrathin frozen sections. *J.Cell Biol.* 85, 597-616.

Rupard, J. H., Dimari, S. J., Damjanov, I., Haralson, M. A., (1988). Synthesis of type I homotrimer collagen molecules by cultured human lung adenocarcinoma cells. *Am.J.Pathol.* 133, 316-326.

Sage, E. H., Bornstein, P., (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J.Biol.Chem.* 266, 14831-14834.

Sage, H., Bornstein, P., (1979). Characterization of a novel collagen chain in human placenta and its relation to AB collagen. *Biochemistry* 18, 3815-3822.

Sakai, L. Y., Keene, D. R., Engvall, E., (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J.Cell Biol.* 103, 2499-2509.

Sasaki, T., Arai, K., Ono, M., Yamaguchi, T., Furuta, S., Nagai, Y., (1987). Ehlers-Danlos syndrome. A variant characterized by the deficiency of pro alpha 2 chain of type I procollagen. *Arch.Dermatol.* 123, 76-79.

Schaefer, L., Iozzo, R. V., (2008). Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J.Biol.Chem.* 283, 21305-21309.

Schalkwijk, J., Zweers, M. C., Steijlen, P. M., Dean, W. B., Taylor, G., van Vlijmen, I., van Haren, B., Miller, W. L., Bristow, J., (2001). A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N.Engl.J.Med.* 345, 1167-1175.

Schlötzer-Schrehardt, U., von der Mark, K., Sakai, L. Y., Naumann, G. O., (1997). Increased extracellular deposition of fibrillin-containing fibrils in pseudoexfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 38, 970-984.

Schmut, O., (1977). The identification of type III collagen in calf and bovine cornea and sclera. *Exp.Eye Res.* 25, 505-509.

Schuppan, D., Becker, J., Boehm, H., Hahn, E. G., (1986). Immunofluorescent localization of type-V collagen as a fibrillar component of the interstitial connective tissue of human oral mucosa, artery and liver. *Cell Tissue Res.* 243, 535-543.

Schwarze, U., Atkinson, M., Hoffman, G. G., Greenspan, D. S., Byers, P. H., (2000). Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am.J.Hum.Genet.* 66, 1757-1765.

Schwarze, U., Hata, R., Mc Kusick, V. A., Shinkai, H., Hoyme, H. E., Pyeritz, R. E., Byers, P. H., (2004). Rare autosomal recessive cardiac valvular form of Ehlers-Danlos syndrome results from mutations in the COL1A2 gene that activate the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Am.J.Hum.Genet.* 74, 917-930.

Scott, J. E., (1988). Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem.J.* 252, 313-323.

Scott, J. E., (1990). Proteoglycan-collagen interactions and sub-fibrillar structure in collagen fibrils: implications in the development and remodelling of connective tissues. *Biochem.Soc.Trans.* 18, 489-490.

Shephard, P., Martin, G., Smola-Hess, S., Brunner, G., Krieg, T., Smola, H., (2004). Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am.J.Pathol.* 164, 2055-2066.

Sicot, F. X., Exposito, J. Y., Masselot, M., Garrone, R., Deutsch, J., Gaill, F., (1997). Cloning of an annelid fibrillar-collagen gene and phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate collagens. *Eur.J.Biochem.* 246, 50-58.

Smith, L. T., Holbrook, K. A., Madri, J. A., (1986). Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am.J.Anat.* 175, 507-521.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 150, 76-85.

Söderhall, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschenhoff, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., Lee, Y. A., (2007). Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS.Biol.* 5, e242.

Steinmann, B., Royce, P. M., Superti-Furga, A., (2002). The Ehlers-Danlos Syndrom. In: Royce, P. M., Steinmann, B. (Eds.), *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Wiley-Liss, Inc., pp. 431-523.

Superti-Furga, A., Steinmann, B., (1988). Impaired secretion of type III procollagen in Ehlers-Danlos syndrome type IV fibroblasts: correction of the defect by incubation at reduced temperature and demonstration of subtle alterations in the triple-helical region of the molecule. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 150, 140-147.

Tajima, S., Pinnell, S. R., (1981). Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture: studies of fibroblasts explanted from papillary and reticular dermis. *J.Invest Dermatol.* 77, 410-412.

Tamburro, A. M., Bochicchio, B., Pepe, A., (2005). The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism. *Pathol.Biol.(Paris)* 53, 383-389.

Tromp, G., Wu, Y., Prockop, D. J., Madhatheri, S. L., Kleinert, C., Earley, J. J., Zhuang, J., Norrgard, O., Darling, R. C., Abbott, W. M., ., (1993). Sequencing of cDNA from 50 unrelated patients reveals that mutations in the triple-helical domain of type III procollagen are an infrequent cause of aortic aneurysms. *J.Clin.Invest* 91, 2539-2545.

Tseng, S. C., Smuckler, D., Stern, R., (1982). Comparison of collagen types in adult and fetal bovine corneas. *J.Biol.Chem.* 257, 2627-2633.

Tuderman, L., Kivirikko, K. I., Prockop, D. J., (1978). Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves the N-terminal propeptides from procollagen. *Biochemistry* 17, 2948-2954.

Tuderman, L., Prockop, D. J., (1982). Procollagen N-proteinase. Properties of the enzyme purified from chick embryo tendons. *Eur.J.Biochem.* 125, 545-549.

Uitto, J., Perejda, A. J., Abergel, R. P., Chu, M. L., Ramirez, F., (1985). Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 5935-5939.

Unsöld, C., Pappano, W. N., Imamura, Y., Steiglitz, B. M., Greenspan, D. S., (2002). Biosynthetic processing of the pro-alpha 1(V)2pro-alpha 2(V) collagen heterotrimer by bone morphogenetic protein-1 and furin-like proprotein convertases. *J.Biol.Chem.* 277, 5596-5602.

van der Rest, M., Garrone, R., (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* 5, 2814-2823.

Veit, G., Hansen, U., Keene, D. R., Bruckner, P., Chiquet-Ehrismann, R., Chiquet, M., Koch, M., (2006a). Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J.Biol.Chem.* 281, 27461-27470.

Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M., Wagener, R., (2006b). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J.Biol.Chem.* 281, 3494-3504.

- Villone, D., Fritsch, A., Koch, M., Bruckner-Tuderman, L., Hansen, U., Bruckner, P., (2008). Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J.Biol.Chem.* 283, 24506-24513.
- von der Mark, K., von der Mark, H., Timpl, R., Trelstad, R. L., (1977). Immunofluorescent localization of collagen types I, II, and III in the embryonic chick eye. *Dev.Biol.* 59, 75-85.
- Wada, H., Okuyama, M., Satoh, N., Zhang, S., (2006). Molecular evolution of fibrillar collagen in chordates, with implications for the evolution of vertebrate skeletons and chordate phylogeny. *Evol.Dev.* 8, 370-377.
- Wang, L., (2007). In-vitro-Fibrillogenese von Kollagenen aus den Sehnen und der Cornea von Hühnern und Isolierung von Kollagen Typ I und V aus Fibroblasten Zellkulturen. Masterarbeit. Fachbereich Chemie, Universität Dortmund, Deutschland.
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Brunskill, E. W., Bell, S. M., Chervoneva, I., Birk, D. E., (2004a). Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J.Biol.Chem.* 279, 53331-53337.
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Cole, W. G., Willing, M. C., Birk, D. E., (2004b). Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome. *J.Cell Biochem.* 92, 113-124.
- Wenstrup, R. J., Florer, J. B., Davidson, J. M., Phillips, C. L., Pfeiffer, B. J., Menezes, D. W., Chervoneva, I., Birk, D. E., (2006). Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. *col5a1* haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J.Biol.Chem.* 281, 12888-12895.
- Werkmeister, J. A., Peters, D. E., Ramshaw, J. A., (1989). Development of monoclonal antibodies to collagens for assessing host-implant interactions. *J.Biomed.Mater.Res.* 23, 273-283.
- Werkmeister, J. A., Ramshaw, J. A., (1989). Monoclonal antibodies to collagens for immunofluorescent examination of human skin. *Acta Derm.Venereol.* 69, 399-402.
- Werkmeister, J. A., Ramshaw, J. A., (1991a). Monoclonal antibodies to type V collagen for immunohistological examination of new tissue deposition associated with biomaterial implants. *J.Histochem.Cytochem.* 39, 1215-1220.
- Werkmeister, J. A., Ramshaw, J. A., (1991b). Multiple antigenic determinants on type III collagen. *Biochem.J.* 274 (Pt 3), 895-898.
- Wheatley, H. M., Traboulsi, E. I., Flowers, B. E., Maumenee, I. H., Azar, D., Pyeritz, R. E., Whittum-Hudson, J. A., (1995). Immunohistochemical localization of fibrillin in human ocular tissues. Relevance to the Marfan syndrome. *Arch.Ophthalmol.* 113, 103-109.
- White, J. F., Werkmeister, J. A., Darby, I. A., Bisucci, T., Birk, D. E., Ramshaw, J. A., (2002). Collagen fibril formation in a wound healing model. *J.Struct.Biol.* 137, 23-30.

Wiberg, C., Klatt, A. R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J. F., Heinegard, D., Morgelin, M., (2003). Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J.Biol.Chem.* 278, 37698-37704.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., Wang, E. A., (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.

Wu, J. J., Weis, M. A., Kim, L. S., Carter, B. G., Eyre, D. R., (2009). Differences in chain usage and cross-linking specificities of cartilage type V/XI collagen isoforms with age and tissue. *J.Biol.Chem.* 284, 5539-5545.

Yamaguchi, K., Matsuo, N., Sumiyoshi, H., Fujimoto, N., Iyama, K. I., Yanagisawa, S., Yoshioka, H., (2005). Pro-alpha3(V) collagen chain is expressed in bone and its basic N-terminal peptide adheres to osteosarcoma cells. *Matrix Biol.* 24, 283-294.

Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P. S., Beason, D. P., Carine, E. T., Soslowsky, L. J., Iozzo, R. V., Birk, D. E., (2006). Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J.Cell Biochem.* 98, 1436-1449.

5.5 Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Bruckner für die hilfreiche Anleitung und Betreuung meiner Arbeit sowie die Unterstützung von oftmals unorthodoxen Arbeitshypothesen danken. Der Dank für die Betreuung meiner Arbeit gilt natürlich auch Dr. Uwe Hansen. Des Weiteren möchte ich meinem Betreuer aus der biologischen Fakultät Herrn Prof. Dr. Martin Bähler danken.

Die Umsetzung der Doktorarbeit in dieser Form ist unter Anderem der außerordentlichen Kooperationsbereitschaft bei der Bereitstellung von Gewebeproben durch Dr. Georg Brunner, Prof. Dr. Dr. Solon Thanos, Dr. Beate Eckes sowie Dr. Michael Barthel und meinem Bruder Dennis zu verdanken. Außerdem wurden die wichtigsten wissenschaftlichen Erkenntnisse mit Antikörper gewonnen, die durch Prof. Dr. Florence Ruggiero sowie PD Dr. Raimund Wagener zur Verfügung gestellt wurden. Diesen Personen gilt daher auch mein aufrichtigster Dank. Für eine besonders große Hilfsbereitschaft durch wissenschaftliche Stellungnahmen und Tipps unterschiedlichster Art möchte ich außerdem Prof. Dr. Rupert Hallmann, PD Dr. Daniela Gabriele Seidler, Prof. Dr. Mats Paulsson, PD Dr. Raimund Wagener, Dr. Zerina Lokmic und Sigi Budny danken. Viel der technischen Unterstützung meiner Arbeit ist mir durch Marianna Ahler, Gerburg Hölscher und Barbara Schedding zu gekommen, denen ich ebenfalls meine Dankbarkeit aussprechen möchte.

Eine große Unterstützung bei der Schreibe habe ich durch Daniela, Katharina, Jeannine, Daniel und Uwe, die jeweils mit etwas anderen Prioritäten (für mich dadurch noch hilfreicher) eine tolle Korrekturarbeit geleistet haben, erfahren. Dafür Euch allen vielen, vielen Dank! Meinem Schwager Pablo habe ich durch manches hilfreiche Gespräch zu verdanken, dass meine Liaison mit „Word“ relativ unproblematisch verlief. Muchas gracias!

Auch für den Austausch gemeinsamen, mentalen und wissenschaftlichen Ballasts mit meinen Weggefährtinnen Sandra und Birgit sowie dem erfrischenden Witt bin ich sehr dankbar.

Meinen Eltern und meiner Familie, die zwar keinen direkten Einfluss auf diese Arbeit ausüben konnten, bin ich jedoch für ihren uneingeschränkten Rückhalt zutiefst dankbar.