

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster  
– Univ.- Prof. Dr. P. Bruckner -**

**DECORIN UND  $\alpha$ 1 KOLLAGEN IX  
DOPPEL- KNOCKOUT- MÄUSE**

**- INAUGURAL – DISSERTATION -**

zur  
Erlangung des doctor medicinae  
Der Medizinischen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:  
Katja Anna Failing geb. Dickerhof  
aus Ludwigshafen am Rhein  
2002

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.- Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. P. Bruckner

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. T. Aigner

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2003

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster**

**– Univ.- Prof. Dr. P. Bruckner –  
Referent: Prof. Dr. P. Bruckner  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. T. Aigner**

**Zusammenfassung**

**Failing, Katja**

**DECORIN UND  $\alpha 1$  KOLLAGEN IX DOPPEL- KNOCKOUT- MÄUSE**

Knorpelfibrillen beinhalten eine heterotope D-periodische Anordnung von Kollagen Typ II, XI und IX im Verhältnis von 8:1:1. Diese Fibrillen sind 20 nm groß. Kollagen Typ IX-Proteoglycan ist weniger häufig in Knorpelfibrillen vorhanden, die Decorin, ein kleines leukinreiches Proteoglycan, enthalten. Kollagen Typ IX ist fast knorpelspezifisch (Ausnahme im Auge), Decorin findet man auch in anderen Geweben (Sehnen, Haut).

Col9 $\alpha 1$  homozygote defiziente Mäuse haben einen funktionellen Knock-out des gesamten Col9 Proteins. Dies bedeutet, dass alle drei Ketten von Kollagen Typ IX nicht synthetisiert werden, obwohl Col9 $\alpha 2$  und Col9 $\alpha 3$  Gene normal transkribiert werden können. Ihre Fibrillenmorphologie ist im Vergleich zu Wildtyp- Mäusen gleich. Col9 $\alpha 1$  homozygote Mäuse haben einen normalen Phänotyp und zeigen keine deutlichen Skelettveränderungen. Eventuell treten vermehrt degenerative Erkrankungen/ Athrose im späteren Lebensalter auf.

Die homozygoten Decorin-Mäuse sind lebensfähig, zeigen aber eine dünne und fragile Haut. Die Haut- und Sehnenbelastbarkeit ist reduziert, die Fibrillenorganisation gestört.

Zur Rollenbestimmung und Klassifizierung von Kollagen Typ IX und Decorin im Knorpel züchteten wir  $\alpha 1$ Col(IX)- und Decorin doppelt defiziente Mäuse. Diese waren sowohl lebens- als auch vermehrungsfähig und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Mit Gesamt- RNA dieser neugeborenen Mäuse untersuchten wir durch Northern Blot Analysen zusätzliche Komponenten (Lumikan, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1$ Col(XIV) und  $\alpha 1$ Col(XII)), um eine eventuell veränderte Genexpression nachzuweisen. Hier zeigte sich bei den Doppeldefizienten Mäusen eine ca. 50%ige Reduktion von Lumikan und eine ca. 20%ige von Biglycan. Die Knorpel- Knochen- Verteilung von ganzen neugeborenen Mäusen zeigte auf lichtmikroskopischer Ebene keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp- Mäusen. Neben Kollagen Typ IX und Decorin muß es noch andere Knorpelbestandteile geben, die für die Differenzierung und den Aufbau von Knorpel entscheidend sind.

Tierversuch: genehmigt im Brief vom 10.02.1994, Az19/94

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2003

## Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeine Einleitung.....	3
Zu 1. Die extrazelluläre Matrix.....	3
Zu 2. Knorpel.....	5
Zu 2.1 Der hyaline Knorpel.....	7
Zu 3. Die Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix.....	14
Zu 3.1 Kollagene .....	14
Zu 3.2 Die Kollagene des Knorpels .....	18
Zu 3.3 Proteoglykane.....	29
Zu 3.4 Die nicht kollagenen Proteine und Glykoproteine der Knorpelmatrix .....	37
II. Fragestellung.....	42
zu 1. Die unterschiedliche Verteilung von Decorin und Kollagen Typ IX entlang Gelenkknorpelfibrillen .....	42
zu 2. Die Kollagen Typ IX Knockout-Maus .....	43
zu 3. Die Decorin Knockout-Maus.....	44
zu 4. Hypothetische Veränderungen der Matrixbiosynthese und der Zusammensetzung von Gelenkknorpel bei gleichzeitigem funktionellen Knockout von Kollagen Typ IX und Decorin.....	44
III. Material und Methoden.....	46
zu 1. Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwanzenden.....	46
zu 2. PCR zur Genotypisierung der Decorin- Mäuse modifiziert nach R.V. Iozzo .....	47
zu 3.1 Southern Blot Analyse zur Kollagen $\alpha 1$ IX - Genotypisierung.....	48
zu 3.2 PCR Kollagen $\alpha 1$ IX DNA (modifiziert nach A.Aszodi).....	50
zu 4. Isolation von Gesamt-RNA aus neugeborenen Mäusen (Szüts, Möllers et al 1998).....	51
zu 5. Northern Blot Analyse.....	52
zu 6. RT- Polymerasekettenreaktion zur Herstellung von Sonden .....	54

zu 7. Subklonieren der Sonden-PCR-Fragmente in den PCR II TOPO Vektor (Invitrogen).....	56
zu 8. Fibrillenpräparation aus 1,0 g Rippenknorpel 4 Wochen alter Decorin - /- Mäuse und Wildtyp-Mäuse.....	58
zu 9. Knorpel-/ Knochenfärbung von neugeborenen Mäuse-embryonen mit Alicanblau und Alicarinrot (Romeis, Mikroskopische Technik).....	60
zu 9.1 Alicanblaufärbung .....	60
zu 9.2 Alizarinrotfärbung .....	61
<b>IV. Ergebnisdarstellung.....</b>	<b>62</b>
zu 1. Zucht der Decorin und $\alpha 1$ Kollagen IX defizienten Mäuse .....	62
zu 2. Generierung der Decorin defizienten Mäuse (Dec-/-) .....	63
zu 3. Generierung der $\alpha 1$ Col(IX) defizienten Mäuse (Col-/-).....	65
zu 4. Generierung der Decorin und $\alpha 1$ Col(IX) doppelt defizienten Mäuse ...	67
zu 5. Northern Blot Analysen der gendefizienten Decorin und $\alpha 1$ Col(IX) Mäuse sowie von weiteren Extrazellulärmembran- Komponenten .....	69
zu 6. Immunhistologische Untersuchung der Knorpel- Knochen- Verteilung bei doppelt gendefizienten Mäusen, doppelt heterozygoten und Wildtyp Mäusen .....	73
zu 7. Fibrillen- Präparationen von homozygoten Decorin -/- und Wildtyp Mäusen .....	77
<b>V. Diskussion der Untersuchungsergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>VII. Lebenslauf.....</b>	<b>114</b>
<b>VIII. Danksagung.....</b>	<b>115</b>
<b>IX. Tierversuche.....</b>	<b>116</b>

## I. Allgemeine Einleitung

### Zu 1. Die extrazelluläre Matrix

Der Organismus vielzelliger Tiere besteht zu über 30 % aus Binde- und Stützgewebe. Es entsteht vor allem aus dem Mesenchym, das aus dem mittleren Keimblatt (Mesoderm) stammt (Karlson et al., 1994; Kristic, 1982). Nicht organspezifisches Bindegewebe durchzieht kontinuierlich den ganzen Organismus, verbindet, unterteilt, durchsetzt und umhüllt alle Organe und Zellen als Stütz- und Gerüstwerk. Ihr Anteil am Gesamtgewebe ist in den einzelnen Organen sehr unterschiedlich: In Haut und Knochen bilden sie den Hauptbestandteil, in Gehirn und Rückenmark dagegen stellen sie nur geringe Anteile (Mc Donald, 1988).

Spezielle Bindegewebsformen sind unter anderem Knorpel, Knochen, Sehnen, Hornhaut, Lederhaut, Glaskörper des Auges, Haut, Lunge und das Blutgefäßsystem.

Jedes Bindegewebe läßt ein typisches Verhältnis aus Zellen und Extrazellulärsubstanz erkennen. Charakteristisch für alle Bindegewebe im Vergleich mit parenchymatösen Organen ist der geringe prozentuale Anteil von Zellen (20 – 30 % des Organvolumens) (Kristic, 1982). Die von den Zellen sezernierte Extrazellulärsubstanz, auch „Extrazelluläre Matrix“ (EZM) genannt, besteht neben Wasser überwiegend aus zwei Hauptklassen von Makromolekülen: 1. den Glycosaminoglykanen (GAG), die zu den Polysacchariden gehören und gewöhnlich, an Proteine gekoppelt, in Form von Proteoglykanen vorliegen; und 2. den Faserproteinen, die man anhand ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen kann: Strukturproteine (z.B. Kollagene und Elastin) und Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin) (Piez et al., 1984).

Die Proteoglykane bilden eine stark wasserhaltige, gelartige „Grundsubstanz“, in welche die Faserproteine eingebettet sind. Die wäßrige Phase des Polysaccharidgels erlaubt die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten und Hormonen zwischen Blut und Gewebe. Die Kollagenfasern machen die Matrix widerstandsfähiger und tragen zu ihrer Struktur bei, die Elastinfasern verleihen ihr Elastizität.

Fibronectin fördert den Kontakt von Fibroblasten und ähnlichen Zellen zur Matrix, Laminine, z.B. Laminin 1, trägt zur Anheftung der Epithelzellen an die Basalmembran bei (Alberts et al., 1990).

**Tab. 1: Zusammensetzung und mechanische Eigenschaften verschiedener Bindegewebe (modifiziert nach Karlson et al., 1994)**

Gewebetyp	Eigenschaften	Haupt-Faserprotein	Kohlenhydratanteil
<b>Knochen</b>	Belastbarkeit**, Druckfestigkeit, Formstabilität	Kollagen Typ 1	<b>Chondroitinsulfat</b> , Hyaluronat, Keratansulfat
<b>Rippenknorpel</b>	Druckfestigkeit*, geringe Reibung, gute Elastizität	Kollagen Typ II, Typ IX und Typ XI	<b>Chondroitinsulfat</b> , (Keratansulfat)
<b>Sehnen</b>	Hohe Zugfestigkeit; geringe Elastizität	Kollagen Typ I	Dermatansulfat; Chondroitinsulfat
<b>Große Blutgefäße</b>	Hohe Dehnbarkeit und Reißfestigkeit	Elastin, Kollagen Typ I und Typ III	<b>Chondroitinsulfat</b> , Hyaluronat, Dermatansulfat, Heparansulfat (Heparin***)
<b>Haut</b>	Festigkeit, mäßige Dehnbarkeit, gute Verformbarkeit	Kollagen Typ I (80 %) Typ III	<b>Dermatansulfat</b> , Hyaluronat
<b>Basalmembran</b>	Trennfunktion, selektiv permeabel	Kollagen Typ IV	Heparansulfat
<b>Cornea</b>	Transparent, fest	Kollagen Typ I und Typ V	<b>Keratansulfat</b> , Chondroitin, Chondroitinsulfat

\* Hauptkomponente (50% und mehr) fett gedruckt, Komponenten unter 10 % in Klammern

\*\* Wird durch Einlagerung von Hydroxylapatit erreicht

\*\*\* Typisches Polysaccharid der Mastzellen

Die einzelnen makromolekularen Komponenten der extrazellulären Matrix variieren in Menge und Struktur. So entsteht eine große Vielfalt von Formen, von denen jede an die Funktion des betreffenden Gewebes angepaßt ist. Beispielsweise kann die Matrix kalzifizieren und so die harten Strukturen von Knochen und Zähnen bilden; ebenso

kann sie zur durchsichtigen Matrix der Hornhaut auf der Augenvorderseite werden, oder sie kann als seilartige Struktur den Sehnen ihre enorme Zugfestigkeit verleihen (Darnell et al., 1993).

Es ist falsch die extrazelluläre Matrix lediglich als inaktives Gerüst zur Stabilisierung von Geweben zu betrachten. Vielmehr beeinflusst sie die Bindegewebszellen über membranständige Matrixrezeptoren in Entwicklung, Fortbewegung, Vermehrung, Form und Stoffwechselfunktionen. So ist z.B. die Morphogenese, bei der Zellen und Zellgruppen ihre Lage verändern und so die endgültige Gestalt des Gewebes bestimmen, wesentlich von Zell/Matrix-Wechselwirkungen abhängig. Auch bei der Embryogenese werden Matrixmoleküle ununterbrochen modifiziert, abgebaut und resynthetisiert bis alle Organe vollständig ausgebildet sind (Darnell et al., 1993). Auch im ausdifferenzierten Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen ständigem Um-, Ab- und Aufbau der extrazellulären Matrix.

## Zu 2. Knorpel

Knorpel stellt eine spezialisierte Form von Bindegewebe dar und ist in der Lage unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. Eine besondere Eigenschaft des Knorpels ist seine Druck- und Biegunselastizität; das bedeutet, das Knorpel bis zu einem gewissen Grade komprimierbar (und dehnbar) sowie biegsam ist (Hall, 1983).

Im Verlaufe der Embryonalentwicklung wird ein knorpeliges Skelett angelegt, das bei höheren Wirbeltieren (Ausnahme: Knorpelfische wie Haie und Rochen) durch Knochen ersetzt wird. Im postnatalen Organismus stützt der Knorpel nichtskelettale Gewebe und Organe, dient als Stoßdämpfer und Gleitfläche an den Knochenenden und ist an den Prozessen des Skelettwachstums und –reparatur beteiligt (Stockwell, 1983).

Knorpel besitzt eine Struktur aus Knorpelzellen (Chondrozyten), die voneinander isoliert in Interzellulärsubstanz (EZM) eingebettet sind. Im Unterschied zu anderen Bindegewebe hat Knorpel weder Nerven noch Blut- oder Lymphgefäße. Die Versorgung der Zellen mit Gasen und Nährstoffen erfolgt ausschließlich durch Diffusion (Caplan, 1984; Stockwell, 1979).

Mit Ausnahme des Gelenkknorpels ist Knorpel von dünnem Bindegewebe, dem Perichondrium oder Knorpelhaut, umgeben, das reich an Gefäßen und Nerven ist, die

aber nicht in den Knorpel eindringen. Ausgehend vom Perichondrium kann Knorpel z.B. nach Knochenbrüchen neu gebildet werden (appositionelles Wachstum). Die Chondrozyten liegen gewöhnlich in kleinen Gruppen in einer sogenannten Knorpelhöhle (Lakune), die von einer Zone faserfreier Grundsubstanz umgeben ist. Die entstehenden Zellaggregate bezeichnet man als Chondrone (Horten et al., 1993).

Die Funktion des Knorpels beruht auf einem gut organisierten Netzwerk von verschiedenen Makromolekülen, z.B. Kollagene, Proteoglykane und anderen Glykoproteinen. Das extrazelluläre Kompartiment besteht hauptsächlich (ca. 80 %) aus Wasser, welches, in Kombination mit den Charakteristika der Matrixmoleküle und deren Interaktionen, die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels bedingt: die Elastizität und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Kompressions- und Zugkräften (Ratcliffe and Mow, 1996).

Anhand morphologischer Unterschiede im Lichtmikroskop, Grad der Kalzifizierung, Fasergehalt und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix lassen sich drei Arten von Knorpel unterscheiden: hyaliner, elastischer und Faserknorpel (Junqueira and Carneiro, 1983; Horten et al., 1993).

Der **hyaline** (glasartige) Knorpel ist die im Organismus am weitesten verbreitete und am besten untersuchte Form des Knorpelgewebes. In frischem Zustand erscheint er weiß-bläulich opal und in dünnen Schnitten glasig-durchsichtig. Man findet ihn an den Rippen, der Nase, im Kehlkopf, den Gelenkoberflächen, aber auch in der Luftröhre (Trachea) und den Bronchien. Fasern sind makroskopisch und nach geeigneter Anfärbung im Lichtmikroskop nicht zu erkennen. Im Embryo bildet hyaliner Knorpel eine Art Vorseklett, auf dessen Grundlage nahezu alle größeren Knochen entstehen. Im Verlauf der Entwicklung bestehen nur noch die schmalen Wachstumsfugen aus Knorpel, von denen das Längenwachstum der Knochen ausgeht.

Der **elastische** Knorpel ist strukturell ähnlich, enthält aber zusätzlich große Fasern aus Elastin, die diesem Knorpeltyp sein gelbliches Aussehen geben. Die Chondrone sind kleiner und zellärmer als jene des hyalinen Knorpels. Elastischer Knorpel ist im Organismus weit weniger verbreitet. Man findet ihn im äußeren Gehörgang, der Ohrtrumpete, Epiglottis und einigen Kehlkopfknorpeln. Der elastische Knorpel verknöchert nicht und ist nicht regenerationsfähig.

**Faserknorpel** ist sehr widerstandsfähig. Sein Zell-Anteil ist sehr niedrig und die Chondrone sind sehr klein und enthalten nur einen oder wenige Chondrozyten. Charakteristisch für Faserknorpel sind die großen dichtgepackten Kollagenfasern, die in wenig amorpher extrazellulärer Grundsubstanz eingebettet sind. Er kommt in den Zwischenwirbelscheiben, den Gelenkscheiben und der Schambeinfuge vor. Die Hauptfunktion dieses Knorpeltypes besteht in der Lastübertragung und Stoßdämpfung zwischen knöchernen Skeletteilen (Kristic, 1982; Stockwell, 1983).

**Tab.2: Zusammensetzung der verschiedenen Knorpelarten (Stockwell, 1983)**

Knorpel	Wasser (%)	Feststoffe (%)			
		Kollagen	GAG*	Elastin	Andere**
Gelenkknorpel	72	66	18	-	16
Epiphysen- knorpel	81	37	15	-	48
Elastischer Knorpel	71	53	12	19	16
Faserknorpel	74	78	2	0,6	19

\* Glycosaminoglycane

\*\* z.B. nichtkollagene Proteine, Calciumphosphat, DNA und RNA

### Zu 2.1 Der hyaline Knorpel

Der hyaline Knorpel spielt eine zentrale Rolle für Form und Wachstum des Skeletts (Junqueira and Carneiro, 1983; Horton et al., 1983). Es lassen sich zwei grundlegende Funktionen unterscheiden: er bildet als Gelenkknorpel die widerstandsfähige, elastische Knochenauflage, die zeitlebens erhalten bleibt (permanenter Knorpel); als Wachstumszonenknorpel ist er an der Entwicklung, dem Wachstum und der Reparatur des Skeletts beteiligt und wird danach durch Knochen ersetzt (Ersatzknorpel).

### Zu 2.1.1 Der Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel bedeckt die Knochenenden mit einer dünnen, widerstandsfähigen, elastischen und stoßdämpfenden Oberfläche. Er ermöglicht eine reibungsarme Übertragung der durch das Skelett ausgeübten Kräfte und erleichtert die Artikulation der Gelenkflächen, z.B. in Ellenbogen, Fingern, Knien, Schultern und Hüfte.

Während täglicher Aktivitäten wie Laufen oder Treppen steigen wirken z.B. Kräfte auf Knie oder Hüfte bis zu dem zehnfachen des eigenen Körpergewichtes (Ratcliffe and Mow, 1996). Aufgrund dieser hohen Anforderungen ist der komplexe Aufbau von Gelenkknorpel erklärbar. Wie in Abbildung 1 beschrieben, ist die Struktur von Gelenkknorpel durch eine spezifische zonale Einteilung charakterisiert (Horton et al., 1993; Hunziker, 1992; Hedlund et al., 1993).

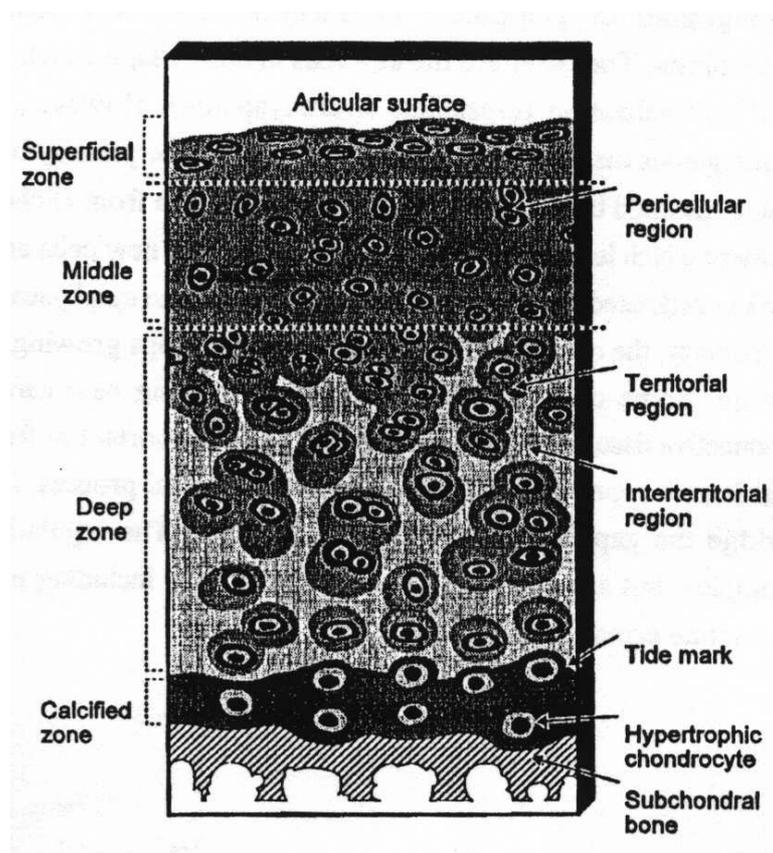


Abb. 1: Schematische Darstellung von Gelenkknorpel (according to Poole et al., 1992)

Die Nährstoff- und Gasversorgung erfolgt ausschließlich durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit des Gelenkes und aus dem subchondralen Knochen (Horton et al., 1993). Die Morphologie des Gelenkknorpels von der Oberfläche bis zum darunterliegenden Knochen zeigt eine Gliederung in drei nicht-mineralisierte Zonen: die oberflächliche (Tangential-), die mittlere (Übergangs-) und die tiefe (Radial-) Zone (vgl. Abb. 1).

In der Tangentialzone liegen flache, spindelartige oder ellipsoide Chondrozyten vor. Der Beginn der Übergangszone ist durch das Auftreten von runden Zellen gekennzeichnet. Die Zellen der Radialzone sind am größten und zeigen eiförmiges Aussehen. Während in der oberen Radialzone Einzelzellen auftreten, findet man im mittleren und unteren Teil Chondrone, die jeweils durch Mitose aus einem Chondrozyt hervorgegangen sind und typische vertikale Säulenstrukturen ausbilden (Egglı et al., 1988). Charakteristisch für die Radialzone sind Fibrillen größeren Durchmessers (bis zu 200 nm) die in parallelen Bündeln senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufen (Lane and Weis, 1975). Diese Fibrillen reichen bis in die kalzifizierte Matrix hinein und bilden ein fest verankertes System für das Knorpelwachstum (Ratcliffe and Mow, 1996).

Auf die Säulenstrukturen ist die Fähigkeit des Gelenkknorpels zurückzuführen, eine aktive nach unten gerichtete Wachstumszone zu bilden. Dabei durchlaufen die Stammzellen der Tangentialzone eine proliferative Phase in der Übergangszone und der oberen Radialzone. Eine weitere Differenzierung in der unteren Radialzone führt zu hypertrophen Chondrozyten, die durch Größenzunahme die erwähnte Säulenstruktur entstehen lassen. Charakteristisch für hypertrophe Chondrozyten ist die starke Expression von Kollagen Typ X und alkalischer Phosphatase. Die Struktureinteilung ist der des epiphysären Knorpels ähnlich.

Die Zellen des Gelenkknorpels sind in strukturell unterschiedliche Matrices eingebettet. Die perizelluläre Matrix schmiegt sich an die Plasmamembran der Chondrozyten an und zeigt einen hohen Proteoglykananteil sowie das Fehlen gebänderter Kollagenfibrillen (Poole et al., 1992). Die perizelluläre Matrix geht fließend in die territoriale Matrix über, in der zusätzlich ein Netzwerk von feinen quergebänderten Fibrillen (ca. 20 nm Durchmesser) vorliegt. Den äußersten und zugleich größten Matrixbereich im hyalinen Knorpel bildet die interterritoriale Matrix. Abhängig vom Differenzierungs- und

Reifezustand der jeweiligen Zone des Knorpels unterscheidet sich die Struktur und Größe der vorhandenen Kollagenfibrillen (Lane and Weis, 1975). In der obersten und am meisten beanspruchten Schicht des Gelenkknorpels sind die dichtgepackten, feinen Fibrillen schon im frühen Entwicklungsstadium parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Zum gleichen Zeitpunkt ist in den anderen Zonen keine spezifische Orientierung erkennbar. Im adulten Zustand zeigen die Fibrillen in der oberen Radialzone eine eher zufällige, in der unteren Radialzone die dicken Fibrillen eine senkrecht zur Gelenkoberfläche verlaufende Anordnung.

Die Orientierung der Kollagenfibrillen im Gelenkknorpel kann individuelle Unterschiede aufweisen und ist abhängig vom Belastungsgrad des jeweiligen Gelenkbereiches (Poole et al., 1992).

### **Zu 2.1.2 Der epiphysäre Knorpel**

Bei Säugetieren existieren zwei grundsätzlich verschiedene Arten der Knochenbildung. Im Verlauf der desmalen (direkten) Ossifikation differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten. Auf diese Weise werden Deck- und Bindegewebsknochen des Schädeldaches, Teile des Gesichtes und des Schlüsselbeines entwickelt (Fawcett, 1986).

Im Gegensatz dazu findet die Bildung der Röhrenknochen durch die enchondrale (indirekte) Ossifikation statt, wobei ein aus hyalinem Knorpel bestehendes Vorseklett allmählich durch Knochen ersetzt wird (Horton et al., 1993).

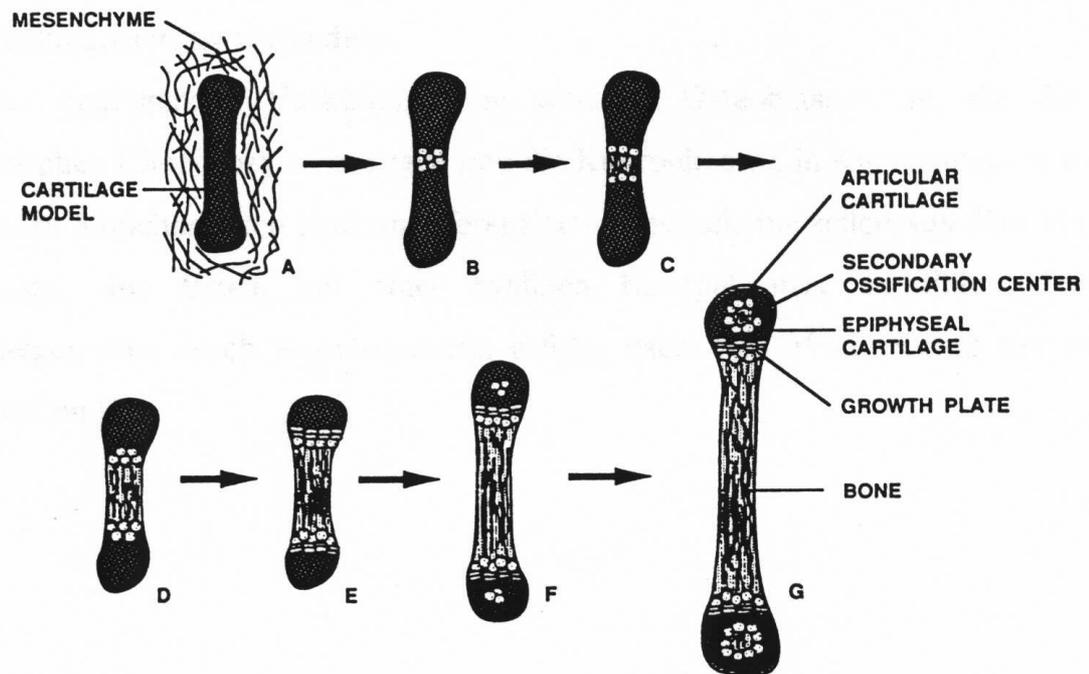


Abb. 2 Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation (Horton et al., 1993)

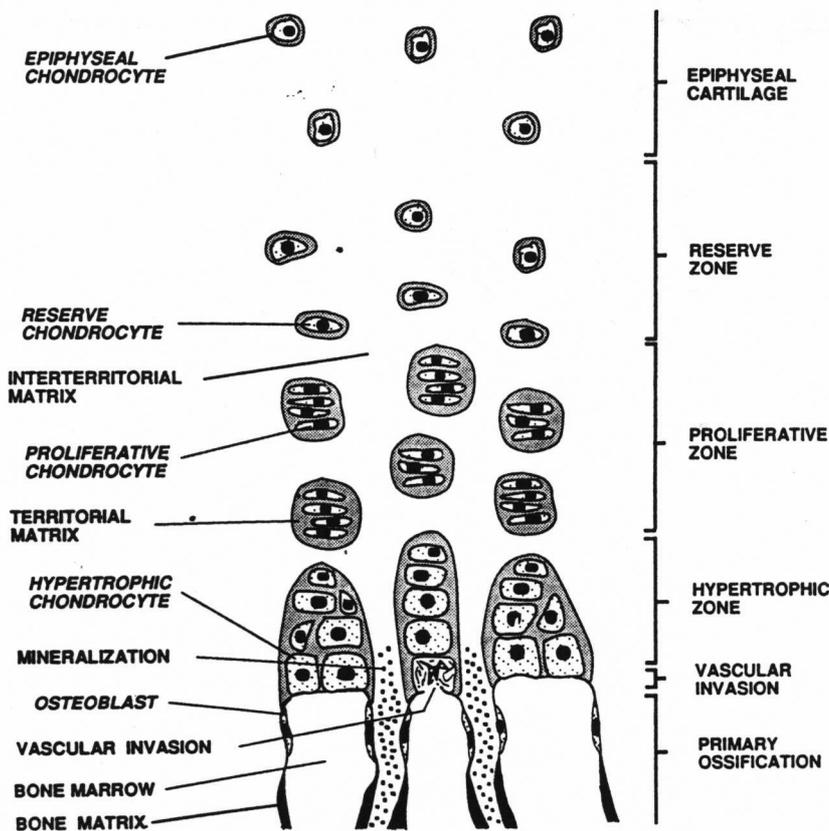


Abb. 3 Schematische Darstellung der epiphysären Wachstumsfuge und deren Unterteilung in Ruhezone, Proliferationszone und Hypertrophierte Zone (according to Horton et al., 1993)

Der Prozeß der Ossifikation beginnt im Zentrum (Diaphyse) der Knorpelanlage und breitet sich in beiden Richtungen entlang der Längsachse aus. Es kommt zur Ausbildung der Wachstumsfuge, der typischen Anordnung des epiphysären Knorpels. Der Ersatz des hyalinen Knorpelgerüsts durch Knochenmatrix geht einher mit der Differenzierung der Chondrozyten längs der Wachstumsfuge. Die Wachstumsfuge des epiphysären Knorpels läßt sich in drei Zonen einteilen, in der die Chondrozyten eine Differenzierungskaskade durchlaufen: Ruhe-, Proliferations- und hypertrophe Zone (Brighton, 1978; Horton et al., 1993; Hunziker, 1994).

In der an die Epiphysenfuge angrenzenden Ruhezone sind die Chondrozyten klein, flach oder ellipsoid und liegen einzeln oder paarweise in großen Mengen extrazellulärer Matrix eingebettet. Durch Zellteilung in axialer Richtung entsteht die charakteristische

Säulenordnung der Zellen (vgl. Abb. 3). In der proliferativen Zone, in der die Chondrozyten eine sehr hohe Teilungsaktivität und Matrixproduktion aufweisen, sind diese Säulen voll ausgebildet und verantwortlich für das Längenwachstum. Durch die interterritoriale Matrix sind die einzelnen Chondrone sowohl horizontal, als auch vertikal voneinander getrennt.

Nach einer definierten Anzahl von Zellteilungen verlieren die proliferativen Zellen ihre Fähigkeit zur Mitose und beginnen zu hypertrophieren. Somit findet eine Änderung in der Morphologie und der biosynthetischen Fähigkeit statt. Die hypertrophe Zone ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung des Zellvolumens, beginnende Kalzifizierung der Matrix, Expression von Kollagen Typ X, Fibronectin und alkalischer Phosphatase, aber Reduktion der Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglykanen. Zudem nimmt die Produktion von natürlichen Proteaseninhibitoren ab. Das Einwandern von Kapillarsprossen von der Metaphyse aus wird ermöglicht. Mit der beginnenden Vaskularisierung wandern Osteoblasten ein, die die absterbenden hypertrophen Chondrozyten ersetzen und verantwortlich sind für die Knochenformation und Mineralisation. Die Knorpelmatrix wird aber lediglich zu ca. 30 % in Knochenmatrix umgewandelt, die restlichen 70 % werden von Osteoklasten resorbiert (Schenk, 1980).

Obwohl die große Aktivität in der Wachstumsfuge kontinuierlich zu neuen Zellen und Knorpelmatrix führt, besteht ein Gleichgewicht zwischen Produktion und Resorption. Am Ende der Pubertät verknöchert die Epiphyse zum größten Teil, aber einige Zellen, mit der Fähigkeit neuen Knorpel zu bilden, persistieren im Periost.

Bei einem Knochenbruch sind diese undifferenzierten Mesenchymzellen in der Lage, den Bruch mit einer hyalinen Knorpelmatrix zu füllen. Der Ersatz des Knorpelgewebes durch Knochenmatrix erfolgt nach dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation (vgl. Abb. 2) (Tschan, 1992).

### Zu 3. Die Zusammensetzung der extrazellulären Knorpelmatrix

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der verschiedenen Bindegewebe variiert sehr stark, da sie unterschiedlichsten Anforderungen genügen muß (vgl. Tab. 1 und Tab. 2). Den Hauptbestandteil der Matrix bilden Kollagene (vor allen Kollagen Typ II haltige Fasern) und Proteoglykane (hauptsächlich Aggrecan). Daneben treten Proteine (z.B. Elastin), Glykoproteine und Glycosaminoglykane in verschiedenen Kombinationen auf.

#### Zu 3.1 Kollagene

Die Kollagene sind Strukturproteine und mit 20 – 30 % der Proteingesamtmasse die mengenmäßig am häufigsten auftretenden Proteine bei Säugetieren.

Die bis heute publizierten 19 Kollagentypen bilden eine heterologe Gruppe verwandter Proteine. Alle Kollagene besitzen eine oder mehrere helikale Domänen mit rechtsgängiger, aus drei  $\alpha$ -Ketten aufgebauten Tripelhelix. Die Länge dieser Trimere beträgt bis zu 450 nm (meist 300 nm) bei einem Durchmesser von 1,5 nm. Es besteht die Möglichkeit, daß sich ein Kollagenmolekül aus drei gleichen (Homotrimer) oder aber aus verschiedenen  $\alpha$ -Ketten (Heterotrimer) zusammensetzt. Die einzelnen  $\alpha$ -Ketten liegen als linksgängige Helix mit einer Ganghöhe von ca. 1 nm vor, wobei auf jede Helixwindung 3,3 Aminosäuren entfallen. Charakteristisch ist außerdem die Aminosäuresequenz (- Gly - Xaa - Yaa -)<sub>n</sub>, wobei X häufig Prolin und Y Hydroxyprolin ist (Kivirikko, 1993). Als weitere modifizierte Aminosäure tritt Hydroxylysin auf. Die Kollagen-Tripelhelix besitzt 10 (- Gly - Xaa - Yaa -) Einheiten pro Windung und eine Ganghöhe von 8,61 nm. Jede dritte Position in der Aminosäuresequenz wird von Glycin besetzt, da ausschließlich deren kleiner Rest im Inneren der Tripelhelix Platz findet. Die Prolin- und Hydroxyprolinreste befinden sich auf der Außenseite der Tripelhelix und stabilisieren durch sterische Abstoßung und Wasserstoffbrückenbindungen diese Struktur. Wasserstoffbrücken zwischen der NH-Gruppe in der Peptidbindung eines Glycin-Moleküls und der Carbonylgruppe in der Peptidbindung einer parallel verlaufenden Peptidkette halten die drei Ketten zusammen (Voet et al., 1994). Die Biosynthese der fibrillären Kollagene Typ I, II, III erfolgt über große Vorläufermoleküle, pro- $\alpha$ -Ketten, an den Ribosomen des rauhen

endoplasmatischen Retikulum (rER). Während der Translation werden ca. 50 % der Prolin- und 10 – 80 % der Lysinreste durch die entsprechenden Hydroxylasen hydroxyliert. Als Cofaktoren brauchen diese Enzyme unter anderem Eisen- (II) und Ascorbinsäure. Bei Vitamin C-Mangel werden die pro- $\alpha$ -Ketten ungenügend hydroxyliert, was zu einer instabilen Kollagen-Tripelhelix führt. Die Folge sind Hautschäden, Gefäß- und Bindegewebsschwäche (Haar- und Zahnausfall) (Stryer, 1994).

Weiterhin findet im ER die Anheftung von N- und O- glycosidischen Oligosacchariden statt. Nach Abschluß der Translation falten sich die C- Propeptidomänen, assoziieren miteinander und leiten somit die Faltung der Tripelhelix und gleichzeitig die C-terminalen Disulfidbindungen ein.

Im extrazellulären Raum werden die Extensionspeptide durch Prokollagen-Peptidasen entfernt. Eine hier gestörte Modifikation kann zu hyperelastischer Haut und überdehnbaren Gelenken führen (Ehlers-Danlos-Syndrom).

Die fertig prozessierten und 300 nm langen Kollagenmoleküle lagern sich lateral zu Kollagenfibrillen und diese wiederum zu Fasern zusammen, welche durch die Bildung von intra- und intermolekularer, kovalenter Quervernetzungen stabilisiert werden. Diese Kollagenfibrillen weisen bei Kontrastierung mit Schwermetallen im Elektronenmikroskop ein charakteristisches Bandenmuster mit einer Periodizität von 67 nm (gewebsabhängig variabel) auf (Wendel, 1995).

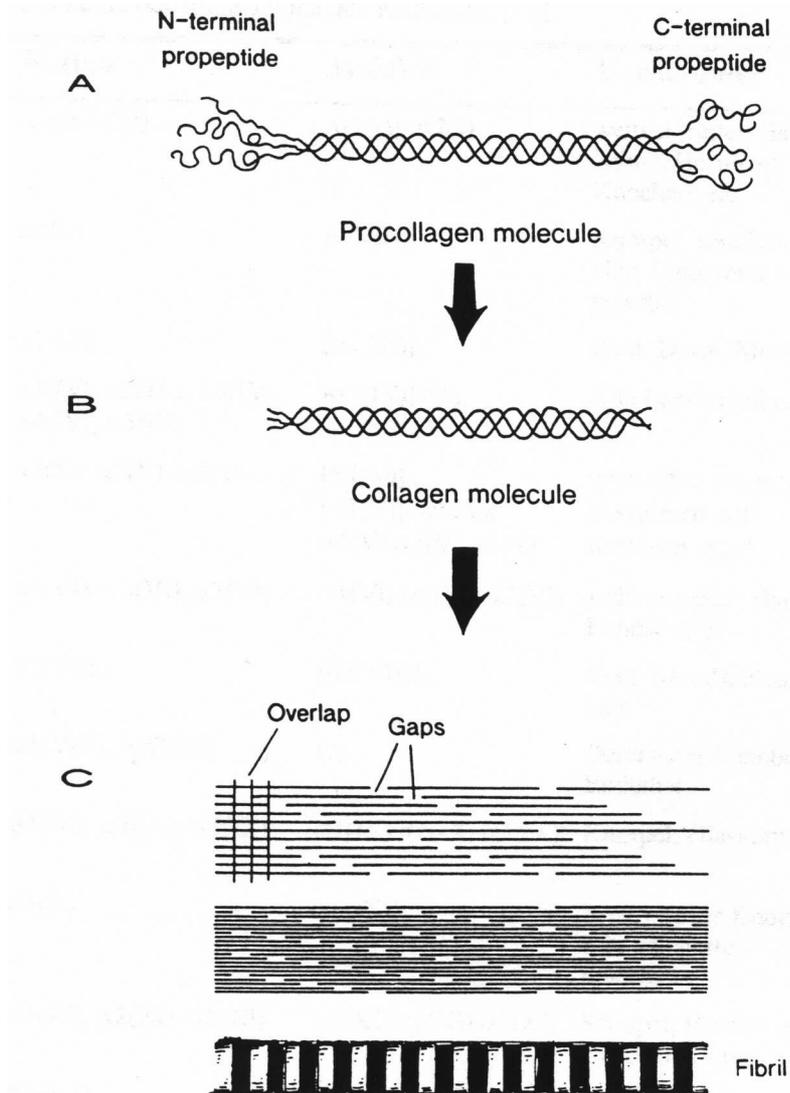


Abb. 4 A Schematische Darstellung eines Kollagenmoleküls

B Propeptide werden durch spezifische Metalloproteinasen von dem Prokollagenmolekül abgespalten

C Die Kollagenmoleküle lagern sich lateral zusammen, wobei es durch Vernetzung zu der charakteristischen Querbändung kommt (Wendel, 1995).

Aufgrund Ähnlichkeiten in der Organisation oder der Struktur kann die Familie der Kollagene in mehrere Unterklassen eingeteilt werden (Prockop and Kivirikko, 1995):

1. Kollagene, die als Fibrillen vorliegen (Kollagen Typ I, II, III, V und XI),
2. Kollagene, die nicht-fibrilläre netzwerkartige Strukturen bilden (Kollagen Typ IV, Kurzkettenkollagene Typ VIII und X),
3. Fibrillen assoziierte Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix (Kollagen Typ IX, XII, XIV, XVI und XIX),
4. Kollagene, die gebänderte Filamente formen können (Kollagen Typ VI),
5. Langkettenkollagene (ca. 450 nm) assoziiert in Form von antiparallelen Dimeren (Kollagen Typ VII),
6. Kollagene mit einer transmembranösen Domäne (Kollagen Typ XIII und XVII) und
7. Kollagen Typ XVIII, aus dem Endostatin freigesetzt werden kann (Burgeson, 1987; Timpl et al., 1987).

Aufgrund dieser Heterogenität und Vielfalt in der Kollagenfamilie ist es nicht überraschend, daß Mutationen in den Genen oder Fehlfunktionen in der Enzymaktivität bei der Kollagensynthese zu schwerstwiegenden Erkrankungen wie z.B. Osteogenesis imperfecta, unterschiedlichen Chondrodysplasien, Alport-Syndrom und verschiedenen Formen der Epidermolysis Bullosa führen können.

Tab. 3: Bis heute bekannte Typen des Kollagens

Typ	Ketten	Molekül	Vorkommen	Merkmale
<b>I</b>	$\alpha 1(I); \alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Weitverbreitet; Haut, Sehne, Hornhaut, Knochen, etc.	Bildet Fibrillen, erhöht die mechanische Belastbarkeit der EZM
<b>II</b>	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	Knorpel, Bandscheibe, viele Embryonalgewebe	Bildet Fibrillen, Haupttyp in Knorpelgewebe
<b>III</b>	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	Haut, Darm, Muskel	bildet Fibrillen
<b>IV</b>	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV), \alpha 3(IV), \alpha 4(IV), \alpha 5(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_3 (?)$	Alle Basalmembranen	Bildet nicht-fibrilläres Netzwerk
<b>V</b>	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	$[\alpha 1(V)]_3$ $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(V)$ $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Weitverbreiter, meist zusammen mit Kollagen Typ I	Bildet Fibrillen, häufig mit Kollagen Typ I
<b>VI</b>	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI),$	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI),$	weitverbreitet; Haut, Bandscheibe	Bildet ca. 100 nm lange dünne Filamente
<b>VII</b>	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	Haut, Mundschleimhaut	Langkettiges Kollagen
<b>VIII</b>	$\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII), ,$	(?)	Descement-Membran, Endothel	Kurzkettiges Kollagen
<b>IX</b>	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX),$	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX),$	Knorpel, Glaskörper	Fibrillenbestandteil, mit unterbr. Tripelhelix
<b>X</b>	$\alpha 1(X),$	$[\alpha 1(X)]_3$	Hypertropher Knorpel, mineralisierter Knochen	Kurzkettiges Kollagen strukturell ähnlich zu Typ VIII
<b>XI</b>	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI),$	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI),$	Knorpel, Bandscheibe, Knochen, Plazenta	Bestandteil von Fibrillen
<b>XII</b>	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$	Sehnen, Bänder	Fibrillenbestandteil, mit unterbr. Tripelhelix
<b>XIII</b>	$\alpha 1(XIII)$	(?)	Weitverbreitet; Haut, Knochen, Darm	Zeigt komplexes Spleißmuster
<b>XIV</b>	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Haut, Sehne	Fibrillenbestandteil, mit unterbr. Tripelhelix
<b>XV</b>	$\alpha 1(XV)$	(?)	Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Plazenta	enthält viele Unterbrechungen in der Tripelhelix
<b>XVI</b>	$\alpha 1(XVI)$	$[\alpha 1(XVI)]_3$	Fibroblasten, Haut, Knorpel	enthält viele Unterbrechungen in der Tripelhelix
<b>XVII</b>	$\alpha 1(XVII)$	(?)	Epidermale Desmosomen	Membranständig
<b>XVIII</b>	$\alpha 1(XVIII)$	(?)	Lunge, Leber	enthält viele Unterbrechungen in der Tripelhelix
<b>XIX</b>	$\alpha 1(XIX)$	(?)	Rhabdomyosarkom	enthält viele Unterbrechungen in der Tripelhelix

### Zu 3.2 Die Kollagene des Knorpels

Kollagene sind die Hauptproteinbestandteile des Knorpels (Bruckner et al., 1994), überwiegend die Kollagentypen II, VI, IX, X und XI. Der Hauptvertreter ist das Typ II Kollagen. Die seltener vorkommenden Typen IX und XI sind mehr oder weniger

knorpelspezifisch und finden sich stets in Verbindung mit Kollagen Typ II (Eyre et al., 1992).

Kollagen Typ II und XI gehören zu der gleichen Untergruppe der fibrillären Kollagene und sind in ihrer Struktur ähnlich. Sie unterscheiden sich lediglich in den N-Propeptiden. Kollagen Typ IX gehört zur Familie der FACIT- Kollagene. Die Interaktionen von Kollagen Typ II, IX und XI sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Meist in der Peripherie der Chondrocyten findet man das Kollagen Typ VI, das gereifte Filamente formen kann, evtl. in Verbindung mit Hyaluronat (Bruckner et al., 1994). Kollagen Typ X wird von hypertrophen Chondrocyten produziert und ist an der enchondralen Ossifikation beteiligt (Schmid et al., 1987, Kwan et al., 1991).

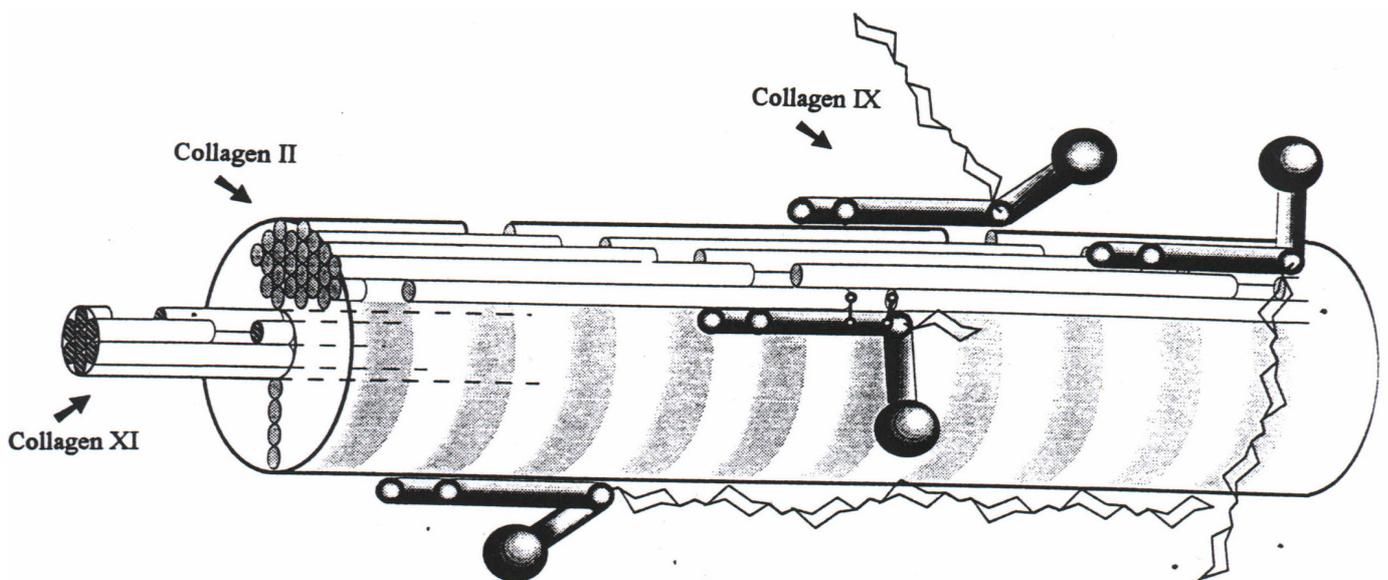


Abb. 5 Schematische Darstellung der Kollagenorganisation in Knorpelfibrillen (Bruckner et al., 1994)

### Zu 3.2.1 Kollagen Typ II

Kollagen Typ II ist mit 80 – 95 % das häufigste Knorpelkollagen (Mayne et al., 1986). Es handelt sich um ein Homotrimer mit der Zusammensetzung  $[\alpha 1 (II)]_3$ , dessen einzelne Ketten ein Gewicht von ca. 95 kDa aufweisen. Die 300 nm lange tripelhelikale

Domäne wird von kurzen Telopeptiden mit 17 Aminosäuren (AS) (N-Terminus) bzw. 21 AS (C-Terminus) eingerahmt. Kollagen Typ II weist eine hohe Homologie zu Kollagen Typ I auf, allerdings ist Kollagen Typ II stärker glycosyliert, was auf eine langsamere Faltung der Tripelhelix zurückgeführt wird (Kühn, 1987).

Durch die Aggregation der einzelnen Kollagenmoleküle entstehen D-periodische Kollagenfibrillen, die im fötalen bzw. unreifen Stadium einen Durchmesser ca. 20 nm besitzen, der sich während der Entwicklung auf > 100 nm vergrößern kann (Lane and Weiss, 1975). Durch Quervernetzung der einzelnen Fibrillen entsteht ein Netzwerk, in das die Proteoglykane und andere Makromoleküle eingebettet sind (Eyre et al., 1992).

Kollagen Typ II kann nicht mehr als knorpelspezifischer Marker betrachtet werden, seit der Entdeckung des Vorkommens in anderen Geweben, z.B. im Glaskörper, verschiedenen Embryonalstrukturen wie Nabelschnur, Cornea (Kosher and Solursh, 1989) und Neuralrohr (Thorogood et al., 1986).

Prokollagen Typ II existiert in zwei verschiedenen Formen aufgrund einer unterschiedlichen Aufteilung (Spleißing) des Exon 2. Dieses Exon, entweder vorhanden in mRNA (IIA) oder nicht (IIB) verschlüsselt eine 69 Aminosäure – Cysteinreiche – Domäne, die ähnlich der Domänen in den  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(III)$  und  $\alpha 2(V)$  Kollagenketten sind (Ryan and Sandell, 1990).

Interessanterweise ist die Gewebeverteilung der zwei Kollagenformen nicht identisch. Typ II B wurde in Chondrocyten entdeckt, begleitet mit einer gesteigerten Synthese von charakteristischen Knorpelmatrix-Proteinen. Im Gegensatz dazu findet man Typ II A in weniger differenzierten, matrixarmen z.B. knorpelumhüllenden Geweben und in embryonalen Spinalganglien (Sandell et al., 1994).

Wie Kollagen Typ I und III ist auch Kollagen Typ II durch interstitielle Kollagenasen (Matrix Metalloproteinase-1) zerstörbar, die eine Aufspaltung der Tripelhelix bewirken (Gadher et al., 1990).

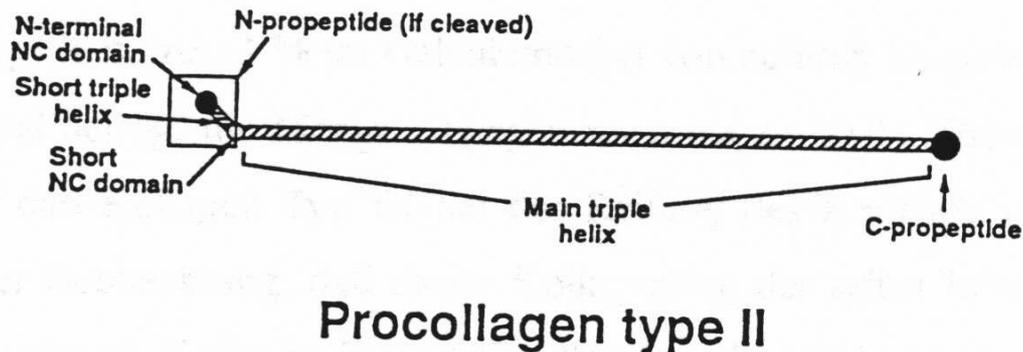


Abb. 6 Kollagen Typ II (Mayne et al., 1986)

### Zu 3.2.2 Kollagen Typ VI

Kollagen Typ VI bildet die Untergruppe der Kollagene, die ubiquitär als dünngebänderte Filamente in der EZM der meisten Bindegewebe vorkommen (Timpl and Engel, 1987). Es wurde durch biochemische Analysen in der Knorpelmatrix entdeckt und durch indirekte Immunfluoreszenz in der Umgebung von Chondrocyten lokalisiert (Ayad et al., 1984; Keene et al., 1988; Poole et al., 1988). Kollagen Typ VI Moleküle bestehen aus Tetrameren mit Disulfidbindungen, besitzen aber keine Aldehydbrücken die charakteristisch für die anderen Kollagentypen sind (Wu et al., 1987).

Die Funktion von Kollagen VI besteht in der Verankerung und Verbindung von Zellen (von der Mark et al., 1984). Die perlenförmige 40 nm große Struktur besteht aus Dimeren, die durch seitliche Aggregation Tetramere bilden. Diese ermöglichen unter anderem z.B. eine Bindung an Kollagen Typ II und Decorin (Bidanset et al., 1992). Die

Stabilisierung der Filamente erfolgt durch Interaktion mit Hyaluronat (Kielty et al., 1992). Eine erhöhte Menge an Kollagen Typ VI findet man bei Osteoarthritis (Svoboda et al., 1988).

Das Kollagen Typ VI ist zusammengesetzt aus drei unterschiedlichen Ketten, die aus einer kurzen Tripelhelix (ca. 105 nm) und nicht-helikalen Abschnitten, die als große kugelförmige Domänen im Elektronenmikroskop erscheinen, bestehen:  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$ ,  $\alpha 3(\text{VI})$ . Ihre Molekulargewichte betragen 150, 140 und 260 kDa. Es gibt Beweise für alternatives Spleißing der  $\alpha 2(\text{VI})$  und  $\alpha 3(\text{VI})$  mRNAs (Chu et al., 1990b; Dolina et al., 1990), so daß möglicherweise gewebespezifische Formen existieren.

Davon ist die  $\alpha 3(\text{VI})$  Kette die größte Untereinheit mit der komplexesten Struktur. Diese beinhaltet bis zu neun kollagenbindende von Willebrand Faktor A-Domänen in der N-terminalen NC-Region (Bonaldo et al., 1990; Chu et al., 1990b). In der C-terminalen NC-Region findet man drei Abschnitte, die Ähnlichkeiten zu Speichelproteinen, zu Fibronectin Typ III und zu Proteaseninhibitoren von Kunitz-Typ aufweisen. Die nicht-kollagene (NC) Domäne aller drei Kollagen Typ VI Ketten umfaßt ca. 200 AS-Sequenzen.

In der Tripelhelix-Domäne von Kollagen Typ VI befinden sich 13 Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenzen, die für die zelladhäsiven Eigenschaften verantwortlich gemacht werden. Untersuchungen an Rinderchondrozyten zeigten, daß abhängig von der An- bzw. Abwesenheit dieser RGD Sequenzen eine Zellverankerung stattfand oder nicht (Marcelino and Devitt, 1995).

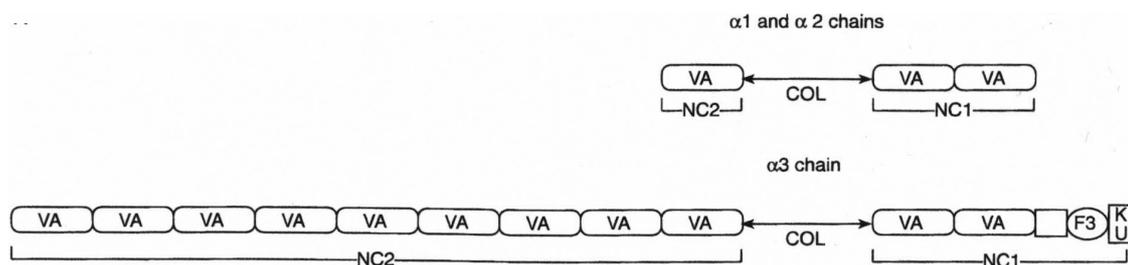


Abb. 7 Kollagen Typ VI (VA: von Willebrandfaktor A, KU: Kunitz/bovine pancreatic trypsin inhibitor, F3: Fibronectin Typ III repeat)

### Zu 3.2.3 KollagenTyp IX

Kollagen Typ IX wurde erstmalig in Säugetier- (Shimokomaki et al., 1980) und Hühnerknorpel (Reese and Mayne, 1981) in Form von pepsinresistenten tripelhelikalen Fragmenten gefunden, die mit SDS-Gelen in komplexe Peptidmuster aufgespalten werden können.

Kollagen Typ IX ist zu ca. 1 % im Gelenkknorpel von adulten Säugetieren, aber bis zu 10 % im fötalen Gelenkknorpel enthalten. Dieser Umstand führte zu der Vermutung, daß Kollagen Typ IX bei der Reifung des Knorpels eine wichtige Rolle spielt (Eyre et al., 1990). Dieser Kollagentyp, der selbst keine Fibrillen bildet, wird auf den Oberflächen von Knorpelfibrillen kovalent gebunden (Bruckner et al., 1988) und stabilisiert das fibrilläre Netzwerk. Kollagen Typ IX ist nicht nur in dünnen Knorpelfibrillen vorhanden (Hagg et al., 1997), die auch keinen einheitlichen Durchmesser aufweisen.

Kollagen Typ IX ist ein Heterotrimer bestehend aus drei verschiedenen Genprodukten: [ $\alpha 1$  (IX)  $\alpha 2$  (IX)  $\alpha 3$  (IX)]. Die Molekulargewichte der einzelnen intakten Ketten betragen 115 kDa ( $\alpha 1$  (IX)), ca. 68 kDa ( $\alpha 2$  (IX)) und 84 kDa ( $\alpha 3$  (IX)) (van der Rest and Mayne, 1987; 1988). Das Molekül besitzt drei tripelhelikale Domänen (COL-Domänen), welche von vier nicht-helikalen (NC) Bereichen unterbrochen bzw. flankiert sind. Die antiparallel (Wu et al., 1992) zu den Kollagen Typ II enthaltenen Fibrillen liegenden COL 1- und COL 2-Domänen interagieren mit diesen, während die COL 3-Domäne von der Fibrille absteht (Vaughan et al., 1988). Die nicht-kollagen Domänen (NC-Domänen) begrenzen und unterbrechen die Tripelhelix. Die NC-Domänen sind meist sehr kurz (12 – 23 AS), lediglich NC4 bildet eine Ausnahme mit 243 AS. Diese wird meist im hyalinen Knorpel gefunden, während die kurzen Formen (ohne NC 4) in embryonalem Gewebe entdeckt wurden, z.B. der Cornea (Svoboda et al., 1988), im Glaskörper (Yada et al., 1990), in der Nabelschnur (Hayashi et al., 1992) und im hypertrophen Knorpel (Tracy, 1990). Die NC3-Domäne der  $\alpha 2$  (IX)-Kette weist fünf zusätzliche AS auf, die als Bindungsstelle für eine Glycosaminoglycankette (Chondroitinsulfat) von variabler Länge fungieren. Diese GAG-Kette macht das Molekül zu einem außergewöhnlichen Proteoglykan-Kollagen Hybrid (Bruckner et al., 1985). In embryonalen Hühnersternum liegt Kollagen Typ IX zu 80 % mit der GAG-

Kette vor (Huber et al., 1988), in Gelenkknorpel dagegen nur zu 5 % (Ayad et al., 1989).

Im Glaskörper hat Kollagen Typ IX die längsten GAG-Ketten und scheint dort für die physikalisch-chemische Stabilität des Gewebes verantwortlich zu sein (Yada et al., 1990; Brewton et al., 1991).

Kollagen Typ IX leistet einen großen Beitrag zu der mechanischen Stabilität des Fibrillennetzwerkes von Knorpel aufgrund der kovalenten Bindungen zwischen individuellen Fibrillen und/oder den Interaktionen mit den eingefügten GAG-Ketten. Kollagen Typ IX kann durch die Metalloproteinase Stromelysin in der NC2-Domäne gespalten werden und trennt somit die Kollagen Typ IX-Moleküle von der Oberfläche der Kollagen Typ II-Fibrillen ab. Dies ist möglicherweise ein wichtiger Schritt in der Reorganisation, im Wiederaufbau und im Wachstum von Knorpel (Wu et al., 1991).

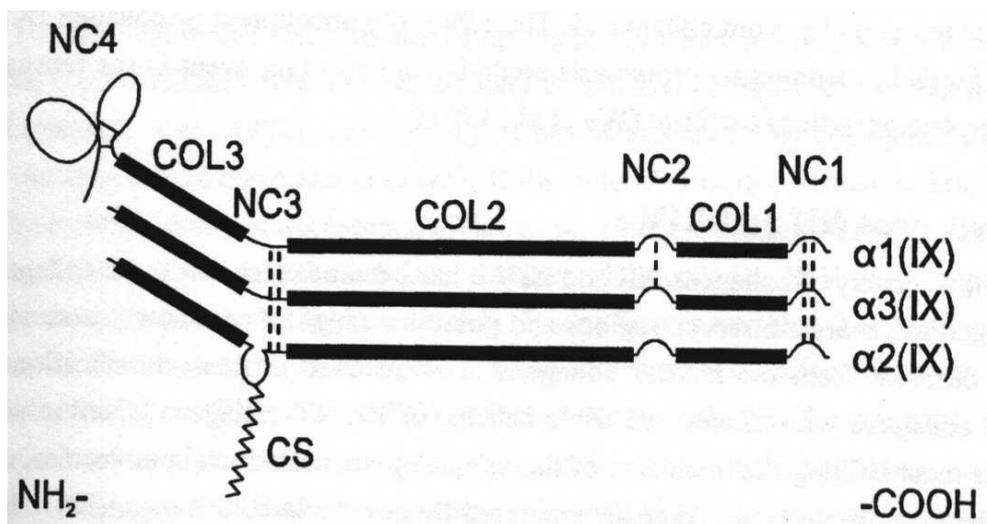


Abb.8 Kollagen Typ IX (Hagg, 1997)

### Zu 3.2.4 Kollagen Typ X

Kollagen Typ X ist ein weiteres kurzes (138 nm) helikales Kollagen (Jacenko et al., 1991). Es handelt sich um ein Homotrimer  $[\alpha 1(\text{X})]_3$ , dessen  $\alpha 1(\text{X})$ -Ketten ein Molekulargewicht von je 59 kDa haben. Das Molekül besteht aus einer einzigen tripelhelikalen Domäne (460 AS), welche von einem kleinen nicht-helikalem Peptid (34 AS) am N-Terminus und einer größeren globulären Domäne (162 AS) am C-Terminus flankiert wird (Schmid et al., 1982; Ninomiya et al., 1990). Diese zeigt eine

Strukturähnlichkeit zu einer Domäne, die am C-Terminus anderer Moleküle mit tripelhelikalen Domänen vorliegt, z.B. die zwei Ketten von Kollagen Typ VIII (Sawada et al., 1990). Die Tripelhelix weist acht Unregelmäßigkeiten in der Gly-Xaa-Yaa Sequenz auf und besitzt eine bemerkenswerte Stabilität mit einer Denaturierungstemperatur von 47° C (Schmid et al, 1986).

Kollagen Typ X wird von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert (Schmid and Linsenmayer, 1987). Man findet Kollagen Typ X nur in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge und im tieferen kalzifizierten Bereich von reifen Gelenkknorpel, was zu der Vermutung führte, daß es bei der Kalzifizierung durch Bindung an Matrixvesikel über Annexin V eine Rolle spielen könnte (Kirsch et al. 1992). Bei Osteoarthritis findet man zusätzlich zum Knorpel der Wachstumsfuge Kollagen Typ X auch im Kallus und in den Intervertebralscheiben (von der Mark et al., 1993). Ebenso wird Kollagen Typ X vermehrt während der Frakturheilung exprimiert, was zu der Vermutung führt, daß es eine wichtige Rolle bei der Regeneration und der Knochenheilung spielt (Grant et al., 1987).

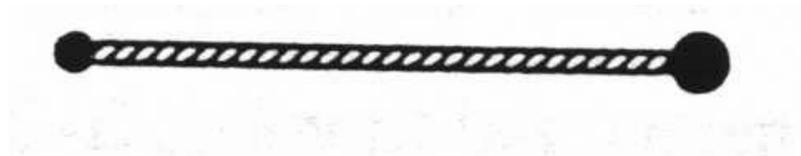


Abb. 9 KollagenTyp X (Mayne et al., 1986)

### Zu 3.2.5 KollagenTyp XI

Kollagen Typ XI liegt im Knorpel als Heterotrimer [ $\alpha 1$  (XI)  $\alpha 2$  (XI)  $\alpha 3$  (XI)] vor und besitzt eine 300 nm lange tripelhelikale Domäne (Morris and Bächinger, 1987). Die N-terminale globuläre Domäne wird im Gegensatz zu anderen Kollagenen nicht vollständig entfernt. Kollagen Typ XI weist bezüglich der Struktur und der Proteasenempfindlichkeit eine große Ähnlichkeit zu Kollagen Typ V auf. Die  $\alpha 1$  (XI)-Kette zeigt eine hohe Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der  $\alpha 1$  (V)-Kette,

ist aber ein anderes Genprodukt. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die  $\alpha 3$  (XI)-Kette und die  $\alpha 2$  (II)-Kette durch ein einziges Gen codiert werden und sich nur in der posttranslationalen Modifikation und damit in der Struktur unterscheiden (Mayne et al., 1995). Diese Ähnlichkeit erklärt, warum Hinweise auf heterotype Kollagene, bestehend aus Ketten von Kollagen Typ XI und Typ V vorliegen (Eyre and Wu, 1987).

Kollagen Typ XI ist mit Typ IX und II Bestandteil der Knorpelfibrillen im Verhältnis 1:1:8. Es befindet sich vorwiegend im Inneren der Fibrillen, hat einen Einfluß auf deren Bildung und kontrolliert den Durchmesser (Eikenberry and Bruckner, 1999). Die einzelnen Moleküle werden lateral zwischen dem N-terminalen Telopeptid und dem C-terminalen Ende verknüpft (Niyibizi et al., 1989; Thom and Morris, 1991) und sind verantwortlich für die dreidimensionale Organisation der Knorpelfibrillen.

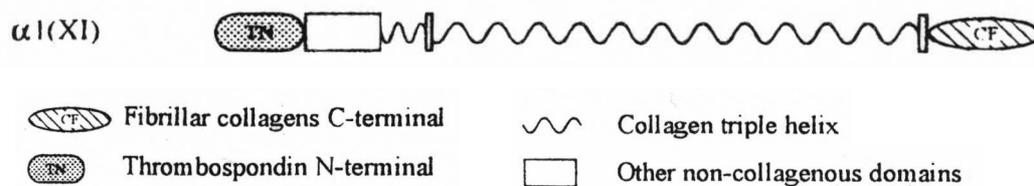


Abb. 10 Kollagen Typ XI,  $\alpha 1$ - Kette

### Zu 3.2.6 Kollagen Typ XII und Typ XIV

Kollagen Typ XII und XIV gehören mit Typ IX, XVI und XIX zu der Gruppe der fibrillenassoziierten Kollagene mit unterbrochener Tripelhelix (FACIT-Kollagene) (Gordon and Olsen, 1990). Mitglieder dieser Gruppe sind große Moleküle, die aus mehreren tripelhelikalen Domänen bestehen, die durch nicht-tripelhelikale Segmente aufgeteilt werden. Sie bilden selbst keine supramolekularen Aggregate, können aber mit Kollagenfibrillen assoziiert sein. Kollagen Typ XII war ursprünglich beschrieben als eine cDNA mit Ähnlichkeiten zu Kollagen Typ IX (Gordon et al., 1987) und Kollagen Typ XIV als kurze tripelhelikale pepsinresistente Fragmente, isoliert aus Rinderhaut (Dublet and van der Rest, 1991).

Beide Kollagene sind Homotrimere, bestehend aus zwei kleinen tripelhelikalen Abschnitten (COL1 und COL2) und drei nicht-tripelhelikalen Domänen (NC1, NC2 und

NC3), die ca. 90 % der Aminosäuresequenz ausmachen. Zwei Regionen von Kollagen Typ XII und XIV haben starke Ähnlichkeit zu Kollagen Typ IX: COL1 und Teile der langen N-terminalen globulären Domäne NC 3.

Kollagen Typ XII wird, ähnlich Typ IX, in zwei Isoformen synthetisiert. Die lange Form (XII A) ergibt ein Polypeptid mit 1164 mehr Aminosäuren (ca. 90 kDa) innerhalb der NC3-Domäne als die kurze Form (Trueb and Trueb, 1992).

Kollagen Typ XII und XIV werden in vielen Bindegeweben gefunden, die ebenfalls Typ I enthalten. Während Kollagen Typ XIV in den meisten embryonalen Geweben von Hühnern ausschließlich in Verbindung mit Kollagen Typ I zu finden ist, zeigt Kollagen Typ XII eine hohe Affinität zu straffem Bindegewebe, wie das in Knochen und Sehnen (Wälchli et al., 1994). Sind beide Kollagentypen im gleichen Gewebe vorhanden, ist auffällig, daß sie oft unterschiedliche Regionen besetzen, z.B. die Haut, in der Typ XII hauptsächlich in der papillären und Typ XIV in der retikulären Dermis lokalisiert ist (Lunstrum et al., 1992).

Kollagen Typ XII und XIV repräsentieren ebenfalls Bestandteile der Knorpelmatrix. Sie können durch indirekte Immunfluoreszenz im fötalen bovinen und humanen Epiphysenknorpel nachgewiesen werden (Dharmavaran et al., 1998). Kollagen Typ XII findet sich meist in der Nähe von venösen Blutgefäßen und an der Gelenkoberfläche, Typ XIV ist mehr in der Knorpelmatrix lokalisiert. Der Knorpel enthält vorwiegend die lange Form (XII A) von Typ XII und an beide Moleküle ist häufig eine GAG-Kette geknüpft (Watt et al., 1992)

Trotz der ähnlichen Struktur der beiden Kollagene ist eine unterschiedliche Funktion möglich. Kollagen Typ XII ist auf der Oberfläche gestreifter Fibrillen in der Haut lokalisiert (Schuppan et al., 1990; Keene et al., 1991a) und es gibt Anzeichen, daß dies auch für Knorpelfibrillen gilt (Watt et al., 1992). Aufgrund dieser Untersuchungen wurde vermutet, daß Kollagen Typ XII und XIV mit der Oberfläche von Kollagen Typ I oder II assoziieren, der experimentelle Nachweis kovalenter Bindungen zwischen Kollagen Typ XII / XIV und Typ I konnte aber nicht erbracht werden. Es konnten Affinitäten zwischen Kollagen Typ XIV und Decorin, Heparin, Perlecan und der tripelhelikalen Domäne von Kollagen Typ VI gezeigt werden. Es bestehen Interaktionen der NC3-Domäne von Kollagen Typ XII mit Fibrillen Kollagen Typ I und Fibroblasten (Nishiyama et al., 1992).

Insgesamt lassen diese Experimente vermuten, daß Kollagen Typ XII und XIV als molekulare Brücken dienen und wichtig sind für die Organisation und Stabilität der EZM (Shaw and Olsen, 1991).

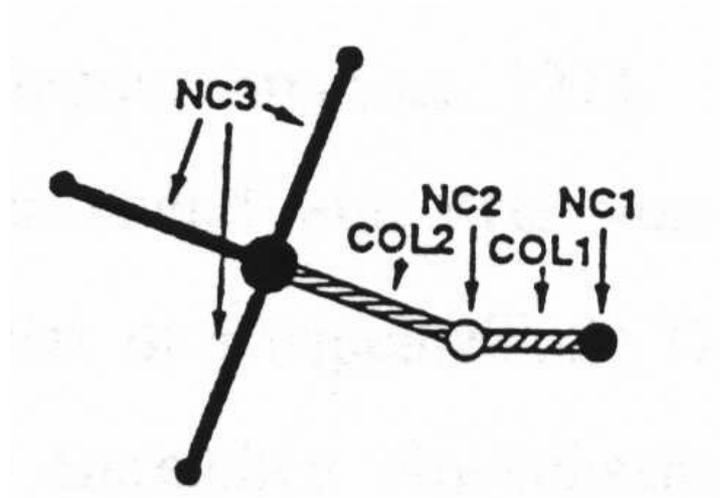


Abb.11 Kollagen Typ XII (Mayne et al., 1986)

### **Zu 3.3 Proteoglykane**

In der extrazellulären Matrix, vor allem in Knorpel, Sehnen, Haut und Gefäßwand sind Kollagen- und Elastinfasern in die gelartige Grundsubstanz eingebettet. Diese besteht im wesentlichen aus Glykosaminoglykanen (GAG), unverzweigten Polysacchariden, die alternierend aus Uronsäure- und Hexosamin-Anteilen aufgebaut sind. Bis auf Hyaluronsäure sind sie sulfatiert und an Proteine gebunden (Proteoglykane) (Wight et al., 1991).

Proteoglykane sind Proteine mit mindestens einer kovalent gebundenen GAG-Seitenkette pro Molekül und zusätzlich besitzen einige N- und O- gebundene Oligosaccharide. Man unterscheidet grundsätzlich vier Typen von GAG: Heparin-/Heparansulfat (HS), Chondroitin-/Dermatansulfat (CS/DS), Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure (HA). Jedes GAG repräsentiert ein Polymer mit sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die bei Heparin, HS und HA aus N-acetyl-Glucosaminen und Uronsäure, bei CS/DS aus N-acetyl-Galaktosaminen und Uronsäure und bei KS aus N-acetyl-Glucosaminen und Galaktose bestehen.

Die Proteoglykane stellen eine der komplexesten und multifunktionalsten Molekülgruppen dar und scheinen von allen Zelltypen synthetisiert werden zu können. Bis jetzt kennen wir mehr als 30 verschiedene Proteoglykane (Iozzo, 1998), die sowohl intrazellulär, an der Zelloberfläche als auch in der Extrazellulärmembran (EZM) auftreten können. Sie haben Anteil an der strukturellen Ordnung und Gewebeorganisation, sind biologische Filter, regulieren direkt das Wachstum und die Differenzierung von Zellen und indirekt über Bindung, Speicherung und Herstellung von Wachstumsfaktoren aus Targetzellen (Iozzo, 1996). Sie beeinflussen zusätzlich die Kollagenfibrillogenese, die Hautstraffheit, das Tumorzellwachstum und die Hornhauttransparenz (Iozzo, 1998).

Die EZM von hyalinem Knorpel beinhaltet hauptsächlich zwei Proteoglykanfamilien, bezeichnet als große aggregierende und als kleine interstitielle Proteoglykane.

Tab.4: Proteoglykane der Knorpelmatrix (Iozzo et al., 1996)

<b>Proteoglycane</b>	<b>Molekulargewicht (Da)</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Charakteristika</b>
Aggrecan	210 000	Knorpel, Gehirn, Blut- gefäße	Gewährleistet Elastizität (hohe fixierte Ladungsdichte)
Versican	270 000 – 290 000	Blutgefäße, Gehirn, Haut, Knorpel	Funktionelle Eigenschaften, wie Aggrecan
Decorin (PG-S2)	36 500	Kollagen-Matrizes, Knochen, Zähne, Mesothelium, floorplate	Bindet an Kollagen I u. II, <i>in vitro</i> Fibrillen- Modulation, auf Fibrillenoberflächen zu finden; bindet an TGF- $\beta$ , Fibronectin, Clq, Thrombospondin und $\beta$ - Amyloid
Biglycan (PG-S1)	38 000	Interstitium Zelloberfläche	Bindet an Kollagen VI; bindet an TGF- $\beta$
Fibromodulin (59-kDa Protein)	41 000	Kollagen-Matrizes	Bindet an Kollagen I u. II, <i>in vitro</i> Fibrillen- Modulation, auf Fibrillenoberflächen zu finden; bindet an TGF- $\beta$
Lumican	38 000	Cornea, Darm, Leber, Muskel, Knorpel	Beeinflusst die Bildung von Kollagen I-Fibrillen
Epiphycan (PG-Lb)	36 000	Epiphysärer Knorpel, Hoden	Enthält 8 Leucin-reiche Konsensussequenzen, trägt möglicherweise CS/DS- Ketten, Funktion unbekannt

### **Zu 3.3.1 Die großen aggregierenden Proteoglykane des Knorpels:**

#### **Aggrecan und Versican**

Das häufigste und größte Proteoglykan in hyalinem Knorpel ist Aggrecan. Es besitzt ein Proteincore (ca. 210 kDa), das in mehrere funktionelle Domänen unterteilt ist (Heinegard and Oldberg, 1993). In der N-terminalen Region befinden sich zwei homologe globuläre Domänen (G1 und G2) (Paulsson et al., 1987), die durch ein 21 nm langes Peptid verbunden werden. Die G1-Domäne besteht aus einem einzelnen und zwei gleichen Schleifenmotiven und ist durch Wechselwirkung mit dem Link Protein für die Bindung an Hyaluronat verantwortlich (Heinegard and Hascall, 1974; Mörgelin et al., 1988; Fosang and Hardingham, 1989). Die Funktion der G2-Domäne ist bis jetzt unbekannt. An die G2-Domäne schließt sich ein ausgedehnter Teil des Proteincores an, an den die GAG-Seitenketten kovalent gebunden sind. Im ersten Abschnitt, der aus einer Wiederholung eines hoch konservierten Hexapeptides besteht, sind ungefähr 30 KS-Ketten angelagert, im nächsten und größten Bereich findet man ca. 100 CS-Seitenketten (Heinegard and Axelsson, 1977; Doege et al., 1987). Diese Hauptdomäne grenzt an die dritte globuläre G3-Domäne am C-terminalen Ende des Moleküls (Paulsson et al., 1987). G3 ist strukturell von G1 und G2 verschieden. Sie besteht aus einer variablen Anzahl von Bereichen, einschließlich zweier alternativ gespleißter EGF-ähnlichen (Epidermal Growth Factor) Domänen (Fülöp et al., 1993), einer ebenfalls alternativ gespleißten CRP-ähnlichen (Complement-Regulatory Protein) Domäne (Doege et al., 1991) und einer Lectin-ähnlichen Domäne. Durch Experimente mit der rekombinanten Form der Lectin-ähnlichen Domäne konnte eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bindung an verschiedene Kohlenhydrate (Halberg et al. 1988; Saleque et al., 1993), u.a. Galactose und Fucose, gezeigt werden. Es wird diskutiert, ob die Liganden dieser Lectin-Struktur evtl. die Kohlenhydrat-Seitenketten einiger Kollagene sein könnten. Die genaue Funktion der G3-Domäne ist aber noch nicht geklärt. Bekannt ist, daß sie, wie auch ein kurzer Teil des Proteincores, durch proteolytische Modifikation nach der Sekretion in adultem Knorpel abgespalten werden kann (Paulsson et al., 1987; Flannery et al., 1992). In reifem Knorpel besitzen nur 10 - 50 % der Aggrecan-Moleküle eine vollständige G3-Domäne (Paulsson et al., 1987).

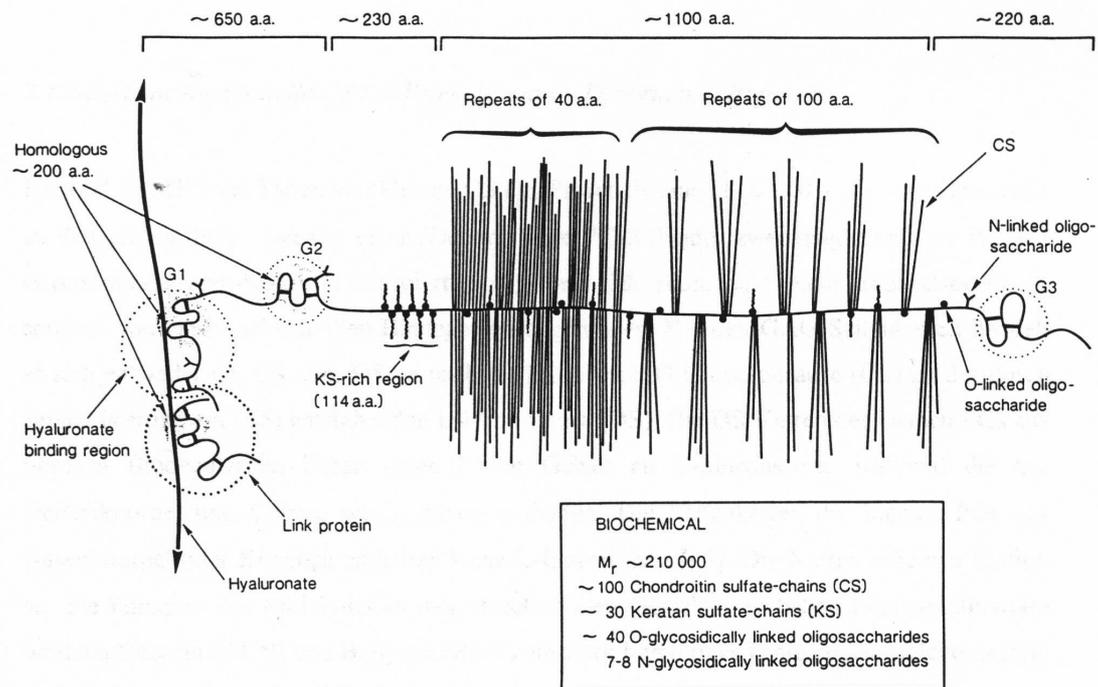


Abb. 12 Schematische Illustration von Aggrecan (Heinegard and Oldberg, 1993)

Versican, das große Proteoglykan von Fibroblasten, wird von Chondrozyten in Gelenkknorpel jeden Alters synthetisiert, aber in weitaus kleineren Mengen verglichen mit Aggrecan (Grover and Roughley, 1993). Die Struktur ist ähnlich der des Aggrecans mit drei Ausnahmen: 1. Versican besitzt keine G2-Domäne am N-terminalen Ende, 2. die GAG-Bindungsregion besitzt eine dreifach kleinere Anzahl an Ser-Gly-Sequenzen, die die Bindungsstellen für die GAG-Ketten sind und 3. die zwei EGF-ähnlichen Domänen in dem C-terminalen Ende von Versican scheinen nicht alternativ gespleißt zu sein.

### Zu 3.3.2 Die kleinen interstitiellen CS/DS-Proteoglykane:

#### Decorin und Biglycan

Knorpel enthält zwei Typen von kleinen CS/DS-Proteoglykanen ( $M_r$  ca  $10^5$ ), die – im Gegensatz zu den großen Proteoglykanen – mit nur einer (Decorin oder PG-S2) oder zwei (Biglycan oder PG-S1) GAG-Ketten substituiert sind. Diese Moleküle sind nicht knorpelspezifisch, sondern werden nahezu in allen Bindegeweben gefunden. Bei den GAG-Seitenketten handelt es sich entweder um CS (D-Glucuronsäure) oder DS (L-Iduronsäure). Die DS-Ketten der kleinen Proteoglykane aus fibrösen Bindegeweben haben einen hohen Gehalt an L-Iduronsäure, während die aus Gelenkknorpel und Cornea wenig davon enthalten. Die Ketten scheinen Einfluß auf die Funktion des Moleküles in den verschiedenen Geweben zu haben (Fransson et al., 1982). Interessanterweise besitzen Decorin und Biglycan ein stark homologes Proteincore welches sich in drei Domänen unterteilen läßt (Fisher et al., 1989). Die zentrale Domäne beider Proteine besteht aus 10 konservierten Leucin-reichen Sequenzmotiven (LRRs) von je 25 Aminosäureresten. Die GAG-Ketten sind nahe dem N-Terminus O-glycosidisch an eins bzw. zwei Ser-Gly-Motive gebunden (Heinegard et al., 1981; Krusius et al., 1986). In der Nähe des aminoterminalen Endes sind vier Cysteinreste konserviert, von denen zwei eine Disulfidbrücke bilden, wodurch es zu einer Loop-Struktur kommt. Eine entsprechende Schleife entsteht auch durch die Verknüpfung der beiden konservierten Cysteine nahe dem C-Terminus (Neame et al., 1989).

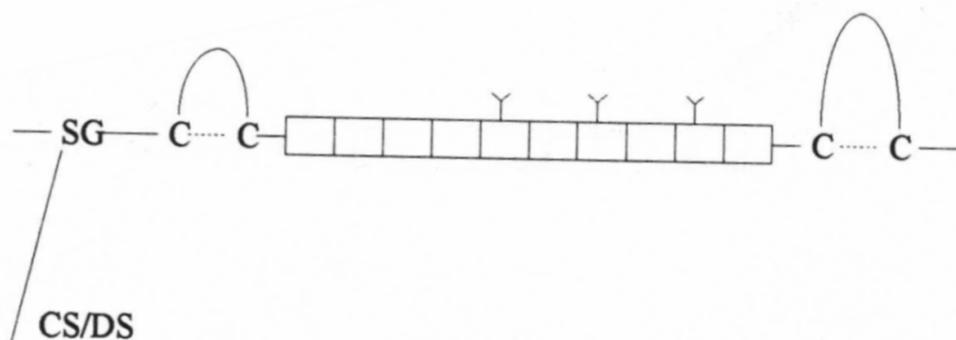


Abb. 13 Decorin

Die funktionelle Rolle von Decorin ergibt sich aus seiner Fähigkeit mit Kollagenen in Wechselwirkung zu treten. Es konnte gezeigt werden, daß es *in vitro* an lösliches Kollagen Typ I und II bindet (Hedbom and Heinegard, 1989), daß es *in vitro* die Fibrillenformation verzögert (Vogel et al., 1984) und simultan den Fibrillendurchmesser vermindert (Vogel and Trotter, 1987).

In allen Fällen sind die Interaktionen von Decorin und Kollagen Typ I/II abhängig von der tripelhelikalen Struktur der Kollagenmoleküle. Die präzisen Bindungsstellen sind noch unklar, aber es wird angenommen, daß die Affinität zu Kollagen Typ I durch die Struktur der Leucin-reichen Bereiche 4 und 5 vermittelt wird (Svensson et al., 1995). Weitere Experimente zeigten eine Bindung der GAG-Seitenketten an lösliches Kollagen, was u.a. zu der Vermutung führte, daß Decorin benachbarte Fibrillen miteinander zu verbinden vermag (Hedbom and Heinegard, 1993).

Durch viele *in vitro* Studien konnte Decorin auf der Oberfläche von Fibrillen in vielen verschiedenen Bindegeweben lokalisiert werden, z.B. in der Plazenta (Ruoshlati, 1988a), in Sehnen (Pringle and Dodd, 1990), in Haut (Fleischmajer et al., 1991) und Gelenkknorpel (Miosge et al., 1994).

Bei Decorin handelt es sich um ein multifunktionales Proteoglykan, da es mit zahlreichen fibrillären und nicht-fibrillären Matrix-Molekülen wechselwirken kann, z.B. mit Kollagen Typ VI (Bidanset et al., 1992), Fibronectin (Schmidt et al., 1991), Thrombospondin (Winnemöller et al., 1992), C1q (Krumdieck et al., 1992) und mit Wachstumsfaktoren, z.B. TGF- $\beta$ . Die Fähigkeit Wachstumsfaktoren binden zu können, spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, und hat Anteil bei der Inaktivierung von TGF- $\beta$  (Yamaguchi et al., 1990).

Im Gegensatz zu Decorin zeigt Biglycan keine hohe Tendenz zur Bindung von Kollagen Typ I (Brown and Vogel, 1989), wohingegen eine selektive Bindung an Kollagen Typ VI beobachtet werden konnte (Hedbom, 1993). Da beide Moleküle vorzugsweise in der perizellulären Matrix von Knorpel gefunden werden (Keene et al., 1988; Poole et al., 1988a; Bianco et al., 1990), ergibt sich die Frage, inwieweit Biglycan am Aufbau des Kollagen Typ VI-Netzwerkes beteiligt sein könnte.

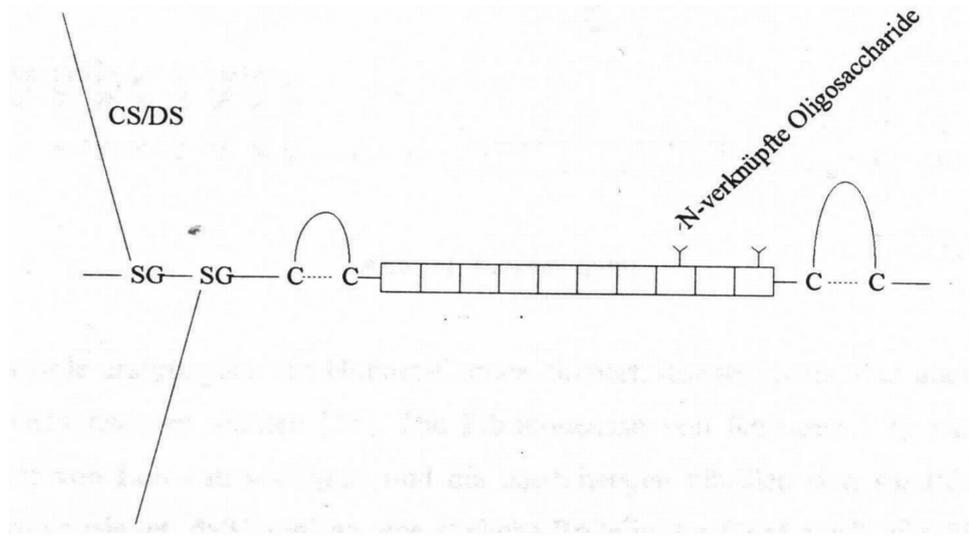


Abb. 14 Biglycan

### Zu 3.3.3 Die kleinen interstitiellen KS-Proteoglykane:

#### Fibromodulin und Lumikan

Die Proteoglykane Fibromodulin und Lumikan enthalten die gleichen sich wiederholenden, homologen Sequenzen und ebenfalls die konservierten Disulfidbrücken, wie Decorin und Biglycan. Diese Matrixproteine gehören zu einer Gen-Familie von Proteinen mit Leucin- reichen Wiederholungssequenzen (SLRPs small leucine-rich proteoglycans) (Iozzo, 1999). Fibromodulin und Lumikan unterscheiden sich von Decorin und Biglycan auf zweierlei Weise. Anstatt der Ser-Gly-Sequenzen im N-terminalen Bereich, die als Bindungsstellen für die GAG-Ketten dienen, besitzen Fibromodulin und Lumikan eine Anzahl sulfatierter Tyrosinreste (Oldberg et al., 1989). Außerdem besitzen sie KS-Seitenketten, die N-glycosidisch an Asparaginreste in den zentralen LRRs gebunden sind (Plaas et al., 1990).

Fibromodulin wurde ursprünglich im Gelenkknorpel gefunden, findet sich aber in verschiedenen Geweben einschließlich Sehnen und Aorta (Heinegard et al., 1986). Es zeigt eine hohe Bindungsaffinität sowohl zu fibrillärem Kollagen Typ I und II, als auch

zu Kollagen-Monomeren und hat außerdem inhibitorischen Einfluß auf die Fibrillogenese (Hedbom and Heinegard, 1989; 1993).

Fibromodulin ist durch Immunogold-Anfärbung im Rindergelenksknorpel fibrillenassoziiert lokalisiert worden. So könnte Fibromodulin an der Regulation des Fibrillendurchmessers mitwirken und/oder die Fibrillenoberfläche mit Fähigkeiten ausstatten, die für die korrekte Lage und Organisation der Fibrillen wichtig sind (Hedlund et al., 1994).

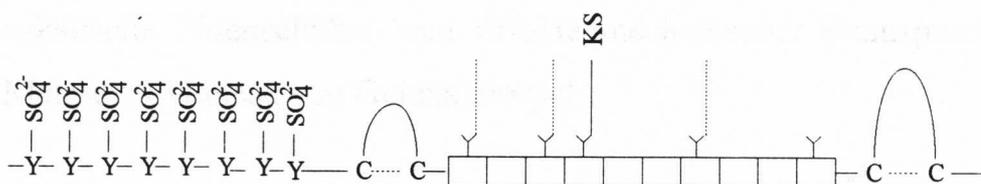


Abb.15 Fibromodulin

Lumikan wurde ursprünglich aus Hühner-Cornea kloniert, konnte später aber auch in anderen Bindegeweben nachgewiesen werden (Blochberger et al., 1992) einschließlich Gelenkknorpel (Grover et al., 1995). Die Fibrillogenese von Kollagen Typ I *in vitro* wird bei Anwesenheit von Lumikan verzögert und die entstehenden Fibrillen sind signifikant dünner. Daraus wird abgeleitet, daß Lumikan eine ähnliche Rolle in der EZM wie Fibromodulin spielt (Rada et al., 1993)

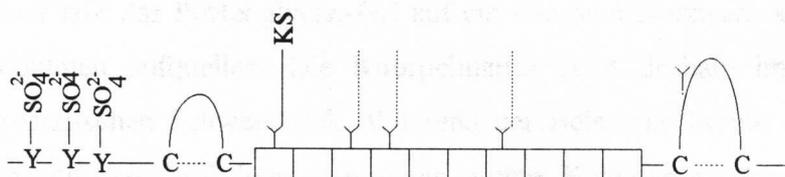


Abb. 16 Lumikan

### Zu 3.4 Die nicht kollagenen Proteine und Glykoproteine der Knorpelmatrix

Neben den Kollagenen und Proteoglykanen enthält der hyaline Knorpel eine Reihe anderer Proteine und Glykoproteine von denen erst wenige bekannt sind, deren Zahl aber ständig zunimmt. Die heterogene Verteilung dieser Moleküle in den verschiedenen Knorpelarten impliziert, daß sie durch komplexe Wechselwirkungen mit anderen Matrix-Molekülen und den Zellen in die Regulation und die Organisation der EZM eingreifen und daß sie wichtige Rollen bei der Interaktion zwischen Chondrozyten und Matrix-Makromolekülen spielen (Heinegard and Oldberg, 1993).

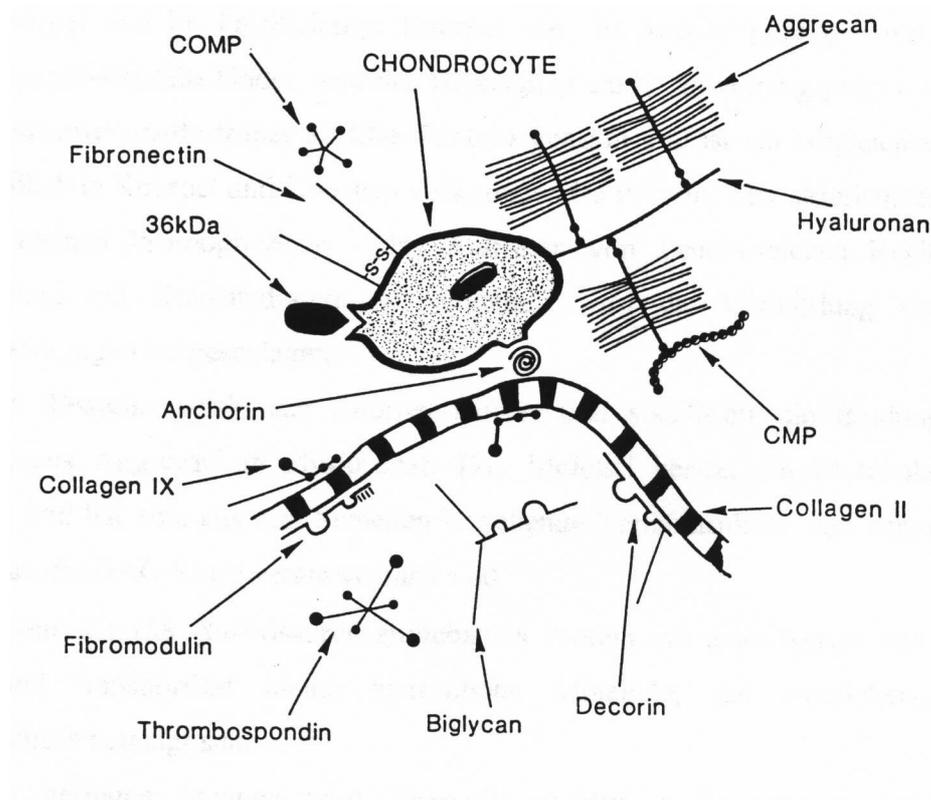


Abb.17 Schematische Darstellung der Komponenten der Knorpelmatrix und ihrer Wechselwirkungen untereinander (Heinegard and Oldberg, 1993)

Das **Cartilage Matrix Protein (CMP)** Matrilin 1 ist ein nicht-kollagener Hauptbestandteil in vielen Knorpeltypen (Paulsson, 1982), findet sich aber auch in Sehnen (Hauser et al., 1995). Es ist ein 148 kDa Protein bestehend aus drei identischen Polypeptidketten von je etwa 50 kDa, die sich im Elektronenmikroskop als ein Trimer aus drei ellipsoidförmigen Untereinheiten darstellen, die an einem Ende miteinander verknüpft sind (Argraves et al., 1987; Hauser et al., 1994). CMP enthält zwei identische Sequenzen (von Willebrand Faktor A-Domänen), die durch eine EGF-ähnliche Domäne getrennt werden. CMP zeigt starke Bindungen zu Proteoglykanen, vor allem mit dem Coreprotein von Aggrecan (Paulsson and Heinegard, 1979). Ebenso spielt es eine Rolle bei der Matrixorganisation (Neame et al., 1999).

Bei dem **Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)** handelt es sich um ein Pentamer aus fünf identischen Untereinheiten zu je ca. 100 kDa, die durch Disulfidbrücken an ihren N-terminalen Enden verbunden sind (Oldberg et al., 1992; Mörgelin et al., 1992). Zuerst wurde COMP als knorpelspezifisch betrachtet, aber es konnte neuerdings auch in Sehnen nachgewiesen werden (DiCesare et al., 1994b). Im Gelenkknorpel ist es hauptsächlich in der Umgebung von Chondrozyten in der territorialen Matrix lokalisiert (Hedbom et al., 1992). Da man eine erhöhte COMP-Konzentration in heilendem Gelenkknorpel nachweisen konnte, geht man von einer Beteiligung am Matrixaufbau aus (Mansson et al., 1995).

Das **Link Protein** wurde ursprünglich aus Knorpel isoliert, als eine von drei Komponenten, die Proteoglykane aufbauen. Im Gewebe zeigten sich diese Proteine als heterogene Gruppe mit strukturellen und immunochemischen verwandten Komponenten (Heinegard and Hascall, 1974; Keiser et al., 1972). Alternatives Spleißing und unterschiedliche Glykosylierung tragen zu dieser Heterogenität bei (Rhodes et al., 1988; Bonnet et al., 1978). Das Molekül besitzt ein Molekulargewicht von 36.8 kDa und hat eine aus drei Schleifen bestehende Tertiärstruktur und ist die Hyaluronat-Bindungsstelle G1 von Aggrecan (Neame et al., 1986).

**PRELP (proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein)** ist ein 55 kDa großes Matrixprotein (Grover et al., 1996), Bestandteil in vielen Knorpeltypen sowie in nicht-knorpeligen Geweben, z.B. Aorta, Sklera, Cornea, Niere, Leber, Haut und Sehne (Heinegard et al., 1986). Die neuesten Erkenntnisse über seine Primärstruktur zeigen,

daß PRELP zu der Familie der LRR-Proteine gehört, obwohl es bedeutend unterschiedlich in der Ausdehnung seiner N-terminalen Domäne ist (Bengtsson et al., 1995). PRELP zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu Fibromodulin (36 %) und Lumikan (33 %) und hat vier potentielle N-gebundene Glykosylierungsstellen. Zur Zeit ist es noch immer unklar, warum PRELP im Knorpel stark vertreten ist und ob es ähnliche funktionelle Aufgaben hat, wie sie für die anderen Mitglieder vermutet werden (Grover et al., 1996).

**Fibronectin, Thrombospondin und Chondroadherin** sind adhäsive Glykoproteine.

**Fibronectin** ist das erste und am besten untersuchte Zell-bindende Protein, das isoliert wurde (von der Mark and Goodman, 1993). Es findet sich in Körperflüssigkeiten und als lösliches Molekül eingebettet in die EZM vieler verschiedener Bindegewebe und Basalmembranen (Mosher, 1990; Hynes, 1990). Die Anwesenheit von Fibronectin in der EZM spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese, bei Wundheilungsprozessen und maligner Zelltransformation (Peters and Mosher, 1994). Fibronectin ist ein über Disulfidbrücken gebundenes Dimer, bestehend aus zwei ähnlichen Polypeptiden (220-250 kDa), die aufgrund alternativen Spleißings gewebespezifisch variieren können. Fibronectin hat sowohl eine hohe Affinität zu Heparin, als auch zu Kollagenen, Fibrin und verschiedenen Proteoglykanen (Ruoslahti, 1988b; Yamada, 1991). Bemerkenswert ist die stark erhöhte Konzentration in osteoarthritischen Geweben. Man vermutet, daß Fragmente von Fibronectin die Zytokin- und Matrixmetalloproteinaseexpression induzieren, die charakteristisch für die Osteoarthritis sind (Homandberg 2001).

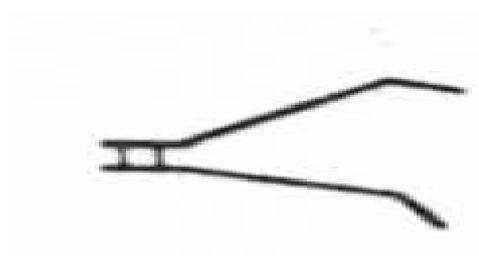


Abb. 18      Fibronectin-Molekül

Analog zu Fibronectin ist **Thrombospondin (TSP-1)** ein Protein mit vielen Domänen das von verschiedenen Zellen, einschließlich denen des Bindegewebes, synthetisiert

wird (Frazier, 1987). Das Molekül besteht aus drei identischen Polypeptidketten (Molekulargewicht ca. 130 kDa), die über Disulfidbrücken an ihren N-terminalen Enden ein Homotrimer bilden. Thrombospondin beinhaltet unterschiedliche Bindungsdomänen, wie z.B. eine Zell-bindende Domäne, eine GAG-bindende Region und einen spezifischen Bereich der Moleküle wie Fibronectin, Fibrinogen, Plasminogen, Laminin, HS-Proteoglykane, Heparin und Kollagen Typ V bindet (Galvin et al., 1987). Man vermutet, daß Thrombospondin eine entscheidende Rolle bei der Heilung fibröser Gewebe spielt. Durch Immunhistochemie konnte Thrombospondin in Gelenkknorpel nachgewiesen und als TSP-1 identifiziert werden (DiCesare et al., 1994a). Die Thrombospondine bilden eine homologe Familie bestehend aus TSP-2 (Laherty et al., 1992), TSP-3 (Vos et al., 1992), TSP-4 (Lawler et al., 1993) und COMP bzw. TSP-5 (Oldberg, 1992).

**Chondroadherin** wurde früher 36 kDa-Protein genannt und ist ein häufiges, ausschließlich im Knorpel und Knochen vorkommendes Protein (Larsson et al., 1991). Charakteristisch ist – wie auch bei den kleinen Proteoglykanen – das Auftreten von Leucin-reichen Regionen und die Verknüpfung mit Kohlehydraten (Neame et al., 1994). Man vermutet eine Funktion bei der Vermittlung von Zell-Matrix Wechselwirkungen und Zellverbindungen. Die starke Expression von Chondroadherin in Wachstumsfugen und anderen dynamischen Regionen im Knorpel läßt eine wichtige Rolle beim Chondrozytenwachstum und –proliferation vermuten (Shen et al., 1998).

**Annexin V** ( ursprüngliche Bezeichnung: Anchorin CII ) ist ein Protein bestehend aus 329 AS (Pfäffle et al., 1988) und ist assoziiert mit den Membranen von Chondrocyten, Osteoblasten und vielen anderen Zellen. Als ein Hauptbestandteil von Knorpelmatrixvesikeln und der EZM von kalzifizierendem Knorpel in der fötalen humanen Wachstumsfuge konnte gezeigt werden, daß Annexin V natives Kollagen Typ X bindet und Bindungen zwischen Kollagen Typ X und den Chondrocyten vermittelt (Kirsch et al., 1992).

**Chondrocalcin** repräsentiert die carboxy-terminale Domäne der  $\alpha 1$  Kette von Kollagen Typ II (van der Rest et al., 1986). Es besteht aus drei Einheiten mit einem Gewicht von

je 35 kDa und kommt hauptsächlich in Gelenk- und im kalzifizierten Knorpel vor. Es konnte gezeigt werden, daß es an Hydroxylapatitkristalle bindet, was eine Beteiligung am Kalzifizierungsprozeß vermuten läßt (Hinek et al., 1987).

**CH21** ist ein aus 158 AS aufgebautes Protein mit einer Masse von ca. 18 kDa. Es bindet und transportiert kleine hydrophobe Moleküle, die möglicherweise an der Morphogenese beteiligt sind (Descalzi-Cancedda et al., 1989).

**Chondromodulin** ist ein knorpelspezifischer Größenwachstumsfaktor, wird in der avaskulären Knorpelzone bei der Transformation zu Knochen exprimiert und ist nicht im kalzifizierenden Knorpel vorhanden. Chondromodulin inhibiert die DNA-Synthese und die Proliferation von vaskulären endothelialen Zellen. Es wird vermutet, daß Chondromodulin als endothelialer Zellwachstumsinhibitor eine regulative Aufgabe bei der Gefäßeinsprossung während der enchondralen Ossifikation hat (Hiraki et al., 1997).

## II. Fragestellung

### zu 1. Die unterschiedliche Verteilung von Decorin und Kollagen Typ IX entlang Gelenkknorpelfibrillen

Viele Untersuchungen von Bindegewebe sind auf die Ultrastruktur von Fibrillen fokussiert. Es wurde bewiesen, daß Fibrillen heterotypische Polymere sind, die aus mehreren verschiedenen Kollagentypen bestehen (Birk et al., 1988; Mendler et al., 1989). Die Interaktionen unterschiedlicher Kollagentypen während der Fibrillogenese haben Anteil bei der Regulation der Fibrillenarchitektur und an der Organisation sowie dem Aufbau der Fibrillenoberfläche. Die Bestandteile der Fibrillenoberfläche spielen eine wichtige Rolle bei den Wechselwirkungen mit anderen Matrixmolekülen und Nachbarfibrillen. Knorpelfibrillen beinhalten Kollagen Typ II als Hauptbestandteil, aber zusätzlich vorhandenen anderen Kollagen-Typen und nicht-kollagenen Glykoproteinen werden wichtige Funktionen bei den unterschiedlichen Fibrilleneigenschaften zugesprochen (Hagg et al., 1998).

Die Orientierung von Kollagen Typ IX Molekülen ist antiparallel zu Kollagen Typ II Fibrillen (Wu et al., 1992), wobei die COL3- und NC4-Domänen in den extrafibrillären Raum abstehen (Vaughan et al., 1988). Experimente mit löslichen Kollagenen zeigten, daß Kollagen Typ II, IX und XI im Verhältnis 8:1:1 Moleküle bilden, die den dünnen Fibrillen (ca. 20 nm) im unreifen Knorpel ähneln (Eikenberry et al., 1992).

Im adulten Rindergelenkknorpel, der wenig dünne Fibrillen enthält, repräsentiert Kollagen Typ IX nur 1-2 % des gesamten Kollagenanteils (Eyre et al., 1992).

Die Funktionen von Kollagen Typ IX sind: 1. die Anwesenheit auf der Fibrillenoberfläche dient einem kontrollierten Fibrillenwachstum und verhindert die Fusion von Fibrillen. 2. Kollagen Typ IX ist beteiligt an der Stabilisierung des Fibrillennetzwerkes durch direkte Interaktionen mit extrafibrillären Proteoglykanen durch die NC4-Domäne und/oder durch die Verbindung verschiedener Fibrillen durch das Molekül selbst.

Ein weiterer Bestandteil der Fibrillenoberfläche ist das kleine Leucin-reiche Proteoglykan Decorin, das durch immunelektronische Mikroskopie in der direkten Nähe von Kollagenfibrillen in verschiedenen Bindegeweben nachgewiesen werden konnte

(Kresse et al., 1993). Decorin scheint hauptsächlich in interterritorialen Abschnitten des Gelenkknorpels aufzutreten (Poole et al., 1986). Es wird vermutet, daß die Bindung einer kollagenen tripelhelikalen Domäne zu Decorin eine wichtige Rolle in der Fibrillenmorphologie und –organisation spielt, wobei Interaktionen zwischen Fibrillen und EZM unterstützt werden (Weber et al., 1996).

In einer Studie konnte die unterschiedliche Verteilung von Decorin und Kollagen Typ IX entlang Fibrillen von Rindergelenkknorpel gezeigt werden. Decorin war vorzugsweise an der Oberfläche dicker Fibrillenpopulationen an spezifischen Bindungsstellen in Abhängigkeit von dem Decorin-Coreprotein in adultem Gelenkknorpel lokalisiert.

Kollagen Typ IX hingegen dominierte bei den Populationen der dünnsten Fibrillen und fand sich selten an der Oberfläche großer Fibrillen (Hagg et al., 1998).

Einige Experimente konnten das gemeinsame Auftreten von Decorin und Kollagen Typ IX in Fibrillen mit unterschiedlichem Durchmesser zeigen, aber zumeist war eine Komponente im adulten Knorpel stark vertreten und die andere fehlte (Hagg et al., 1998). Im fötalen epiphysären Knorpel waren Kollagen Typ IX und Decorin häufig an Fibrillen von mittlerem und großem Durchmesser lokalisiert. Somit wurde deutlich, daß Kollagen Typ IX nicht ausschließlich an dünne Fibrillen bindet (Hagg et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Gelenkknorpelfibrillen eine große biochemische Heterogenität besitzen. Um weitere Aussagen über die Funktion von Kollagen Typ IX und Decorin beim Knorpelaufbau machen zu können, wurde ein funktioneller Knock-out von Kollagen Typ IX (Fässler et al., 1994) und Decorin (Danielson et al., 1997) untersucht.

## zu 2. Die Kollagen Typ IX Knockout-Maus

Es wird vermutet, daß Kollagen Typ IX eine wichtige Rolle bei den Interaktionen der Fibrillen untereinander und/oder mit anderen Komponenten der EZM spielt. Aufgrund dieser Hypothese wurde eine Maus gezüchtet, der beide Isoformen der  $\alpha 1$  (IX)-Kette fehlen (Fässler et al., 1994). Es scheint, daß in Kollagen Typ IX  $\alpha 1$ -Null Mäusen kein Col IX- Protein mehr nachgewiesen werden kann, obwohl die  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  (IX) Ketten transkribiert werden können (Hagg et al., 1997). Die Kollagen Typ IX Null-Maus hat

einen normalen Phänotyp und zeigt keine erkennenswerten Skelettveränderungen zum Zeitpunkt der Geburt. Eventuell treten mit zunehmendem Lebensalter vermehrt arthritische Erkrankungen / Arthrose auf (Fässler et al., 1994). Überraschenderweise ist die Fibrillenmorphologie von Embryonen- und adulten-Mäusen von Kollagen Typ IX-Null und Wildtyp-Mäusen gleich. Somit wird deutlich, daß Kollagen Typ IX nicht essentiell wichtig für den Knorpelaufbau ist, da die Fibrillogenese im Knorpel *in vivo* auch bei Abwesenheit von Kollagen Typ IX ohne sichtbare Veränderungen abläuft (Hagg et al., 1997).

### zu 3. Die Decorin Knockout-Maus

Die funktionelle Rolle von Decorin im Knorpel ergibt sich aus seiner Fähigkeit mit Kollagenen in Wechselwirkung zu treten. Es zeigte sich, daß Decorin unter anderem eine wichtige Rolle bei der Fibrillenorganisation und auch der Stabilität von Knorpelgewebe (Iozzo, 1999) durch Interaktionen zwischen Fibrillen und EZM spielt.

Die Decorin Null-Mäuse sind lebens- und vermehrungsfähig. Sie besitzen eine dünne und fragile Haut sowie Sehnen, deren Belastbarkeit reduziert ist. Detaillierte Analysen zeigten eine abnormale Kollagenfibrillenmorphologie in Haut und Sehnen. Diese Ergebnisse bestätigen, daß bei Abwesenheit von Decorin die Fibrillenmorphologie und die –organisation gestört ist (Danielson et al., 1997).

### zu 4. Hypothetische Veränderungen der Matrixbiosynthese und der Zusammensetzung von Gelenkknorpel bei gleichzeitigem funktionellen Knockout von Kollagen Typ IX und Decorin

Um den Mechanismus der Differenzierung und des Aufbaus von Gelenk- und epiphysärem Knorpel zu verstehen, sind Informationen über die Zusammensetzung der Knorpelmatrix wichtig. In unserer Studie haben wir zuerst Decorin- und Kollagen Typ IX Null-Mäuse gezüchtet und anschließend diesen Doppel-Knockout bei neugeborenen Embryonen untersucht, um die Rolle dieser Fibrillenoberflächenbestandteile im Knorpel besser erklären und sie genauer klassifizieren zu können. Diskutiert wurde, ob bei

Abwesenheit von Decorin und Kollagen Typ IX funktionstüchtiger Knorpel gebildet werden kann sowie ob die Skelettogenese normal abläuft. Wir wollten wissen, ob Decorin und Kollagen Typ IX redundant sind und keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Fibrillogenese und dem Knorpelaufbau spielen. Gibt es bei einem Doppel-Knockout einen bestimmten Phänotyp? Sind diese Mäuse überhaupt lebensfähig und besitzen sie besondere Merkmale? Wir vermuteten, daß die Mäuse eine gestörte Fibrillogenese sowie eine gestörte Knorpelfibrillenorganisation und –morphologie besitzen. Sie könnten auch größere Hautschäden aufweisen.

Falls diese Doppel-Knockout-Mäuse lebensfähig sind, gibt es vielleicht andere Knorpelkomponenten, zum Beispiel Fibromodulin, Biglykan, Lumikan, Kollagen Typ XII und Typ XIV, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mehr oder weniger stark exprimiert werden und damit vielleicht eine Ersatzfunktion bei Abwesenheit von Decorin und Kollagen Typ IX übernehmen?

### III. Material und Methoden

#### zu 1. Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwanzenden

Man gibt 0,5 ml Lysispuffer und ein 1 cm Stück eines Mäuseschwanzes zusammen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß und läßt es über Nacht bei 55° C schütteln.

Das Gemisch wird am nächsten Tag gevortext und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (14.000 U/min.). Der Überstand wird abgezogen, das Pellet mit 200 µl Lysispuffer erneut gevortext und 10 Minuten bei RT in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert (14.000 U/min). Diese Lösung (ca. 650 µl) wird zusammen mit 600 µl Phenol 1 Stunde bei RT gedreht. Danach wird 1 Minute zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Phenol mit 150 µl TE-Puffer versetzt, 15 Sekunden gevortext, dann erneut 1 Minute zentrifugiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden mit 800 µl Phenol 1 Stunde bei RT gedreht. Anschließend wird 1 Minute zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Phenol mit 150 µl TE versetzt, 15 Sekunden gevortext und 1 Minute zentrifugiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden mit 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 1 Minute geschüttelt, 1 Minute zentrifugiert und die wäßrige Phase abgenommen. Diese wird erneut mit 800 µl Chloroform / Isoamylalkohol 1 Minute geschüttelt, 1 Minute zentrifugiert und die wäßrige Phase in 1 ml Isopropanol pipettiert. Das Eppendorfgefäß wird geschüttelt und mindestens 1 Stunde bei RT stehen gelassen, die DNA fällt als weiße Fäden aus. Danach wird das Isopropanol 30 Minuten bei 10°C zentrifugiert (14.000 U/min), der Überstand abpipettiert und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird zuletzt in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 37°C gelöst.

Nach OD 260 –Messergebnissen beträgt die Ausbeute ca. 150 µg genomischer DNA pro Mäuseschwanz.

Lysispuffer: 100 m M Tris / HCL pH 8.5  
5 mM EDTA  
0,2 % SDS  
200 mM Na Cl  
100 µg/ml Proteinase K (2,5 µl / 0,5ml)  
(von Böhringer Mannheim)

TE-Puffer: 10 mM Tris / HCL pH 7.6  
 1 mM EDTA pH 8.0

zu 2. PCR zur Genotypisierung der Decorin- Mäuse modifiziert  
 nach R.V. Iozzo

**PCR-Ansatz (Sigma)**

2 µg DNA  
 10 µl 10 x PCR II Puffer (Sigma)  
 8 µl Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM)  
 3 µl Dec 5' (300 ng)  
 3 µl Dec 3' (300 ng)  
 3 µl PGK-1 (300 ng)  
 2 µl jedes dNTP (10 mM)  
 mit H<sub>2</sub>O HPLC auf 97,5 µl auffüllen

Hot Start bei 95°C für 5 Minuten, dann wird in jedes Tube 2,5 µl (1U/µl) Taq Polymerase (Sigma) hinzugegeben und gut durchmischt. Das Endvolumen in jedem Tube beträgt 100 µl.

Die PCR-Konditionen betragen 35 Zyklen mit jeweils 95°C für 1 Minute, 57°C für 20 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden.

Primersequenzen

T<sub>m</sub>

PGK 1	5'-TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG G-3'	57° C
Dec 5'	5'-CCT TCT GGC ACA AGT CTC TTG G-3'	62° C
Dec 3'	5'-TCG AAG ATG ACA CTG GCA TCG G-3'	62° C

### zu 3.1 Southern Blot Analyse zur Collagen $\alpha 1$ IX - Genotypisierung

Der Probenansatz für den genomischen DNA-Verdau zur Southern Blot-Analyse beinhaltet 20  $\mu\text{g}$  DNA je Probe und wird mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 21,5  $\mu\text{l}$  Volumen aufgefüllt. Dazu kommen 1  $\mu\text{l}$  EcoR I [60 U/ $\mu\text{l}$  NE Biolabs) und 2,5  $\mu\text{l}$  10 x Puffer H.

Die Probe von 25  $\mu\text{l}$  wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das 0,8%ige Southern-Trisacetat (TAE)- Gel wird über Nacht bei 45 Volt gefahren und am nächsten Tag für 10 Minuten in 0,25 M HCl geschwenkt, 30 bis 45 Minuten in 1.5 M NaCl / 0,5 M NaOH denaturiert und zum Schluß zweimal 15 Minuten in 1.5 M NaCl / 1,0 M Tris / HCl pH 8,0 gewaschen.

Der Southern Blot Aufbau zum Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylon-Membran (Amersham): Eine Kunststoffschale wird mit 10 x SSC-Puffer gefüllt und eine sterilisierte Glasplatte darübergelegt. Auf die Glasplatte legt man ein mit 10 x SSC-Puffer angefeuchtetes Filterpapier (Whatman 3 MM) luftblasenfrei, so daß beide Enden in dem Transferpuffer liegen. Das Gel wird mit der Unterseite nach oben auf das Filterpapier gelegt und mit Parafilm abgedichtet, zwecks Vermeidung von unerwünschtem Randtransfer und Pufferaustrocknung. Auf das Gel wird luftblasenfrei eine passende Nylonmembran placiert, darüber erneut Filterpapier und ein ca. 6 cm hoher Fließpapierstapel, der mit ca. 500 g Gewicht gleichmäßig beschwert wird. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt über Nacht im Kühlraum.

Nach dem Trocknen der Membran werden beide Seiten im UV-Stratalinker behandelt, um die DNA auf dem Filter zu fixieren.

Die Prähybridisierung der Membran erfolgt bei 65°C im Roler für ca. 2 Stunden.

Die Prähybridisierungslösung beinhaltet 20 x SSC, 50 x Denhardt, 20 % SDS und  $\text{H}_2\text{O}$ .

Hybridisierung:

50 ng der jeweiligen Sonde werden mit DE PC  $\text{H}_2\text{O}$  auf 45  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 5 Minuten gekocht. Die denaturierte DNA wird in ein Eppendorfgefäß mit dem Ready to

go DNA Labelling Beads von Amersham Pharmacia Biotech Inc. überführt. Die Markierung der jeweiligen Sonden erfolgt mit 5  $\mu$ l P<sup>32</sup> [dCTP] NEN mit einer totalen Aktivität von 3000 Ci/mmol für 20 Minuten bei 37° C.

Die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgt über Nensorb-Säulen (NEN) mit zweimaliger Spülung mit je 1 ml 100 % Methanol und zweimal je 1 ml Puffer A. Die Probe in 200  $\mu$ l Puffer A auf die Säule geben und dreimal mit je 1 ml Puffer A waschen. Anschließend zweimal mit je 200  $\mu$ l 50 % ETOH eluieren.

Die Hybridisierung der Membran erfolgt bei 65° C im Hybridisierungsröhrchen über Nacht. Nach der Hybridisierung wird die Membran in 2 x SSC, 0,1 % SDS für 10 Minuten bei RT und für 10 Minuten bei 68°C gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgt in 1 x SSC, 0,1 % SDS für 10 Minuten bei 68°C.

Die Entwicklung der Membran erfolgt entweder mit dem Phosphor Imager System (Amersham Pharmacia biotech.) oder die Membran wird für 2 bis 3 Tage bei -80°C mit Röntgenfilm exponiert.

#### 20 x SSC-Puffer

175,3 g NaCl (3M)  
 88,2 g Natriumacetat (0.3 M)  
 pH 7,0 einstellen und mit DEPC-Wasser auf 1 Liter auffüllen

#### A-Puffer für Nensorb-Säulen

1 M Tris-HCl pH 7.6    5 ml  
 Triethylamin            70 ml  
 0.5 M EDTA pH 7.4    100  $\mu$ l  
 H<sub>2</sub>O                        44,83 ml  
 pH 7,7 einstellen

1 x TAE-Puffer            0,04 m Trisacetat  
                                   0,001 m EDTA

### zu 3.2 PCR Collagen $\alpha$ 1 IX DNA (modifiziert nach A.Aszodi)

Zur  $\alpha$ 1 Col IX-Genotypisierung mit der PCR-Methode sind zwei Ansätze mit der gleichen Probe notwendig:

#### Ansatz I (Sigma)

- 1  $\mu$ g DNA
- 10  $\mu$ l 10 x PCR II Puffer (Sigma)
- 8  $\mu$ l Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM)
- 3  $\mu$ l Col IX A (300 ng)
- 3  $\mu$ l Col IX B (300 ng)
- 2  $\mu$ l jedes dNTP (10 mM)
- 2,5  $\mu$ l Taq polymerase (1 U/ $\mu$ l)

#### Ansatz II

- 1  $\mu$ g DNA
- 10  $\mu$ l 10 x PCR II Puffer (Sigma)
- 8  $\mu$ l Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM)
- 3  $\mu$ l Col IX A (300 ng)
- 4  $\mu$ l NEO 3 (300 ng)
- 2  $\mu$ l jedes dNTP (10 mM)
- 2,5  $\mu$ l Taq polymerase (1U/ $\mu$ l)

Beide Ansätze werden mit H<sub>2</sub>O HPLC auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt.

Die PCR-Konditionen betragen 1 Zyklus von 3 Minuten bei 94°C, 35 Zyklen jeweils 1 Minute bei 94°C, 56,5°C und 72°C, zum Schluß 1 Zyklus bei 72°C von 7 Minuten.

	Primersequenzen	T <sub>m</sub>
Col IX A	5'-CCA GTG AAC TCC CCT TCC ATT -3' forward	59.8° C
Col IX B	5'-GGG ACG TCT GGC CCT TTC TAA -3' reverse	61.8° C
NEO 3	5'-CTG CTC TTA CTG AAG GCT C -3'	56.7° C

zu 4. Isolation von Gesamt-RNA aus neugeborenen Mäusen (Szüts,  
Möllers et al 1998)

Zur Isolation der RNA beträgt das Material aus einem neugeborenen Mäuseembryo nach Entfernung der inneren Organe ca. 1 g. Das Gewebe pro Embryo wird mit 15 ml 3 M LiCl / 6 M Urea versetzt und mit dem Polytron 1 bis 3 Mal für 45 Sekunden bei RT homogenisiert. Die Suspension wird bei 4.500 rpm im Falconrotor (S 4180-Beckmann) für 15 Minuten bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die Suspension wird kurz geschwenkt und bei 12.000 rpm (Beckmann Rotor 30.15) für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet in 1 ml Proteinase K Puffer gelöst und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wird auf 2 Eppendorfgefäße mit je 500 µl verteilt und mit 1 Volumenanteil Aqua-Phenol (sauer) extrahiert. Anschließend wird kurz gevortext und für 15 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (14.000 U/min). Der wässrige Überstand wird in ein neues Tube überführt und mit 1 Vol Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, gevortext und zentrifugiert wie oben. Die Probe wird mit je 250 µl auf 4 Eppendorfgefäßen verteilt und mit 1/10 Volumenanteil 3M Na Ac pH 5.2 (25µl) und 2,5 Volumenanteil 100% ETOH (625 µl) bei -20°C RNA für 2 Stunden gefällt. Danach wird die Suspension 10 Minuten bei 4°C (14.000 rpm) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 25 µl DEPC Wasser auf Eis gelöst.

Bei -80°C wird die RNA gelagert.

Proteinase K-Puffer:

0,2 M Tris - HCl pH 8.0

2 % SDS

200 µg / ml Proteinase K (Böhringer Mannheim)

## zu 5. Northern Blot Analyse

20 µg der jeweiligen RNA-Probe wird mit DEPC Wasser auf 4 µl aufgefüllt. Parallel zu den Proben wird ein 1 µl RNA-Standard (Gibco BRL) und 3 µl DEPC Wasser angesetzt. Im weiteren Verlauf werden Proben und Standard gleich behandelt.

Zu den Proben werden zwei Volumenanteile (8 µl) Denaturierungspuffer hinzugegeben und 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden je 1 µl EtBr (0,5 mg/ml) und 1 µl Ladungspuffer hinzugegeben. Die Proben werden auf ein MOPS-Formaldehyd-Gel aufgetragen und über Nacht bei 40 Volt und 4°C gefahren. Das Gel wird dreimal 20 Minuten mit 10 x SSC gewaschen. Der Northern Blot Aufbau erfolgt analog wie beim Southern Blot. Die Nylonmembran wird getrocknet und beide Seiten im Stratalinker fixiert. Die Prähybridisierung erfolgt für 1 bis 2 Stunden bei 65°C im Roler mit 5 ml Prähybridisierungslösung (s. Southern). Zur Hybridisierung werden 3 µl der jeweiligen Sonde (25 ng) mit 42 µl DEPC Wasser 5 Minuten gekocht, anschließend auf Eis gesetzt und in ein Ready to go DNA Labelling Beads von Amersham Pharmacia Biotech Inc. überführt. Bei der Markierung werden 5 µl P<sup>32</sup> dCTP (Aktivität 3000 Ci/mmol) zum Ready to go-Gemisch hinzugefügt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der Sonde erfolgt mit dem PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen (siehe Protokoll des Herstellers).

Zur Probe gibt man 200 µl einzelsträngige DNA und läßt sie bei 95°C 10 Minuten kochen. Danach wird diese für 2 Minuten auf Eis gesetzt und zu der Prähybridisierungslösung ins Röhrchen hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgt für in 1 bis 2 Stunden im Roler bei 65°C. im Durchschnitt wurden  $4 \times 10^8$  Counts / µg eingesetzt. Das Waschen der Membran erfolgt jeweils für 10 Minuten bei 60°C. Zuerst einmal mit 2 x SSC, 0,1 % SDS, dann zweimal mit 1 x SSC, 0,1 % SDS und zuletzt einmal mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS.

Die Entwicklung der Membran erfolgt mit dem Phosphor-Imager-System (Amersham Pharmacia biotech.) oder die Membran wird bei -80°C mit Röntgenfilm exponiert.

Wird die Membran mit einer weiteren Sonde hybridisiert, muß der Filter vorher mit Stripping-Puffer gewaschen werden. 500 ml Puffer werden aufgeköcht und den Blot 30

Minuten darin geschwenkt. Anschließend wird die Membran zweimal mit 10 x SSC bei RT 10 Minuten gewaschen.

Stripping-Puffer:

5 mM Tris / HCl pH 8.0

2 mM EDTA pH 8.0

0,1 % Denhardt

10 x MOPS – (3 – [N-morpholino] propane sulfonic acid) Puffer:

0,2 M MOPS

0.05 M Natriumacetat

0,01 M EDTA

mit DEPC Wasser auf 1 l auffüllen und einen PH-Wert von 7,0

mit NaOH einstellen

MOPS-FA-Gel: 1,5 g Seakem Agarose (Biozym)

108 ml DEPC Wasser

15 ml MOPS 10 x

27 ml Formaldehyd 37 %

Laufpuffer 150 ml MOPS 10 x

27 ml Formaldehyd 37 %

auf 1,5 l mit DEPC Wasser auffüllen

Zusammensetzung des Denaturierungspuffers:

5 % Formamid

0,32 % Formaldehyd

1 x MOPS

## zu 6. RT- Polymerasekettenreaktion zur Herstellung von Sonden

2 µg RNA werden mit 2 µl Oligo-dT (50 µM) (Böhringer Mannheim) und DEPC Wasser auf 10 µl Endvolumen gebracht und 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

### Ansatz zur Herstellung der c-DNA:

- 4 µl 5 x Puffer (RT) Gibco BRL
- 0,5 µl jedes dNTP's (10 mM)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNase Inhibitor (Gibco)
- 1 µl MMLV Gibco BRL ( U/µl)

Dieser Ansatz wird 1 Stunde bei 37°C und 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

### PCR-Ansatz (Sigma):

- 10 µl 10 x PCR II Puffer
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 0,5 µl jedes dNTP (10 mM)
- 1 µl Primer forward (50 p mol/µl)
- 1 µl Primer reverse (50 p mol/µl)
- 2,5 µl Sigma Red Taq<sup>TM</sup> Polymerase (1 U/µl)
- 2 µl c-DNA

Dieser Ansatz wird mit DEPC Wasser auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR-Konditionen beinhalten 35 Zyklen mit jeweils 1 Minute bei 94°C, 1 Minute primerspezifische Temperatur und 1 Minute bei 72°C.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Tm</b>	<b>Amplikon- größe</b>
Oligo dT	TTT TTT TTT TTT TTT		
RGAPDH 1	CAC AGT CAA GGC TGA GAA TGG G	62,1°C	290 bp
RGAPDH 1 r	TTG GTG GTG CAG GAT GCA TTG C		
m Lum 1	CAC CCA ACT GTG CC CAG AAT G	62°C	690 bp
m Lum 1r	GGA GAG ATC AAG CTC GAG CAA G		
m Fibmo 1	CAC TGG TGG ATC CAA TAC CTC C	62°C	620 bp
m Fibmo 1r	CTC AGG TCT AGT AGG ATC AGG G		
m Bigly 1	CAC CAA GGT GGG CAT CAA TGA C	60,7°C	480 bp
m Bigly 1r	GTG GCA GTG TGC TCT ATC CAT C		
m $\alpha$ 1 XII a	TGG AGA TCT TCG CAG TCG GTG T	62.1°C	710 bp
m $\alpha$ 1 XII b	TTC CTG TCA GTG GAG ATC CAG G		
m Col XIV c	GAA AGT CGT CCT GGA AGT CCT G	62°C	477 bp
m Col XIV ct	CCT TCT CAG CAC TCT TCA TTG G		
r $\alpha$ 1 IX a	GAT GAG AGA GGT CCT CCG GGT G	64°C	478 bp
r $\alpha$ 1 IX b	AGC GAC CTG GTG GGC AGG AAT T		

zu 7. Subklonieren der Sonden-PCR-Fragmente in den PCR II TOPO Vektor (Invitrogen)

2  $\mu$ l des PCR-Produktes werden mit 2  $\mu$ l Wasser und 1  $\mu$ l Vektor 5 Minuten bei RT inkubiert und danach auf Eis gesetzt. Die kompetenten Zellen (one shot cells von Invitrogen) werden auf Eis gesetzt, dazu werden 2  $\mu$ l 0,5 M  $\beta$ -mercaptoethanol gegeben und 2  $\mu$ l des Gemisches PCR-Produkt / Wasser / Vektor hinzugefügt. Dieses Gemisch wird 30 Minuten auf Eis gesetzt, 30 Sekunden auf 42°C und anschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Es werden 250  $\mu$ l Soc Medium dazu gemischt und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Die Lösung wird auf LB-Platten (Ampicillin 100  $\mu$ g/ml, IPTG 1M, X-GAL 4 %) ausplattiert: einmal 50  $\mu$ l und einmal 100  $\mu$ l. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und danach ausgewählte Einzelkolonien ausgepickt

**DNA-Mini-Präparation (je Probe 4 bis 6 Ansätze):**

Die ausgewählte Einzelkolonie wird in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Jeweils 4 ml der verschiedenen Ansätze werden aufgearbeitet. Sie werden zuerst 10 Minuten bei RT (4.800 rpm) zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das jeweilige Pellet aufgearbeitet nach Vorschrift QIA prep Spin Miniprep KIT Protokoll von Qiagen.

Zur Qualitätskontrolle der DNA-Mini-Präparation werden von jedem Ansatz 2  $\mu\text{l}$  DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit je 1  $\mu\text{l}$  Eco RI Puffer 10 x, 0,5  $\mu\text{l}$  Eco RI (NE Biolabs) und 6,5  $\mu\text{l}$  Wasser (Totalvolumen 10  $\mu\text{l}$ ) vermischt, 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert und dann auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Soc-Medium:        20 g Bacto-tryptone  
                          5 g Bacto-yeast-extract  
                          0,5 g NaCl  
                          20 mM Glucose  
                          auf 1 l mit DEPC Wasser auffüllen

LB-Medium:        10 g Bacto-tryptone  
                          5 g Bacto-yeast-extract  
                          0,5 g NaCl  
                          auf 1 l mit DEPC Wasser auffüllen

LB-Platten (25 ml  $\cong$  1 Platte)  
                          4  $\mu\text{l}$  1M IPTG  
                          25  $\mu\text{l}$  4 % X-Gal  
                          25  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin

zu 8. Fibrillenpräparation aus 1,0 g Rippenknorpel 4 Wochen alter  
Decorin -/- Mäuse und Wildtyp-Mäuse

Homogenisation:

Zu dem Knorpel wird 7,5 ml Homogenisationspuffer (HP) hinzugegeben und mit dem Polytron 3 x 20 Sekunden homogenisiert. Es wird mit 2,5 ml HP nachgespült und 30 Minuten bei 27.000 x zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Homogenisationsvorgang wird zwei- bis dreimal mit dem Pellet wiederholt.

HP $\cong$ PBS

0,15 M NaCl  
2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
5 mM Benzamidin  
5 mM NEM  
0,1 M ACS  
0,1 mM PMSI  
20 mM EDTA  
PH-Wert 7,4 einstellen

**Vorbereitung der Grid's für das Elektronenmikroskop (EM)**

Die EM-Grid's werden auf je 1 Tropfen der auf Parafilm getropften Fibrillen-Suspension gelegt zur Adsorption der Fibrillen auf die Grid's und 2 bis 3 Minuten einwirken gelassen. Anschließend werden die Grid's 30 Minuten in je 1 Tropfen Blockierungspuffer (2 % Magermilchpulver (MMP) in PBS) gelegt. Danach werden die Grid's einmal in 1 Tropfen PBS gewaschen.

Der erste Antikörper wird in 0,2 % Magermilchpulver 1:60 verdünnt und jedes Grid wird in 1 Tropfen der Antikörperlösung für 1,5 Stunde gelegt und gut abgedichtet, damit das feuchte Milieu erhalten bleibt und die Antikörperlösung nicht eintrocknet.

Danach werden die Grid's fünfmal für jeweils 1 Minute in PBS gewaschen. Anschließend werden die Grid's in je 1 Tropfen des zweiten Antikörpers 1:30 in 0,2 % MMP PBS verdünnt für 1.5 Stunden einwirken gelassen.

Die Grid's werden zum Schluss erneut fünfmal in PBS gewaschen und zuletzt 7 Minuten in je 1 Tropfen 2 % Uranylacetat gelegt. Anschließend werden die Grid's getrocknet und luftdicht aufbewahrt.

Monoklonaler erster Antikörper: C<sub>1</sub>D<sub>3</sub> anti Collagen II

1:60 Verdünnung: 1 µl D<sub>3</sub> + 1 µl C<sub>1</sub> + 58 µl 0,2 %  
MMP in PBS

Zweiter Antikörper: Goat anti mouse gekoppelt mit 12 nm Goldpartikeln (Sigma)

## zu 9. Knorpel-/ Knochenfärbung von neugeborenen Mäuse-embryonen mit Alicanblau und Alicarinrot (Romeis, Mikroskopische Technik)

Aus ganzen neugeborenen Mäuseembryonen werden dünne Schnitte zur mikroskopischen Untersuchung des Knochen-/ Knorpelverhältnisses angefertigt.

Diese werden mit Alicanblau zur Knorpel- und mit Alizarinrot zur Knochenfärbung behandelt.

### zu 9.1 Alicanblaufärbung

Zur Alicanblaufärbung wird Alicanblau 8GX (ph 2.5) für Glycosaminoglycane verwendet.

Zuerst werden die Schnitte entparaffiniert und in Aqua dest gelegt. Dafür werden sie sechsmal für je 5 min in verschiedene Lösungen gewaschen: zuerst in Rotihistollösung I und II, dann in Ethanollösungen 96%, 70% und 50% und zuletzt in Aqua dest. Danach werden die Schnitte 3 min in 3%iger Essigsäure eingestellt und dann 30 min in die Färbelösung eingelegt. Die Färbelösung besteht aus 1% Alicanblau 8GX in 3%iger Essigsäure bei einem ph Wert von 2.5.

Anschließend werden die Schnitte mit 3%iger Essigsäurelösung solange abgespült bis keine Farbe mehr entweicht und danach ca für 3 min in Aqua dest gewaschen. Dann werden die Schnitte für 3 bis 5 min mit Kernechtrot gegengefärbt und wieder für ca 3 min in Aqua dest gewaschen. Zuletzt werden die Schnitte wie folgt entwässert: jeweils 5 min in 50%iger, 70%iger und 96%iger Ethanollösung, dann in Rotihistollösung I und II. Die Schnitte werden in einem Löschpapierblock getrocknet, mit 1 Tropfen Canada-Balsam unter einem Deckglas eingeschlossen und über Nacht unter einem Abzug nachgetrocknet.

## zu 9.2 Alizarinrotfärbung

Zur Knochenfärbung bzw. zum Kalziumnachweis wird Alizarinrot S in einer Lösung (0.5% Alizarinrot S in Aqua dest) mit ph Wert von 4 verwendet.

Zuerst werden die Schnitte entparaffiniert und in Aqua dest gebracht. Die geschieht analog zur Färbung mit Alicanblau. Danach färbt man Knochen und anderes hartes verkalktes Gewebe für 5 min in 0.5%iger Alizarinrotlösung bei ph Wert von 4. Anschließend werden die Schnitte kurz mit Aqua dest abgespült und entwässert. Dies erfolgt in den gleichen Lösungen und Reihenfolge wie bei Alicanblau, aber nicht für je 5 min, sondern die Schnitte werden in jedes Lösungsbad so oft kurz eingetaucht bis keine Schlieren auf dem Objektträger mehr zu erkennen sind. Erst dann werden sie ins nächste Bad überführt. In der Rotihistollösung II können die Schnitte kurzfristig aufbewahrt werden, damit man alle zusammen in einem Löschpapierblock trocknen kann. Zuletzt werden die Schnitte wieder mit einem Tropfen Canada-Balsam unter einem Deckglas verschlossen und über Nacht unter dem Abzug nachgetrocknet.

## IV. Ergebnisdarstellung

### zu 1. Zucht der Decorin und $\alpha 1$ Kollagen IX defizienten Mäuse

Die Veränderung des genetischen Erbmaterials von Mäusen hat in den letzten Jahren zu großen Entdeckungen geführt. Es wurden verschiedene Knockout- Mäuse gezüchtet, um strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf den Knorpel zu untersuchen.

Ziel dieser Studie war einen Doppel-Knockout von Decorin und Kollagen IX defizienten Mäusen herzustellen, da die alleinigen homozygoten Decorin und Kollagen IX defizienten Mäuse lebens- und vermehrungsfähig waren und keine offensichtlichen Mängel im Knorpel- und Knochenskelett zeigten.

Aus Wildtyp-Mäusen des Stammes DBA/2 (Charles-River) und 2 eingekreuzten heterozygoten Decorin Männchen (Iozzo), sowie 2 eingekreuzten homozygoten Kollagen IX Männchen (Fässler) wurden in unserer Studie zuerst homozygote Decorin und Kollagen IX defiziente Mäuse gezüchtet. Diese wurden durch Polymerasekettenreaktion genotypisiert.

Wir bestimmten 225 Nachkommen von Decorin und Kollagen IX doppelt heterozygoten Mäusen (Dec+/- und Col IX +/-), die miteinander verpaart wurden.

Tabelle 1: Zuchtergebnis der Nachkommen der doppelt heterozygoten Mäuse

<b>Genotyp Decorin</b>	<b>Genotyp Kollagen IX</b>	<b>Anzahl gefunden</b>	<b>Prozent (%)</b>	<b>Anzahl erwartet</b>	<b>Prozent (%)</b>
+/+	+/+	11	4.9	14	6.25
+/+	+/-	27	12	28	12.5
+/+	-/-	6	2.7	14	6.25
+/-	+/+	25	11.1	28	12.5
+/-	+/-	82	36.4	56	25
+/-	-/-	12	5.3	28	12.5
-/-	+/+	11	4.9	14	6.25
-/-	+/-	41	18.2	28	12.5
-/-	-/-	10	4.4	14	6.25

Wir erhielten von diesen 225 Nachkommen der doppelt heterozygoten Mäuse (Dec<sup>+/-</sup> und Col IX<sup>+/-</sup>) 28 Mäuse defizient für  $\alpha$ 1Col (IX) (Col IX<sup>-/-</sup>), dies entspricht 12,4 % und 62 Mäuse defizient für Decorin (Dec<sup>-/-</sup>), dies entspricht 27,6 %. Daraus ergibt sich ungefähr ein Verhältnis von 1 zu 2.

Davon waren 10 Tiere doppelt defizient für Decorin und  $\alpha$ 1Col (IX) (entspricht 4,4 %), 41 Tiere Dec<sup>-/-</sup> und Col IX<sup>+/-</sup> (entspricht 18,2 %) und 12 Tiere Dec<sup>+/-</sup> und Col IX<sup>-/-</sup> (entspricht 5,3 %).

Das Zuchtergebnis ist auffällig, da nach der Mendelschen Vererbungslehre der Anteil der doppelt defizienten Mäuse 1/16 (entspricht 6,25 %) und damit höher sein müsste. Ebenfalls ist die geringere Anzahl der defizienten Mäuse für  $\alpha$ 1Col(IX) auffällig im Vergleich zu dem mehr als doppelt so großen Anteil der Decorin defizienten Mäuse.

## zu 2. Generierung der Decorin defizienten Mäuse (Dec<sup>-/-</sup>)

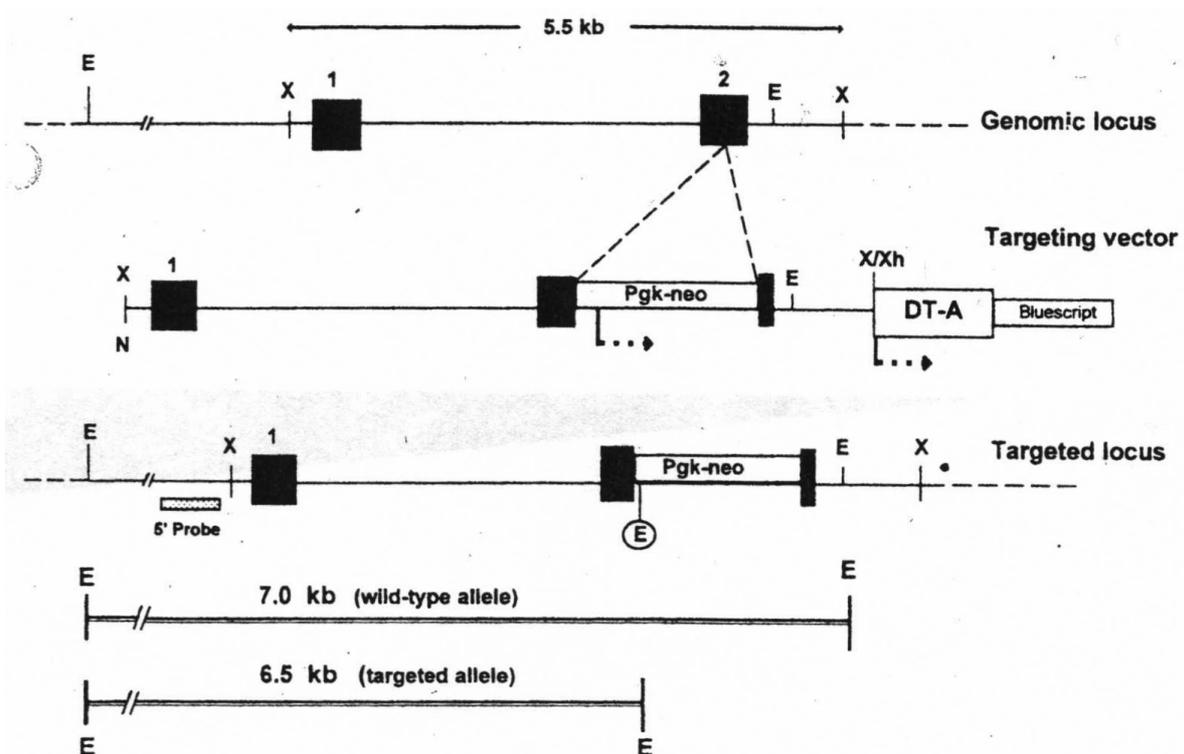


Abb. 1 Homologe Rekombination des Decorin-Locus in Exon 2.

Ein 5.5 kb eines XbaI- Schnittstelle enthaltendes genomisches murines Decorin Fragment aus dem Mäusestamm 129SV wurde benutzt um den Decorin- Zielvektor herzustellen. Dieses genomische Fragment beinhaltet Exon 1 und 2. Ein Plasmid (p Bluescript KS, Stratagene) welches die Sequenz für die P<sub>gk</sub>-neo (Neomycinphosphotransferase) beinhaltet, wurde gespalten und die daraus resultierende 1.6 kb große P<sub>gk</sub>-neo Kasette wurde mit Exon 2 verbunden. Dadurch wurde das genomische Fragment in zwei homologe Arme von ca. 3.8 und 1.7 kb zu dem Ziel Locus augeteilt.

Mit Hilfe von spezifischen Primern, die zu dem Exon 2 von Decorin korrespondieren, konnte dadurch bei der PCR ein 161 Basenpaar großes Fragment als Indikator für die nicht homologe Rekombination gefunden werden. Diese Bande erhält man bei Wildtyp- und heterozygoten Mäusen. Ein zusätzlicher Primer, der den P<sub>gk</sub> Promotor auf der P<sub>gk</sub> Neokassette erkannte, zeigte ein 250 Basenpaare großes Fragment welches die homologe Rekombination bewies. Diese Bande findet sich sowohl bei heterozygoten- (hier aber in Kombination als Doppelbande mit der Wildtyp-Bande) als auch alleine bei homozygoten Mäusen (Danielson et al., 1997).

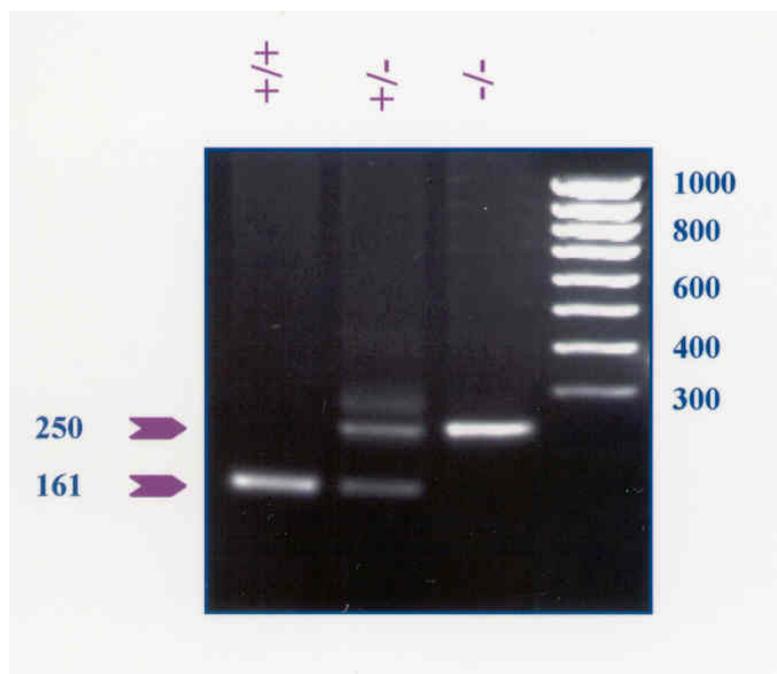


Abb. 2 Darstellung der spezifischen Banden der Decorin- DNA durch PCR. Es wurden spezifische Primer zur Erkennung der PGK-Neokassette und des dazu

korrespondierenden Exon 2 von Decorin verwendet. (Die detaillierten Primersequenzen sind im Material und Methoden-Teil unter Punkt 2 aufgelistet).

Die Abbildung 2 zeigt zwei unterschiedliche Banden bei 161 Bp und 250 Bp. In Spalte 1 (+/+) und 2 (+/-) erkennen wir die Wildtypbande bei 161 Bp, in Spalte 2 und 3 (-/-) findet sich die homozygote Bande bei 250 Bp. In der ersten Spalte findet sich lediglich eine Bande bei 161 Bp als Beweis, daß hier die DNA einer Wildtyp-Maus vorliegt. In der dritten Spalte sieht man ebenfalls nur eine Bande bei 250 Bp, die spezifisch ist für die homozygote Rekombination. Hier handelt es sich um die DNA einer homozygoten Decorin-Maus (Dec -/-). In der mittleren Spalte erkennt man eine Doppelbande, diese zeigt das Vorliegen der DNA einer heterozygoten Decorin-Maus (+/-).

### zu 3. Generierung der $\alpha 1$ Col(IX) defizienten Mäuse (Col-/-)

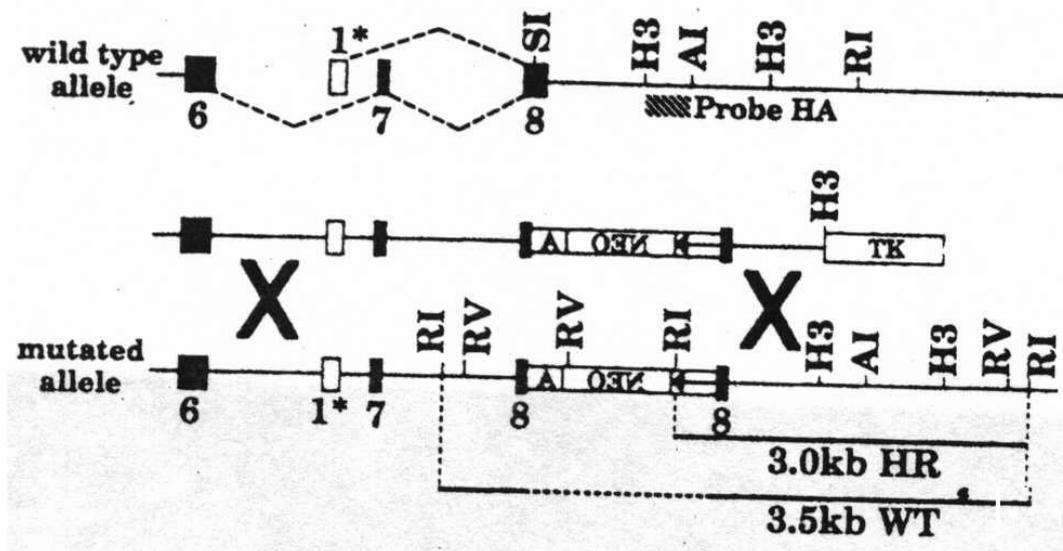


Abb. 3 Homologe Rekombination des Col9A1- Locus auf Exon 8

Der Zielvektor (pmCol9KOB) beinhaltet Teile der NC4 Kodierungssequenz (Exon 6,7 und alternatives Exon 1) und Exon 8, welches das erste gemeinsame Exon für die lange und kurze Kette von  $\alpha 1$  (IX) Kollagen darstellt. Die Phosphotransferase-neomycin

Kassette, die in entgegengesetzter Richtung zu dem Kollagen-Gen transkribiert wird, wurde in Exon 8 eingebaut (Fässler et al., 1994). Mit Hilfe spezifischer Primer (1 Primer für die PGK-Neokassette und 2 intron Primer für Col9A1) konnte zwischen Wildtyp und homozygoten Mäusen unterschieden werden. Die Wildtypbande liegt bei 384 Bp und die Bande der  $\alpha 1$ Col(IX) defizienten Mäuse bei 520 Bp (persönliche Information von A. Aszodi).

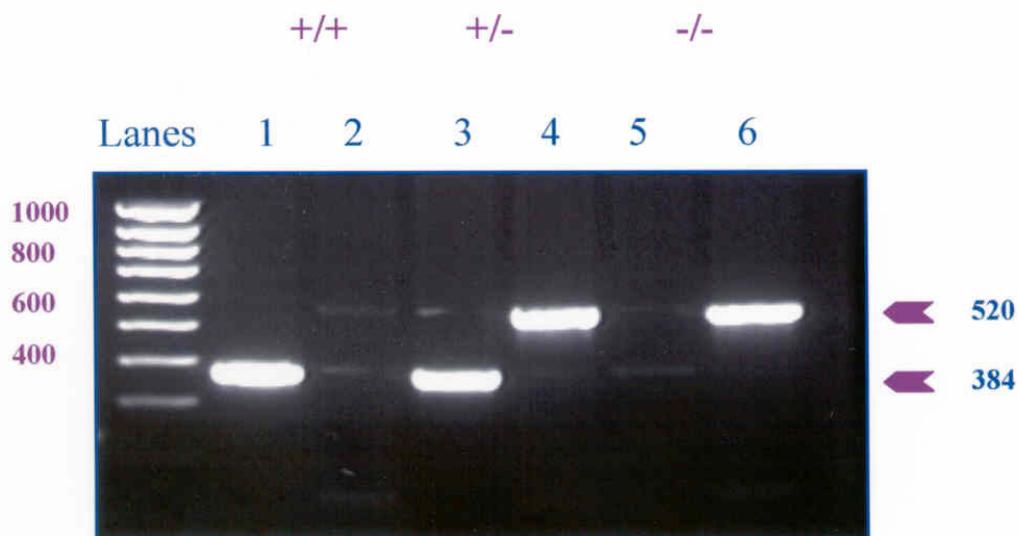


Abb.4 PCR- Darstellung der DNA von  $\alpha 1$  Kollagen IX  $-/-$  Mäusen mit Hilfe von spezifischen Primern für die PGK-Neokassette und Wildtypallelen.

Die PCR- Proben in den Spalten 1, 3 und 5 wurden mit dem Primerpaar 1 versetzt, die in den Spalten 2, 4 und 6 mit dem Primerpaar 2 (Die detaillierten Primersequenzen sind im Material und Methoden-Teil unter Punkt 3.2 aufgelistet).

Die Abbildung vier zeigt sechs Spalten, wobei jeweils die beiden benachbarten Spalten dieselbe DNA- Probe enthalten, die mit unterschiedlichen Primerpaaren versetzt worden sind und gemeinsam ausgewertet werden. Die Proben in den Spalten 1, 3 und 5 wurden mit dem Primerpaar 1 (Col IX A und Col IX B spezifisch für die Wildtypbande) und in den Spalten 2, 4 und 6 mit dem Primerpaar 2 (Col IX A und Neo 3 spezifisch für die

PGK- Neokassette) versetzt. Die detaillierten Primersequenzen sind im Material- und Methodenteil unter Punkt 3.2 aufgeführt.

Die erste Spalte zeigt eine Bande bei 384 Bp spezifisch für die Wildtypbande, die zweite keine Bande. Diese Kombination ist spezifisch für die DNA einer Wildtyp-Maus (+/+).

Die dritte Spalte zeigt ebenfalls eine Bande bei 384 Bp und zusätzlich findet sich in der vierten Spalte eine Bande bei 520 Bp als Beweis für das Vorliegen der PGK-Neokassette. Diese Kombination ist typisch für die DNA einer heterozygoten  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Maus (+/-).

In der fünften Spalte findet sich keine Bande, in der sechsten eine bei 520 Bp. Diese Kombination ist spezifisch für die DNA einer homozygoten  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Maus (-/-).

#### zu 4. Generierung der Decorin und $\alpha 1\text{Col(IX)}$ doppelt defizienten Mäuse

Die jeweiligen homozygoten Mäuse für  $\text{Dec}^{-/-}$  und  $\alpha 1\text{Col(IX)}^{-/-}$  wurden untereinander erneut verpaart. Hieraus erhielten wir doppelt heterozygote Decorin und Kollagen IX Mäuse ( $\text{Dec}^{+/-}$  und  $\alpha 1\text{Col(IX)}^{+/-}$ ). Diese wurden nun wiederum miteinander verpaart, um nun homozygote Decorin/  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Mäuse ( $\text{DC}^{-/-}$ ) zu züchten. Die Nachkommen wurden durch PCR auf Decorin und Kollagen IX Defizienz getestet. Diese wurden wiederum miteinander verpaart und zeigten normalen lebensfähigen Nachwuchs. Von diesen neugeborenen Mäusen gewannen wir Gesamt-RNA zur weiteren Untersuchung. Zunächst wurde diese RNA mittels RT-PCR weiter untersucht. Mit spezifischen Primern wurde getestet, ob auch wirklich keine Expression des Decorin und  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Gens mehr vorlag.

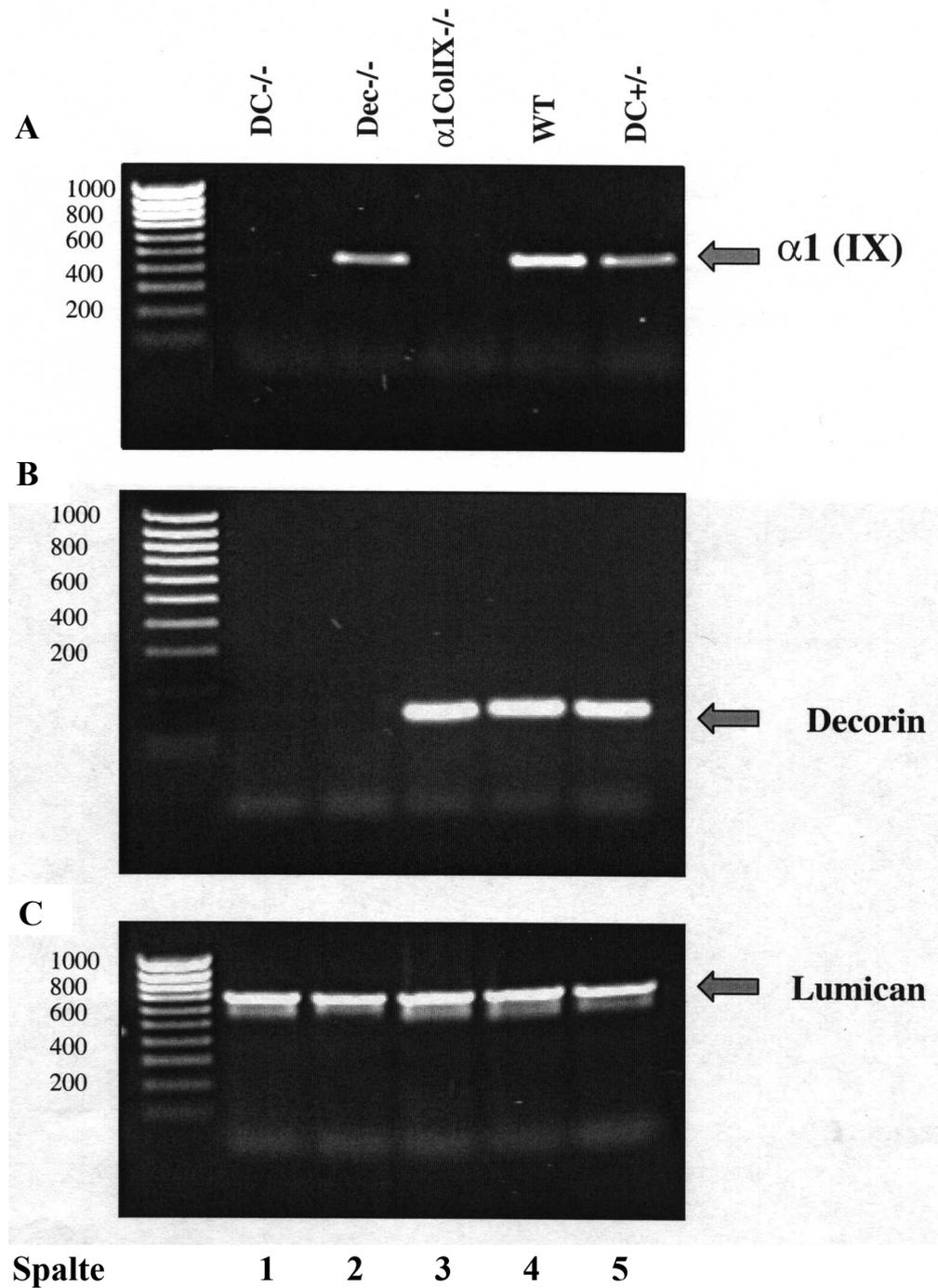


Abb.6 RT-PCR von Gesamt-RNA von gendefizienten Decorin/  $\alpha$ 1Col(IX)-Mäusen (DC<sup>-/-</sup>), gendefizienten Decorin-Mäusen (Dec<sup>-/-</sup>), gendefizienten Kollagen IX-Mäusen ( $\alpha$ 1 ColIX<sup>-/-</sup>), Wildtyp-Mäusen (WT) sowie Decorin und Kollagen IX heterozygoten Mäusen (DC<sup>+/-</sup>)

Von ganzen neugeborenen Tieren aller 5 Spezies wurde Gesamt-RNA gewonnen und nach RT-PCR mit spezifischen Primern die Genexpression analysiert. Die Primer-Sequenzen sind im Material und Methoden Teil unter Punkt 6 aufgelistet. Alle drei Untersuchungen wurden mit denselben RNA-Proben durchgeführt.

Bild A zeigt das Ergebnis der RT-PCR, in der die RNA der verschiedenen Genotypen mit  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  spezifischen Primern untersucht wurde. Man erkennt die kollagen typische Bande bei 478 Bp bei Dec<sup>-/-</sup>, WT und DC<sup>+/-</sup> (Spalte 2, 4 und 5). Bei DC<sup>-/-</sup> sowie  $\alpha 1\text{Col(IX)}$ <sup>-/-</sup> (Spalte 1 und 3) sieht man keine Bande als Zeichen, daß hier das  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Gen nicht mehr exprimiert wird.

Bild B stellt das Ergebnis für Decorin spezifische Primer dar. Man erkennt typische Banden bei 250 Bp bei  $\alpha 1\text{Col(IX)}$ , WT und DC<sup>+/-</sup>. Bei DC<sup>-/-</sup> sowie Dec<sup>-/-</sup> lassen sich keine Banden mehr nachweisen als Ausdruck dafür, daß hier kein Decorin mehr exprimiert wird.

Bild C zeigt eine Kontrolluntersuchung. Die c-DNA aller 5 Tiere wurde mit Lumican spezifischen Primern versetzt. Dies wurde als Kontrolle für die RNA-Qualität und -Integrität benutzt. Alle 5 Spalten zeigen eine einheitliche Lumican typische Bande bei 690 Bp.

## zu 5. Northern Blot Analysen der gendefizienten Decorin und $\alpha 1\text{Col(IX)}$ Mäuse sowie von weiteren Extrazellulärmembran- Komponenten

Für detailliertere Informationen zur Genexpression von zusätzlichen, in der Extrazellulärmembran (ECM) vorkommenden, Komponenten im Knorpel bei gendefizienten Decorin/  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  Mäusen führten wir mit der Gesamt-RNA Northern-Blot-Analysen durch. Zusätzlich zur Genexpression von Decorin und  $\alpha 1\text{Col(IX)}$  untersuchten wir noch weitere Bestandteile von Knorpelfibrillen (Lumikan, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1\text{Col(XIV)}$  und  $\alpha 1\text{Col(XII)}$ ), um genaueres über die Knorpelstruktur von Doppel-Null-Mäusen zu erfahren. Es interessierte uns, ob bei den Doppel- Knockout-Mäusen eine geänderte Regulation der Genexpression obiger Knorpelbestandteile im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vorliegt.

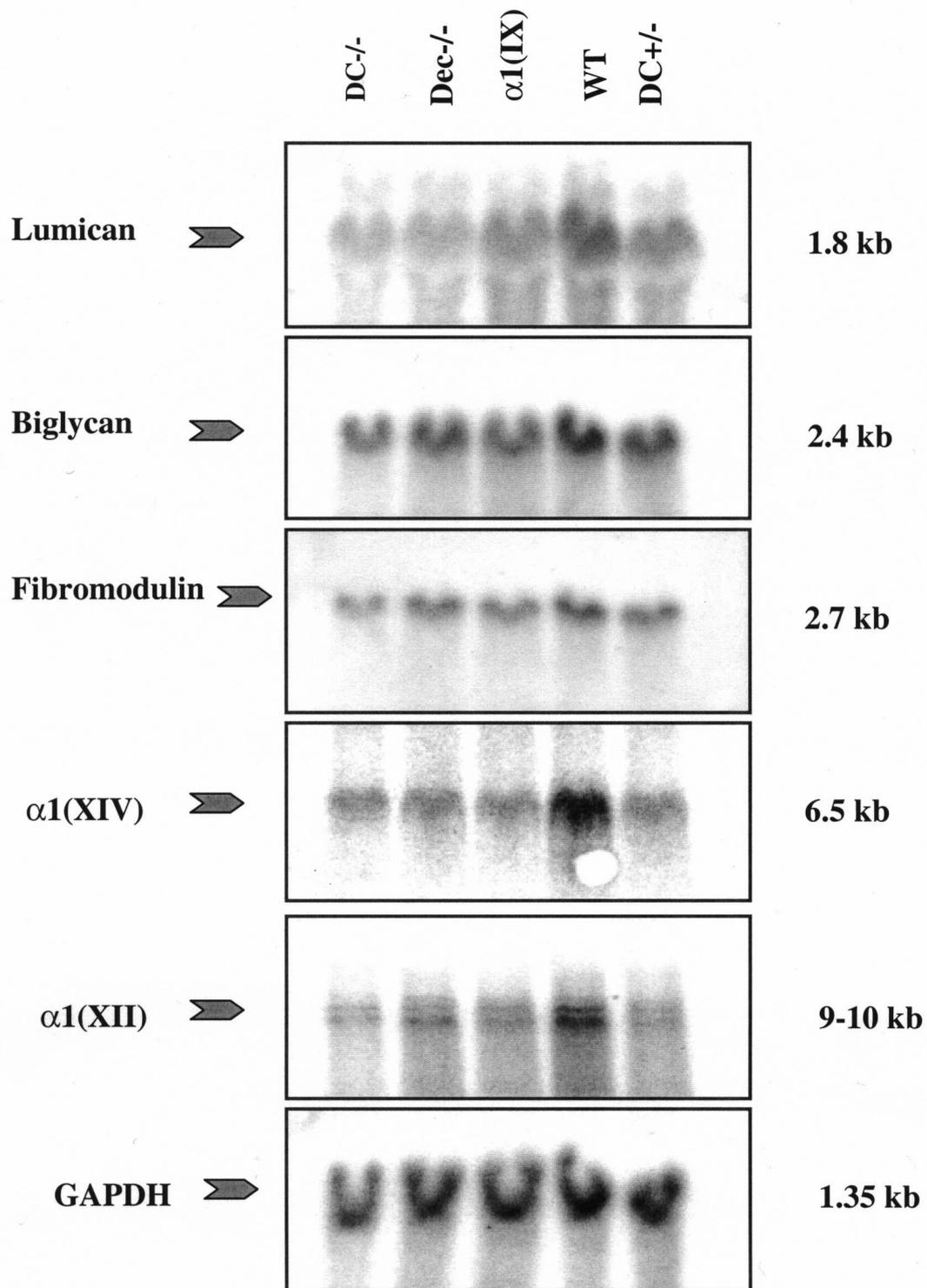


Abb. 7 Northern Blot- Analyse von Gesamt-RNA von neugeborenen Mäusen ( DC<sup>-/-</sup>, Dec<sup>-/-</sup>,  $\alpha 1\text{Col}(\text{IX})$ , WT und DC<sup>+/-</sup> Mäuse ) mit Lumikan, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1\text{Col}(\text{XIV})$  und  $\alpha 1\text{Col}(\text{XII})$

Die Sonden für Lumican, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1$ Col(XII) und  $\alpha 1$ Col(XIV) wurden mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA von Wildtyp-Mäusen gewonnen. Zur Herstellung siehe bitte Material und Methoden Punkt 6. Die GAPDH- Sonde (Glycerinaldehydphosphodehydrogenase, 1 kb großes Plasmid) war eine freundliche Leihgabe der Abteilung Professor Kresse.

Abbildung 7 zeigt, daß alle 5 Tiere Lumikan, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1$ Col(XII) sowie  $\alpha 1$ Col(XIV) exprimieren. Zur weiteren Bestimmung ob Unterschiede in der Expression bei den verschiedenen RNA Proben vorliegen, erfolgte eine quantitative Auswertung von drei Northern Blots. Für jeden Northern Blot wurden unterschiedliche RNA- Proben von Tieren aus verschiedenen Würfen verwendet.

Die Ergebnisse der drei Experimente wurden mit Hilfe von Phospho-Imaging (Phospho-imager, Storm, Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg) quantitativ ausgewertet und die jeweilige mRNA-Expression wurde in Beziehung zur GAPDH- Expression (Glycerinaldehydphosphodehydrogenase) als internen Standard gesetzt. Man geht davon aus, daß GAPDH ubiquitär vorkommt und in jeder Zelle gleich exprimiert wird, sowie keine Unterschiede in den verschiedenen Knock- out- Mäusen zeigt.

WT-Ergebnisse wurden als 100% definiert.

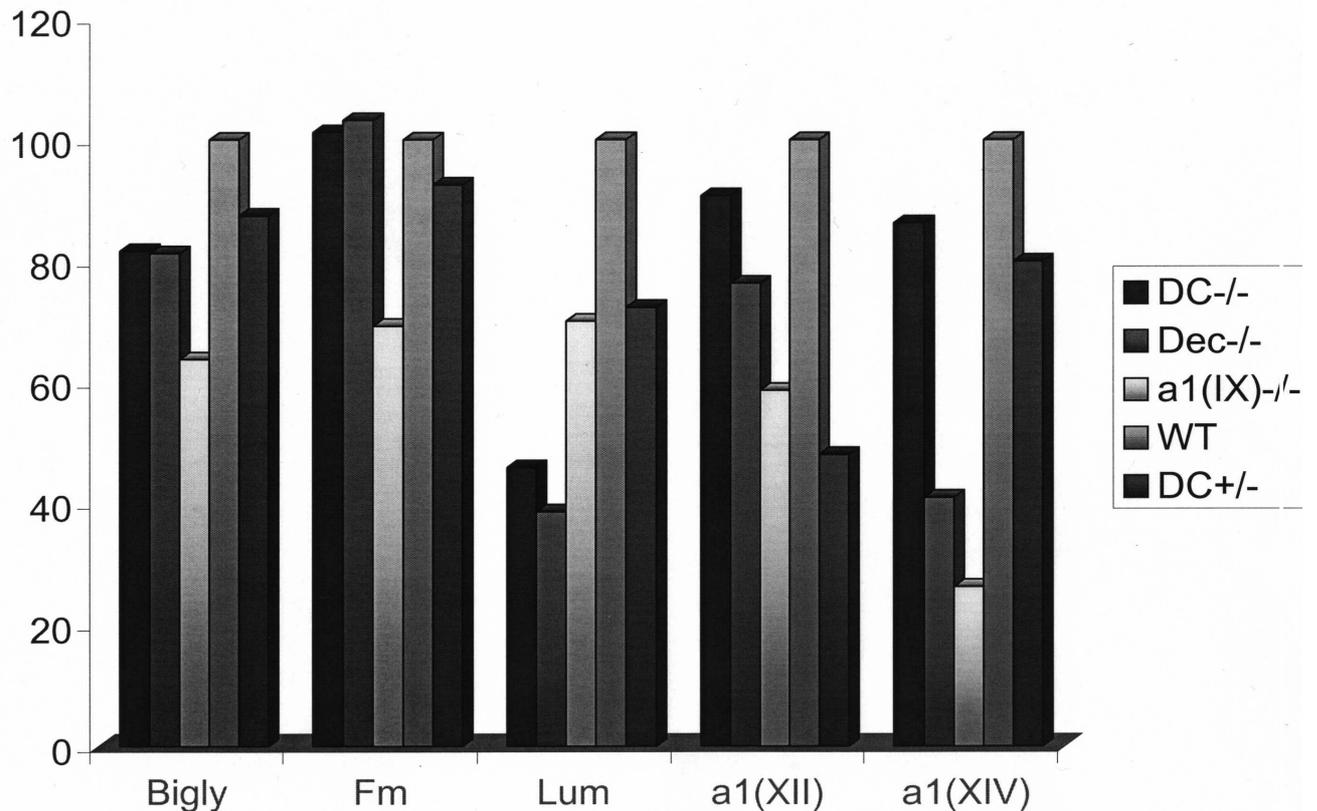


Abb.8 Quantitative Analyse des Genexpressionsmusters von Lumican, Fibromodulin, Biglycan,  $\alpha 1\text{Col(XII)}$  und  $\alpha 1\text{Col(XIV)}$

Die Graphik zeigt eine Verminderung der Lumikan- Expression bei den Doppeldefizienten- Mäusen von ca. 50 % und eine Reduktion von Biglykan von ca.20 %.

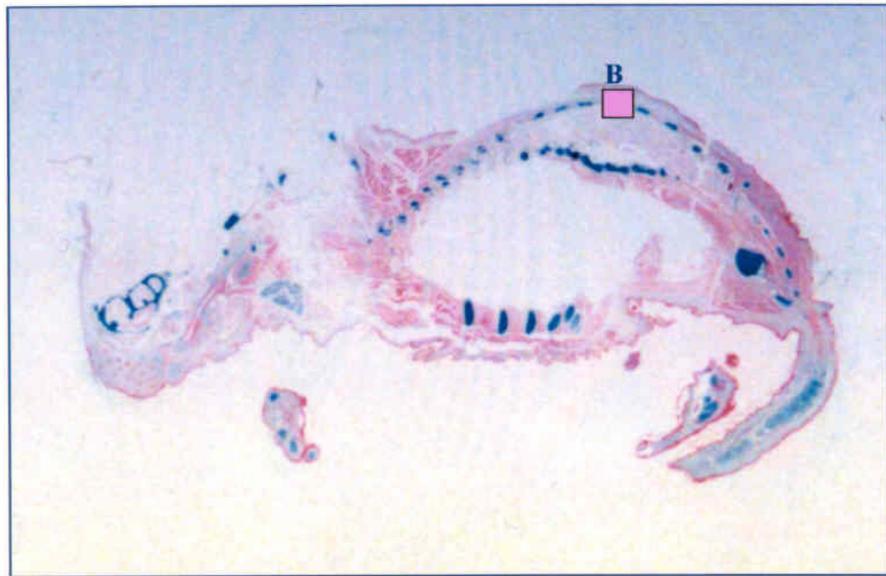
Die  $\alpha 1\text{Col(IX)-/-}$  Mäuse zeigen eine ca. 70% ige Reduktion und die Dec-/- Mäuse eine ca. 50% ige Reduktion der  $\alpha 1\text{Col(XIV)}$  Expression. Die Dec-/- Mäuse zeigen ebenfalls eine ca. 20% ige Reduktion der Biglycan- und eine ca. 60% ige Reduktion der Lumikan- Expression. Auffällig ist eine allgemeine Reduktion der Expression aller untersuchten Gene bei den  $\alpha 1\text{Col(IX)-/-}$  Mäusen (Biglycan ca. 40%, Fibromodulin ca. 30%, Lumikan ca. 30%,  $\alpha 1\text{Col(XII)}$  ca. 40% und  $\alpha 1\text{Col(XIV)}$  ca. 70%). Die qualitativen Mittelwerte der übrigen Untersuchungsbestandteile sind nicht auffällig verändert.

zu 6. Immunhistologische Untersuchung der Knorpel- Knochen-  
Verteilung bei doppelt gendefizienten Mäusen, doppelt  
heterozygoten und Wildtyp Mäusen

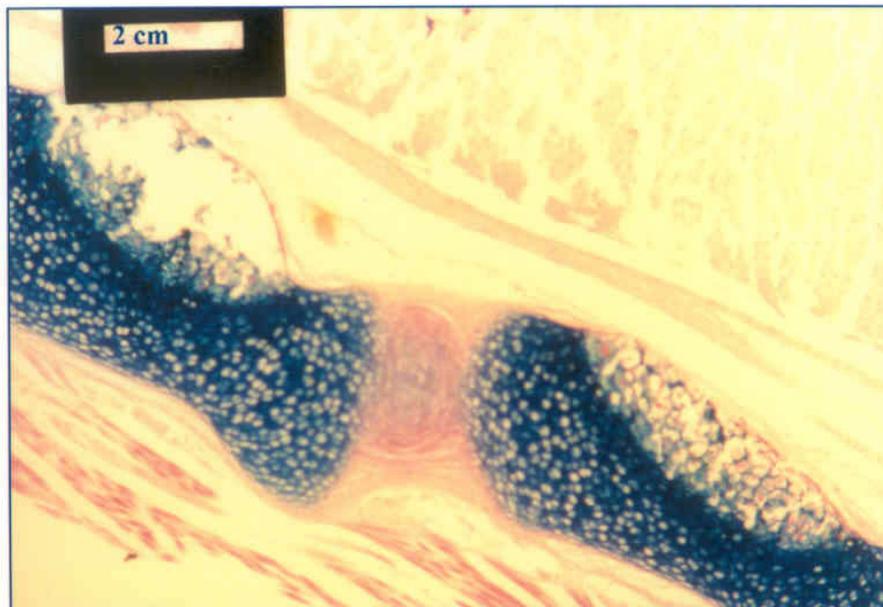
Im weiteren Verlauf untersuchten wir die Knorpel-Knochen- Verteilung von Wildtyp- (WT), doppelt heterozygoten (DC+/-)- und doppelt defizienten Mäusen (DC-/-). Wir wollten vergleichen, ob es Unterschiede im Skelettaufbau zwischen diesen drei Tiergruppen gibt. Wir vermuteten, daß die Doppel-Null-Mäuse vielleicht weniger funktionsfähigen Knorpel haben könnten, weniger Knorpel zu Knochen umbauen können oder einen verminderten Knochenanteil (weniger Knochenmasse) hätten. Dies könnte entscheidende Aussagen über die Skelettstabilität und Belastbarkeit der Mäuse erlauben.

Dünne Paraffinschnitte von ganzen neugeborenen Mäuse wurden mit Alcian-Blau (für saure Mukosubstanzen bzw. Knorpelfärbung) und Alicerin-Rot (Kalziumnachweis bzw. Knochenfärbung) behandelt, um eventuelle Unterschiede im Skelettaufbau darstellen zu können (exaktes Färbeprotokoll siehe Material und Methoden Teil).

**A**  
WT



**B**  
WT



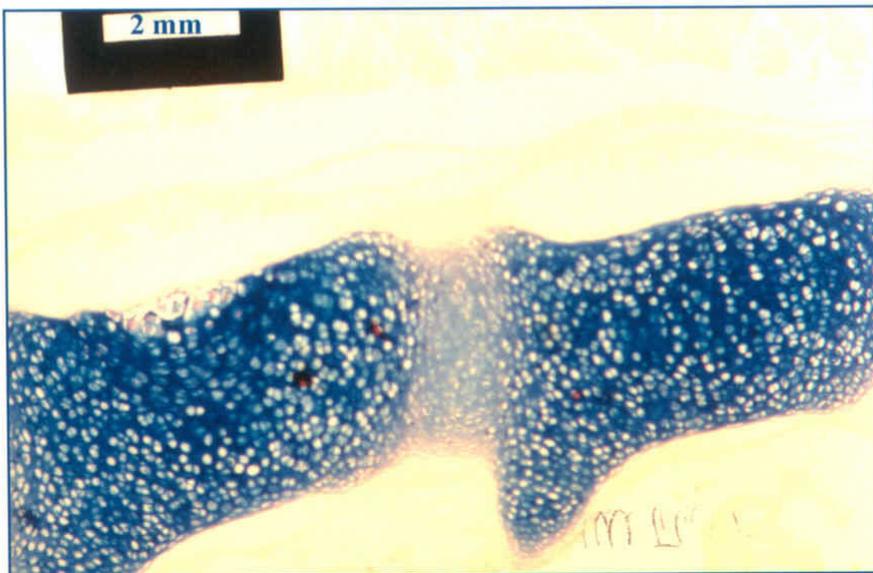
**A**

DC-/-



**B**

DC-/-



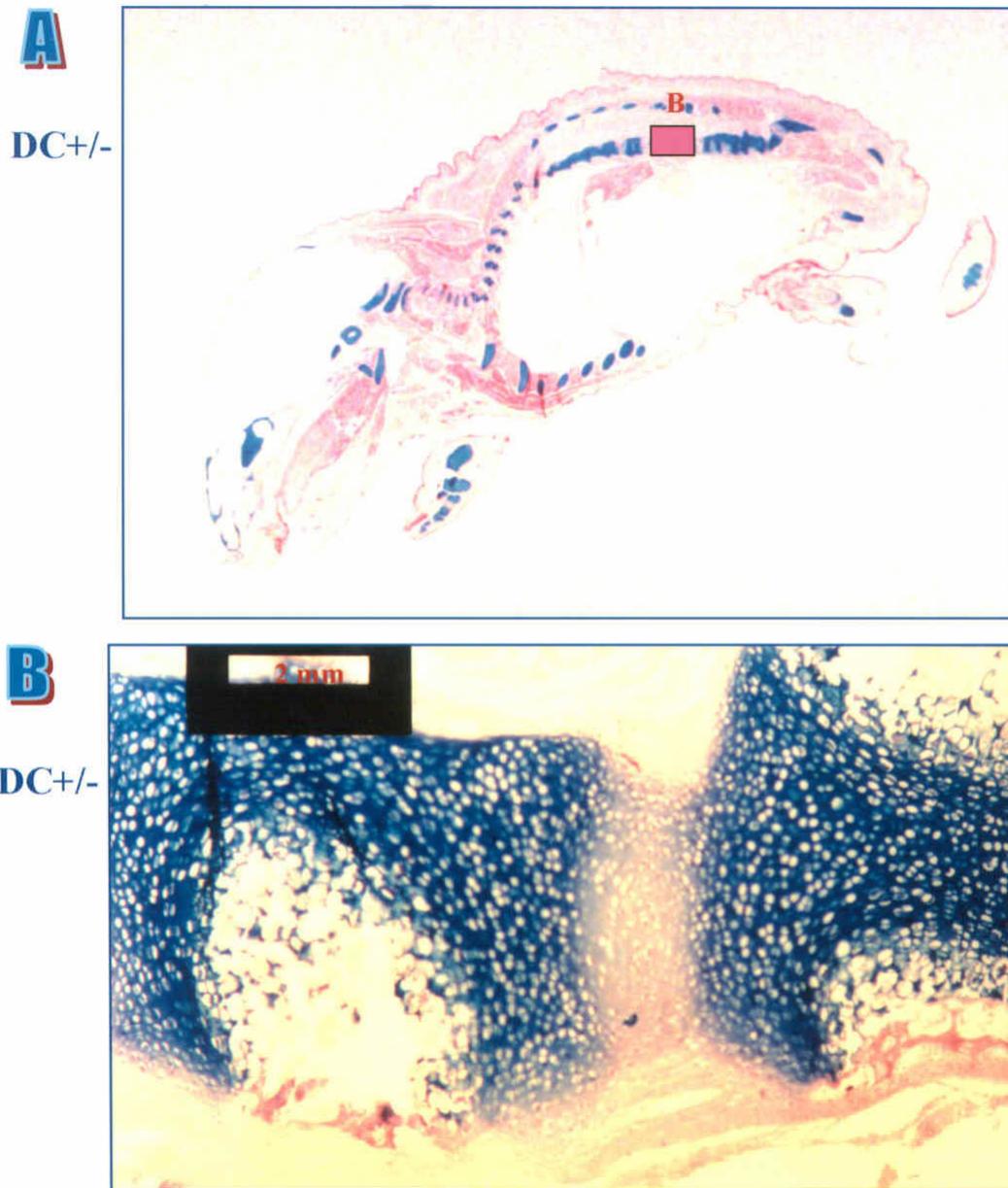


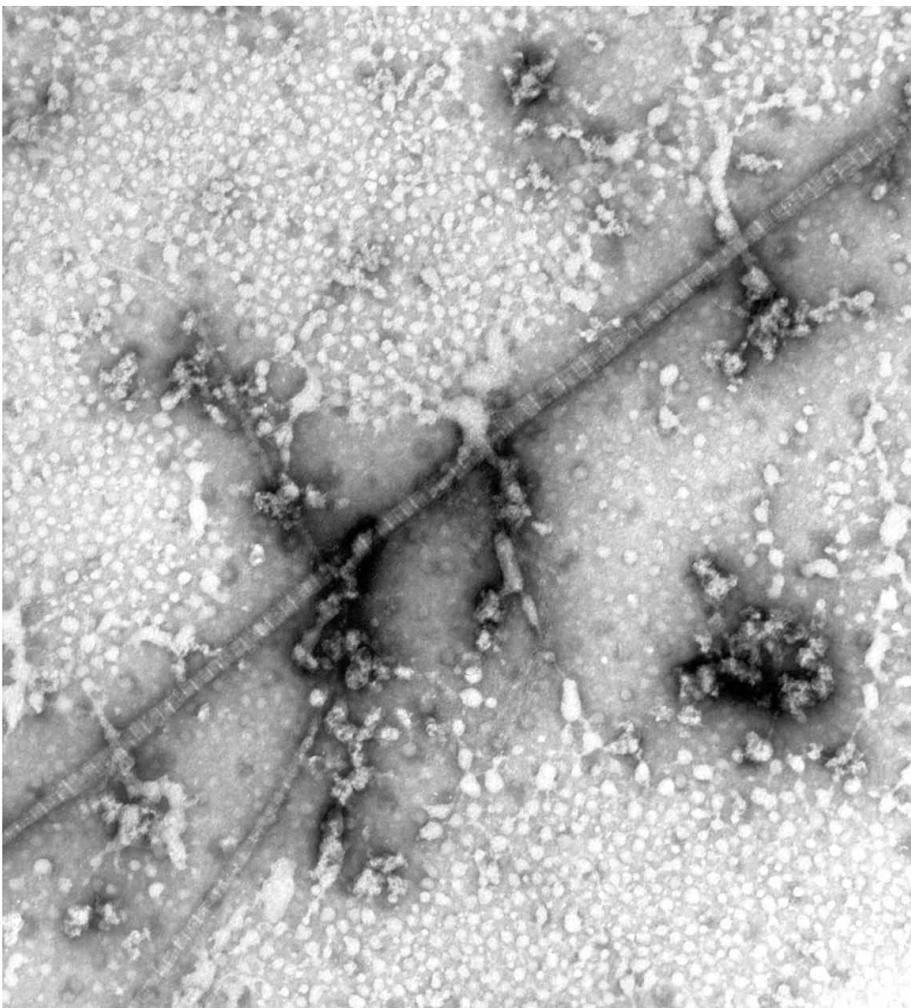
Abb. 9 Paraffinschnitte des Skeletts von ganzen neugeborenen Mäusen, die mit Alcian-Blau und Alizerin-Rot behandelt wurden in 40 facher Vergrößerung

In den Skelettschnitten der drei neugeborenen Mäuse finden sich keine Skelettanomalien oder auffälligen Unterschiede in der Knorpel-Knochen Zusammensetzung auf lichtmikroskopischer Ebene. Die Rippen, die Wirbelkörper und die Gelenke zeigen einen vergleichbaren Aufbau. Die Knorpel- und Knochenanteile sind in Relation nahezu identisch zueinander.

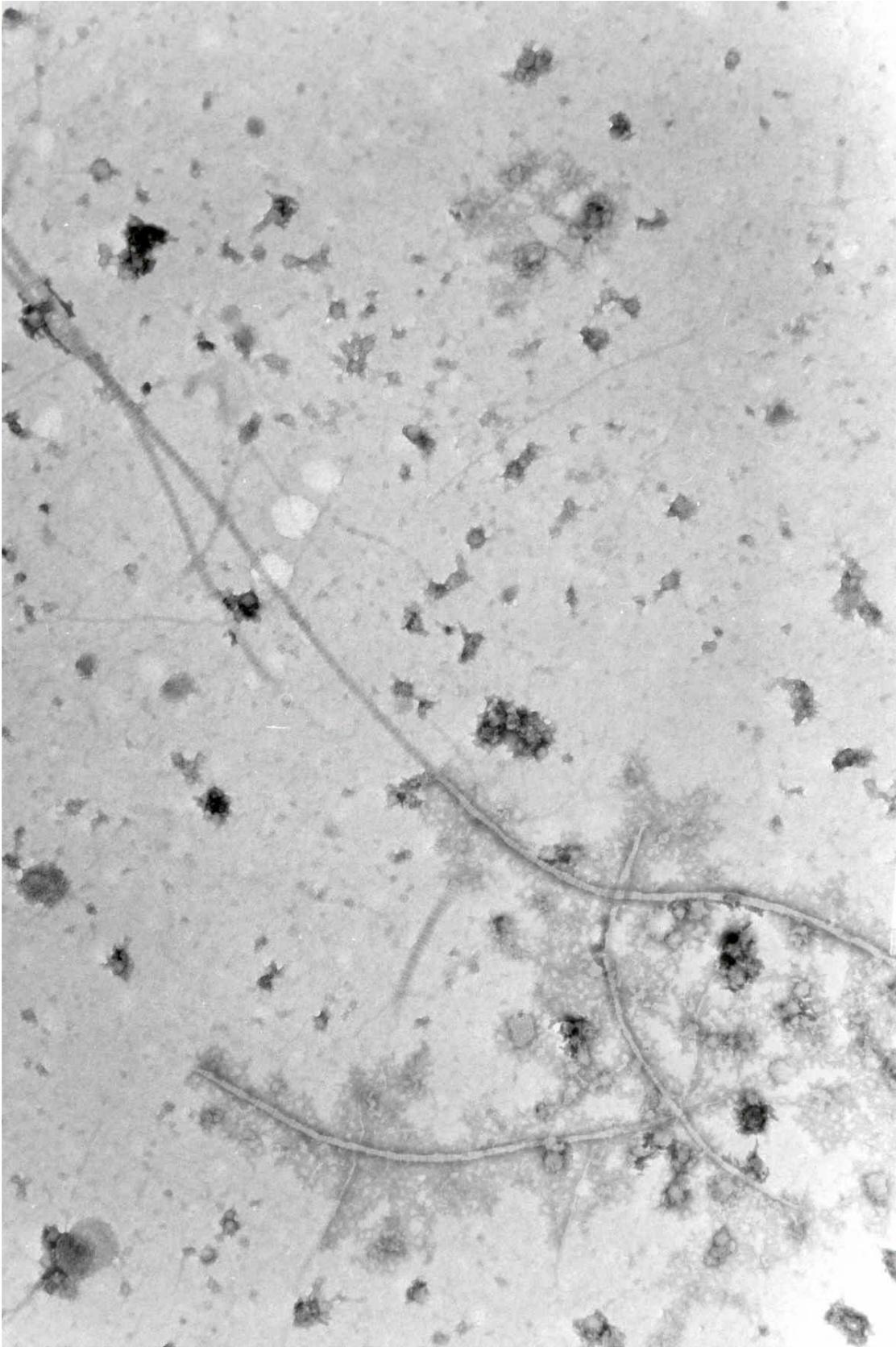
## zu 7. Fibrillen- Präparationen von homozygoten Decorin -/- und Wildtyp Mäusen

Zuletzt suchten wir in Fibrillen-Präparationen aus Rippenknorpel von 4-Wochen alten Wildtyp und Decorin-/- Mäusen nach Unterschieden in der Fibrillenlänge, im Durchmesser oder in der Fibrillendichte. Auch wäre eine Veränderung in der Fibrillenstruktur und im Aufbau der Fibrillen möglich.

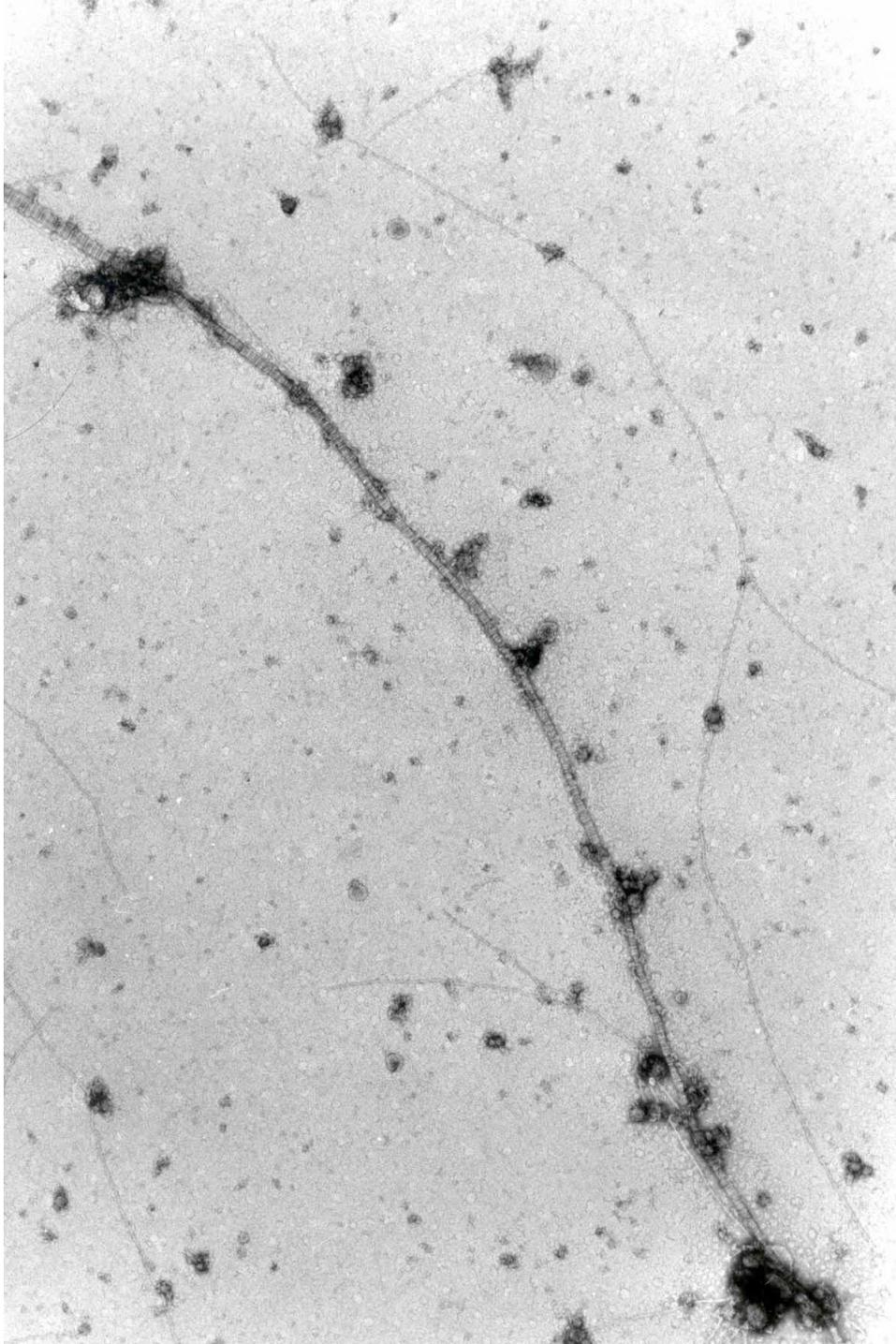
Decorin -/-



Decorin -/-



WT



WT

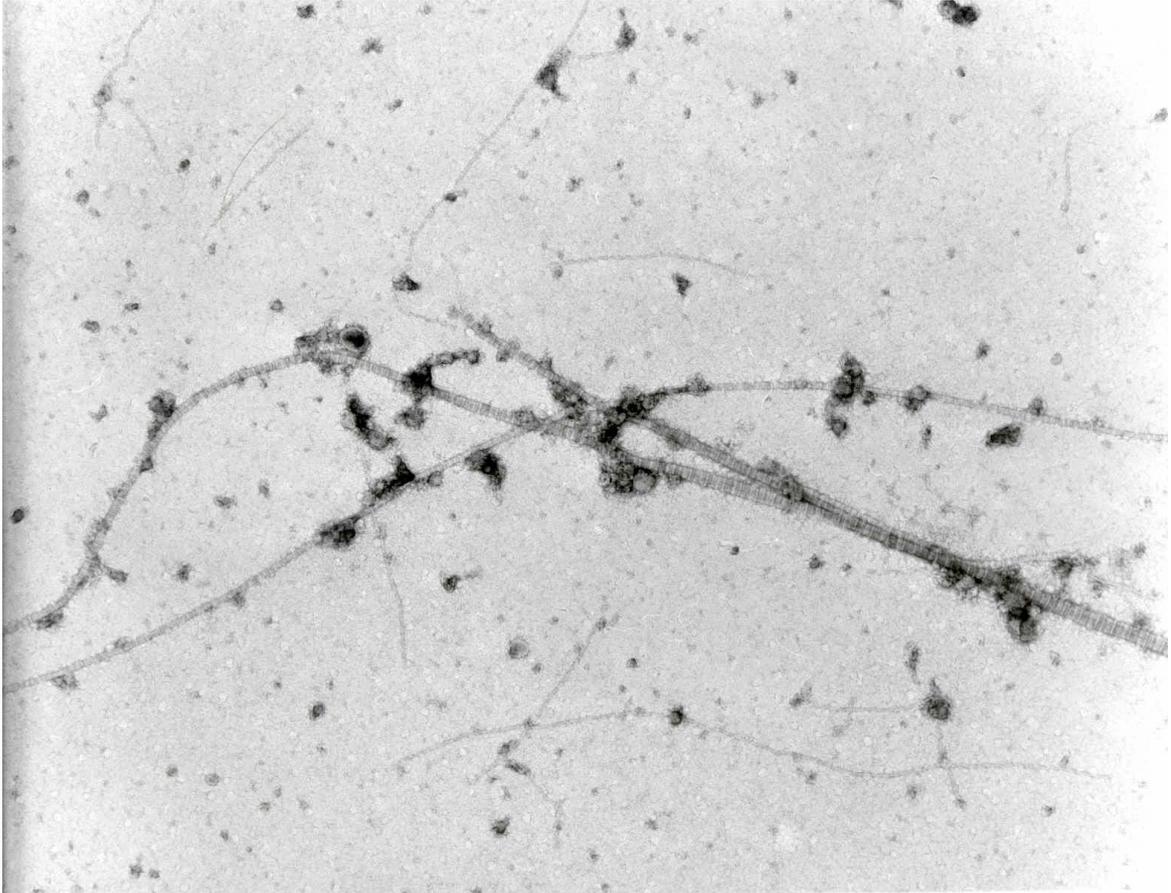


Abb. 10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibrillen-Präparationen von homozygoten Decorin und Wildtyp Mäusen in 200.000 facher Vergrößerung

Die von uns angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten keine deutlichen Veränderungen. Im Vergleich der Decorin- und Wildtyp- Fibrillen war kein offensichtlicher Unterschied in dem Aufbau und der Beschaffenheit der Fibrillen erkennbar. Auch die Fibrillendichte war ähnlich. Es müssten aber weitere und detailliertere Untersuchungen für spezifischere Aussagen im Hinblick auf die Fibrillenstruktur gemacht werden. So müssten zum Beispiel auch Fibrillen auf mehr Bildern ausgezählt werden, um genauere Informationen über die Fibrillendichte zu erhalten.

## V. Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Die Untersuchungen von transgenen Mäusen haben sich in den letzten Jahren mit erstaunlicher Geschwindigkeit entwickelt, da das Interesse sowohl an verschiedensten genetischen Manipulationen in vitro (Knock-Out- oder Knock-In-Experimente) als auch biochemischen Analysen in vivo gestiegen ist. Es gibt unterschiedliche Strategien, um genetisches Material zu verändern und eventuell dadurch verschiedene Phänotypen zu generieren. Zu diesen gehört der klassische Knockout, die sogenannte Nullmutation, bei der ein oder mehrere Gene aus der DNA „ausgeknoct“ werden. Hierbei wird mit Hilfe eines Zielvektors ein auserwähltes Gen geblockt, damit es nicht mehr transkribiert und so die normale Genfunktion unterbrochen wird. Dieser Ziel- oder Knockout-Vektor beinhaltet einen Selektions- Marker (neomycin- Gen) mit der Kodierungssequenz des genomischen DNA Fragmentes, der zu einer Unterbrechung im auserwählten Gen führt. Diese Strategie kann zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Zum Beispiel wird beobachtet, daß Mäuse, denen entweder Fibronectin oder auch DNA- Methylase fehlen, in der frühen Entwicklung sterben.

Im Gegensatz dazu gibt es auch Untersuchungen bei denen präzise Modifikationen in den vorhandenen Genen vorgenommen werden, sogenannte Knock- In- Experimente. Die effizienteste Methode dieser Knock-In-Experimente ist die „hit and run“ Strategie (Fässler et al.,1996).

Eine Reihe von Phänotypen können auch durch Mutationen in transgenen Mäusen oder durch natürliche Mutationen auftreten.

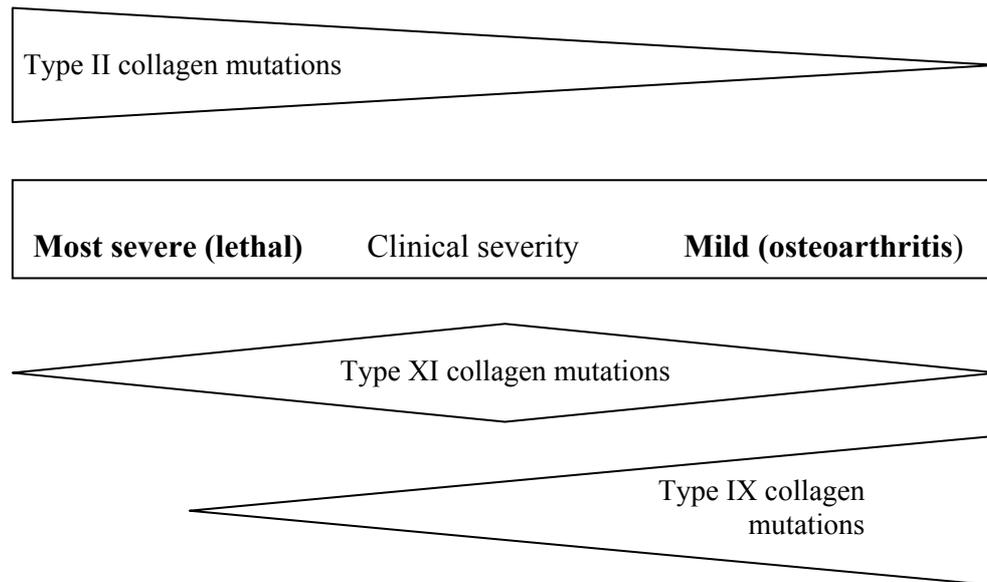


Abb. 1 Ein Spektrum von Phänotypen entstanden durch Mutationen von Knorpelkollagen- Genen (Olsen et al., 1995)

Das Diagramm zeigt die Vielfalt und Auswirkungen von Mutationen in den Genen der Kollagen Typen II, IX und XI aufgrund Untersuchungen von transgenen Mäusen sowie natürlichen Mutationen. Diese sind verantwortlich für eine große Reihe von Abnormitäten und Fehlbildungen, angefangen von Osteoarthrose bis hin zu letaler Chondrodysplasie. Mutationen im Col2A1 Locus führen zu mehr schwerwiegenden Erkrankungen (Osteoarthrose bis hin zu schweren Knorpeldysplasien) als solche bei Kollagen Typ IX. Mutationen bei Kollagen Typ IX führen eher zu Krankheitsbildern leichteren Schweregrades (leichtere Formen der Osteoarthrose bei Mutationen im Col9A1 Locus und multiple epiphysäre Dysplasien bei Mutationen im Col9A2 Locus). Mutationen bei Kollagen Typ XI verursachen Veränderungen im Netzwerk und in der Organisation der Knorpelfibrillen, da bei Abwesenheit von Kollagen Typ XI die Fibrillen abnormal dick und die Chondrozyten hypertrophiert erscheinen. Der Schweregrad reicht von intrauterinem Tod, Osteochondrodysplasien bis zu leichten arthrotischen Veränderungen. Man vermutet eine genetische Prädisposition an Osteoarthrose zu erkranken bei familiären Kollagen XI- Mutationen (Olsen et al., 1995).

Ziel unserer Studie war es doppelt homozygote Decorin<sup>-/-</sup> und  $\alpha 1$  Kollagen IX<sup>-/-</sup> Mäuse zu erhalten. Bereits zuvor wurden homozygote Decorin und Kollagen IX Mäuse getrennt beschrieben.

Die Decorin<sup>-/-</sup> homozygote Maus ist lebens- und vermehrungsfähig. Elektronenmikroskopische Studien zeigen eine abnormale Kollagenfibrillenmorphologie in Haut und Sehnen, sowie eine erhöhte Hautfragilität mit reduzierter Belastbarkeit ab einem Lebensalter von 9 Monaten ( Danielson et al., 1997).

Die  $\alpha 1$  Kollagen IX<sup>-/-</sup> homozygote Maus ist ebenfalls lebens- und vermehrungsfähig. Sie zeigt einen normalen Phänotyp und keine erkennenswerten Skelettveränderungen zum Zeitpunkt der Geburt. Es treten mit zunehmendem Lebensalter vermehrt degenerative Erkrankungen des Knorpels auf, die humaner Arthrose ähneln (Fässler et al., 1994).

Da die einzelnen Knockout-Mäuse keine auffälligen Veränderungen und neuen Erkenntnisse in Bezug auf den Aufbau und die Zusammensetzung von Knorpel (insbesondere Gelenkknorpel oder Wirbel) zeigen, haben wir einen Doppel- Knockout von Decorin und  $\alpha 1$ Col(IX) generiert, um die Rolle dieser Knorpelbestandteile besser erklären zu können. Fraglich war, ob bei gemeinsamer Abwesenheit von Decorin und Kollagen IX überhaupt noch funktionstüchtiger Knorpel gebildet werden kann oder ob sie funktionell redundant und somit durch andere Komponenten ersetzbar sind. Können lebensfähige Mäuse gezüchtet werden, die sich auch weiter vermehren können? Wenn ja, könnten vielleicht andere Komponenten, die auch in Knorpel vorkommen, wie Lumikan, Biglykan, Fibromodulin, Kollagen Typ XII und Typ XIV Ersatzfunktionen übernehmen. Diese könnten dann im Vergleich zu Wildtyp Mäusen unterschiedlich exprimiert sein.

Wir züchteten zunächst homozygote Decorin und  $\alpha 1$  Kollagen IX defiziente Mäuse, um diese dann miteinander verpaaren zu können. Diese Nachkommen (doppelt heterozygote Decorin und  $\alpha 1$  Kollagen IX Mäuse (Dec<sup>+/-</sup> und Col IX <sup>+/-</sup>)) bekamen erneut Nachwuchs und so erhielten wir doppelt defiziente Mäuse. Wir konnten zeigen, daß keine Genexpression von  $\alpha 1$  Kollagen IX und Decorin vorhanden war und weitere Untersuchungen durchführen.

Wir genotypisierten 225 Nachkommen von jeweils Decorin und  $\alpha 1$ Kollagen IX doppelt heterozygoten Mäusen (Dec +/- und Col +/-).

Von diesen **225** Tieren (100%) waren **28** Kollagen IX-/- homozygot (entsprechen 12.4%) und **62** Decorin-/- homozygot (entsprechen 27.6%)

Dies entspricht einem ungefähren Verhältnis von 1:2 und zeigt eine deutliche Unterrepräsentation der Kollagen IX defizienten Mäuse. Normalerweise hätten wir eine annähernd gleiche Verteilung erwartet. Finden sich abnormale Embryonen mit einem Knorpeldefekt der nicht mit dem Leben vereinbar ist und sterben deswegen intrauterin schon Tiere ab? Gibt es einen letalen Phänotyp mit schwacher Penetranz bei den Kollagen IX defizienten Mäusen? Sicherlich war auffällig, daß ohne offensichtliche Erklärung deutlich weniger homozygote Kollagen IX-/- Mäuse geboren wurden.

Insgesamt betrachtet erhielten wir von diesen **225** Tieren (siehe ausführliche Tabelle im Ergebnisteil):

**10** Doppel-Null-Mäuse (entsprechen 4.4%)

**41** Decorin -/- Kollagen IX +/- Mäuse (entsprechen 18,2%)

**12** Decorin +/- Kollagen IX -/- Mäuse (entsprechen 5,3%)

Verpaart man zwei jeweils doppelt heterozygote Mäuse miteinander, so müßte nach der Mendel'schen Vererbungslehre der Anteil der doppelt homozygoten Tiere 1/16 (entsprechen 6.25%) betragen. Wir hätten in unserer Studie also 14 Tiere erwartet, erhielten allerdings nur 10 (entsprechen 4.4%). Diese Differenz ist wahrscheinlich der natürlichen Variationsbreite zuzuordnen.

Allerdings sind die Kollagen IX defizienten Mäuse in allen Genotyp-Kombinationsmöglichkeiten unterrepräsentiert, am deutlichsten bei dem Genotyp Dec +/- Col IX-/- mit 12 gefundenen Tieren (entspricht 5.3%) bei erwarteten 28 Tieren (entspricht 12.5%) sowie etwas schwächer bei Dec+/+ Col IX-/- mit 6 gefundenen (entspricht 2.7%) bei erwarteten 14 Tieren (entspricht 6.25%).

Durch in situ Hybridisationen konnte Kollagen Typ IX in der Embryonalentwicklung von Mäusen am zwölften Tag postcoitum im Knorpel nachgewiesen werden (Savontaus et al., 1998). Aufgrund der verringerten Anzahl der Kollagen IX defizienten Mäuse könnte man trächtige Mäuse nach dem zwölften Tag (also nachdem Kollagen Typ IX exprimiert wird) untersuchen. Damit könnte man abnormale Embryonen, die einen

Knorpeldefekt besitzen, der nicht mit dem Leben vereinbar ist, finden und somit ein intrauterines Absterben beweisen.

Weitere Untersuchungen unseres Arbeitskreises konnten inzwischen zeigen, daß die doppelt defizienten Mäuse einen Nieren- Phänotyp mit limitierter Penetranz besitzen. Es findet sich das Krankheitsbild der Hydronephrose, allerdings immer nur einseitig, nie waren beide Nieren betroffen.

Von ganzen neugeborenen Tieren der Genotypen Decorin defizient, Kollagen IX defizient, Decorin und Kollagen IX doppelt defizient, Decorin und Kollagen IX doppelt heterozygot und Wildtyp wurde RNA gewonnen und mittels RT-PCR weiter untersucht. Zuerst konnten wir zeigen, daß weder Decorin, noch  $\alpha 1$  Kollagen IX in den doppelt defizienten Mäusen exprimiert wurde. Als Qualitätskontrolle für die Gesamt-RNA wurde Lumikan benutzt, welches bei allen Genotypen die gleiche Bandengröße aufwies. Zur Abklärung der Frage, ob andere extrazelluläre Knorpelbestandteile (Lumikan, Biglycan, Fibromodulin,  $\alpha 1$ Col(XII) und  $\alpha 1$ Col(XIV)) durch Genexpressionsänderungen eine Ersatzfunktion übernehmen können, führten wir mit der Gesamt-RNA Northern-Blot-Analysen durch. Drei dieser Blots wurden quantitativ ausgewertet und in Beziehung zu GAPDH als Kontrollgröße (interner Standard) gesetzt.

Die Northern Blot Analyse zeigte eine Reduktion der Genexpression von Lumikan bei den Doppel- Null- Mäusen (DC<sup>-/-</sup>) um ca. 50% und bei den homozygoten Decorin<sup>-/-</sup> Mäusen (Dec<sup>-/-</sup>) um ca. 60%.

Die Gene von Lumikan, Epiphycan und Decorin liegen nahe zusammen auf Chromosom 10 (Danielson et al., 1998). Wenn man davon ausgeht, daß sie eine gemeinsame Regulation haben, wäre dadurch vielleicht die Verminderung der Genexpression von Lumikan bei den Doppel- Null- Mäusen (DC<sup>-/-</sup>) und den homozygoten Decorin- Mäusen (Dec<sup>-/-</sup>) zu erklären?

Es wäre hier interessant zu wissen, ob auch Epiphycan weniger stark in Doppel- Null- Mäusen bzw. in homozygoten Decorin<sup>-/-</sup> Mäusen exprimiert wird und ob hier Zusammenhänge mit den gefundenen Hautveränderungen der homozygoten Decorin Mäusen vorliegen, da Epiphycan auch in der Extrazellulärmembran vorkommt. Epiphycan ist ein kleines Proteoglycan, das erstmalig 12 Tage nach Empfängnis in

hohen Dosen in Strukturen, aus denen sich später Knorpel entwickelt, nachgewiesen werden kann. Die Genexpression von Epiphykan ist ein Marker für die Chondrogenese und in der Wachstumszone besonders hoch (Johnson et al., 1999).

Die Northern-Blot-Analyse zeigte zusätzlich eine ca. 20%ige Reduktion von Biglycan bei den DC<sup>-/-</sup> Mäusen. Interessanterweise besitzt Decorin auch Ähnlichkeiten mit Biglycan, die beide ein stark homologes Proteincore, welches sich in drei Domänen unterteilen läßt, besitzen (Fisher et al., 1989). Im Gegensatz zu Decorin zeigt Biglycan nur eine geringe Bindungstendenz zu Kollagen Typ I (Brown and Vogel, 1989).

Auffällig war, daß alle untersuchten Gene bei den  $\alpha 1$ Col(IX)<sup>-/-</sup> Mäusen weniger exprimiert waren. Die Reduktion bei Biglycan betrug ca. 40%, bei Fibromodulin ca. 30%, bei Lumikan ca. 30%, bei  $\alpha 1$ Col(XII) ca. 40% und bei  $\alpha 1$ Col(XIV) ca. 70%. Wir verwendeten allerdings nur Gesamt-RNA von neugeborenen Mäusen.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wäre es interessant, die RNA spezifischer Gewebe, zum Beispiel Knorpelgewebe zu untersuchen, denn Kollagen Typ IX kann neben einer hohen Genexpression im Knorpelgewebe, auch zusätzlich in den Augen und in geringeren Mengen im Gehirn, in der Niere und der Haut von neugeborenen Mäusen gefunden werden (Perälä et al., 1997). Die technische Schwierigkeit besteht jedoch darin, aus Mäuseembryonen eine ausreichende Menge an Knorpelgewebe zu extrahieren. Da wir in unserer Studie eine Quantifizierung vornehmen wollten um genaue Angaben, in welchem Verhältnis diverse Knorpelkomponenten exprimiert werden, zu erhalten untersuchten wir die RNA von ganzen Embryonen mittels rtPCR und Northern Blots.

Eine andere Methode ist die in situ Hybridisation, bei der spezifische Gewebe getrennt untersucht werden können. Allerdings ist dadurch keine Quantifizierung, sondern lediglich eine Lokalisation möglich. Durch diese Methode konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß die drei Ketten des Kollagen IX ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) eine enge Organisation in Chondrozyten, aber eine verminderte Koordination in nicht- knorpelhaltigem Gewebe während der Embryonalentwicklung besitzen (Perälä et al., 1997).

Keiner unserer zusätzlich auserwählten Knorpelbestandteile wurde vermehrt exprimiert. Gibt es vielleicht noch andere Komponenten, die man ausführlicher untersuchen sollte?

Man könnte zum Beispiel Epiphygan , als ein weiteres Proteoglycan der extrazellulären Matrix untersuchen, dem ebenfalls eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung zugesprochen wird (Danielson et al., 1998).

Da wir die Gesamt- RNA von ganzen neugeborenen Mäusen untersuchten, könnte vielleicht eine veränderte Genexpression aufgetreten bzw. kleine Unterschiede in der Expression von Lumikan, Biglycan, Fibromodulin, Kollagen Typ XII und XIV gar nicht aufgefallen sein, da diese Komponenten nicht nur spezifisch im Knorpel vorkommen. Bei einer Isolation von RNA lediglich aus Knorpelgewebe könnte man das Verhältnis der einzelnen Komponenten bei den doppelt homozygoten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp- Mäusen genauer bestimmen.

Zur weiteren Untersuchung des Knorpel-Knochen-Verhältnisses der unterschiedlichen Genotypen untersuchten wir Skelettschnitte von ganzen neugeborenen Mäusen. Sie wurden sowohl mit Alcian-Blau (färbt saureGlycosaminglycane), als auch mit Alizarin-Rot (Kalziumnachweis, färbt Knochen) behandelt. Es zeigten sich keine auffälligen Unterschiede im Skelettaufbau oder in der Knorpel-Knochen-Verteilung, sowohl in den Rippen, den Wirbelkörpern als auch in den Gelenken. Es muß daher davon ausgegangen werden, daß die neugeborenen Doppel-Null-Mäuse keine offensichtliche Skelettinstabilität oder reduzierte Belastbarkeit bezüglich des normalen Bewegungsablaufes und ihrer Aktivität aufweisen. Vielleicht sollte man allerdings Verlaufskontrollen von zum Beispiel 4 Wochen, 3 und 6 Monate alten Mäusen anfertigen. Hierbei könnte man eventuell eine Veränderung der entwicklungsbedingten Umwandlung von Knorpel in Knochen zeigen oder eine erhöhte Abbaurrate von Gelenkknorpel durch Knorpeldegenerationen. Könnten dann bei vermehrter Belastung oder spontan vielleicht pathologische Frakturen auftreten?

Interessant wäre ebenfalls die Frakturheilung bei diesen Mäusen zu beobachten. Benötigen sie zum Beispiel länger als eine Kontrollgruppe von Wildtyp-Mäusen um Kallus zu bilden und diesen in Knochen umzuwandeln? Können sie vielleicht keinen oder nur insuffizienten, nicht belastungsstabilen Kallus bilden, so daß dadurch keine adäquate Frakturheilung entsteht? Das würde bedeuten, daß zwar zu Geburt ein anscheinend normal angelegtes Skelett vorliegt, aber während der Entwicklung Defizite (Umwandlungsstörung, vermehrte Knorpeldegeneration) auftreten und die Stabilität des

Skelettes der adulten Mäuse sowie die Reparabilität bei Frakturen stark eingeschränkt wäre.

Frakturheilung und Kallusbildung ist abhängig von der Stabilität des Frakturspaltes und dem verwendeten Osteosynthesematerial. Immunhistochemische Studien zeigten, daß mRNA von Kollagen IX, welches über kovalente Bindung mit Kollagen II verknüpft ist, bei stabilen Frakturen vermehrt in dem Frakturspalt während der Heilung nachgewiesen werden konnte. Kollagen IX ist damit ein wichtiger Parameter für das Vorhandensein von Kallusbildung bei der Frakturheilung (Hankemeier et al., 2000).

In unserer Studie wurden doppelt homzygote Decorin<sup>-/-</sup> und  $\alpha 1$  Kollagen IX<sup>-/-</sup> Mäuse gezüchtet. Augenscheinlich bestehen keine Skelettanomalien, es kann also trotzdem Knorpel bzw. Knochen normal gebildet werden. Aber hat die Abwesenheit von Kollagen IX somit Auswirkungen auf die Stabilität des Knorpels und die Frakturheilung? Kann eventuell nur belastungsschwächerer Knorpel gebildet werden? Zu dieser Fragestellung könnte man einmal Mäuse unter Belastung (Drehrad, Stufenleiter) und mechanisch induzierte Frakturen untersuchen.

Weitere Studien zeigen, daß ein Allel vom Col9A2- Gen mit Krankheiten der Zwischenwirbelscheiben assoziiert ist. Im Nucleus pulposus der Bandscheibe findet man neben Aggrecan auch Kollagen IX. Ergebnisse zeigen, daß Mutationen von Kollagen IX und Aggrecan bei älteren Mäusen Degenerationen und Prolapse der Zwischenwirbelscheiben verursachen können (Annunen et al., 1999). Interessant wäre es, die Bandscheiben bei unseren defizienten Mäusen zu untersuchen, da hier Kollagen IX fehlt. Führt nur eine Mutation von Kollagen IX zu Veränderungen der Zwischenwirbelscheiben oder auch die vollständige Abwesenheit bei unseren doppelt defizienten Mäusen? Man könnte bei Neugeborenen und im Verlauf von 1, 3 und 6 Monaten alter Mäuse den Aufbau und die Beschaffenheit der Zwischenwirbelscheiben untersuchen.

Mutationen in Col9A2, Col9A3, COMP (cartilage oligomeric matrix protein) und MATR3 (Matrilin3) Genen, alles extrazelluläre Knorpelmatrixbestandteile, werden gehäuft in Verbindung mit dem Krankheitsbild der multiplen epiphysären Dysplasie

(MED) gefunden. In einer klinischen Studie wurden aktuell auch Mutationen im Col9A1- Gen in diesem Zusammenhang entdeckt. Man vermutet allerdings, daß Mutationen in Col9A1, Col9A2, Col9A3 und COMP nicht alleine verantwortlich für die Entwicklung einer MED sind (Czarny- Ratajczak et al., 2001). Mutationen von Kollagen IX spielen jedoch eine wichtige Rolle vor allem bei der Osteochondrosis dissecans und der Osteoarthrose der Kniee (Lohiniva et al., 2000). Man könnte radiologische und immunhistochemische Untersuchungen bei unseren defizienten Mäusen durchführen, um nach epiphysären Dysplasien zu suchen.

Für genauere Aussagen über die Fibrillenstruktur untersuchten wir Fibrillenpräparationen aus Rippenknorpel von 4 Wochen alten Wildtyp- und homozygoten Decorin-/- Mäusen. Die bereits entdeckte Hautfragilität bei den homozygoten Decorin Mäusen korrespondiert mit einer unterschiedlichen Dichte, Dicke und Struktur der Kollagenfibrillen (Danielson et al., 1997). Wir analysierten, ob auch im Knorpel der Decorin-/- Mäuse Differenzen in der Fibrillenmorphologie und im Aufbau der Kollagenfibrillen bestehen und ob dadurch vielleicht vermehrte Instabilität oder verringerte Knorpelmasse auftreten können. Wir fertigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibrillenpräparationen aus Rippenknorpel von 4 Wochen alten Wildtyp- und Decorin defizienten Mäusen an, die keine offensichtlichen Unterschiede zeigten. Auf den ersten Blick offenbarten sich keine besonderen Auffälligkeiten. Um genauere Informationen zu erhalten, müßten allerdings detaillierte Studien angefertigt werden. Zum Beispiel sollten mehr elektronenmikroskopische Präparate angefertigt und ausgezählt werden, zusätzlich sollten die Knorpelfibrillen in bezug auf Dicke, Länge und Dichte ausgewertet werden. Dadurch könnte man ein Verhältnis von dicken (50- 200 nm) zu dünnen (20- 25nm) Fibrillen bei Wildtyp und homozygoten Decorin Mäusen bestimmen.

Decorin besitzt die Fähigkeit Wachstumsfaktoren zu binden und spielt möglicherweise eine entscheidene Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, da es Anteil an der Inaktivierung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  hat (Yamaguchi et al. 1990). Man könnte bei den homozygoten Decorin-/- Mäusen die Zellproliferation genauer untersuchen, um diese Rolle zu klären, da Decorin auch Einfluß auf die Zellteilung/ Mitose hat.

Homozygote Decorin<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln spontan kein vermehrtes Tumorwachstum. Um die Rolle von Decorin in der Tumorgenese zu untersuchen, wurde in Verbindung mit einem zusätzlichen Knockout von p53, einem Tumorsuppressorgen, ebenfalls eine Doppel- Knockout- Maus gezüchtet. Hier zeigte sich eine generell schnellere Tumorentwicklungsrate, sowie ein gehäuftes Auftreten besonders von Thymuslymphomen, als bei Kontrollmäusen. Die mittlere Überlebenszeit dieser Mäuse betrug 4 Monate. Kulturen dieser Lymphomzellen zeigten ein schnelleres Zellwachstum bei der Abwesenheit von Decorin (Iozzo et al., 1999). Eventuell verursachen auch tumoröse Prozesse im Zusammenhang mit Fehlbildungen bei unseren Mäusen ein intrauterines Absterben.

Vielleicht zeigen sich bei unserer Doppel- Knockout- Maus auch Unterschiede in der frühen Phase der Organdifferenzierung bzw. der späteren Organentwicklung. Hierzu könnte man bei Neugeborenen sowie bei ausgewachsenen Mäusen (zum Beispiel 3 oder 6 Monate alt) verschiedene Organe wie Niere, Milz, Lunge und Leber auf zum Beispiel tumoröse Veränderungen, Zystenbildungen und Enzymproduktion untersuchen.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie lebens- und vermehrungsfähige Decorin und  $\alpha 1$  Kollagen IX homozygote Mäuse ohne offensichtliche phänotypische Abnormitäten. Die Gesamtzahl der Tiere ist minimal geringer als erwartet, aber die Anzahl der Kollagen IX defizienten Mäuse ist bei allen Genotyp- Kombinationsmöglichkeiten deutlich verringert. Eventuell gibt es einen letalen Phänotyp der Kollagen IX defizienten Mäuse mit limitierter Penetranz. Die Northern Blot Analysen von Gesamt RNA von neugeborenen Mäusen zeigen eine ca. 50%ige Reduktion von Lumikan und eine ca. 20%ige von Biglycan. Es müssen neben Kollagen Typ IX und Decorin, die funktionell redundant zu sein scheinen, andere Knorpelbestandteile essentiell für den Aufbau und die Differenzierung von Knorpel sein.

## VI. Literaturverzeichnis

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1990. *Molekular Biology of the Cell*, Second Edition, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: 956-957

Annunen, S., P.Paassilta, J. Lohiniva, M. Perälä, T. Pihlajamaa, J. Karppinrn, O. Tervonen, H. Kröger, S. Lähde, H. Vanharanta, L. Ryhänen, H.H. Göring, J. Ott, D.J. Prockop and L. Ala-Kokko. 1999. An Allele of COL9A2 Associated with Intervertebral Disc Disease. *Science* Vol 285

Argraves, W.S., F. Deak, K.J. Sparks, I. Kiss and P.F. Goetinck. 1987. Structural features of cartilage matrix protein deduced from cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 464-468

Ayad, S., H.Evans, J.B. Weiss and L.Holt. 1984. Type VI collagen but not type V collagen is present in cartilage. *Collagen Rel. Res.*, IV: 165-168

Ayad, S., A. Marriott, K. Morgan and M.E. Grant. 1989. Bovine cartilage type-VI and type-IX collagens. Characterization of their forms in vivo. *Biochem J* 262: 753-761

Bengtsson, E., P J. Neame, D. Heinegard and Y. Sommarin. 1995. The primary structure of a basic leucine- rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem* 270: 25639-25644

Bianco,P., L.W. Fisher, M.F. Young, J.D. Termine and P.G. Robey. 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

Bidanset, DJ., C. Guidry, L.C. Rosenberg, H.U. Choi, R. Timpl and M. Höök. 1992. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type- VI. *J Biol Chem* 267: 5250-5256

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

Blochberger, T., J.-P Vergnes, J. Hempel and J. Hassel. 1992. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem* 267: 347-352

Bonaldo, P., V. Russo, F. Bucciotti, R. Doliana and A. Colombatti. 1990. Structural and functional features of the  $\alpha 3$  chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochem* 29: 1245-1254

Bonnet, F., J.P Perin and P. Jolles. 1978. Isolation and chemical characterization of two distinct "link proteins" from bovine nasal cartilage proteoglycan complex. *J Bio Chem* 532: 242-248

Brewton, R.G., D.W. Wright and R. Mayne. 1991. Structural and functional comparison of type IX collagen-proteoglycan from chicken cartilage and vitreous humor. *J Biol Chem* 266: 4752-4757

Brighton, C. T. 1978. Structure and function of the growth plate. *Cli Orthop* 136: 22-32

Brown, D.C. and K.G. Vogel. 1989. Characteristics of the in vivo interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. *Matrix* 9: 468-478

Bruckner, P., L. Vaughan and K.H. Winterhalter. 1985. Type IX collagen from sternal cartilage of chicken embryo contains covalently bound glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2608-2612

Bruckner, P., M. Mendler, B. Steinmann, S. Huber and K.H. Winterhalter. 1988. The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils. *J Biol Chem* 263: 16911-16917

Bruckner, P. and M. van der Rest. 1994. Structure and Function of Cartilage Collagens. *Microscopy Research and Technique* 28: 378-384

Burgeson, R.E. 1987. Type VII Collagen. In: *Structure and Function of Collagen Types* (Mayne, R., Burgeson, R.E., Hrsg.), Academic Press, New York: 145-172

Caplan, A.I. 1984. Knorpel. *Spektr. d. Wissenschaft* Dezember:106-115

Chu, M.L., R.Z. Zhang, T. Pan, D. Stokes, D. Conway, H.J. Kuo, R. Glanville, U. Mayer, K. Mann, R. Deutzmann and R. Timpl. 1990b. Mosaic structure of globular domains in the human type VI collagen  $\alpha 3$  chain: Similarity to von Willebrand Factor, fibronectin, actin, salivary, proteins and aprotinin type protease inhibitors. *EMBO J* 9: 385-393

Czarny-Ratajczak, M., J. Lohiniva, P. Rogala, K. Kozłowski, M. Perälä, L. Carter, T.D. Spector, L. Kolodziej, U. Seppanen, R. Glazar, J. Krolowski, A. Latos-Bielenska and L. Ala-Kokko. 2001. A Mutation in COL9A1 Causes Multiple Epiphyseal Dysplasia: Further Evidence for Locus Heterogeneity. *Am J Hum Genet* 69(5)

Danielson, K.G., H. Baribault, D.F. Holmes, H. Graham, K.E. Kadler and R. V. Iozzo. 1997. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136: 729-743

Danielson, K.G., L.D. Siracusa, P.J. Donovan and R.V. Iozzo. 1998. Decorin, epiphycan, and lumican genes are closely linked on murine Chromosome 10 and are deleted in lethal steel mutants. *Mammalian Genome* 10: 201-203

Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore. 1993. *Molekulare Zellbiologie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York

Descalzi-Cancedda, F., P. Manduca, C. Tacchetti, P. Fossa, R. Quarto and R. Cancedda. 1989. Developmentally regulated synthesis of a low molecular weight protein (Ch21) by differentiating chondrocytes. *J Cell Biol* 107: 2455-2463

DiCesare, P. E., M. Mörgelin, K. Mann and M. Paulsson. 1994a. Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem* 223: 927-937

DiCesare, P, N. Hauser, D. Lehman, S. Paswnarti and M. Paulsson. 1994b. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.* 354: 237-240

Doerge, K., M Sasaki, E. Horigan, J.R. Hassel and Y. Yamada. 1987. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J Biol Chem* 262: 17757-17767

Doerge, K.J., M. Sasaki, T. Kintura and Y. Yamada. 1991. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan: human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 266: 894-902

Doliana, R., P. Bonaldo and A. Colombati. 1990. Multiple forms of chicken  $\alpha 3(\text{VI})$  collagen chain generated by alternative splicing in type A repeated domains. *J Cell Biol* 111: 2197-2205

Dublet, B. and M. van der Rest 1991. Type XIV collagen, a new homotrimeric molecule extracted from fetal bovine skin and tendon, with a triple helical disulfide-bonded domain homologous to type IX and type XII collagens. *J Biol Chem* 266: 6853-6858

Eggl, P.S., E.B. Hunziker and R.K. Schenk. 1988. *The Anatomical Record*: 217-227

Eikenberry, E.F., M. Mendler, R. Bürgin, K.H. Winterhalter and P. Bruckner. 1992. Fibrillar organization in cartilage. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J. G. Peyron, and V. C. Hascall, editors. Raven Press, New York: 133-149

Eikenberry, E.F. and P. Bruckner. 1999. *Supramolecular Structure of Cartilage Matrix. Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Accademic Press: 289-300

Eyre, D. and J.-J. Wu. 1987. Type XI or  $1\alpha 2\alpha 3\alpha$  collagen. In *Structure and Function of Collagen Types*. R. Mayne and R.E. Burgeson, editors. Academic Press, New York: 261-281

Eyre, D.R., J.J. Wu and C. Niyibizi. 1990. The collagens of bone and cartilage: molekular diversity and supramolekular assembly. In: Cohn, D.V., Glorieux, F.H.; Martin, T.J., eds. *Calcium regulation and boun metabolism*. Elsevier: 188-194

Eyre, D.R., J.J. Wu and P. Woods. 1992. Cartilage-specific collagens -structural studies. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron and V.C. Hascall, editors. Raven Press, NewYork:119-131

Fässler, R.,P.N.J. Schnegelsberg, J. Dausman, T. Shinya, Y. Muragaki, M.T. McCarthy, B.R. Olsen and R. Jaenisch. 1994. Mice lacking  $\alpha 1(\text{IX})$  collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5070-5074

Fässler, R.,K. Martin, E. Forsberg, T. Litzemberger and A. Iglesias. 1996. Knockout Mice: How to Make Them and Why: The Immunological Approach. *Int Arch Allergy Immunol*: 538

Fawcett, D.W. 1986. *A Textbook of Histology*, 11.th ed, Saunders, Philadelphia: 188-238

Fisher, L W ., J.D .Termine and M. F .Young. 1989. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several non-connective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 264: 4571-4576

Flannery, C., V. Stanescu, M. Mörgelin, R. Boynton, J. Gordy and J. Sandy. 1992. Variability in the G3 domain content of bovine aggrecan from cartilage extracts and chondrocyte cultures. *Arch Biochem Biophys* 297: 52-60

Fleischmajer, R., L W. Fisher, E.D. MacDonald, L Jacobs, J.S. Perlish and J.D. Tennine. 1991. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J Struct Biol* 106: 82-90

Fosang, A.J., and T.E. Hardingham. 1989. Isolation of the N-terminal globular protein domains from cartilage proteoglycans. Identification of G2 domain and its lack. *Biochem .J* 261 :801-809

Fransson, L.A, L Cöster, A. Malmström and J.K. Sheehan. 1982. Self-association of scleral proteodermatan sulfate. Evidence for interaction via the dermatan sulfate side chains. *J Biol Chem* 257: 6333-6338

Frazier, W.A. 1987. Thrombospondin: A modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* 105: 625-632

Fülop, C., E. Walcz, M. Valyon and T.T. Glant. 1993. Expression of alternatively spliced epidermal growth factor- like domains in aggrecans of different species. Evidence for a novel module. *J Biol Chem* 268: 17377-17383

Gadher, S.J., D.R Eyre, V.C. Duance, S.F. Wotton, L.W. Heck. T.M. Schmid and D.E. Wooley. 1990. Susceptibility of cartilage collagens type II, IX, X and XI to human synovial collagenase and neutrophil elastase. *Eur J Biochem* 175: 1-7

Galvin, N.J., P.M. Vance, V.M. Dixit, B. Fink and W.A. Frazier. 1987. Interaction of human thrombospondin with types I -V collagen: direct binding and electron microscopy. *J Cell Biol* 104: 1413- 1422

Gordon, M., D. Gerecke and B.R. Olsen. 1987. Type XII collagen: distinct matrix component discovered by cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6040-6044

Gordon, M.K and B.R. Olsen. 1990. The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies. *Curr Op Cell Biol* 2: 833- 838

Grover, J. and P.J. Roughley. 1993. Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation with aggrecan. *Biochem J* 291: 361-367

Grover, J., X.N. Chen, J.R. Korenberg and P.J. Roughley. 1995. The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem* 270: 21942-21949

Grover, J., X. Chen, J.R. Korenberg, A.D. Recklies and P.J. Roughley. 1996. The Gene Organization, Chromosomal Location and Expression of a 55-kDa Matrix Protein (PRELP) of Human Articular Cartilage. *Genomics* 38: 109-117

Hagg, R., E. Hedbom, U. Möllers, A. Aszodi, R. Fässler, P. Bruckner. 1997. Absence of the  $\alpha 1(\text{IX})$  Chain Leads to a Functional Knock-out of the Entire Collagen IX Protein in Mice. *J.Biol.Chem.* 272: 20650-20654

Hagg, R., P. Bruckner and E. Hedbom. 1998. Cartilage Fibrils of Mammals are Biochemically Heterogeneous: Differential Distribution of Decorin and Collagen IX. *J Cell Biol* 142: 285-294

Halberg, D.F., G. Proulx, K. Doege, Y. Yamada and K Drickamer. 1988. A segment of the cartilage proteoglycan core protein has lectin-like activity. *J Biol Chem* 263: 9486-9490

Hall, B.K. *Cartilage*. Vols 1- 3. Academic Press. New York. 1983

Hankemeier, S., S. Grassel, G. Plenz, H.U. Spiegel, P. Bruckner and A. Probst. 2000. Alteration of fracture stability influences chondrogenesis, osteogenesis and immigration of macrophages. *J o Orthopaedic Res* 19: 531-538

Hauser, N. and M. Paulson. 1994. Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil  $\alpha$ -helix. : *Biol Chem* 269: 25747-25753

Hauser, N. 1995. Structure and interactions of cartilage matrix proteins. Ph D- Thesis, Biozentrum der Universität Basel

Hayashi. M., K. Hayashi. K. Iyama. R.L. Trelstad, T.F. Linsenmayer and R. Mayne. 1992. Notochord of chick embryos secretes short-form type IX collagen prior to the onset of vertebral chondrogenesis. *Devel Dynam* 194: 169-176

Hedbom. E. and D. Heinegard. 1989. Interaction of a 59- kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol.Chem* 264: 6898-6905

Hedbom, E., P. Antonsson, A. Hjerpe, D. Aeschlimann, M. Paulsson, E. Rosa-Pimentel, Y. Sommarin, M. Wendel, A. Oldberg and D. Heinegard. 1992. Cartilage Matrix Proteins- An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 267: 6132-6136

Hedbom, E. 1993. Characterization of a family of proteoglycans with the capacity to bind collagens. Ph D- Thesis. Medical Faculty, University of Lund

Hedbom, E. and D. Heinegard. 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 268: 27307-27312

Hedlund, H, S. Mengarelli- Widholm, F.P. Reinholt and O. Svensson. 1993. Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage. *Apmis* 101: 133-140

Hedlund, H., S. Mengarelli- Widholm, D. Heinegard, F.P. Reinholt and O. Svensson. 1994. Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol* 14 :227-232

Heinegard, D. and V.C. Hascall. 1974. Aggregation of cartilage proteoglycans. 3. Characteristics of the proteins isolated from trypsin digests of aggregates. *J Biol Chem* 249 :4250-4256

Heinegard, D. and I. Axelsson. 1977. Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans. *J Biol Chem* 249:1 971-1979

Heinegard, D.K., M. Paulsson, S. Inerot and C. Carlström. 1981. A novel low-molecular weight chondroitin sulphate proteoglycan isolated from cartilage. *Biochem J* 197 (2): 355-366

Heinegard, D., T. Larsson, Y. Sommarin, A. Franzen, M. Paulsson and E. Hedbom 1986. Two novel matrix proteins isolated from articular cartilage show wide distributions among connective tissues. *J Biol Chem* 261: 13866-13872

Heinegard, D.K and E.R. Pimentel. 1992. Cartilage Matrix Proteins, In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner, K., Schleyerbach, R., Peyron, J.G., Hascall, V.C., Hrsg.), Raven Press, New York: 95-111

Hinek, A., A. Reiner and A.R. Poole. 1987. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen chondrocalcin. *J Cell Biol* 104:1 435-1441

Hiraki, Y., H. Inoue, K. Iyama, A. Kamizono, M. Ochiai, C. Shukunami, S. Iijima, F. Suzuki and J. Kondo. 1997. Identification of Chondromodulin I as a Novel Endothelial Cell Growth Inhibitor. *J BiolChem* 272: 32419-32426

Homandberg, G.A. 2001. Cartilage Damage by Matrix Degradation Products: Fibrinectin Fragments. *Clin Orthop Res* 391: 100- 107

Horton, W.A. 1993. Morphology of connective tissue: cartilage. In *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. P .M. Royce and B. Steinmann, editor. Wiley- Liss Inc, New York. 73-84

Huber, S., K.H. Winterhalter and L. Vaughan. 1988. Isolation and sequence analysis of the glycosaminoglycan attachment site of type IX collagen. *J Biol Chem* 263: 752-756

Hunziker, E.B. 1992. Articular cartilage structure in humans and experimental animals. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. K.E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron and V .C. Hascall, editors. Raven Press, NewYork. 183-199

Hunziker, E.B. 1994. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 28: 505-519

Hynes, R.O. 1990. In *Fibronectins*. Springer, New York.

Iozzo, R. V. and A.D. Murdoch. 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

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

Iozzo, R.V. 1999. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 274: 18843-18846

Iozzo, R.V., F. Chakrani, D. Perrotti, D.J. McQuillan, T. Skorski, B. Calabretta and I. Eichstetter. 1999. Cooperative action of germ- line mutations in decorin and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6): 3092- 3097

Jacenco, O., B.R. Olsen and P.A. LuValle. 1991. Organization and regulation of collagen genes. *Crit Rev Eukariot Gene Expr* 1: 327-353

Johnson, J., T. Shinomura, H. Eberspaecher, G. Pinero, B. Decrombrugge and M. Hook. 1999. Expression and localization of PG- Lb/ epiphycan during mouse development. *Dev Dyn* 216 (4-5): 499- 510

Junqueira, L., and J. Carneiro. 1983. In *Basic Histology*. LANGE Medical Publications, Los Altos, California.

Karlson, P., D. Doenecke, J. Koolman. 1994. *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Keene, D.R., E. Engvall and R. W .Glanville. 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., G.P. Lunstrum, N.P. Morris, D.W. Stoddard and R.E. Burgeson. 1991a. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol* 113: 971-978

Keiser, H.F., H.J. Shulman and J.I. Sandson. 1972. Immunochemistry of cartilage proteoglycan. Immunodiffusion and gel- electrophoretic studies. *Biochem J* 126: 163-169

Kielty, C.M., S.P. Whittaker, M.E. Grant and C.A. Shuttleworth. 1992. Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 118: 979-990

Kielty, C.M., I. Hopkinson and M.E. Grant. 1993. The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. P.M. Royce and B. Steinmann, editors. Wiley-Liss Inc, New York. 103-147

Kirsch, T. 1992. Dissertation, Universität Erlangen, Deutschland

Kirsch, T., M. Pfäffle. 1992. Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implication of anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett* 310(2): 143-147

Kivirikko, K.I. 1993. Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med* 25: 113-126

Kosher, R.A. and M. Solursh. 1989. Widespread distribution of type II collagen during embryonic chick development. *Dev Biol* 131: 558-566

Kresse, H., H. Hausser and E. Schönherr. 1993. Small proteoglycans. *Experientia* 49: 403-416

Kristic, R.V. 1982. *Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Krumdieck, R., M. Höök, L. C. Rosenberg and J.E. Volanakis. 1992. The proteoglycan decorin binds C1q and inhibits the activity of the C1 complex. *J Immunol* 149: 3695-3701

Krusius, T., E. Ruoslathi. 1986. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7683-7687

Kühn, K. 1987. The classical collagens: type I, II and II, In: *Structure and Function of Collagen Types* (Mayne, R., R.E. Burgeson, Hrsg.), Academic Press, New York: 1-42

Kwan, A.P.L., C.E. Cunnings, J.A. Chapman and M.E. Grant. 1991. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J Cell Biol* 114: 597-604

Laherty, C.D., K. O'Rourke, K. Wikstrom, F.W. Wolf, R. Katz, P. Li and V.M. Dixit. 1992. Characterization of mouse thrombospondin- 2 sequence and expression during cell growth and development. *J Biol Chem* 267: 3274-3281

Lane, J.M. and C. Weiss. 1975. Review of articular cartilage collagen research. *Arthritis Rheum* 18: 553- 562

Larsson, T., Y. Sommarin, M. Paulsson. P. Antonsson. E. Hedbom. M. Wendel and D. Heinegard. 1991. Cartilage matrix proteins: A basic 36- kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone. *J Bio Chem* 266: 20428-20433

Lawler, J., M. Duquette, C.A Wittaker, J.C. Adams, K McHenry and D. W. DeSimone. 1993. Identification and characterization of thrombospondin 4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cel Bio* 120: 1059-1067

Lohiniva, J., P.Paassilta, U. Seppänen, O. Vierimaa, S. Kivirikko and L. Ala-Kokko. 2000. Splicing Mutations in the COL3 Domain of Collagen IX Cause Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Am J o Med Gen* 90: 216-222

Lunstrum, G.P., A.M McDonough, M.P. Marinkovich, D.R. Keene, N.P. Morris and R.E. Burgeson. 1992. Identification and partial purification of a large, variant form of type XII collagen. *J Biol Chem* 267: 20087-20092

Mansson, B., D. Carey, M. Alini, M. Ionesco, L.C. Rosenberg, A.R. Poole and T. Heinegard. 1995. Cartilage and bone metabolism in the rheumatoid arthritis. Differences in rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest* 95(3): 1071-1077

Marcelino, J. and C.A. McDevitt. 1995. Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochim Biophys Acta* 1249: 180-188

Mayne, R., M.H. Irwin. 1986. Collagen types in cartilage, In: *Articular Cartilage Biochemistry* (Kuettner, K. et al., Hrsg.), Raven Press, New York: 23-38

Mayne, R., R.G. Brewton. P.G. Mayne and J.R. Baker. 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., M. van der Rest, P. Bruckner and T. Schmid. 1995. Approaches for isolating and characterizing the collagens of cartilage (types II, IX, X and XI) and the type IX-related collagens of other tissues. In *Extracellular matrix. A practical approach*. M.A. Haralson and J.R. Hassell, editors. Oxford University Press, Oxford, U.K 73-97

Mc Donald, J.A. 1988. Extracellular matrix assembly. *Annu Rev Cell Biol* 4: 183-208

Mendler, M., S.G. Eich-Bender, L. Vaughan, K.H. Winterhalter and P. Bruckner. 1989. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. *J Cell Biol* 108: 191-197

Miosge, N., K. Flachsbarth, W. Götz, W. Schultz, H. Kresse and R. Herken. 1994. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J* 26: 939-945

Mörgelin, M., M. Paulsson, T.E. Hardingham, D. Heinegard and J. Engel. 1988. Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem J* 253: 175-185

Mörgelin, M., D. Heinegard, J. Engel and M. Paulsson. 1992. Elektron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the swarm rat chondrosarcoma reveals a fived- armed structure. *J Biol Chem* 267: 6137-6141

Morris, N.P. and H.P. Bächinger. 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

Mosher, D.F. 1990. Physiology of thrombospondin. *Ann Rev Med* 41: 85-97

Neame, P.J., J.E. Christner and J.R. Baker. 1986. The primary structure of link protein from rat chondrosarcoma proteoglycan aggregate. *J Biol Chem* 261: 3519-3535

Neame, P.J., H.U. Choi, and L.C. Rosenberg. 1989. The primary structure of the core protein of the small, leucine- rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 264: 8653- 8661

Neame, P.J., Y. Sommarin, R.E. Boynton and D. Heinegard 1994. The structure of a 38-kDa leucine- rich protein (chondroadherin) isolated from bovine cartilage. *J Biol Chem* 269: 21547-21554

Neame, P.J., H. Tapp and A. Azizan. 1999. Noncollagenous, nonproteoglycan macromolecules of cartilage. *Cell Mol Life Sci* 55(10): 1327-1340

Ninomiya, Y., P. Castagnola, D.R. Gerecke, M.K. Gordon, P. Jacenko, M. Maccarthy, Y. Muragaki, I. Nishimura, S. Oh, N. Rosenblum, N. Sato, S.P. Sugrue, R. Taylor, G. Vasios, N. Yamaguchi and B.R. Olsen. 1990. The molecular biology of collagens with short triple-helical domains. In: *Extracellular Matrix Genes*. L.J. Sandell and C.D. Boyd, eds. Academic Press, San Diego: 79-114

Nishiyama, T ., A.M. McDonough and R.E. Burgeson. 1992. *Mol Biol Cell* 74-79

Niyibizi, C. and D.R. Eyre. 1989. Identification of the cartilage  $\alpha 1(XI)$  chain in type V collagen from bovine bone. FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Letts. 242: 314-318

Olsen, B.R. 1995. Mutations in Collagen Genes Resulting in Metaphyseal and Epiphyseal Dysplasias. Bone Vol 17, No 2: 45S – 49S

Oldberg, A., P. Antonsson, K. Lindblom and D. Heinegard. 1989. A collagen- binding 59- kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG- S1 and PG- S2 (decorin). EMBO J 8: 2601-2604

Oldberg, A., P. Antonsson, K Lindblom and D. Heinegard 1992. COMP (Cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. J Biol Chem 267: 22346-22350

Paulsson, M and D. Heinegard 1979. Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. Biochem J 183: 539-545

Paulsson, M and D. Heinegard 1982. Radioimmunoassay of the 148 kilodalton cartilage protein; distribution of the protein among bovine tissues. Biochem J 207: 207-213

Paulsson, M., M. Mörgelin, H. Wiedemann, M. Beardmore- Gray, D. Dunham, T. Hardingham, D. Heinegard, R. Timpl and J. Engel. 1987. Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans. Biochem .J 245: 763-772

Perälä, M., M. Savontaus, M. Metsäranta and E. Vuorio. 1997. Developmental regulation of mRNA species for types II, IX and XI collagens during mouse embryogenesis. Biochem J 324: 209- 216

Peters, D.M.P. and D.F. Mosher. 1994. Formation of fibronectin extracellular matrix. In Extracellular Matrix Assembly and Structure. P.D. Yurchenko, D.E. Birk and R.P. Mecham. editors. Academic Press, San Diego: 315-350

Piez, K.A. and A. H. Reddi. 1984. *Extracellular Matrix Biochemistry*. Elsevier, New York

Plaas, A.H.K., P.J. Neame, C.M. Nivens and L. Reiss. 1990. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 265: 20634-20640

Pfäffle, M., F. Ruggiero, H. Hofmann, M.P. Fernandez, O. Selmin, Y. Yamada, R. Garrone and K. von der Mark. 1988. Biosynthesis, secretion, and extracellular localization of anchorin II CII, a collagen-binding protein of the calpactin family. *EMBO J* 7: 2335-2342

Poole, A.R., C. Webber, I. Pidoux, H. Choi and L.C. Rosenberg. 1986. Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of immunologically related species in other tissues. *J Histochem Cytochem* 34: 619-625

Poole, C.A., S. Ayad and J .R. Schofield. 1988. Chondrons from articular cartilage. 1. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci* 90: 635-643

Poole, A.R., G. Rizkalla, R. Reiner, M. Ionescu and E. Bogoch. 1992. Changes in osteoarthritis. In *Trends in Research and Treatment of Joint Diseases*. K. Hirohata, K. Minuzo and T. Matsubara, editors. Springer- Verlag, Tokyo. 3-12

Pringle, G.A. and C.M. Dodd 1990. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the D- bands and E- bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 38: 1405-1411

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

Rada, J.A./ Courneau, P.K. and J.R. Hassel. 1993. Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res* 56: 635-648

Ratcliffe, A. and V.C. Mow. 1996. Articular cartilage. In *Extracellular Matrix*. W.D. Comper, editor. OPA, Amsterdam, The Netherlands. 234-302

Reese, C.A. and R. Mayne. 1981. Minor collagens of chicken hyaline cartilage. *Biochemistry* 20: 5443- 5448

Rhodes, C., K. Doege, M. Sasalci and Y. Yamada. 1988. Alternative splicing generates two different mRNA species for rat link protein. *J Biol Chem* 263: 6063-6067

Ruoslahti, E. 1988a. Structure and biology of proteoglycans. *Ann Rev Cell Biol* 4: 229-255

Ruoslahti, E. 1988b. Fibronectin and its receptors. *Ann Rev Biochem* 57: 375-413

Ryan, M.C. and L.J. Sandell. 1990. Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type- II (cartilage) procollagen by alternative splicing of messenger RNA. *J Biol Chem* 265: 10334-10339

Saleque, S., N. Ruiz and K. Drickamer. 1993. Expression and characterization of a carbohydrate- binding fragment of rat aggrecan. *Glycobiol* 3: 185-190

Sandell, L.J. 1994. In situ expression of collagen and proteoglycan genes in notochord and during skeletal development and growth. *Microsc Res Tech* 28: 470-482

Savontaus, M., T. Ihanamaki, M. Pärälä, M. Metsaranta, M. Sandberg- Lall and E. Vuorio. 1998. Expression of type II and IX collagen isoforms during normal and pathological cartilage and eye development. *Histochem Cell Biol* 110 (2): 149- 159

Sawada, H., H. Konomi and K. Hirose. 1990. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane -its relation to type VIII collagen. *J Cell Biol* 110: 219-227

Schenk, R.K. 1980. Basic histomorphology and physiology of skeletal growth. In *Treatment of fractures in children and adolescents*. B.G. Weber, C. Brunner and F. Freuler, editor. Springer-Verlag, Berlin. 3-19

Schmid, T.M. and H.E. Conrad. 1982. A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes. *J Biol Chem* 257: 12333-12340

Schmid, T.M., R. Mayne, J.J. Jeffrey and T.F. Linsenmayer. 1986. Type X collagen contains two cleavage sites for a vertebrate collagenase. *J Biol Chem* 261: 4184-4189

Schmid, T.M., T.F. Linsenmayer. 1987. Type X collagen. In: Mayne, R., R.E. Burgeson, eds *Biology of extracellular matrix: Structure and function of collagen types*. New York: Academic Press 223-259

Schmidt, G., H. Hausser and H. Kresse. 1991. Interaction of the small proteoglycan decorin with fibronectin: Involvement of the sequence NKISK of the core protein. *Biochem J*: 280: 411-414

Schuppan, D., M.C. Cantaluppi, J. Becker, A. Veit, T. Bunte, D. Troyer, F. Schuppan, M. Schmid, R. Ackermann and E.G. Hahn. 1990. Undulin, an extracellular matrix glycoprotein associated with collagen fibrils. *J Biol Chem* 265: 8823-8832

Shaw, L.M. and B.R. Olsen. 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem Sci* 16: 191-194

Shen, Z., S. Gantcheva, B. Mansson, D. Heinegard and Y. Sommarin. 1998. Chondroadherin expression changes in skeletal development. *Biochem J* 330: 549-557

Shimokomaki, M., V.C. Duance and A.J. Bailey. 1980. Identification of a new disulfide- bonded collagen from cartilage. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett 121: 51-54

Stockwell, R.A. 1979. Biology of cartilage cells. Cambridge University press, Cambridge.

Stockwell, R.A. 1983. Metabolism of Cartilage. In: Cartilage (Hall, B.K., Hrsg.), Academic Press, New York: 253-273

Stryer, L. 1994. Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Svensson, L., D. Heinegard and A. Oldberg. 1995. Decorin- binding sites for collagen type I are mainly located in leucine- rich repeats 4- 5. J Biol Chem 270: 20712-20716

Svoboda, K.K, I. Nishimura, S.P. Sugrue, Y. Ninomiya and B.R. Olsen. 1988. Embryonic chicken cornea and cartilage synthesize type IX collagen molecules with different amino- terminal domains. Proc Natl Acad Sci USA 85: 7496-7500

Thom, J.R. and N.P. Morris. 1991. Biosynthesis and proteolytic processing of type XI collagen in embryonic chick sterna. J Biol Chem 266: 7262-7269

Thorogood, P., J. Bee and K von der Mark. 1986. Transient expression of collagen type II at epitheliomesenchymal interfaces during morphogenesis of the cartilaginous neurocranium. Dev Biol 116: 497-509

Timpl, R. and J. Engel. 1987. Type VI collagen. In Structure and function of collagen types. R Mayne and RE. Burgeson, editors. 105-143

Tracy, R W. 1990. Type IX collagen gene expression during endochondral ossification. D.M.D. thesis, Harvard School of Dental Medicine. Boston

Trueb, J. and B. Trueb. 1992. The two splice variants of collagen XII share a common 5' end. *Biochim Biophys Acta* 1171: 97-98

Tschan, T. 1992. Dissertation, Diss. ETH Nr. 9959, ETH Zürich, Schweiz

Van der Rest, M., L.C. Rosenberg, B.R. Olsen and A.R. Poole. 1986. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. *Biochem J* 237: 923-025

Van der Rest, M. and R Mayne. 1987. Type IX collagen. In *Structure and Function of Collagen Types*. R Mayne, and RE. Burgeson, editors. Academic Press, New York. 195-221

Vaughan, L., M. Mendler, S. Huber, P. Bruckner, K.H. Winterhalter, M.I. Irwin and R Mayne. 1988. D-periodic distribution of collagen IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol* 106: 991-997

Voet, D. and J.G. Voet. 1994. *Biochemie*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo

Vogel, K.G., M. Paulsson and D. Heinegard 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223: 587-597

Vogel, K.G. and J.A. Trotter. 1987. The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro. *Collagen Rel Res* 7: 105-114

Von der Mark, H., M. Aumailley, G. Wick, R. Fleischmajer and R. Timpl. 1984. Immunchemistry, genuine size and tissue localization of collagen VI. *Eur J Biochem* 142 (3): 493-502

Von der Mark, K and S. Goodman. 1993. Adhesive glycoproteins. In *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. P .M. Royce, and B. Steinmann, editors. Wiley-Liss Inc, New York. 211-236

Vos, H.L., S.Devarayalu, Y Devries and P. Bornstein. 1992. Thrombospondin- 3 (Thbs 3), a new member of the thrombospondin gene family. *J Biol Chem* 267: 12192-12196

Wälchli, C., M. Koch, M. Chiquet, B.F. Odennatt and B. Trueb. 1994. Tissue- specific expression of the fibril- associated collagens XII and XIV. *J Cell Sci* 107: 669-681

Watt, S.L., G.P. Lunstrum, A.M. McDonough, D.R. Keene, R.E. Burgeson and N.P. Morris. 1992. Characterization of collagen type XII and type XIV from fetal bovine cartilage. *J Biol Chem* 267: 20093- 20099

Weber, I.T., R.W. Harryson and R.V. Iozzo. 1996. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 271: 31767-31770

Wendel, M., Y. Sommarin, T. Bergman and D. Heinegard. 1995. Isolation, characterization, and primary structure of a calcium- binding 63- kDa bone protein. 1995. *J Biol Chem* 270 (11): 6125-33

Wight, T.N., D.K. Heinegard and V.C. Hascall. 1991. Proteoglycans, In: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (Hay, E.D., Hrsg.), Plenum Press, New York: 45-78

Winnemöller, M., P. Schön, P. Vischer and H. Kresse. 1992. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin- Interference with cell attachment *Eur J Cell Biol* 59: 47-55

Wu, J.J., D.R. Eyre, H.S. Slayter. 1987. Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and elektron microscopic charakterization of the native proteine. *Biochem. J.* 248: 373-381

Wu, J.J., M.W. Lark, L.E. Chun and D.R. Eyre. 1991. Sites of stromelysin cleavage in collagen type II, type IX, type X and type XI of cartilage. *J Biol Chem* 266: 5625-5628

Wu, J.J., P.E. Woods and D.R. Eyre. 1992. Identification of cross- linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II- type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 267: 23007-23014

Yada, T., S. Suzuki, K. Kobayashi, M. Kobayashi. T. Hoshino, K. Horie and K. Kimata. 1990. Occurrence in chick embryo vitreous humor of a type IX collagen proteoglycan with an extraordinarily large chondroitin sulfate chain and short  $\alpha 1$  polypeptide. *J Biol Chem* 265: 6992-6999

Yamada, K.M 1991. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In *Cell Biology of Extracellular Matrix..* E.D. Hay, editor. Plenum Press, New York. 111-146

Yamaguchi, Y., D.M. Mann and E. Ruoslahti. 1990. Negative regulation of transforming growth factor  $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Biochem J* 346: 281-284

## VII. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname	Failing, Katja Anna, geb. Dickerhof
Geburtsdatum/ -ort	06. April 1974, Ludwigshafen am Rhein
Eltern	Dickerhof, Dr. Karlheinz Dickerhof, Ursula, geb. Piejko
Familienstand	verheiratet
Ehegatte	Failing, Jürgen
Staatsangehörigkeit	deutsch

### SCHULISCHER WERDEGANG

08.1980 – 09.1983	Grundschule Waldsee
09.1983 – 07.1984	Grundschule Münster-Amelsbüren
08.1984 – 05.1993	Kardinal-von-Galen Gymnasium, Münster-Hiltrup Abschluß: Abitur

### STUDIUM

10.1993 – 06.2000	Humanmedizin
10.1993 – 03.1999	Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
04.1999 – 03.2000	Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken, Dortmund
08.1995	Ärztliche Vorprüfung
08.1996	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03.1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
06.2000	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08.2000 – 01.2002	Ärztin im Praktikum Radiologische Klinik, Städtisches Klinikum, Dortmund
01.2002	Verleihung der Vollapprobation für Ärzte durch die Bezirksregierung Arnsberg
seit 02.2002	Assistenzärztin Radiologische Klinik, Städtisches Klinikum, Dortmund

## **VIII. Danksagung**

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Prof. P. Bruckner, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, für die Überlassung des Themas und sein Bemühen zum Fortgang der Arbeit beizutragen. Für die freundliche Aufnahme bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe. Ich erhielt zu jeder Zeit fachliche und persönliche Unterstützung durch alle Mitarbeiter.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Susanne Grässel für die vielen Stunden liebevoller Betreuung und Beratung, sowie für ihre vielfältigen Anregungen und ihr Interesse an meiner Dissertation. Durch ihr wertvolles Engagement bishin zur Unterstützung bei der Auswertung wurde für mich die Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse einfacher.

Stets zu meiner Seite, mit mentaler und tatkräftiger Unterstützung, sowie stetiger Aufmunterung, war Frau Heidemarie Bracht für mich eine wichtige Stütze. Ohne ihre Hilfe hätte ich so manche Versuche gar nicht durchführen bzw. diese beenden können. Für die Unterstützung bei der Anfertigung von Färbungen möchte ich mich bei Frau Anne Forsberg herzlich bedanken.

## **IX. Tierversuche**

Brief vom 10.02.1994, Aktenzeichen 19/94

Versuche an lebenden transgenen Mäusen sind nicht geplant.

Die Haltung und Züchtung der Tiere ist vom Stadtpräsidium Münster für die Arbeitsgruppe Professor P. Bruckner genehmigt worden.