Universitätsklinikum Ulm
Institut für Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Walther Vogel

Sequenz- und Expressionsanalysen kleiner leucinreicher Proteoglykane bei Patienten mit klassischem Ehlers-Danlos-Syndrom

DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr.med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Melanie Katharina Pook
aus Konstanz

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Just

2. Berichtserstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 20.06.2008

Gewidmet meinem Doktorvater Walter Just und seiner gesamten Arbeitsgruppe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1. Das Ehlers-Danlos-Syndrom 1

1.1.1. EDS vom klassischen Typ 3

1.2. Genetische Ursachen des Ehlers-Danlos-Syndroms 5

1.2.1. Genetik der EDS-Untertypen 2 bis 6 5

1.2.2. Genetik des EDS vom klassischen Typ 6

1.3. Spontane Dissektion der A. carotis interna (sCAD) 9

1.4. Ausgewählte Proteine der Extrazellulären Matrix 10

1.4.1. Kleine leucin-reiche Proteoglycane (SLRP) 10

1.4.2. Wachstumsfaktoren 16

1.5. Fragestellung der Arbeit 19

2 Material und Methoden 21

2.1. Material 21

2.1.1. Chemikalien 21

2.1.2. Zelllinien zur DNA-/RNA-Gewinnung 22

2.1.3. Radiochemikalien 22

2.1.4. Enzyme 23

2.1.5. Antibiotika 23

2.1.6. Nukleinsäuren 23

2.1.7. Kulturmedien für die Zellkultur 25

2.1.8. Puffer, Lösungen und Ansätze 25

2.1.9. Reagenziensysteme (Kits) 28

2.1.10. Sonstige Verbrauchsmaterialien 29

2.2. Geräte 29

2.3. Software 30

2.4. Methoden 31

2.4.1. Zellkultur 31

2.4.2. Nukleinsäuretechniken 32

2.4.3. Segregations-Analyse am *COL5A1*- und *COL5A2*-Locus 38

2.4.4. Sequenzierung Decorin-Promoter 42

2.4.5. Statistik 47

3 Ergebnisse 48

3.1. Segregationsanalyse für COL5A1 und COL5A2 in zwei vom klassischen EDS betroffenen Familien 48

3.2. Sequenzierung des Decorin-Promoters Ib 50

3.3. Northern-Blot Analyse der Expression von Lumican, Transforming Growth Factor-β und Interleukin-1β in Patienten mit klassischem EDS 56

4 Diskussion 59

4.1. Co-Segregation des klassischem EDS mit Allelen aus der *COL5A2*-Genregion 62

4.2. Mutationsanalyse des Promoters Ib des *DCN*-Gens 63

4.3. Expressionsanalyse von Lumican und IL-1β 68

4.3.1. Lumican 69

4.3.2. Interleukin-1β 74

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick 78

5 Zusammenfassung 80

6 Literaturverzeichnis 82

7 Anhang 107

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADAMTS2	A disintegrin and metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2
ALF	automated laser fluorescence
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ASCII	American standard code for information interchange
ATP	Adenosintriphosphat
BGN	Biglycan
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CHO	chinese hamster ovary
COL1A1	collagen type I alpha-1
COL1A2	collagen type I alpha-2
COL3A1	collagen type III alpha-1
COL5A1	collagen type V alpha-1
COL5A2	collagen type V alpha-2
COL5A3	collagen type V alpha-3
Cre	causes recombination
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (Versican)
CTP	Cytidintriphosphat
CYP21B	Cytochrom p450 c21B
DCN	Decorin
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EDS	Ehlers-Danlos-Syndrom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELN	Tropoelastin
ERK	extracellular signal-regulated kinase

FasL	Fas-Ligand
FMOD	Fibromodulin
FN1	Fibronectin 1
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat-dehydrogenase
GAG	glycosaminoglycane
GBS	GATA binding sequence
GI	Geninfo Identifier
GTP	Guanosintriphophat
HPRTI	Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase I
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1α	Interleukin 1 alpha
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
ISE	intronic splicing enhancers
ISS	intronic splicing silencers
JNK	c-jun Terminale Kinase
KERA	Keratocan
LRR	leucine-rich region
LUM	Lumican
MAP	mitogen activated protein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MB	MegaBasen
MEM	Minimal Eagle's medium
MIM	Mendelian Inheritance in Men
MMP	matrix metalloproteinase
MOPS	3N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NEEO	Niedrige Elektroendoosmose
NFκB	nuclear factor kappa B
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PGE2	Prostaglandin E2
PLOD	procollagen-lysine 2-oxoglutarat 5-dioxygenase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	ribonucleic acid
RZPD	Ressourcenzentrum Primärdatenbank
sCAD	spontaneous cervical artery dissection
SDS	sodium dodecyl sulphate
SLRP	small leucine-rich proteoglycans
SOB	super optimal broth
SOC	super optimal broth with glucose for catabolism repression effect
SP3	specificity protein 3
SSC	saline sodium citrate
SSPE	saline sodium phosphate EDTA (siehe oben)
STS	sequence tagged sites
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA (siehe dort)
TE	Tris EDTA (siehe dort)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transforming growth factor beta
THBS	Thrombospondin
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TNFRE	Tumor necrosis factor response element
TNXB	Tenascin XB
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
UTR	untranslated region

1 Einleitung

1.1. Das Ehlers-Danlos-Syndrom

Bei den Krankheitsbildern, die heute unter der Entität „Ehlers-Danlos-Syndrom“ (EDS) subsummiert werden, handelt es sich um seltene (Inzidenz 1:150.000) erbliche Erkrankungen unterschiedlicher, bisher nicht vollständig geklärter Pathogenese. Ihr gemeinsames Merkmal ist die Manifestation von pathologischen Veränderungen im Bindegewebe der erkrankten Personen. Typische Symptome sind hierbei eine Hyperelastizität, leichte Verletzbarkeit und eine weiche, samtartige Konsistenz der Haut sowie eine ausgeprägte Überstreckbarkeit der Gelenke. Dies führte dazu, dass Personen mit dieser Erkrankung sich früher häufig als sogenannte „Schlangenmenschen“ ihren Lebensunterhalt auf Jahrmärkten verdienten.



Abbildung 1: Historisches Bild eines Patienten mit Ehlers-Danlos-Syndrom. Die ausgeprägte Überdehnbarkeit der Haut ist gut zu erkennen. (zitiert nach Böhm et al. 2002, S. 109)

Neben den typischen Symptomen an Haut und Gelenken können aber auch alle anderen Organsysteme mit bindegewebigem Anteil von der Erkrankung betroffen sein.

Erstmals erwähnt wurde das Ehlers-Danlos-Syndrom im Jahre 1668 mit der Beschreibung eines 23-jährigen spanischen Patienten, der das vielleicht eindrücklichste Merkmal der Erkrankung, nämlich die ausgeprägte Überdehnbarkeit der Haut, in einem solche Maße darbot, dass es ihm möglich

war, seine Kinnhaut bis über die Augen oder auf die Brust zu ziehen (van Meek'ren 1668). Seinen Namen erhielt das Ehlers-Danlos-Syndrom 1933 dann aber von den zwei Dermatologen Eduard Ehlers aus Kopenhagen und Henri-Alexandre Danlos aus Paris. Beide hatten Anfang des 20. Jahrhunderts unabhängig voneinander Patienten untersucht und beschrieben, die die typische Merkmalskonstellation eines EDS an Haut und Gelenken aufwiesen (Denko 1978). Die erste ausführliche Dokumentation des typischen klinischen Bildes der Krankheit erfolgte allerdings schon 1891 durch einen russischen Dermatologen namens Tschernogubow, so dass in der russischen Medizin bis heute die Bezeichnung „Tschernogubow-Syndrom" synonym verwendet wird (Denko 1978).
Die Zusammenstellung der dem EDS zugehörigen Erkrankungen wurde im Laufe der Jahre mit dem stetigen Zuwachs von Erkenntnissen insbesondere zur Pathogenese immer wieder ergänzt, und es erfolgte mehrfach eine Neuordnung der einzelnen Typen in verschiedenen Klassifikationen (z.B. McKusick 1972; Beighton et al. 1988; Beighton et al. 1992). Dieser Arbeit liegt die aktuell gültige sogenannte Villefranche-Klassifikation zugrunde, die sich an der Ätiologie als Klassifikationskriterium orientiert und Major- und Minor-Kriterien zur Diagnosestellung festlegt (Beighton et al. 1998). Es werden dort 6 Grundtypen unterschieden.

Tabelle 1: Villefranche-Klassifikation des Ehlers-Danlos-Syndroms (Beighton et al. 1998). In Klammern angegeben die frühere Bezeichnung sowie die Nummer, unter der die Erkrankung in der Datenbank „Online Mendelian Inheritance in Men" zu finden ist (OMIM 2006).

Nr.	Aktuelle Bezeichnung der verschiedenen Formen
1	**Klassischer Typ** hierunter werden die ehemaligen Typen I (MIM 130000) und II (MIM 130010) als unterschiedlich schwere Ausprägungen einer sich ätiologisch gleichenden Erkrankung subsummiert
2	**Hypermobiler Typ** (ehemaliger Typ III, MIM 130020)
3	**Vaskulärer Typ** (ehemaliger Typ IV, MIM 130050)
4	**Kyphoskoliotischer Typ** (ehemaliger Typ VI, MIM 225400)
5	**Arthrochalastischer Typ** (ehemaliger Typ VII A/B, MIM 130060)
6	**Dermatosparaktischer Typ** (ehemaliger Typ VIIC, MIM 225410)

Es werden in diesem System außerdem 6 weitere Subtypen wie beispielsweise der idiopathische und der nicht klassifizierte Typ definiert.

1.1.1. EDS vom klassischen Typ

Die Mitglieder des EDS-Patientenkollektivs, aus welchem wir unser Untersuchungsmaterial bezogen haben, zeigten alle ein klassisches Ehlers-Danlos-Syndrom. Aus diesem Grund stellt die nun folgende Tabelle nur das klinische Erscheinungsbild und die Diagnosekriterien dieses ersten Typs der Villefranche-Klassifikation übersichtsweise dar.

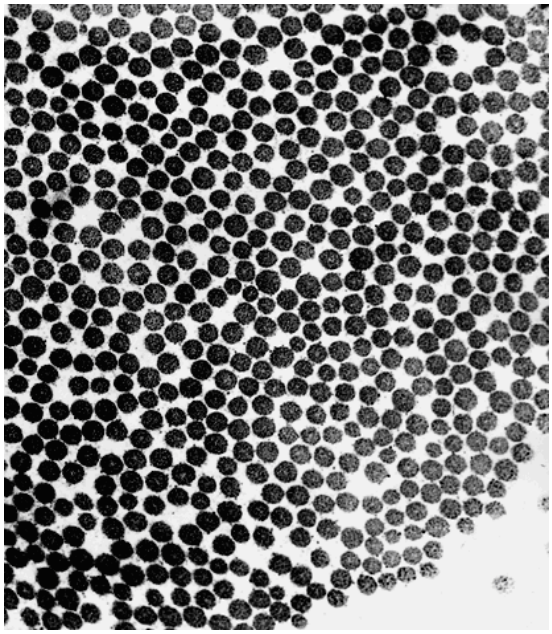
Tabelle 2: Charakteristische Symptome an den verschiedenen Organsystemen beim Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) vom klassischen Typ (modifiziert nach Böhm et al. 2002)

EDS vom klassischen Typ (ehemalig EDS Typ I und EDS Typ II)		
Erbgang	**Major-Kriterien**	**Minor-Kriterien**
Autosomal dominant	▪ Hyperelastizität und Fragilität der Haut ▪ Verbreiterte, atrophe Narbenbildung, „cigarette-paper-scars“ ▪ Gelenkhypermobilität	▪ Weiche, samtartige Haut („Marshmallow-Haut“) ▪ Molluskoide Pseudotumoren, Spheroide ▪ Komplikationen infolge der Gelenkhypermobilität (Luxation, Subluxation, Pes Planus) ▪ Muskuläre Hypotonie ▪ Hämatomneigung ▪ Verzögerte statomotorische Entwicklung ▪ Symptome der Bindegewebsschwäche (Hiatushernie, Analprolaps, Zervixinsuffizienz) ▪ Auftreten von Komplikationen nach chirurgischen Eingriffen ▪ Positive Familienanamnese ▪ Ausgeprägte Müdigkeit

a)  b) 

Abbildung 2: Symptombilder bei klassischem Ehlers-Danlos-Syndrom: a) Atrophe Narbenbildung an exponierten Körperstellen; b) Überstreckbarkeit der Gelenke (zitiert nach Böhm et al. 2002, S. 110 und 111)

Unter dem Elektronenmikroskop betrachtet, präsentiert das Bindegewebe betroffener Personen deutliche Veränderungen in seiner Organisation und Zusammensetzung. In Hautproben von Patienten mit einem EDS vom Typ I finden sich kaum normale, im Querschnitt runde, sondern hauptsächlich in ihrer Kontur unregelmäßig veränderte Kollagenfasern. Nicht nur die Form, sondern auch der Durchmesser zeigt hierbei eine übermäßig große Variationsbreite. Weiterhin finden sich große Konglomerate von Kollagenfasern, die ungeordnet bündelweise und in teilweise bizarren Formen in dichten Massen zusammengelagert sind (Hausser et al. 1994b). Das Bild gleicht in vielen Punkten den mikroskopischen Befunden der Haut von Decorin-Knockout-Mäusen ($Dcn^{-/-}$) (Danielson et al. 1997). Bei Patienten mit der weniger schweren Variante Typ II sind die Grundkomponenten der extrazellulären Matrix im Übermaß vorhanden, die Kollagenfibrillen präsentieren sich mit vergrößerten, blumenartigen Querschnitten und zeigen gelegentlich Einschlüsse von flockigem Material.
Das Ausmaß der Bindegewebsalteration kann im Spektrum des klassischen EDS aufgrund der Zusammenfassung der Erkrankungen vom Typ I und Typ II sehr unterschiedlich ausgeprägt sein (Hausser et al. 1994b).

a) 

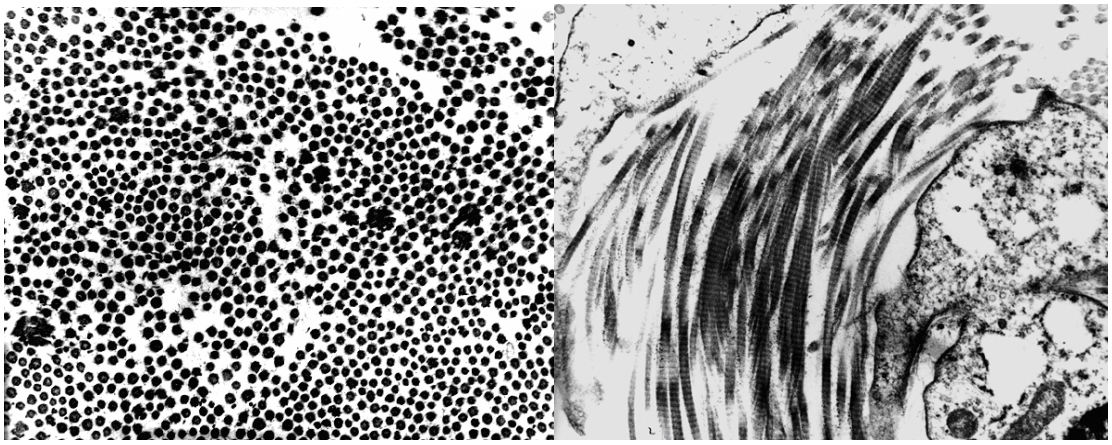
b) 

Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Bilder des Kollagennetzwerkes a) gesunder und b) an klassischem Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) erkrankter Personen. Auffällig sind die unregelmäßigen Querschnitte der Kollagenfasern und ihre chaotische Anordnung beim klassischen EDS (Bilder aus dem Bestand der EDS-Ambulanz in Heidelberg).

1.2. Genetische Ursachen des Ehlers-Danlos-Syndroms

1.2.1. Genetik der EDS-Untertypen 2 bis 6

Die Pathogenese der typischen Bindegewebsveränderungen des klinisch und histopathologisch diagnostizierten EDS zeichnet sich durch Heterogenität der zugrundeliegenden Defekte aus.

Für den vaskulären Typ des EDS (Typ IV) konnten Mutationen im Kollagen-3-Gen *COL3A1* (Pepin et al. 2000; Kuivaniemi et al. 1997) und der Mangel an Kollagen der Gruppe III (Pope et al. 1975) als Ursache nachgewiesen werden. Eine Mutation in *COL3A1* wurde auch für das als hypermobiler Typ des EDS (Typ III)

bezeichnete Krankheitsbild gezeigt (Narcisi et al. 1994). Weiterhin wurden hier Mutationen in Tenascin (*TNXB*) (Zweers et al. 2003) oder das komplette Fehlen des zugehörigen Proteins (Lindor et Bristow 2005) berichtet. Für den Kyphoskoliose-Typ des EDS (Typ VI) wurden Mutationen im Gen der Lysyl-Hydroxylase (*PLOD*) nachgewiesen (Walker et al. 2005). Mutationen der Procollagen-N-Peptidase (*ADAMTS2*) zeichnen verantwortlich für den Dermatosparaxis-Typ des autosomal rezessiven Ehlers-Danlos-Syndroms VII (Colige et al. 1999). Splice-Junction-Mutationen in Genen von Kollagenen der Gruppe I (*COL1A1* und *COL1A2*) oder die vollständige Deletion des Exon 6 dieser Gene wurden als Ursache für das EDS vom Typ VIIa und VIIb gefunden (Byers et al. 1997). Eine weitere Mutation im *COL1A2*-Gen konnte nachgewiesen werden, die für Fälle von EDS mit begleitender Osteogenesis imperfecta verantwortlich war (Feshchenko et al. 1998).

1.2.2. Genetik des EDS vom klassischen Typ

Für die Entität des klassischen EDS konnten bisher in Einzelfällen Mutationen wie die im *COL1A1*-Gen (Nuytinck et al. 2000) nachgewiesen werden. Ein autosomal rezessiv vererbter, mutations- oder deletionsbedingter Verlust von *TNXB* (Schalkwijk et al. 2001) verursachte das typische klinische Bild eines Ehlers-Danlos-Syndroms bis auf das Fehlen atropher Narbenbildung. Die Konstellation von fehlender Expression von *TNXB* und einer verminderten Aktivität der 21-Hydroxylase (*CYP21B*) brachte ebenfalls das Bild eines Ehlers-Danlos-Syndroms hervor (Burch et al. 1997).

Als relativ häufigste Ursache für ein klassisches EDS müssen allerdings Mutationen in den Genen *COL5A1* und *COL5A2* gelten, für die in vielen Fällen ein Zusammenhang mit der Manifestation der Erkrankung beschrieben werden konnte.

1.2.2.1. Kollagene der Gruppe V

COL5A1 (MIM 120215), *COL5A2* (MIM 120190) und *COL5A3* (MIM 120216) sind auf zellulärer Ebene durch eine variable Kombination ihrer α-Ketten zu Heterotrimeren charakterisiert. So geordnet spielen sie eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Fibrillogenese der Struktur-Kollagene aus den Gruppen I und II. Insbesondere initiieren und regulieren sie das Wachstum und die

Zusammenlagerung der einzelnen Fibrillen, deren Durchmesser sie durch Bindung steuern können (Wenstrup et al. 2004a; Birk et al. 1990). Homozygote *Col5a1*-Knockout-Mäuse (*Col5a1*$^{-/-}$) starben bereits früh während der Embryogenese ab und zeigten ein offensichtliches Fehlen der Kollagen-Fibrillogenese (Wenstrup et al. 2004a). Mäuse, denen hingegen nur ein Allel von *Col5a1* fehlte (*Col5a1*$^{-/+}$) und deren *Col5a1*-Expression um die Hälfte vermindert war, wurden lebend geboren. Sie zeigten allerdings eine Reduktion des gesamten Kollagengehalts und der Fibrillenzahl der Haut um 50 Prozent sowie eine in etwa die Hälfte der Fibrillen umfassende Teilpopulation von abnormalen Kollagenfibrillen. Die mechanische Belastbarkeit der Haut war vermindert (Wenstrup et al. 2004a). Der Einbau von Hydroxyprolin in das Struktur-Kollagen durch menschliche EDS-Fibroblasten mit einer solchen Haploinsuffizienz von *COL5A1* war bei annähernd normaler Kollagen-Gesamtmenge auf mehr als die Hälfte vermindert, und der Fibrillendurchmesser verhielt sich umgekehrt proportional zum Verhältnis von Kollagen V und Kollagen I. Ebenso war die gesamte Anzahl der Fibrillen bei haploinsuffizienten Zellen deutlich vermindert (Wenstrup et al. 2004b).

Mäuse, deren *Col5a2*-Gen gezielt genetisch verändert wurde, waren eingeschränkt lebensfähig, wobei die meisten Mutanten innerhalb von 48 h nach Geburt verstarben. Sie zeigten ebenfalls pathologische Veränderungen der Haut und der Augen mit mikroskopisch nachweisbarer Desorganisation der Kollagenfasern sowie ausgeprägte Deformitäten der Wirbelsäule (Andrikopoulos et al. 1995).

Die Kollagene der Gruppe V haben also offenbar eine Schlüsselrolle inne, die die große pathogenetische Bedeutung von Mutationen in diesen Genen unterstreicht (Wenstrup et al. 2004a).

Aus der aktuellen Datenlage geht hervor, dass Mutationen in Kollagenen der Gruppe V vermutlich für mindestens ein Drittel bis die Hälfte aller Erkrankungen von klassischem EDS verantwortlich sind (Malfait et De Paepe 2005). Auch die Überlegung, dass es sich bei den Typen I und II um allelische Erkrankungen handeln könnte, entstand nach der Untersuchung der Vererbung von *COL5A1* in einer Mehrgenerationenfamilie. Die mikroskopische Untersuchung der Hautstruktur betroffener Familienmitglieder ergab phänotypisch Fälle sowohl von EDS Typ I als auch von EDS Typ II, die Erkrankung gleich welchen Typs wurde aber immer mit dem gleichen Allel von *COL5A1* vererbt (Burrows et al. 1996).

Es wurden Mutationen entdeckt, die zu einem Einzelbasenaustausch in den hoch konservierten Motiven der splice junctions am Exon-Intron-Übergang führten. Dies bewirkte einen Verlust einzelner Exons durch Exon-Skipping bei der Transkription (Takahara et al. 2002; Burrows et al. 1998; Nicholls et al. 1996; Wenstrup et al. 1996). Weiterhin konnte man Mutationen innerhalb der codierenden Sequenz nachweisen, die in Folge die Aminosäuresequenz des translatierten Proteins und dadurch dessen Struktur veränderten (Malfait et al. 2005; de Paepe et al. 1997). Auch wurden Mutationen beschrieben, die zur Bildung verfrühter Stop-Codons für die Translation führten (Malfait et al. 2005; Schwarze et al. 2000). Diese verschiedenen Arten von Mutationen betrafen hierbei die Gene *COL5A1* oder *COL5A2*. Für das Gen *COL5A3* wurden bisher keine Mutationen beschrieben.
Alle diese Mutationen münden entweder in eine Synthese von fehlerhaften Kollagenpropeptiden, deren Einbau in die Kollagen-Tripel-Helix nur erschwert oder gar nicht möglich ist. Sie behindern dadurch die Bildung des extrazellulären Kollagennetzes (Burrows et al. 1998; Michalickova et al. 1998; de Paepe et al. 1997; Wenstrup et al. 1996). Sie können aber auch zu einem sogenannten „nonsense-mediated mRNA decay“ (Frischmeyer et al. 1999) führen. Das bedeutet, dass die mRNA als fehlerhaft erkannt und rasch abgebaut wird, somit nicht mehr zur Translation verfügbar und in den Zellen häufig nicht einmal nachweisbar ist (Malfait et al. 2005; Schwarze et al. 2000). Dieser durch Messungen auf Proteinebene quantifizierbare Ausfall eines der beiden allelen Genprodukte bedingt dann eine funktionelle Haploinsuffizienz des betroffenen Kollagen-V-Gens (Wenstrup et al. 2000). Der Nachweis einer solchen Haploinsuffizienz bei erkrankten Personen zeigt auch, dass die korrekte Formation von Kollagenfibrillen die Expression beider Allele der Kollagene der Gruppe V benötigt.
In der Human Gene Mutation Database (Cooper et al. 2007) ist es möglich, online die oben genannten Mutationen in den Genen der Kollagene der Gruppe V nachzuvollziehen.

Zusammengefasst zeigt sich bei allen Formen des EDS eine Beteiligung von Kollagen-Genen (*COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2*) oder Faktoren, welche Kollagene posttranslational modifizieren (*PLOD*, *ADAMTS2)* oder sich direkt an Kollagenfibrillen anlagern können (*TNXB*).

1.3. Spontane Dissektion der A. carotis interna (sCAD)

Dissektionen arterieller Gefäße können traumatisch bedingt sein oder spontan, ohne ersichtlichen Anlass entstehen. Dabei dringt Blut an einer Endothel- und Intimaläsion zwischen die Schichten der Gefäßwand ein und trennt diese durch den hohen Druck, mit dem es einströmt, voneinander, wobei sich ein blutgefüllter Hohlraum bildet. Das so entstandene Hämatom in der Gefäßwand verengt oder verschließt das Blutgefäß, so dass es im distal gelegenen Versorgungsbereich der betroffenen Arterie zu Ausfallserscheinungen durch Minderdurchblutung bis hin zur vollständigen Ischämie kommen kann. Ist das Hämatom weit außen unter der Adventitia der Arterie gelegen, so kann eine Dissektion auch als Aneurysma dissecans imponieren und dabei den Blutstrom weitgehend unbehindert lassen. Als typische Symptome einer hämodynamisch wirksamen Dissektion der Arteria carotis interna präsentieren sich plötzlich beginnende Kopf- oder Halsschmerzen, aber auch ein Horner-Syndrom und Lähmungen von Halsnerven, Amaurosis fugax sowie durch einen kompletten Verschluss der Arterie Halbseitenausfälle der Gegenseite (Leys et al. 1997).

Verschiedene Ursachen für eine solche Dissektion im Bereich der Arteria carotis interna wurden bisher beschrieben. Eine Dissektion kann unter anderem zur klinischen Synopsis eines EDS gehören. Sie kann familiär gehäuft (Mokri et al. 1987; Neau et al. 1995) oder aber sporadisch auftreten. Starkes Erbrechen kann ebenso eine solche Dissektion auslösen (Kumar et al. 1998) wie die Durchführung einer Ösophagogastroskopie (Ricchetti et al. 1999). Weitere mögliche Ursache sind auch plötzliche, schnelle Halsbewegungen (Norris et al. 2000). Eine fibromuskuläre Dysplasie und die cystische Medianekrose sind als Risikofaktoren für ein solches Ereignis ebenfalls bekannt (Schievink et al. 1994, Mokri et al. 1986). Über die Relevanz erniedrigter Spiegel von α-1-Antitrypsin gibt es bisher widersprüchliche Ergebnisse (Grond-Ginsbach et al. 2004; Vila et al. 2003). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass die arterielle Hypertension, im Gegensatz zu Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen, mit der Entstehung einer sCAD assoziiert ist (Pezzini et al. 2006), ebenso wie ein Polymorphismus im Gen eines Zelladhäsionsmoleküls der ICAM-Familie (Longoni et al. 2006).

Bei etwa zwei Drittel der Patienten mit einer solchen spontanen Dissektion im Bereich der Arteria carotis interna lassen sich unter mikroskopischer Betrachtung ultrastrukturelle Veränderungen des Bindegewebes nachweisen (Brandt et al.

1998; Schievink et al. 1998). Diese bieten jedoch kein einheitliches Bild, was eine genetische Heterogenität auch der hier zugrundeliegenden Defekte nahe legt (Hausser et al. 2004). Bindegewebserkrankungen wie das Ehlers-Danlos-Syndrom, Marfan-Syndrom oder eine Osteogenesis imperfecta begünstigen das Entstehen solcher spontanen Dissektionen (Schievink et al. 1994). Die ultrastrukturellen Veränderungen in Gewebe von Patienten mit sCAD gleichen außerdem in vieler Hinsicht denen, die auch beim Ehlers-Danlos-Syndrom gefunden werden (Ulbricht et al. 2004). Nichtsdestotrotz konnten in Untersuchungen solcher Patienten keine ursächlichen Mutationen im Gen für *COL3A1* (von Pein et al. 2002; Kuivaniemi et al. 1993) gefunden werden. Auch für das Gen Tropoelastin (*ELN*) zeigten sich keine Veränderungen (Grond-Ginsbach et al. 2000). In den Genen für *COL5A1* (Grond-Ginsbach et al, 1999) und *COL5A2* (Grond-Ginsbach et al. 2002) wurden bei Patienten mit sCAD Mutationen nachgewiesen, die bei gesunden Kontrollen und anderen Patienten mit sCAD nicht auffindbar waren. Deren ursächlicher Einfluss auf die Ausprägung der Befunde in der extrazellulären Matrix wurde jedoch jeweils nicht bewiesen. Ebenso konnte für einen *COL1A2*-Polymorphismus, der mit der Bildung von intrakraniellen Aneurysmen assoziiert ist, keine Assoziation zur Entwicklung von sCAD gezeigt werden (Kuhlenbaumer et al. 2006).

1.4. Ausgewählte Proteine der Extrazellulären Matrix

1.4.1. Kleine leucin-reiche Proteoglycane (SLRP)

Proteoglycane sind ein weit verbreiteter Bestandteil der extrazellulären Matrix, deren Vertreter zahlreiche biologische Funktionen wahrnehmen. Während bei Glycoproteinen der Proteinanteil in der Menge wie in der Determinierung der Molekülfunktionen die vorherrschende Komponente ist, bestimmen bei Proteoglycanen die an den Proteinkern kovalent gebundenen Glycane einen Großteil der Moleküleigenschaften und Interaktionen. Decorin (DCN) (Krusius et al. 1986) und Lumican (LUM) (Funderburgh et al. 1993; Blochberger et al. 1992), die in dieser Arbeit Gegenstand verschiedener Untersuchungen sind, gehören in die Gruppe der kleinen leucin-reichen Proteoglycane, kurz SLRPs (small leucine-rich proteoglycans). Die Klassen der in dieser Gruppe zusammengefassten Proteine sind der Abbildung 5 zu entnehmen. Biochemisch gesehen handelt es sich bei den SLRP um Moleküle mit einem relativ einfach aufgebauten,

hufeisenförmig gefalteten Proteinskelett (Scott et al. 1996), gefaltet nach dem Modell der Struktur des Ribonuclease-Inhibitors (Kobe et al. 1993). An bestimmten, durch modifizierte Aminosäuren markierten Stellen sind diesem Molekül lange lineare Polysaccharidketten angelagert. Die räumliche Struktur der SLRP ist, am Beispiel von Decorin, sehr gut in Abbildung 4 zu erkennen.

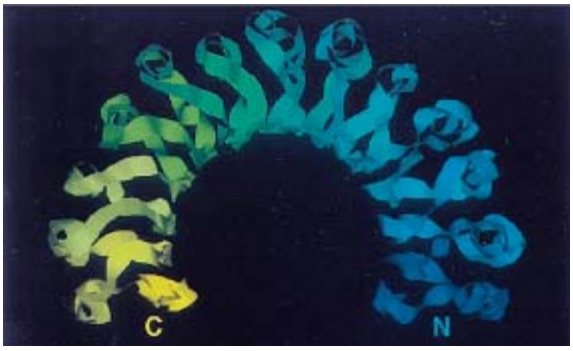


Abbildung 4: 3-D-Strukturmodell des Proteins Decorin. Deutlich ist hier die hufeisenförmige Struktur des gefalteten Proteins zu erkennen. C=Carboxyterminus, N=Aminoterminus (zitiert nach Weber et al. 1996, S. 31769).

Die Polysaccharidketten bestehen zum größten Teil aus repetitiven Disacchariden. Die ebenfalls gebräuchliche Bezeichnung Glycosaminoglycane (GAG) rührt daher, dass im Aufbau dieser Disaccharide eines der Zuckermoleküle immer ein stickstofftragendes Hexosamin oder dessen N-acetyliertes Derivat ist, welches meist von einer Uronsäure gefolgt wird (außer im Keratansulfat, welches keine Uronsäuren enthält). Häufig sind einzelne Zuckermoleküle zusätzlich an einer ihrer Hydroxylgruppen mit Sulfatgruppen verestert. Aufgrund zahlreicher negativer Ladungen in den Glycosaminoglycanen wirken diese als Polyanionen.
Decorin gehört zusammen mit Biglycan zur ersten Untergruppe der SLRP, deren Mitglieder als Disaccharidketten Dermatan- oder Chondroitinsulfat tragen, während Lumican zusammen mit Fibromodulin einen Teil der zweiten Untergruppe bildet, deren Disaccharidketten Keratansulfat enthalten (Iozzo 1998).

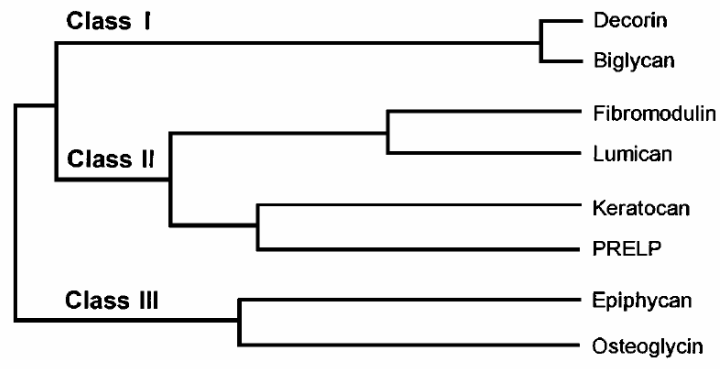


Abbildung 5: Klassen der verschiedenen SLRP (zitiert nach Iozzo 1998, S. 635). Allen Klassen gemein ist eine zentrale leucin-reiche Struktur, die beidseits von kleinen cystein-reichen Sequenzen flankiert wird. Die Unterscheidung in einzelne Klassen erfolgte aufgrund von Homologie-Untersuchungen der genomischen Sequenz (Einzelheiten im Text). (SLRP = small leucine-rich proteoglycans)

Den einzelnen Vertretern der SLRPs gemeinsam ist eine typische Struktur auf Proteinebene, welche grob drei Bereiche unterscheidet: das amino-terminale Ende mit den Bindestellen für die GAGs, eine zentrale Domäne, die eine variable Anzahl von leucin-reichen Aminosäure-Wiederholungen (LRRs) beherbergt, sowie ein carboxy-terminales Ende (Iozzo 1998; Neame et al. 1989). Außer Epiphycan und Osteoglycin, bei denen es nur 6 LRRs gibt, beherbergen alle SLRPs 10 dieser Wiederholungen in der zentralen Domäne. Diese werden amino- wie carboxylseitig von sogenannten Cystein-Clustern, Stellen mit einer hohen Dichte an Cystein-Resten in der Aminosäuresequenz, flankiert. Die Anordnung dieser Cystein-Reste untereinander folgt dabei einem durch die Evolution hindurch hochkonservierten Muster, welches sich innerhalb einer einzelnen Untergruppe gleicht (Iozzo 1997).

Für einzelne Mitglieder der Familie der SLRP sind über die Jahre viele verschiedene Funktionen beschrieben worden, und das Wissen hierüber wächst noch immer weiter an. Auch an der Regulierung des Auf- und Umbaus der Bindegewebsmatrix sind SLRP in vielfältiger Weise beteiligt. Besonders gut erforscht ist hierbei das Decorin, für das zahlreiche Interaktionen und Funktionen beschrieben werden.

1.4.1.1. Decorin (*DCN*)

Das Gen *DCN* befindet sich auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 12 im Band q21.33 von Position 90.063.167 bp bis Position 90.100.937 bp (gemessen vom Telomer des kurzen Arms), und überspannt somit 37.770 bp. *DCN* besteht aus 8 Exons mit teilweise sehr langen Introns (Danielson et al. 1993). Die Länge seines Transkripts beträgt 2.287bp. Das endgültige Translationsprodukt besitzt jedoch nur 359 Aminosäurereste, da die Exons 1 und 8 lange Abschnitte nicht-translatierter Regionen (UTRs) enthalten (Hubbard et al. 2007).

Bevor das bisher bekannte Zusammenspiel von Decorin mit seiner Umgebung in seinen Einzelheiten beschrieben werden kann, muss vorausgeschickt werden, dass die teilweise widersprüchlichen Forschungsergebnisse zu diesem Thema gewebespezifische Unterschiede in den Regulationsmechanismen und Funktionen von Decorin nahe legen. Hierbei muss immer auch die Frage der Übertragbarkeit von in Tier- (meistens Maus-) Modellen gewonnenen Erkenntnissen auf den Menschen bei der Interpretation von Forschungsergebnissen berücksichtigt werden.

Die Expression von Decorin zeigt sich im Vergleich zu proliferierenden Fibroblasten vielfach und langfristig erhöht in solchen Bindegewebszellen, die in die Ruhephase eingetreten sind (Mauviel et al. 1995). Dies legt eine wichtige modulierende Rolle dieses SLRP vor allem für den Ruhestoffwechsel von Bindegewebszellen und deren Aktivitäten zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix nahe. Decorin wird zu den sogenannten Quiescinen gezählt, einer Gruppe von Proteinen, deren mindestens 10-fach verstärkte Expression in Zellen nach Eintritt in die Ruhephase gezeigt wurde (Coppock et al. 1993). Zellen aus einer CHO-Linie veränderten ihr Wachstumsverhalten nach Transfektion mit cDNA des *DCN*-Gens hin zu einer besser geordneten und dabei weniger dichten Zusammenlagerung zu einschichtigen Zellrasen (Yamaguchi et Ruoslahti 1988). Auch das unkontrollierte Wachstum von menschlichen Kolon-Tumorzellen konnte durch eine solche Transfektion gebremst und die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert werden (Santra et al. 1995). Diese Daten legen nahe, dass Decorin als Teil einer negativen Rückkopplungsschleife eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums spielt.

Decorin kann auch die Kollagen-Fibrillogenese in der extrazellulären Matrix durch Bindung an Typ I- und II-Kollagen beeinflussen (Weber et al. 1996; Schönherr et al. 1995; Vogel et al. 1984). Ebenso assoziiert es mit Kollagen vom Typ VI (Bidanset et al. 1992). Auch Fibronectin (Winnemöller et al. 1991) und Thrombospondin (Winnemöller et al. 1992) können durch Decorin gebunden werden, wodurch die durch diese Moleküle vermittelte Zelladhäsion von Fibroblasten vermindert wird. Decorin-Knockout-Mäuse (*Dcn*$^{-/-}$) zeigten in Experimenten eine vierfache Reduktion ihrer Hautbelastbarkeit mit einer mikroskopisch nachweisbaren Fehlorganisation des Kollagenfasernetzwerkes im Sinne von weniger eng gepackten, im Durchmesser stark variierenden Kollagen-Fibrillen mit irregulären Durchmessern (Danielson et al. 1997).
Decorin ist in der Lage, den Wachstumsfaktor TGF-β (Transforming growth factor beta) zu inaktivieren. Dies geschieht, indem auch TGF-β an Decorin gebunden und so als wirksames Agens aus dem Extrazellulärraum entfernt wird (Hildebrand et al. 1994; Yamaguchi et al. 1990). Korrespondierend hierzu konnte für Decorin ein reduzierender Effekt auf die Stärke der Signalübertragung von TGF-β und damit dessen Wirkung in Zelllinien aus muskulären Satellitenzellen nachgewiesen werden (Droguett et al. 2006). Unterstützt wird die Bedeutung von DCN in der Regulierung von TGF-β auch durch Experimente, in denen Decorin in der Lage war, in Nierenglomeruli eine durch TGF-β induzierte Fibrose zu verhindern (Isaka et al. 1996; Border et al. 1992). Die Funktion von Decorin als Inhibitor des TGF-β scheint jedoch kontext- und zellabhängig zu sein. Beispielsweise konnte eine Verstärkung der Affinität von TGF-β zu seinem Rezeptor durch Decorin in der extrazellulären Matrix von Rinderknochen gezeigt werden (Takeushi et al. 1994). In Osteosarkom-Zellen antagonisiert Decorin, vermutlich durch Komplexbildung mit dem Wachstumsfaktor, die TGF-β-vermittelte Hochregulation von Biglycan, zeigt jedoch auf andere Funktionen von TGF-β keine signifikante Wirkung, so dass die Bildung solcher Komplexe offenbar nicht zwingend zu einem Wirkungsverlust von TGF-β führen muss (Hausser et al. 1994a).

So viele verschiedene Funktionen das Decorin erfüllt, so umfangreich sind auch die Möglichkeiten seiner Regulation durch andere Stoffe und Faktoren im Rahmen des Bindegewebsstoffwechsels.

Beschrieben wird eine Hochregulation der Decorinexpression durch Interleukin 4 (IL-4), verbunden mit der Identifikation einer Sequenz im *DCN*-Promoter, die möglicherweise einen Angriffspunkt für IL-4 sein könnte (Wegrowski et al. 1995). Später wird jedoch auch die Möglichkeit einer Verminderung der *DCN*-Expression in menschlichen Fibroblasten durch IL-4 nachgewiesen (Kuroda et Shinkai 1997).
IL-1β stimuliert die Decorin-Expression (Lin et al. 1996). TGF-β (Kähäri et al. 1991; Mauviel et al. 1995) und Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α; Mauviel et al. 1995) beispielsweise führen hingegen beide zu einer verminderten Produktion von Decorin. Auch der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) konnte in menschlichen periodontalen Fibroblasten die Expression von Decorin vermindern (Haase et al. 1998).
Auf mögliche hierbei ablaufende Signalkaskaden wird im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse noch genauer eingegangen werden.

1.4.1.2. Lumican (*LUM*)

Das Gen *LUM* ist auf dem menschlichen Chromosom 12 im Bereich q21.33 von Position 90.021.363 bp bis Position 90.029.673 bp lokalisiert (Chakravarti et al. 1995). Es ist somit 8.130 bp lang und beinhaltet 3 Exons. Sein Transkript überspannt 2.116 bp, die Länge des Translationsprodukts beträgt 338 Aminosäurereste (Hubbard et al. 2007).
In der Kornea des menschlichen Auges trägt das Proteoglycan Keratansulfat-Seitenketten, während es in anderen Geweben lediglich spärlich sulfatiert oder sogar ohne Sulfatgruppen vorliegt (Funderburgh et al. 1991; Funderburgh et al. 1987). In menschlichen Knorpelzellen beispielsweise führte eine Stimulation durch IL-1β zur Sekretion von unsulfatiertem Lumican (Melching et Roughley 1999).
Lumican verzögert, wie in stärkerem Maße auch Decorin, die Fibrillogenese der Kollagen-Matrix und reduziert dabei den endgültigen Durchmesser der Fibrillen (Neame et al. 2000; Rada et al. 1993). Bei Mäusen mit einer homozygoten Deletion des Lumican-Gens ($Lum^{-/-}$) wurde eine ausgeprägte (8-fache) Reduktion der Reißfestigkeit der Haut nachgewiesen (Chakravarti et al. 1998). Die Defizienz von Lumican verursachte bei den gleichen Mäusen außerdem eine im Verlauf ihrer Entwicklung einsetzende Trübung der Kornea (Chakravarti et al. 1998). Die Effekte in Haut und Kornea gingen dabei einher mit mikroskopisch sichtbaren Desorganisation ihrer Kollagenstruktur im Sinne von unregelmäßig verteilten,

verformten und teilweise verbreiterten Fibrillen und regellosen seitlichen Fusionen sowie einem vergrößerten Abstand zwischen den einzelnen Fibrillen (Chakravarti et al. 1998). Die Defizienz von Lumican führte im Kornealgewebe weiterhin zu einer erhöhten Proliferationsrate von Fibroblasten und einer Verminderung ihrer Apoptose (Vij et al. 2004). Immunologische Abläufe wie die Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten waren vermindert, die Spiegel von Zytokinen wie Tnf-α und Il-1β erniedrigt (Vij et al. 2005). Die Wundheilung im Kornealgewebe erfolgte deutlich verzögert (Saika et al. 2000). Lumican induzierte im Kornealgewebe die Bildung von Keratocan, sein Fehlen reduziert die Expression von Keratocan (*KERA*) (Carlson et al. 2005).

Im Sehnen-Bindegewebe von Fibromodulin(*Fmod*)-Knockout-Mäusen ($Fmod^{-/-}$) zeigten sich die Spiegel von Lumican bis zu vierfach erhöht (Jepsen et al. 2002). Gleichzeitig war die Menge an *Lum*-mRNA deutlich vermindert, was eine posttranskriptionelle Regulation vermuten lässt (Svensson et al. 1999). In Decorin-Knock-Out-Mäusen ($Dcn^{-/-}$) konnte hingegen keine kompensatorische Erhöhung von Lumican gefunden werden (Danielson et al. 1997).

1.4.2. Wachstumsfaktoren

1.4.2.1. Interleukin-1β (*IL-1β*)

Bei Interleukin-1β handelt es sich um ein Zytokin mit vor allem proinflammatorischer Wirkung. Wenn auch im Proteinaufbau unterschiedlich, gleicht es in seinen Wirkungen grundsätzlich dem verwandten Zytokin Interleukin-1α (IL-1α) (Rupp et al. 1986).

Seine genomische DNA befindet sich auf Chromosom 2 des Menschen von Position 113.303.808 bp bis Position 113.310.827 bp und ist somit 27.020 bp groß. Die transkribierte Sequenz ist auf 7 Exons verteilt, das Transkript besteht aus 1.498 bp. Das native Protein umfasst 269 Aminosäuren (Hubbard et al. 2007).

Seine Produktion und Sezernierung erfolgt in Makrophagen, aber auch Endothelzellen, Keratinozyten, Corneaepithelzellen und andere Zellen besitzen die Fähigkeit zur Bildung und Sekretion dieses Zytokins. Seine bekannteste Funktion im Organismus ist die Ausschüttung im Rahmen einer koordinierten Reaktion auf eine Gewebeverletzung. Es erfüllt jedoch auch noch andere Aufgaben als parakriner und autokriner Botenstoff im Zellstoffwechsel und der interzellulären Signaltransduktion. Seine Funktionen im Organismus sind vielfältig und noch nicht

in Gänze erforscht. Zu ihnen gehört die Aktivierung von Zellen des lymphatischen Systems und neutrophilen Granulozyten, die Stimulation zu Bildung und Sekretion von weiteren Zytokinen und Antikörpern sowie von Akut-Phase-Proteinen in der Leber. IL-1β löst im Hypothalamus Fieber aus und stimuliert die Ausschüttung von ACTH und Cortisol.

Eine Funktion von IL-1β, die in unserem Fall von großem Interesse ist, liegt in der Stimulation von Fibroblasten im Sinne einer gesteigerten Kollagensynthese und verstärkten Proliferation, wodurch IL-1β an der Regulation des Bindegewebsstoffwechsels teilnimmt und gleichzeitig katabole wie anabole Stoffwechselvorgänge der extrazellulären Matrix beeinflusst (Nietfeld 1993; Takeshita et al. 1992; Kähäri et al. 1987). Die Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-6, IL-8 oder PGE_2 wird ebenfalls durch IL-1β ausgelöst (Kida et al. 2005). Auch die Expression von SLRPs wird durch IL-1β beeinflusst: IL-1β steigert über ein AP-1-Bindungsmotiv im Promoter des Decorin-Gens dessen Expression (Mauviel et al. 1996). Ein Verlust dieser stimulierenden Funktion von IL-1β wurde bereits als Befund in einem Fall von letalem Marfan-Syndrom beschrieben (Pulkkinen et al. 1990).

1.4.2.2. Transforming-Growth-Factor beta 1 (*TGF-β1*)

TGF-β1 gehört ebenfalls zur Gruppe der Zytokine und wird von Makrophagen, Lymphozyten, Megakaryozyten und anderen Zellen des Körpers produziert.

Die genomische Sequenz für *TGF-β1* befindet sich auf Chromosom 19 im Bereich zwischen Position 46.528.254 bp und Position 46.551.628 bp und umfasst somit 23.374 bp. Sie ist wie bei IL-1β auf 7 Exons verteilt und codiert für ein Transskript von 2.555 bp Länge. Das entstehende Protein ist 390 Aminosäurenreste lang (Hubbard et al. 2007).

TGF-β1 besitzt chemotaktische Wirkung und spielt eine große Rolle in der Entstehung von Tumoren oder Autoimmunerkrankungen. Außerdem wirkt TGF-β1 als Wachstumsmodulator für viele Zellen. Er ist beteiligt an der Wundheilung und nimmt vielfältig Einfluss auf die Formation der extrazellulären Matrix.

Während der somatischen Entwicklung der Maus konnten große Mengen von Tgf-β1 in Knorpel, Knochen und Haut nachgewiesen werden, was eine regulatorische Funktion für den Wachstumsfaktor in Differenzierung und Proliferation in diesen Geweben nahelegt (Dickinson et al. 1990; Pelton et al. 1990).

Auf die Interaktionen von TGF-β mit Decorin wurde weiter oben im Text bereits ausführlich eingegangen. TGF-β beeinflusst außerdem die Expression anderer Matrix-Proteoglykane. Für Versican (*CSPG2*), ein Mitglied der Familie der großen Strukturproteoglykane, und Biglycan (*BGN*) aus der Gruppe der SLRP wurde eine erhöhte Expression unter TGF-β-Stimulation gezeigt (Kähäri et al. 1991). Auch die Expression von Kollagen Typ I, Fibronectin (*FN1*) und Thrombospondin (*THBS*) wird durch TGF-β stimuliert (Penttinen et al. 1988). In Knochenzellen der Maus erhöhte die Zugabe von TGF-β1 unter anderem auch die Expression von *Col5a1*, welches oben bereits als wichtiger Faktor in der Pathogenese des klassischen EDS vorgestellt wurde (Kahai et al. 2004).

1.5. Fragestellung der Arbeit

Das Bindegewebe im menschlichen Körper erfüllt mehr als nur eine mechanisch-stabilisierende Rolle. Es vermittelt auf vielfältige Weise Kontakte zwischen den Zellen und dem sie umgebenden Milieu sowie zwischen den Zellen untereinander. Es fungiert als temporärer Aufenthaltsraum für viele Botenstoffe und andere aktive Substanzen. Weiterhin ist es Schauplatz immunologischer Reaktionen und erfüllt eine wichtige Funktion in der Abwehr und Eindämmung von entarteten Zellen.

Bisher existiert kein vollständiges Modell, welches alle Faktoren und deren Interaktionen beschreiben könnte, die am Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) sowie der Aufrechterhaltung ihrer zahlreichen Funktionen beteiligt sind. Nichtsdestotrotz hat die Forschung bereits für viele in der ECM vorhandene Stoffe eine oder mehrere wichtige strukturelle oder regulative Funktionen nachgewiesen, so unter anderem für Kollagene, Proteoglycane und Wachstumsfaktoren.

Das Ehlers-Danlos-Syndrom ist eine Erkrankung, die mit einer mikroskopisch fassbaren Alteration der Bindegewebsstruktur in Haut und anderen Organen einhergeht. Defekte, die dieses Krankheitsbild auslösen, könnten in einer oder mehreren der oben angesprochenen Regulationskaskaden lokalisiert sein. Erkenntnisse zu derartigen Störungen und ihren Auswirkungen würden in Zusammenschau mit den bisherigen Forschungsergebnissen zum tiefer gehenden Verständnis der molekularbiologischen Abläufe auf diesem Gebiet beitragen.

Für Patienten mit den Bindegewebsveränderungen eines klassischen EDS konnte eine signifikante Downregulation des Proteoglycans Decorin auf Transkript-Ebene gezeigt werden. DCN ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und erfüllt in ihr zahlreiche regulatorische Funktionen. Nachdem für die verminderte Expression keine ursächliche Mutation in den codierenden Exons des Gens *DCN* gefunden werden konnte, war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob eine Veränderung im Promoterbereich des *DCN*-Gens bei diesen Patienten ursächlich sein könnte und falls ja, welcher Regulationsweg hiervon betroffen ist. Die *DCN*-Expression kann bei intakter Promotersequenz auch durch Interaktion mit anderen Faktoren beeinflusst werden. Daher sollte auch die Expression anderer funktionell bedeutsamer Komponenten der ECM untersucht werden, von denen bekannt ist, dass sie mit DCN interagieren oder andere regulative Funktionen erfüllen, die mittelbar die Decorin-Expression beeinflussen könnten. Zu diesen ECM-

Komponenten zählen auch das Proteoglycan Lumican und die Wachstumsfaktoren IL-1β und TGF-β1. Transkriptmengen-Änderungen in Hautfibroblasten von Patienten mit klassischem EDS wurden gemessen in der Hoffnung, ebenfalls Hinweise auf mögliche bisher nicht bekannte Feedback- und Regelungsmechanismen zu erhalten.

Diese Untersuchungen wurden mittels Transkriptmengen-Messung im quantitativen Northern Blot, DNA-Sequenzierung und Segregationsanalyse durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Agarose	BioRad, München
Alconox	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Bindesilan	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dynabeads	Invitrogen, Groningen, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Amersham Biosciences, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Gelatine	Roth, Karlsruhe
Glycerol 50%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Sigma, Taufkirchen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon 360	Sigma, München
RNAse Zap	Applied Biosystems, Darmstadt
Repel-Silan	Amersham Biosciences, Freiburg
Sephadex G50	Amersham Biosciences, Freiburg
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED	Amersham Biosciences, Freiburg
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg

Zellkultur

Bicarbonat – Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
DMSO	Serva, Heidelberg
EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Fetales Rinderserum	ICN Biomedicals Inc., Eschwege
Hanks Salt Solution	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MEM	Biochrom, Berlin
MEM Non-essential Amino Acids	Biochrom, Berlin
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin

2.1.2. Zelllinien zur DNA-/RNA-Gewinnung

Wir verwendeten zur Untersuchung insgesamt Zelllinien von 29 Patienten sowie 15 Kontrollpersonen.

Es wurden 17 Patienten mit klassischem Ehlers-Danlos-Syndrom untersucht (bezeichnet mit Gw 204, Gw 208, Gw 212, Gw 213, Gw 214, Gw 215, Gw 218, Gw 220, GW 221, Gw 222, Gw 223, Gw 225, Gw 226, Gw 230, Gw 231, Gw 235, Gw 256), außerdem 2 Patienten mit EDS Typ III (bezeichnet mit Gw 216, Gw 217), 8 Patienten mit Spontaner Dissektion der A. carotis interna (bezeichnet mit Gw 202, Gw 205, Gw 206, Gw 210, Gw 219, Gw 227, Gw 233, Gw 234) sowie ein Patient mit Wiedemann-Rautenstrauch-Syndrom (bezeichnet mit Gw 211) und ein unklassifizierter Patient (bezeichnet mit Gw 224) in verschiedenen Kombinationen.

Als Kontrollen wurden die Zellen von 15 gesunden Probanden (bezeichnet mit H 248, H 210, GMO0043A, GMO8399, Gw 157, Gw 169, Gw 167, Gw 164, GMO321, GMO4505A, GMO1653, GMO0024B, GMO4504A, GMO0851A, Gw 258) untersucht.

2.1.3. Radiochemikalien

Radionuklid α^{32}P-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg
Radionuklid γ^{32}P-dATP (5000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.4. Enzyme

Restriktionsenzyme: *Eco*RI, *Nhe*I, *Rsa*I	New England Biolabs, Frankfurt /M.
T4-Polynucleotid-Kinase	Amersham Biosciences, Freiburg
Taq-Polymerase	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.5. Antibiotika

Gentamicin	Biochrom, Berlin

2.1.6. Nukleinsäuren

2.1.6.1. Genomische DNA

Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.6.2. Hybridisierungssonden

Für die Northern Hybridisierung wurden folgende cDNA-Sonden verwandt:

Gen	Cloning Site	Lokalisation	Insertgröße	Quelle
LUM	*Sfi*I	Chromosom 12	1,804 kb	Chakravarti et al. (1995)
TGF-β	*Eco*RI, *Xho*I	Chromosom 19	1,78 kb	Derynck et al. (1985)
IL1-β	*Not*I, *Sal*I	Chromosom 2	1,019 kb	March et al. (1985)
GAPDH	*Eco*RI	Chromosom 12	1,3 kb	Tso et al. (1985)

Diese Sonden stammten aus dem Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Berlin.

2.1.6.3. Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid, Interactiva Division, Ulm hergestellt.

<u>PCR-Primer</u>

Primer	Verwendung	Modifikation	Bedingungen	Sequenz 5'→3'
DCNProm1f DCNProm1r	Decorin-Promoter Teil a für die Sequenzierung	5' Biotin keine	4 mM $MgCl_2$-Mix; 50°C, 35 Zyklen	TCT TCT CTT AAA GGG ATA CTC AAA ATA AAT CAA TTT CCT AGT
DCNProm2f DCNProm2r	Decorin-Promoter Teil b für die Sequenzierung	keine 5' Biotin	3 mM $MgCl_2$-Mix; 50°C, 35 Zyklen	GAA TGG ATA AAT ATG GAA TAC CTA CTT GCC ATG TAG AAT ACC
DCNProm1clonf	DCNProm1f für Klonierung (ohne Biotin)	keine	4 mM $MgCl_2$-Mix; 50°C, 35 Zyklen	TCT TCT CTT AAA GGG ATA CTC

CBL 43 CBL 45	COL5A1	keine	3 mM $MgCl_2$-Mix; 53°C, 30 Zyklen	CTC AAA GTA ACA CGC CTG TG TTC TCT TTG TCA TCA CTT TTG G
AFMc016xh9f AFMc016xh9r	COL5A1	keine	2 mM $MgCl_2$-Mix; 53°C, 30 Zyklen	TTG GGC CAC CCA TAA AAT A CTA GAG ACC CAG GCA ATT CTT
AFMa205zf1f AFMa205zf1r	COL5A1	keine	3 mM $MgCl_2$-Mix; 53°C, 30 Zyklen	CCT GGG CGA CAA AGT G GCC AAA GCG TGA TTT TTT A
AFMb335xh1f AFMb335xh1r	COL5A1	keine	2 mM $MgCl_2$-Mix; 53°C, 30 Zyklen	TCC CCA TTG GTT AGC ATT GAT CTC TGA AGC CCC TAA G
AFMa057vg9f AFMa057vg9r	COL5A2	keine	4 mM $MgCl_2$-Mix; 51°C, 30 Zyklen	AAC TTC AGC ATT CTA AGA GAC CTT T CGT GCC CAG CAG TGA T
AFMb072wg1f AFMb072wg1r	COL5A2	keine	3 mM $MgCl_2$-Mix; 51°C, 30 Zyklen	CAT ATT TGA GAG GAC CTT TGT GTG CAG GAT AAG ACC ACA
AFM a084yf9f AFMa084yf9r	COL5A2	keine	2 mM $MgCl_2$-Mix; 51°C, 30 Zyklen	TCA GAA GTG AAG ATG CCT CC TTG GTC CTA CAG CAC GAG
AFM065yf11f AFM065yf11r	COL5A2	keine	4 mM $MgCl_2$-Mix; 51°C, 30 Zyklen	GAG ATC AGG TAT ATT CAA TCC AC CAG AAA ATG ACA AAC TTT AGA GAG
M13uni M13rev	Klonierung	Keine	1 mM $MgCl_2$-Mix; 56°C, 35 Zyklen	GTA AAA CGA CGG CCA G CAG GAA ACA GCT ATG AC

Sequenzierprimer

Primer	Verwendung	Modifikation	Bedingungen	Sequenz 5'→3'
DCNProm1 Neuseq	Sequenzierung Teil a des Decorin-Promoters	5' Cy5	T7-Auto-Read (37°C+ 42°C) Cycle-Sequencing	GCT AAT AAA CAC ATA TGG AAA
DCNProm2 Seq	Sequenzierung Teil b des Decorin-Promoters	5' Cy5	T7-Auto-Read	CAT TTA TCA AAA CAA TAC TTG
DCNProm1mid seq	Sequenzierung 3'-Hälfte von Teil b des Decorin-Promoters	5' Cy5	T7-Auto-Read	GAA ACC ATT CTG ATA TCT CC

Synthetische Oligonukleotid-Sonden

Sonde	Verwendung	Modifikation	Sequenz 5'→3'
CA-11	Segregationsanalyse COL5A1 und COL5A2	keine	CAC ACA CAC ACA CAC ACA CAC A

2.1.6.4. Längenstandards (RNA, DNA)

RNA-Ladder 0,16 -1,77 kb — Life Technologies, Karlsruhe

RNA-Ladder 0,24 – 9,5 kb — Life Technologies, Karlsruhe

DNA-Marker Phi X 174/*Hae*III — Promega, Mannheim

2.1.7. Kulturmedien für die Zellkultur

MEM-Medium mit Earle's Salzen	50 ml	10 x MEM
	14,6 ml	7,5% $NaHCO_3$
	5 ml	200 mM L-Glutamin
	3 ml	10 mg/ml Gentamicin
	5 ml	MEM Non-essential Amino Acids
	50 ml	Fetales Rinderserum
	ad 500 ml	Aqua bidest.
Hanks-Medium	50 ml	10 x Hanks Salt Solution
	2,4 ml	7,5% $NaHCO_3$
	ad 500 ml	Aqua bidest.
Trypsin mit EDTA	0,3 % Trypsin/0,08% EDTA	
	7,5 ml	7,5% $NaHCO_3$
	ad 500 ml	1 x PBS
Tieffrierlösung	6,2 ml	MEM-Medium
	1 ml	DMSO
PBS-Puffer (10x)	49,22 g	PBS
ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	ad 11 ml	Aqua bidest.

2.1.8. Puffer, Lösungen und Ansätze

PCR

Standard-$MgCl_2$-Mix 1 mM (10x)	0,1 M	Tris pH 8,5
	0,5 M	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	0,1 %	Gelatine

PCR-Reaktionsansatz normal (30 µl)	24,7 µl	H_2O
	3,0 µl	$MgCl_2$-Mix (Molarität siehe Tabelle „Nukleotide“ 2.1.6.3)
	0,3 µl	dNTP
	0,3 µl	Primer 1
	0,3 µl	Primer 2
	0,4 µl	Taq-Polymerase
	1,0 µl	Proben-DNA (ca. 100 ng)
PCR-Reaktionsansatz groß (50 µl)	39,5 µl	H_2O
	5,0 µl	$MgCl_2$-Mix (Molarität siehe Tabelle „Nukleotide“ 2.7)
	0,5 µl	dNTP
	1,0 µl	Primer 1
	1,0 µl	Primer 2
	1,0 µl	Taq-Polymerase
	2,0 µl	Proben-DNA
Elektrophoresepuffer (1xTBE)	0,09 M	Tris-Base
	0,089 M	Borsäure
	2 mM	EDTA-Na_2

Northern Blot und Northern Hybridisierung

Denhardt’s Lösung	0,02%	BSA
	0,02%	Ficoll 400
	0,02%	PVP 360
DEPC-H_2O	0,1 ‰	DEPC
Formaldehyd-Lösung	37%	Formaldehyd

Ladepuffer (Northern Blot)	50 %	Glycerol
	1 mM	EDTA
	0,4 %	Bromphenolblau
	0,4 %	Xylencyanol FF
MOPS-Puffer (pH 7,1)	200 mM	MOPS
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA
	pH 7,1	mit NaOH einstellen
Prähybridisierungslösung und	50 %	Formamid
Hybridisierungslösung	5 x	SSPE
	2 x	Denhardt's Lösung
	0,1 %	SDS
Denaturierungslösung	50 mM	NaOH
	10 mM	NaCl
RNA-Färbelösung	0,5 M	Na-Acetat, pH 5,2
	0,04 %	Methylenblau
SDS-Lösung	0,5%	SDS
SSC-Puffer (20 x)	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat-Dihydrat
	pH 7,0	mit HCl einstellen
SSPE-Puffer (20 x)	3 M	NaCl
	0,6 M	NaH_2PO_4 x H_2O
	0,02 M	EDTA-Na_2
	pH 7,4	mit NaOH einstellen
TE-Puffer (1x)	10 mM	Tris-Cl
	1 mM	EDTA

Transfer-Phosphatpuffer	50 mM	Na-Phosphat, pH 6,5
Wasch-Phosphatpuffer	50 mM	Na-Phosphat, pH 7,2

Southern Blot und Southern Hybridisierung

Prähybridisierungslösung und	5 x	SSPE
Hybridisierungslösung	3 %	SDS
Bindesilan-Mischung	5 ml	100% Ethanol
	175 µl	10% Essigsäure
	17,5 µl	Bindesilan
TBE-Puffer (10x)	0,8 M	Tris, pH 8,3
	0,8 M	Borsäure
	20 mM	EDTA

Sequenzierung

B&W-Waschpuffer	10 mM	Tris-Cl pH 7,5
	1 mM	EDTA
	2 M	NaCl
	0,1 %	Tween 20 (Polysorbate 20)
TE-Puffer (1x)	siehe Northern Blot	
Denaturierungslösung	0,1 M	NaOH
Laufpuffer (0,5 x TBE)	0,045 M	Tris Ultrapure
	0,045 M	Borsäure
	1 mM	EDTA

2.1.9. Reagenziensysteme (Kits)

ALFexpress Auto Read Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
HiSpeed MidiPräp	Qiagen, Hilden

Quick Prep mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Rediprime II Random prime labelling System	Amersham Biosciences, Freiburg
Repro Gel Long Read	Amersham Biosciences, Freiburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Topo TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, NL

2.1.10. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Blotpapier (dick, dünn)	Schleicher + Schuell, Dassel
Hybond N+ Membran	Amersham Biosciences, Freiburg
MicroSpin Columns S-400 HR	Amersham Biosciences, Freiburg
Nunclon-Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Nunclon-Röhrchen 50 ml (BlueCaps)	Nunc, Wiesbaden
Nunclon Kryo-Röhrchen 5 ml	Nunc, Wiesbaden
Soft-Strips-Tube	Biozym, Hessisch Oldendorf
0,45 µm Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybridisierungsröhren	Saur, Tübingen
Sephadex-G-50-Säule	Amersham Biosciences, Freiburg
Röntgenfilme	FUJI, Düsseldorf

2.2. Geräte

Bakterienschüttler EB Swip SM 25	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Brutschrank cytoperm 2	Kendro, Hanau
Elektrophoreseapparaturen	
GNA-200	Amersham Biosciences,Freiburg
Macrophor™	Amersham Biosciences,Freiburg
Hybridisierungsofen	Bachofer, Reutlingen
Kodak Digital Science™ EDAS 120	Kodak, Stuttgart
Kryostat MultiTemp III	Amersham Biosciences,Freiburg
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss, Oberkochen

PCR-Geräte	
FTS-960 Thermal Sequencer	Corbett Research LTF, Wasserburg
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Phosphor Imager SF	Molecular Dynamics, Krefeld
Power Supplies	
Consort E425, 722	LTF, Wasserburg
PS 3002	Invitrogen, Karlsruhe
Sequenziergerät ALFexpress™	Amersham Biosciences,Freiburg
Spectrometer Gene Quant	Amersham Biosciences,Freiburg
Speed Vac SC110	Bachofer, Reutlingen
Sterile Bank LaminAir	Jouan GmbH, Unterhaching
Szintillationszähler 2200 CA	Packard BioScience, USA
Taumler Reax 3	Heidolph, Schwabach
Thermoblöcke	
Thermomixer Comfort Compact, 5346	Eppendorf, Hamburg
UV Transilluminator	UVP, Cambridge, UK
UV Crosslinker UVC 500	Amersham Biosciences,Freiburg
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
	Köttermann, Hänigsen
Zellzähler AL Modell 871	AL Systeme, Karlsruhe
Zentrifugen	
Biofuge pico + fresco	Kendro, Hanau
Megafuge 1.0 RS	Kendro, Hanau
Hettich Rotanta/S	Helmer, Unterschleißheim
Sorvall	Kendro, Hanau

2.3. Software

1D Image Analysis Software	Life Technologies, Karlsruhe
Aida 2 D Densitometry	Raytest, Straubenhardt
Blast 2 Sequences [bl2seq]	National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, USA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)
Cyrillic 2.1	Cherwell Scientific Publishing,

	Frankfurt
DNA-Star	GATC Biotech, Konstanz
Sequence Analyser 2.10	Amersham Biosciences, Freiburg
StatView	Adept Scientific, Herts, United Kingdom

2.4. Methoden

2.4.1. Zellkultur

2.4.1.1. Kulturbedingungen

Die Kulturflaschen wurden im dunklen Brutschrank bei 37°C, hoher Luftfeuchtigkeit und in 5%-CO_2-angereicherter Atmosphäre inkubiert. Die kleinen Kulturflaschen enthielten 5 ml, die mittleren 10 ml und die großen 40 ml Kulturmedium. Durchschnittlich alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen; zur Entfernung von Stoffwechselprodukten wurde außerdem vorher mit 10 ml Hanks-Lösung gespült.

2.4.1.2. Subkultur anlegen

Wenn die Zellen den Flaschenboden in einem konfluenten Zellrasen bedeckten, wurden sie subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen mit 10 ml Hanks-Lösung gespült und danach mit 5 ml Trypsin-Lösung überschwenkt (Lösung wurde gleich wieder abgesaugt). Nach 2 Minuten Inkubation im Brutschrank waren die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellsuspension nach enthaltener Zellzahl auf zwei oder mehrere Flaschen verteilt und mit Kulturmedium ergänzt.

2.4.1.3. Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff

Zur Aufbewahrung für mögliche weitere Kulturen wurden Zellen aller verwendeten Zelllinien tiefgefroren. Hierzu wurde die Kulturflasche mit 10 ml Hanks-Lösung gespült und die Zellen mit 5 ml Trypsin-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Nach Zentrifugation 10 min bei 1000 rpm und Absaugen des Überstands wurde das Pellet mit Kulturmedium resuspendiert und auf dem Schüttler mit 7,5 % DMSO-Lösung in Medium versetzt, die innerhalb 6 Minuten tropfenweise zugegeben wurde. Dann wurden die Tieffrierröhrchen mit den Zellen mindestens 100 min in

der Gasphase des Stickstoffbehälters belassen und danach vollständig in flüssigem Stickstoff versenkt.

2.4.1.4. Auftauen tiefgefrorener Zellen

Tiefgefrorene Zellen wurden unter tropfenweiser Zugabe von 9 ml kaltem Kulturmedium auf dem Schüttler resuspendiert, danach 9 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mit angewärmtem Kulturmedium (37°C) wiederholt. Danach wurde das Zellpellet in 1 ml angewärmtem Kulturmedium gelöst, mit der Pipette in eine Kulturflasche überführt und weitere 7 ml Kulturmedium zugegeben. Die Kulturflasche wurde daraufhin über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.4.1.5. Tieffrieren von Zellen zur Aufarbeitung von RNA

Die Zellen wurden mit 10 ml Hanks-Lösung gespült und mit 5 ml Trypsin-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Nach 2 min wurde mit 5 ml Kulturmedium das Trypsin inaktiviert und der Inhalt jeder Flasche in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit PBS-Puffer resuspendiert. Waren mehrere Flaschen einer Zelllinie vorhanden, so wurden sie bei diesem Schritt zusammengeführt (Menge PBS-Puffer für alle Flaschen = 50 ml insgesamt). Die Zellen wurden nochmals 15 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet wiederum in 50 ml PBS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde zur Zellzählung am Zellzähler verwendet. Nach erneuter Zentrifugation von 10 min bei 1000 rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert (1 ml/Tieffrierröhrchen) und die Suspension auf die Tieffrierröhrchen verteilt (5-10 Mio. Zellen pro Röhrchen). Diese wurden nochmals 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und nach dem Absaugen des Überstandes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

2.4.2. Nukleinsäuretechniken

2.4.2.1. Polymerase-Kettenreaktion: Analyse verschiedener Loci

Die PCR wurde gemäß gängigen Standards durchgeführt (Saiki et al. 1988). Die gewählten Bedingungen sind für alle Primer in der Tabelle „Nukleotide“ unter Punkt 2.1.6.3 aufgeführt.

Durchführungsbedingungen der PCR:

	Initial-Denaturierung	5 min	bei	95°C
30 – 35 Zyklen	Denaturierung	30 s	bei	95°C
	Annealing	30 s	bei	46 – 61°C
	Polymerisierung	30 – 45 s	bei	72°C
	Extension für 5 min bei 72°C nach letztem Zyklus			
	Kühlung auf 4°C			

2.4.2.2. Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurden 10 µl aus jedem PCR-Tube auf ein 2%-NEEO-Agarose-Gel aufgetragen und bei einer Feldstärke von 6,67 V/cm in der Elektrophorese aufgetrennt (zwischen 30 und 60 min lang, je nach Größe des amplifizierten Fragments).

2.4.2.3. Färbung und Abbildung

Das Agarosegel wurde für 30 min durch Einlegen in 0,1%-Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach für 30 min gewässert, um nicht-DNA-gebundenes Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

2.4.2.4. RNA-Transskriptmengenbestimmung: Gesamt-RNA

Die Aufarbeitung der Zellen geschah mit dem *RNeasy mini Kit* von Qiagen nach dem dort beigefügten Protokoll (bei den *kursiv* geschriebenen Lösungen handelt es sich hier und in den folgenden Beschreibungen jeweils um die Herstellerbezeichnung).

Die tiefgefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurden 600 µl *RLT* und *ME* zupipettiert. Das Gemisch wurde 10 x durch eine Tuberkulinspritze mit aufgesetzter Kanüle gezogen, um die Zellen zu lysieren. Dabei war darauf zu achten, dass das Lysat nicht zu warm wurde, um RNA-Degradation zu vermeiden.

Das Lysat wurde dann 4 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, mit 600 µl 70% Ethanol vermischt und auf eine Säule mit Silikatgelmembran gegeben. Es folgten mehrere Waschvorgänge mit Zusatz verschiedener Waschpuffer und Ethanol und anschließender Zentrifugation, während derer die RNA an die Silikatgelmembran gebunden wurde. Am Ende wurde die Membran trocken zentrifugiert. Mit 2 x 30 µl

DEPC-Wasser wurde dann im letzten Schritt die RNA in ein neues Eppendorfgefäß eluiert. 2 µl des Eluats wurden zur photometrischen Konzentrationsmessung verwendet. Die RNA wurde bei –70°C tiefgefroren.

2.4.2.5. RNA-Transskriptmengenbestimmung: messenger-RNA (mRNA)

Die Aufarbeitung von mRNA aus Zellen der Zellkultur erfolgte mit dem *QuickPrep mRNA Purification Kit* nach dem Protokoll des Herstellers. Vor Beginn der Prozedur wurde der Arbeitsplatz mit *RNAseZap* gereinigt, um die Gefahr einer Kontamination der Proben mit RNAse zu vermindern. Der *Extraction Buffer* wurde vor Beginn der Prozedur auf 37°C erwärmt.

Die tiefgefrorenen Zellen wurden in 1,5 ml des *Extraction Buffer* resuspendiert und durch wiederholtes Aufziehen durch eine 21-G-Nadel mechanisch lysiert. Das Lysat wurde dann mit 3 ml *Elution Buffer* des Kits versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde die Matrix der *Oligo-(dT)-Cellulose Spun Column* des Kits durch vorsichtiges Aufschütteln homogenisiert. Oberer und unterer Verschluss der Säule wurden entfernt und die Säule noch unbeschickt für 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Wiederverschließen der Säule am unteren Ende wurden 4 ml vom Überstand des zentrifugierten Zell-Lysats auf das Granulat der Säule gegeben. Die Säule wurde oben ebenfalls verschlossen und das Granulat durch Rotation auf dem Karussell sehr behutsam gemischt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 1500 rpm, der Überstand wurde verworfen. Die Säule wurde mit 3 ml *High Salt Buffer* versetzt, verschlossen und vorsichtig gemischt, danach 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Dann wurden 3 ml *Low Salt Buffer* auf die Säule gegeben, diese verschlossen ebenfalls 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgte eine erneute Zugabe von 3 ml *Low Salt Buffer*, diesmal jedoch wurde die Säule mit offenen Verschlüssen 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert und anschließend in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 260 µl des auf 60°C vorgewärmten *Elution Buffer* wurde die Säule 2 min 15 sec bei 1700 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ebenfalls zweimal wiederholt. Das so gewonnene Eluat (~750 µl) wurde nun mit 80µl K-Acetat und 1,6 ml -20°C kaltem, 95%igem Alkohol versetzt, vorsichtig gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wurde die Probe bei -6°C 45 min bei 13000 rpm

zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und dann nach einer Konzentrationsmessung in einer geeigneten Menge DEPC-Wasser resuspendiert (jeweils berechnet nach der gewünschten Zielkonzentration der mRNA).

2.4.2.6. Northern Blot

Zur Herstellung des Elektrophorese-Gels wurden 2 g *BioRad*-Agarose mit 146 ml DEPC-Wasser aufgekocht und sofort nach dem Kochen 20 ml 10 x MOPS-Puffer zugegeben. Nachdem das Gel auf 60°C abgekühlt war, wurde es mit 34 ml 37% Formaldehyd (pH>4) versetzt und sofort unter dem Abzug gegossen.

Als Elektrophoresepuffer diente 1xMOPS-Puffer, der mit DEPC-Wasser angesetzt wurde. Für jede Geltasche wurde eine RNA-Probe mit einem Gesamtvolumen von 22 µl angesetzt. Sie enthielt entweder 3 µg mRNA oder 10-20 µg gesamtRNA. Die gelöste RNA wurde mit 0,5% SDS-Lösung auf ein Volumen von 4,5 µl aufgefüllt; bei sehr niedriger RNA-Konzentration und daher größerem Volumen als 4,5 µl erfolgte zuerst eine Volumenreduktion auf unter 4,5 µl im *Speed Vac*.

Weitere Zusätze je Probe:	2	µl	10 x MOPS
	3,5	µl	Formaldehyd
	10	µl	Formamid
	2	µl	RNA-Ladepuffer
	22	µl	Gesamtansatz

Als Marker verwendeten wir jeweils 5 µl der verschiedenen RNA-Ladder, die analog der RNA-Proben angesetzt und zusätzlich noch mit 2,5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt wurden (Gesamtvolumen 25 µl).

Vor dem Auftragen wurden alle Proben 15 min bei 60 °C auf dem Thermoblock inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 4°C oder Raumtemperatur über Nacht bei einer Feldstärke von 1 V/cm.

Das Gel wurde nach dem Lauf unter UV-Licht so abgedeckt fotografiert, dass lediglich die Markerspur dem UV-Licht ausgesetzt war. Ein Lineal wurde neben der Markerspur positioniert und mitfotografiert (Skalierungsbeginn = Taschenposition). Danach wurde das Gel auf dem Taumler für 5 min in DEPC-Wasser geschwenkt, um das Formaldehyd auszuwaschen.

Währenddessen wurde mit DEPC-Wasser 1 Liter Denaturierungslösung angesetzt, das Gel hineintransferiert und 30 min auf dem Taumler inkubiert. Es erfolgte eine weitere, kurze Spülung in DEPC-Wasser und dann der Transfer in den Transferpuffer (50 mM Na-Phosphatpuffer mit pH 6,5), worin das Gel nochmals 15 min auf dem Taumler inkubiert wurde.

Die Transfermembran (Hybond N+) wurde zugeschnitten, beschriftet, kurz mit DEPC-Wasser befeuchtet und bis zur Verwendung in Transferpuffer eingelegt. Als Docht für den Blot diente ein Streifen dickes Blotpapier, der von einer Glasplatte aus mit beiden Enden in die Wanne mit dem Transferpuffer tauchte und auf den ein weiteres dickes und ein dünnes Blotpapier aufgelegt wurden. Dann wurde das Gel aufgelegt und mit Parafilm umrandet, so dass nur durch das Gel ein Kapillarstrom stattfinden konnte. Die vorbehandelte Transfermembran wurde auf das Gel aufgebracht und mit einer sterilen Plastikpipette glattgerollt, so dass keine Luftblasen mehr zu sehen waren. Auf die Membran schließlich wurden gelegt: 2 Streifen dünnes Blotpapier (feucht), 10 Streifen dickes Blotpapier (trocken) und dann eine gleichmäßig geschichtete Packung Handpapier. Beschwert wurde der Blot mit einer Glasplatte und einem zusätzlichem Gewicht von ca. 1 kg. Während der Blotphase wurde bei Bedarf Transferpuffer nachgefüllt.

Der Blotabbau erfolgte ein oder zwei Tage später. In einer gesäuberten Plastikschale wurden 250-500 ml Waschpuffer angesetzt und der Filter kurz darin gewaschen. Danach ließen wir den Filter kurz lufttrocknen, bevor die RNA unter UV-Licht (Intensität 1500 µJ/cm^2) mit dem Filter vernetzt wurde. In Alufolie wurde der Filter dann bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2.7. Sondenpräparation

Die Präparation der Hybridisierungssonden erfolgte aus Plasmiden, die die klonierte cDNA zu den von uns gesuchten Transkripten (LUM, TGFbeta und Il-1-beta) enthielten. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Kit *HiSpeed Midi Präp* wie später unter 2.4.4.5 beschrieben.

Zur Insertpräparation wurden z.B. 20 µl des Plasmids (entsprechend 37 µg) mit 50 U des Enzyms *Nhe*I sowie 100 U des Enzyms *Eco*RI unter Zugabe von 10 µl 10x *Eco*RI-Puffer und 60 µl Aqua bidest in einem 100 µl-Ansatz über Nacht bei 37°C gespalten. Am nächsten Tag erfolgte eine Inaktivierung für 20 min bei 65°C. Die geschnittene DNA wurde auf einem 0,8% NA-Agarose-Gel bei einer Feldstärke

von 0,67V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und das Gelstück mit dem gesuchten Fragment (Insert) herausgeschnitten. Mittels des *QIAgen Gel Extraction Kits* wurde nach Herstellerprotokoll das Insert präpariert und mit 50 µl *Elution Buffer* eluiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl des Eluats auf einem 2% NEEO-Agarose-Gel aufgetragen und die Insertmenge auf dem Gel im Vergleich zum Standard geschätzt. Hieraus errechnete sich die Konzentration des Inserts im Eluat. Das so präparierte Insert kam als Sonde bei der Northern Hybridisierung zum Einsatz.

2.4.2.8. Northern Hybridisierung

Wir verwendeten die gleiche Lösung als Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung. Zu Beginn wurden 20 ml dieser Lösung angesetzt und dann bei 60°C für 2 Stunden im Wasserbad inkubiert, um eine vollständige Lösung der Bestandteile zu erreichen. Dann wurde die Lösung durch einen 0,45 µm-Filter gefiltert und zu gleichen Teilen auf zwei Polyurethanröhrchen für Prähybridisierung und Hybridisierung aufgeteilt, die dann bis zur Verwendung im auf 42°C vorgeheizten Drehschrank des Isotopenlabors aufbewahrt wurden.

Prähybridisierung

Zur Prähybridisierung wurden 100 µl von im Wasserbad aufgekochter Lachssperma-DNA für 1 min auf Eis gestellt und der Prähybridisierungslösung zupipettiert. Der Filter wurde mit der RNA-Seite nach innen in die Hybridisierungsröhre eingerollt und die Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Röhre wurde dann dicht verschlossen und für 4 Stunden bei 42°C im Drehschrank inkubiert.

Markierung der Sonde

Zur Herstellung der Markierung nach einem abgewandelten Protokoll des Kits *Rediprime II Random Prime Labelling System* wurde die Sonden-DNA so mit TE-Puffer verdünnt, dass mindestens 25 ng Sonden-DNA in 47 µl Volumen gelöst waren. Dann wurde die DNA durch Kochen denaturiert und für 2 min auf Eis gestellt. Das gesamte Volumen wurde ins Reaktionsgefäß des Kits pipettiert und 3 µl ^{32}P-dCTP dazugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert und danach 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. In dieser Zeit stellte die Klenow-Polymerase I des Kits radioaktiv markierte DNA-Fragmente der Sonden-DNA her.

Nach Zugabe von 50 µl TE-Puffer wurde der Ansatz auf eine *Sephadex-G-50*-Säule gegeben und 3½ min bei 1000 rpm zentrifugiert. 2 µl des Eluats wurden zur Aktivitätsmessung verwendet. Ab einer Aktivität von 300 000 cpm wurde die Markierung verwendet. Nach Denaturierung durch 10-minütiges Kochen wurde die Markierung auf Eis gestellt.

Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurde die vorbereitete Hybridisierungslösung mit der markierten Sonde versetzt, alles zusammen 10 min gekocht und in die zuvor von der Prähybridisierungslösung befreite Röhre mit dem Filter gegeben. Die Inkubation des Filters mit der Markierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Drehschrank.

Am nächsten Morgen wurde der Filter in Waschpuffer mit absteigender Konzentration von SSC gewaschen.

2 x 15 min	5 x SSC / 0,1% SDS	42°C
2 x 20 min	2 x SSC / 0,1% SDS	65°C
2 x 20 min	0,5 x SSC / 0,1% SDS	65°C
2 x 20 min	0,1% SDS	

Der Filter wurde kurz luftgetrocknet und in einen Folienschlauch eingeschweißt. Dann wurde er in eine Kassette des *Phosphor Imager* eingelegt und je nach Aktivität für einen oder mehrere Tage exponiert.

2.4.2.9. Auswertung im Phosphor Imager

Die exponierten Platten wurden am *Phosphor Image*r mit dem Programm *2D Densitometry* ausgewertet.

2.4.3. Segregations-Analyse am *COL5A1*- und *COL5A2*-Locus

Mit polymorphen Mikrosatelliten-Markern aus der Nachbarschaft von *COL5A1* und *COL5A2* wurden eine Segregationsanalyse durchgeführt, um nachzuweisen, ob Allele dieser Regionen mit dem Phänotyp eines EDS I oder EDS II co-segregieren. Diese Studie wurde an der DNA von zwei an EDS erkrankten Familien durchgeführt. Die Allele wurden im Southern Blot nach radioaktiver Hybridisierung mit einem $(CA)_n$-Dinukleotidrepeat bestimmt.

2.4.3.1. PCR

Siehe Punkt 2.4.2.1

Die Matrizen-DNA für die PCR war genomische DNA von jeweils allen Mitgliedern zweier Familien (jeweils Mutter, Vater und zwei Kinder), bei denen der Vater und beide Kinder an EDS Typ I oder II erkrankt waren (histologisch gesichert), die Mutter aber gesund war.

2.4.3.2. DNA-Acrylamidgelelektrophorese

Für 50 ml 6%-Acrylamidgel:	25 g	Harnstoff
	5 ml	10 x TBE
	10 ml	Aqua bidest.
	7,5 ml	40% Acrylamid-Stammlösung

Die Mischung wurde im Wasserbad auf 60°C erwärmt, so dass sie sich vollständig löste, jedoch nicht heißer, damit das Acrylamid keinen Schaden nahm.

Diese Mischung wurde dann auf 50 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und mit einer Wasserstrahl-Unterdruckpumpe durch einen Millipore-Filter gereinigt und entgast.

Alle Platten der Elektrophoreseapparatur wurden vor Gebrauch sorgfältig mit 70% Ethanol, *Alconox* (7,5 g/l), Aqua bidest und Isopropanol gereinigt. Die Thermoplatte wurde mit *Repel-Silan* vorbehandelt, die Glasplatte mit einer Bindesilan-Mischung (5 ml 100% Ethanol, 175 µl 10% Essigsäure, 17,5 µl Bindesilan), damit das Gel gut haften konnte. Zwischen die zusammengefügten und seitlich von 0,5mm-Spacern auf Abstand gehaltenen Platten wurde nun das vorbereitete Gel gegossen, nachdem 300 µl 10% APS und 25 µl TEMED zupipettiert worden waren. Innerhalb einer Stunde war das Gel polymerisiert.

Elektrophoresevorlauf

Für den Elektrophoresevorlauf wurden 2 l 1 x TBE verwendet. Das Gel wurde vertikal in die Apparatur eingespannt und die Thermoplatte an den 50°C warmen Wasserkreislauf angeschlossen. Nach dem Kammzug wurden die Geltaschen mit TBE gespült (Ablagerungen von Harnstoff). Der Vorlauf dauerte 30 min bei einer Feldstärke von 36 V/cm.

Pro Spur wurden 2,5 µl PCR-Produkt mit 5 µl Ladepuffer versetzt. Nach 3-minütigem Aufkochen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und in die vorher nochmals gespülten Geltaschen pipettiert.

Elektrophorese

Die Elektrophorese dauerte normalerweise 3-4 Stunden, ebenfalls bei einer Feldstärke von 36 V/cm. Sie wurde beendet, wenn die obere Bande des Ladepuffergemisches (hellblau) im unteren Viertel des 48 cm langen Gels erschien.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelplatten aus der Apparatur genommen und die Glasplatte mitsamt dem haftenden Gel vorsichtig von der Thermoplatte gelöst.

2.4.3.3. Southern Blot

Die Transfermembran (Hybond N^+) wurde zugeschnitten, in 1 x TBE angefeuchtet und auf das Gel gelegt, wobei darauf zu achten war, dass sich keine Luftblasen bildeten. Nach Markierung der Geltaschen auf dem Filter wurden 4 gleichgroße Streifen dickes Blotpapier darauf platziert und der Blot mit der Thermoplatte und ca. 1 kg zusätzlichem Gewicht beschwert. Geblottet wurde über Nacht bei Raumtemperatur.

Zur Denaturierung der DNA auf dem Filter wurde dieser nach dem Blotabbau 15 min lang in 0,4 N NaOH eingelegt und dann in 5 X SSC durch kurzes Schwenken neutralisiert. Noch vorhandene Gelreste wurden entfernt. Der Filter trocknete an der Luft und wurde dann entweder in einen Folienschlauch eingeschweißt und bei 4°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

2.4.3.4. Southern Hybridisierung

Für Prähybridisierung und Hybridisierung wurde die gleiche Lösung verwendet. Es wurden zu Beginn 40 ml der Lösung angesetzt und zu gleichen Teilen auf zwei Polyurethanröhrchen für Prähybridisierung und Hybridisierung verteilt.

Die Prähybridisierungsmischung wurde im Wasserbad auf 60°C vorgewärmt und dann zum Filter in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte bei 60°C für 3 Stunden im Drehschrank.

Zur Markierung der $(CA)_n$-Repeat-Sonde diente folgender Ansatz:

2 µl	CA-Repeat (100 pmol/µl)
2 µl	One-for-All-Buffer
7 µl	γP^{32} dATP (10 mCi/ml)
8 µl	Aqua bidest
1 µl	T4-Polynukleotid-Kinase
20 µl	

Nach Zugabe der Kinase wurde die Markierung für 30 min bei 37°C auf dem Thermoblock inkubiert.

Zur Aufreinigung der Markierung wurde eine DEAE-Sephacel-Säule vorbereitet: 200 µl DEAE-Sephacel wurden in eine Polypropylen-Säule pipettiert und mit 15 ml 1 x TE gespült. Die Säule wurde danach luftdicht verschlossen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Zur Reinigung wurde der Markierungsansatz mit 80 µl TE versetzt und 10 min bei 65°C im Becherglas denaturiert. Die Mischung wurde auf die Säule pipettiert und zuerst mit 2 ml TE gewaschen, dann 2 ml 0,2 M NaCl zugegeben und erneut gewaschen. Mit 1 ml 0,5 M NaCl wurde die Sonde schließlich in ein Eppendorfgefäß eluiert. An 2 µl des Eluats wurde im Szintillationszähler die Cerenkov-Strahlung der Markierung bestimmt; ab 70 000 cpm wurde die Markierung verwendet.

Die markierte DNA wurde zur Hybridisierungslösung gegeben, die Prähybridisierungslösung verworfen und gegen die Hybridisierungslösung mit markierter DNA ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C im Drehschrank.

Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung entfernt und der Filter in Waschpuffer (6 x SSC, 1 x SDS) gewaschen. Dann wurde er in einen Folienschlauch eingeschweißt und in einer Röntgenkassette, je nach Ausgangsstrahlung, bei -80°C einen bis mehrere Tage gegen einen Röntgenfilm exponiert. Nach der Entwicklung wurde der Röntgenfilm ausgewertet.

2.4.4. Sequenzierung Decorin-Promoter

2.4.4.1. PCR

Siehe Punkt 2.4.2.1

Als Matrizen-DNA diente genomische DNA von fünf Patienten (Gw204, Gw215, Gw218, Gw230, Gw235), die alle an histologisch gesichertem klassischen EDS erkrankt waren. Es handelte sich hierbei durchweg um Patienten aus dem Kollektiv, für welches eine Minderexpression von DCN bereits nachgewiesen werden konnte (Walter 2004). Es wurden die Primerpaare DCNProm1f/r sowie DCNProm2f/r verwendet. Die PCR-Bedingungen sind der Tabelle unter *2.1.6.3* zu entnehmen.

2.4.4.2. Vorbereitung der PCR-Produkte mit *Dynabeads*

Die Auftrennung der doppelsträngigen PCR-Produkte in Einzelstränge erfolgte mit *Dynabeads*, kleinen Streptavidin-beschichteten Eisenkügelchen, die über Biotin an den PCR-Primer gekoppelt waren. Hierzu war ein Primer des Paares am 5'-Ende mit Biotin markiert. Über einen speziellen Magnetständer konnten die *Dynabeads* samt gebundenen Molekülen aus einer Lösung extrahiert werden.

Pro zu sequenzierender PCR-Probe wurden 20 µl *Dynabeads*, hier noch für alle Proben gemeinsam, in B&W-Waschpuffer gewaschen. Hierzu wurden sie im Magnetständer gesammelt und der Überstand möglichst vollständig mit einer Pipette abgenommen, ohne aber das Pellet mit der Pipettenspitze zu berühren (dieser Vorgang wird weiter unten als „Waschvorgang" bezeichnet). Dann wurden pro PCR-Probe 20 µl Waschpuffer hinzupipettiert, die *Dynabeads* durch vorsichtiges Schnippen resuspendiert und wiederum der Überstand im Magnetständer abgenommen. Nun wurden 40 µl Waschpuffer pro Probe hinzugegeben und nach Resuspension der *Dynabeads* die Lösung in 40 µl-Portionen auf Eppendorfgefäße verteilt.

Jedes Eppendorfgefäß wurde dann mit 40 µl PCR-Produkt versetzt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Analog dem oben beschriebenen Waschvorgang wurden die *Dynabeads* mit dem gebundenen PCR-Produkt zuerst in 40 µl Waschpuffer, dann in 8 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Beim letzten dieser Schritte wurde die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt, so dass hier wie auch beim nächsten Waschvorgang mit 50 µl 0,1 M NaOH die Stränge mit nicht biotinmarkiertem Primer jeweils zusammen mit dem Überstand

verworfen wurden. Die *Dynabeads* samt gebundenem PCR-Einzelstrang wurden weiterhin zuerst in 50 µl TE gewaschen und dann in 13 µl (Auto Read) oder 18 µl (Cycle Sequencing) Wasser resuspendiert.

2.4.4.3. Sequenzierung am ALFexpress Automaten (T7, cycle)

Die vorbereiteten Proben wurden entweder mit dem *ALFexpress Auto Read Sequencing Kit* oder mit dem *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* verarbeitet. Bei *ALFexpress Auto Read Sequencing Kit* wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll verwendet. Durch Erhöhung der Sequenziertemperatur auf 42°C konnten die Sequenzierergebnisse teilweise noch verbessert werden. Die Arbeit mit dem *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zu den in 18 µl Wasser gelösten *Dynabeads* wurden 4,5 µl des Sequenzierprimers gegeben und dann 20 µl der Mischung zu gleichen Teilen auf die Gefäße für die Basen A, C, G und T verteilt. Den Gefäßen wurden jeweils 2 µl des vorgesehenen Reagenz aus dem Cycle Sequencing Kit zugesetzt. Die Sequenzierung erfolgte im PCR-Gerät:

1 x	5 min	bei 96°C
25x	30 sec	bei 96°C
	10 sec	bei 60°C
	20 sec	bei 72°C

Jedem Gefäß wurden 3 µl Stoppmix zupipettiert und die Gefäße bis zum Auftragen auf Eis aufbewahrt.

Für den Sequenzierautomaten ALFexpress wurde der Kit *ReproGel Long Read*, ein 7% Acrylamid/Bisacrylamidgel, verwendet. Das Gel wurde nach dem Herstellerprotokoll vorbereitet und gegossen.

Als Laufpuffer wurden 2 l nicht fluoreszierender 0,5 x TBE verwendet. Vor Beginn der Sequenzierung musste die Thermoplatte auf die in den Laufbedingungen vorgesehenen 55°C vorgeheizt werden. Dies geschah im „Preset“-Vorlauf des ALFexpress-Automaten.

Laufbedingungen für das *ReproGel Long Read* im ALFexpress:

Spannung	1500 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	25 Watt
Temperatur	55°C
Messintervall	2 sec
Laufzeit	1000 min

Direkt vor dem Auftragen wurden die Proben denaturiert (85°C für 3 min bei AutoRead Sequencing, 96°C für 2 min bei Cycle Sequencing), sofort auf Eis gestellt und nach der Reihenfolge A,C,G,T in die Geltaschen aufgetragen.

Der Automat wurde gestartet, und die Sequenzierung erfolgte über Nacht. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem Sequence Analyser des ALFexpress ausgewertet. Wir verwendeten die Funktion „automatisches Prozessieren“ mit der Option „heterozygot“.

Die so erhaltenen Daten wurden im ASCII-Format exportiert und mit dem Programm "Blast 2 Sequences" auf der NCBI World Wide Web Page (siehe unter 2.3 Software) mit der Referenzsequenz verglichen.

2.4.4.4. Clonierung *Topo TA*

Da sich aus den Ergebnissen der ersten Sequenzierungen bei zwei Patienten Hinweise darauf ergaben, dass eine Heterozygotie des *DCN*-Gens vorliegen könnte, klonierten wir das PCR-Produkt mit Hilfe des *Topo TA Cloning Kits* von Invitrogen.

Es wurde für jeden Patienten ein normaler PCR-Ansatz hergestellt und die stattgehabte Amplifikation auf einem Agarosegel kontrolliert. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden dann 4 µl des PCR-Produkts mit 1 µl *Salt Solution* versetzt, 1 µl *Topo*-Vektor hinzupipettiert und die Mischung für 5 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die chemisch kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut. 2 µl der Klonierungsreaktion wurden den aufgetauten Zellen hinzupipettiert. Nach vorsichtigem Mischen blieben sie für 30 min auf Eis stehen.

Ein Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad ermöglichte die Aufnahme der DNA und damit die Transformation. Danach wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt. Dann wurden je 250 µl auf 37°C vorgewärmtes SOC-

Medium hinzugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 37°C in den Schüttler gespannt. Pro Klonierung wurden zwei Agarplatten mit 50 µl X-Gal vorbehandelt; auf der einen wurden 50 µl, auf der anderen 150 µl der Zellsuspension ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutraum bei 37°C aufbewahrt.
Am nächsten Morgen wurden von jedem Versuchsansatz zwanzig weiße oder hellblaue Kolonien gepickt und in einer PCR auf das Vorhandensein von rekombinanten Plasmiden geprüft. Hierzu wurde für jede Kolonie ein normaler PCR-Ansatz hergestellt (Primer M13uni/M13rev), die Kolonie mittels eines Zahnstochers abgenommen und kurz im Ansatz geschwenkt. Danach wurden die entsprechenden *E. coli* Klone geordnet auf einer Rasterplatte (gleiche Zusätze wie oben) ausplattiert und im Brutraum bei 37°C über Nacht inkubiert.
Die PCR lief zu den unter 2.4.2.1 aufgeführten Bedingungen. Die Polymerisationsdauer variierte mit dem verwendeten PCR-Gerät (*Robocycler*: 45 sec, Corbett: 30 sec). Die Produkte wurden auf einem 2%-NEEO-Agarosegel durch Elektrophorese neben einem Marker (PhiX 174/*Hae*III) aufgetrennt. Das Plasmid ohne Insert bildete eine Bande bei 220 bp, das Plasmid mit Insert eine Bande bei 1150 bp (930+220 bp). So konnten die erfolgreich transformierten Klone identifiziert werden.
Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, jeweils Klone von beiden Allelen zu erhalten, wurden von jedem Patienten fünf erfolgreich transformierte Klone von der Rasterplatte abgenommen und in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml SOB-Medium unter Zugabe von 50 µl Ampicillin über Nacht auf dem Schüttler (ca. 600 rpm) inkubiert und angereichert.

2.4.4.5. Plasmidpräparation

Die Präparation erfolgte mit dem Kit *HiSpeed MidiPrep* von Qiagen. Das SOB-Medium wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) umgefüllt, für 40 min bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde zur Lyse der Bakterien in 6 ml *Puffer 1* resuspendiert, mit 6 ml *Puffer 2* versetzt, mehrere Male durch Wenden vorsichtig gemischt und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 6 ml gekühlter *Puffer 3* wurden zugegeben und vorsichtig gemischt; ein wolkiges, weißes Präzipitat wurde in der Lösung sichtbar. Die Lösung wurde in eine stempellose Spritze umgefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich das Präzipitat an der Oberfläche absetzte.

Dann wurde die Lösung auf die vorher mit 4 ml *Puffer QBT* equilibrierte *Midi Tip* Säule gegeben und passierte diese entlang des Schwerkraftgefälles. Die Plasmid-DNA verblieb hierbei im Filter der Säule. Die Säule wurde dann mit 20 ml *Puffer QC* gewaschen. Das Plasmid wurde mit 5 ml *Puffer QF* eluiert und durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol in 5 min bei Raumtemperatur gefällt. Die Lösung wurde dann mittels einer Spritze durch das *QIAprecipitator* Modul gepresst und die Membran im Modul danach durch mehrfache Druckluftapplikation durch die leere Spritze getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl TE-Puffer aus dem Modul eluiert und das Eluat nochmals durch das Modul gepresst, um den Gewinn an Plasmid-DNA zu maximieren. Zu jeder Probe wurde 1 ml Ethanol pipettiert und die Proben 35 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das bei RT getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und mittels Absorptionsspektrometrie die Konzentration der Plasmid-DNA bestimmt.

2.4.4.6. Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels des *Cy5-Auto Read Sequencing* Kits. 5 µg Plasmid wurden in 10 µl Aqua bidest gelöst, 2 µl markierter Primer in einer Konzentration von 2,5 pmol/µl hinzupipettiert und zur Denaturierung der Plasmid-DNA 1,5 µl 1 M NaOH zugegeben. Nach Mischen wurde die Lösung für 5 min bei 65°C inkubiert, dann kurz zentrifugiert und nochmals für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 1,5 µl 1 M HCl. Dann wurden 3 µl DMSO sowie 2 µl *Annealing Puffer* hinzugegeben und die Mischung für 15 min bei 37°C inkubiert. Jeder Probe wurden dann 2 µl T7-DNA-Polymerase (entsprechend 6 U) sowie 1 µl Extensionspuffer zugemischt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit 3 µl des jeweiligen Nukleotidmixes in der Reihenfolge ACGT vorbereitet und je 5 µl der Probe in jede Vertiefung zupipettiert. Die Platte wurde anschließend 5 min bei 37°C (zur Verbesserung der Sequenzierergebnisse wahlweise 42°C) inkubiert. In jede Vertiefung wurden dann 5 µl Stoppmix gegeben und die Proben entweder bei –20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Direkt vor dem Auftragen erfolgte eine 3-minütige Denaturierung bei 85°C. Der Gellauf am ALFexpress erfolgte analog der PCR-Produkt-Sequenzierung unter Punkt 2.4.4.3.

2.4.4.7. Restriktionsenzymspaltung zur Überprüfung einer Sequenzvariante

Nachdem bei der DNA von zwei Patienten dieser Studie eine Sequenzvariante in Form einer Insertion/Deletion gefunden wurde, wurde untersucht, ob es sich um einen allgemein vorkommenden Polymorphismus handelt oder um eine Mutation, die die Promoteraktivität beeinflussen könnte.

Die Sequenzvariante verändert die Schnittstelle für das Restriktionsenzym *RsaI*, so dass über PCR mit flankierenden Primern und anschließender Restriktionsenzymspaltung unmittelbar getestet werden konnte, ob die Sequenzvariante vorlag oder nicht. Dazu wurde die DNA von 50 gesunden Personen (= 100 Chromosomen) sowie DNA von drei Patienten (Gw 204, Gw 218, Gw 230) aus dem Patientenkollektiv mit klassischem EDS untersucht. Hierbei hatte der Patient mit der Kennung Gw 230 in der vorhergegangenen Sequenzierung die zu untersuchende Sequenzvariante gezeigt, während Gw 204 und Gw 218 keine Abweichung von der Referenzsequenz geboten hatten.

Die DNA aller Personen wurde mit den Primern DCNProm1f/r amplifiziert (siehe Punkt 2.4.2.1). Dann wurden pro Ansatz 12 µl des jeweiligen PCR-Produkts mit 2,5 µl des vom Enzym-Hersteller für die Anwendung von *RsaI* empfohlenen 10 x *NEBuffers 1* sowie 5 U des Restriktionsenzyms *RsaI* versetzt. Dieser Ansatz wurde mit Aqua bidest auf 25 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation der Proben für sechs Stunden bei 37°C, welche gefolgt war von einer 20-minütigen Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzung auf 65°C. Im Anschluss wurden die entstandenen DNA-Fragmente analog Punkt 2.4.2.2 auf einem 2% NEEO-Agarosegel aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.4.5. Statistik

Die Auswertung der Rohdaten aus der Northern-Blot-Hybridisierung erfolgte mit dem Programm *StatView* der Firma Adept Scientific, Herts, United Kingdom in Kooperation mit einem Biomathematiker.

Es wurden der Median, das arithmetische Mittel und die Standardwabweichung der Messwerte bestimmt, ebenso die 25 und 75% sowie 10% und 90% Quantile und das Minimum bzw. Maximum. Außerdem erfolgte die Darstellung in Box-Whisker-Plots. Die Auswertung der Daten bezüglich statistisch signifikanter Unterschiede erfolgte aufgrund der Stichprobengröße und der Art der Daten mittels des Mann-Whitney-Tests. Als Signifikanzniveau galt hierbei $\alpha=0,05$.

3 Ergebnisse

3.1. Segregationsanalyse für COL5A1 und COL5A2 in zwei vom klassischen EDS betroffenen Familien

Bisher konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass Mutationen und daraus resultierende funktionelle Insuffizienzen verschiedener Kollagen-Gene, vor allem der Kollagene der Gruppe V, ursächlich für das Krankheitsbild eines klassischen Ehlers-Danlos-Syndroms sein können. Wir untersuchten daher die Vererbung beider Gene in zwei von klassischem EDS betroffenen Familien. In beiden Familien waren jeweils ein Elternteil sowie beide Kinder daran erkrankt. Wir versuchten, bei den untersuchten Familien Hinweise auf einen gemeinsamen Haplotyp des erkrankten Elternteils mit den erkrankten Kindern für die Gene *COL5A1* oder *COL5A2* zu erhalten oder aber diese als Kandidatengene für die Erkrankung in diesen Familien auszuschließen. Eine Sequenzierung dieser Gene erfolgte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht, da diese aufwändige Analyse von unserem Kooperationspartner am Uniklinikum Heidelberg durchgeführt werden sollte.

Durch Bestimmung der Allele von jeweils vier die Gene flankierenden Sequence Tagged Sites (STS) verfolgten wir mittels Southern Blot und Hybridisierung dieser Marker mit radioaktiv markierten Sonden die Vererbung der elterlichen Chromosomen auf die Kinder. Die gewählten STS sind maximal 10 MB von den genannten Kollagen-Genen entfernt und werden daher höchstwahrscheinlich gemeinsam mit ihnen vererbt.

Das Gen *COL5A1* liegt auf Chromosom 9 im Bereich von 136.6 bis136.9 MB, das Gen *COL5A2* befindet sich auf Chromosom 2 im Bereich von 189.6 bis 189.8 MB (Hubbard et al. 2007).

Bei der Auswertung zeigte sich, dass im Fall der Vererbung von *COL5A2* die Kinder in beiden Familien mit hoher Wahrscheinlichkeit jeweils das gleiche Allel des Chromosoms 2 des erkrankten Elternteils erhielten, was in diesen Familien als ein Hinweis auf die gemeinsame Vererbung von *COL5A2* und der Erkrankung an klassischem EDS gedeutet werden kann (siehe hierzu auch die in Abbildung 6 gezeigten Stammbäume). Eine Sequenzierung dieses Gens durch unseren Kooperationspartner in Heidelberg wurde jedoch wegen des hohen Arbeitsaufwands vertagt. So kann letztendlich nicht gesagt werden, ob Mutationen

in *COL5A2* bei diesen Familien die Ursache für das EDS vom klassischen Typ sind.

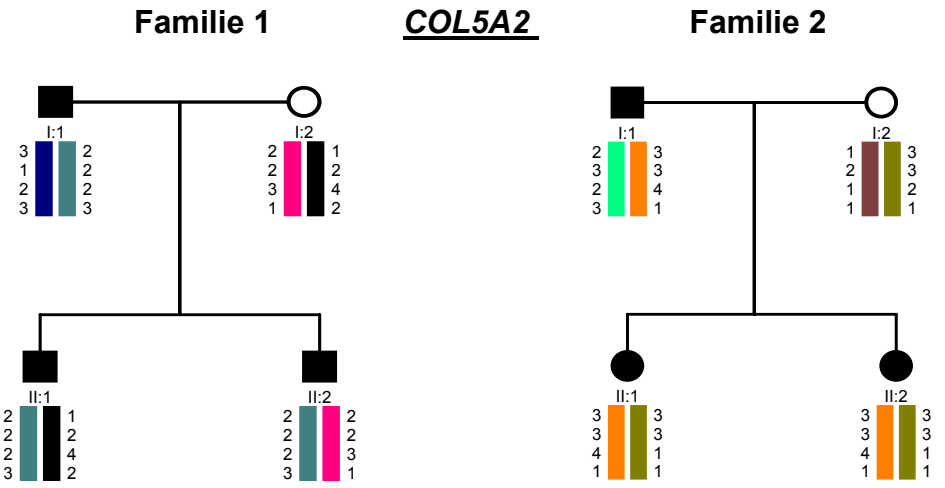


Abbildung 6: Stammbäume zur Vererbung des Genlocus für *COL5A2* auf Chromosom 2 in zwei Familien, in denen jeweils der Vater sowie beide Kinder an klassischem EDS erkrankt waren. Die verschiedenen gefundenen Varianten der untersuchten STS (jeweils vier) wurden von 1 bis 4 nummeriert, die Abfolge der STS nach ihren Positionen auf Chromosom 2 ist Tabelle 3 zu entnehmen. Man kann an der Markerverteilung erkennen, dass die Kinder vom Vater jeweils das gleiche Allel erhielten, während die Mutter den Kindern unterschiedliche Allele vererbte. (COL5A2 = collagene type 5 alpha 2; EDS = Ehlers-Danlos-Syndrom; STS = sequence tagged sites; Legende: □ = männlich, ○ = weiblich; □ = gesund, ■ = krank)

Hingegen zeigte sich für beide Familien kein Hinweis für eine Co-Segregation der Erkrankung mit einem bestimmten Allel von *COL5A1*, da in beiden Familien die erkrankten Kinder jeweils unterschiedliche Allele des Chromosoms 9 vom kranken Elternteil geerbt hatten (Stammbäume hier nicht gezeigt). Allerdings konnte hierbei einer der vier Marker für Familie 2 nicht eindeutig ausgewertet werden.
Weiterhin befinden sich die Marker für das Gen *COL5A1* nach den aktuellsten Positionsangaben (Hubbard et al. 2007; Map Viewer 2006) inzwischen alle auf einer Seite des Genlocus für *COL5A1*, so dass der Ausschluss eines eventuell stattgefundenen Crossing Overs zwischen dem Genlocus von *COL5A1* und den von uns gewählten STS nicht eindeutig erfolgen kann.

Tabelle 3: Aktuelle Positionen der von uns für die Vererbungsanalyse verwendeten Sequence Tagged Sites (Hubbard et al. 2007; Map Viewer 2006)

COL5A1		***COL5A2***	
Marker	**Position**	**Marker**	**Position**
CBL43/CBL45 D9S315	128.2 MB	AFMb072wg1	181.2 MB
AFMa205zf1	131.3 MB	AFMa057vg9	184.2 MB
AFMc016xh9	132.4 MB	AFM065yf11	195.3 MB
AFMb335xh1	132.9 MB	AFMa084yf9	196.8 MB

3.2. Sequenzierung des Decorin-Promoters Ib

Um eine mögliche Ursache für die bereits beschriebene Downregulation der Expression des Proteoglykans Decorin (*DCN*) bei Patienten mit klassischem EDS zu finden, die bei den untersuchten Patienten nachweislich nicht in einer Mutation des *DCN*-Gens selbst begründet liegt, sequenzierten wir bei fünf ausgewählten Patienten mit histologisch gesicherter Erkrankung aus dem gleichen Patientengut den Promoter des *DCN*-Gens.

DCN besitzt zwei führende Exons Ia und Ib, wobei jedoch nachweislich nur die 5'-Region vor Exon Ib Promoteraktivität zeigt. Der von uns untersuchte Bereich befindet sich (Hubbard et al. 2007) auf Chromosom 12 vor Exon Ib im Bereich von 90.097.351 bp bis 90.098.354 bp und erstreckt sich damit über 1004 bp. Der Transkriptionsstart von Exon Ib liegt an der Position 90.0973.50 bp, welche, der Übersichtlichkeit halber, in dieser Arbeit entgegen der aktuell gültigen Nomenklatur als Position +1 bezeichnet wird (siehe auch Legende zu Abbildung 7). Ein alternativer Startpunkt befindet sich hiernach an Position -10 (90.097.360 bp). Im Bereich des Promoters finden sich zwei TATA-Boxen, eine CAAT-Box, die Enhancer-Elemente AP1 und AP5 und Bindungsstellen für nukleäre Faktoren. Weiterhin liegt an seinem 5'-Ende ein 148 bp überspannendes Homopurin-/Homopyrimidinelement (Santra et al. 1994).

Außerhalb des Promoters, kurz hinter dem Transkriptionsstart und damit bereits innerhalb von Exon Ib, liegt ein weiteres Element an Position +16 bis +25 (90.097.326 bis 90.097.335 bp), über welches TNF-α theoretisch seine Wirkung entfalten könnte (im folgenden TNFRE). Dessen Sequenz wurde ebenfalls überprüft (Mauviel et al. 1995).

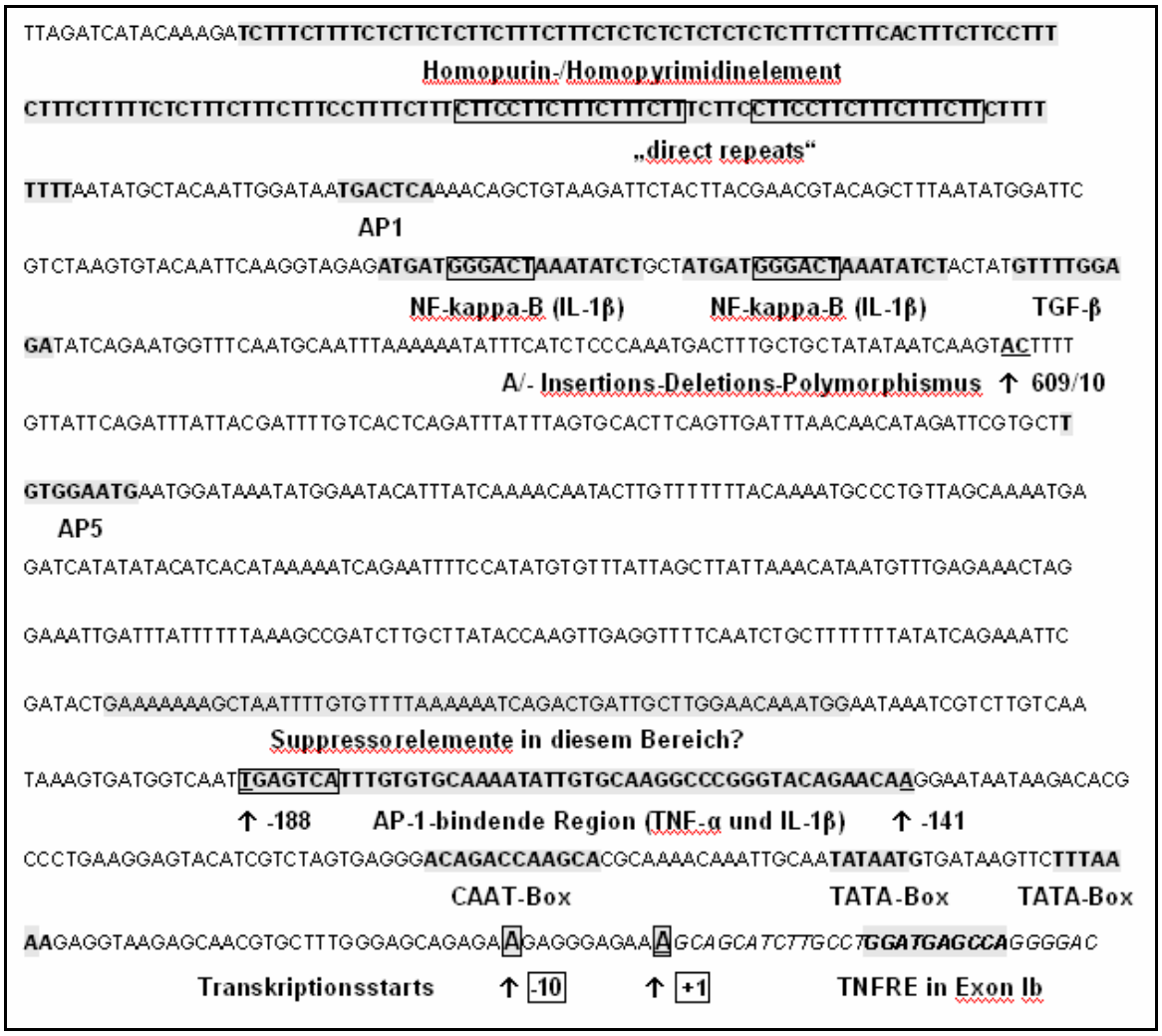
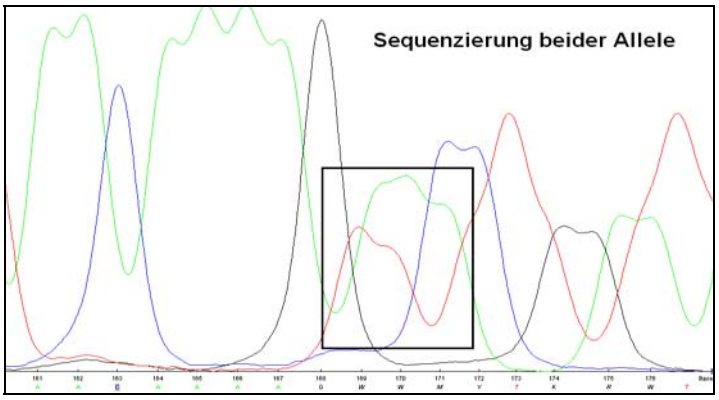


Abbildung 7: Abbildung des *DCN*-Promoters mit den im Text erwähnten Elementen (Hubbard et al. 2007; Map Viewer 2006). Die relevanten Abschnitte der Basenfolge sind jeweils grau unterlegt und/oder mit Rahmen versehen. Es gilt die darunter befindliche Legende. Die Bezeichnung des Transkriptionsstarts mit +1 entspricht nicht der aktuellen Vereinbarung zur Nomenklatur, in der stattdessen der Translationsstart mit +1 bezeichnet wird. Da unsere Untersuchungen sich jedoch abgesehen vom TNFRE in Exon 1b auf den Bereich des Promoters beschränken, wurde analog der früher geltenden Nomenklatur der Transkriptionsstart als Position +1 definiert. Alle gemachten Positionsangaben beziehen sich auf diese Fixposition. (AP1 = activator protein 1; AP5 = activator protein 5; DCN = Decorin; IL-1β = Interleukin-1 beta; NFkappaB = nuclear factor kappa B; TGF-β = Transforming growth factor beta; TNF-α = Tumor Necrosis Factor alpha; TNFRE = Tumor Necrosis Factor response element)

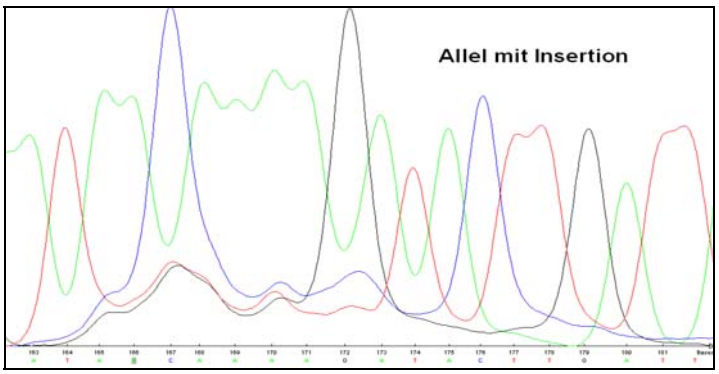
Als Referenz für die Sequenzierung diente die komplette Referenz-Sequenz des menschlichen Chromosoms 12 mit dem *GenInfo Identifier* GI.:89161190 (Map Viewer 2006), welcher identisch ist mit der Referenzsequenz aus der Datenbank „ensembl“ ist (Hubbard et al. 2007; siehe auch Abbildung 7).

Bei zwei Patienten konnte im Bereich des Promoters nach einer Trennung beider chromosomalen Allele mittels bakterieller Klonierung und getrennter Sequenzierung eine Insertions-Deletions-Sequenzvariante an der Position -609-610insT (zwischen 90097959 bp und 90097960 bp) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8).

a)



b)



c)

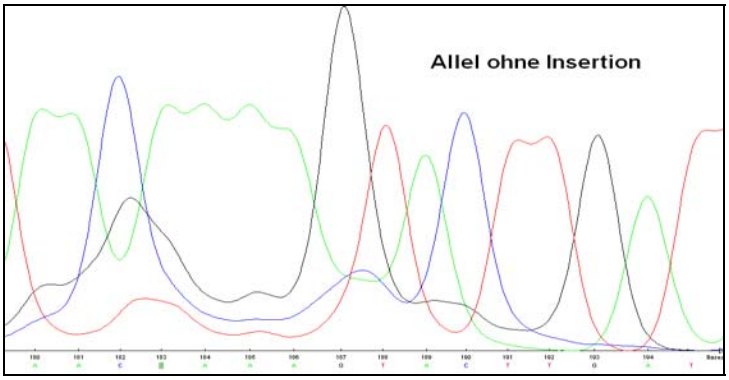


Abbildung 8: Sequenzanalyse des *DCN*-Promoters bei einem für den im Text beschriebenen Polymorphismus heterozygoten Patienten mit klassischem EDS mittels des ALFexpress Sequenziergeräts. Unter a) ist schwarz umrahmt die Überlagerung der zwei unterschiedlichen Allele und in Folge die Verschiebung der beiden Basenfolgen gegeneinander zu erkennen, die eine Auswertung der Kurven ab dieser Position unmöglich machte. Nach Separation der beiden Allele (unter b) Allel mit Insertion; unter c) Allel ohne Insertion) durch bakterielle Klonierung ließen sie sich einzeln problemlos sequenzieren und bestätigten das Vorhandensein des Insertions-/Deletions-Polymorphismus (Einzelheiten siehe Text). Die Nummern unter den Peaks beziehen sich auf den jeweiligen Start des Sequenzierung, welcher abhängig von der Primerposition ist, und entsprechen somit NICHT der weiter oben beschriebenen Nomenklatur für die Basenabfolge des Promoters. (ALF = automated laser fluorescence; DCN = Decorin; EDS = Ehlers-Danlos-Syndrom)

Daraufhin wurde an 100 Chromosomen von gesunden Kontrollpersonen eine Restriktionsfragmentanalyse mit dem Enzym *Rsa*I durchgeführt, welches bei

Vorhandensein der nachgewiesenen Insertion die umgebende Basenfolge nicht mehr als Schnittstelle erkennt. So entstehen entweder vier (Allel ohne Insertion: 481 bp, 262 bp, 144 bp und 29 bp) oder drei Fragmente (Allel mit Insertion: 481 bp, 406 bp und 29 bp), die in der Gelelektrophorese dargestellt werden können (siehe Abbildung 9).

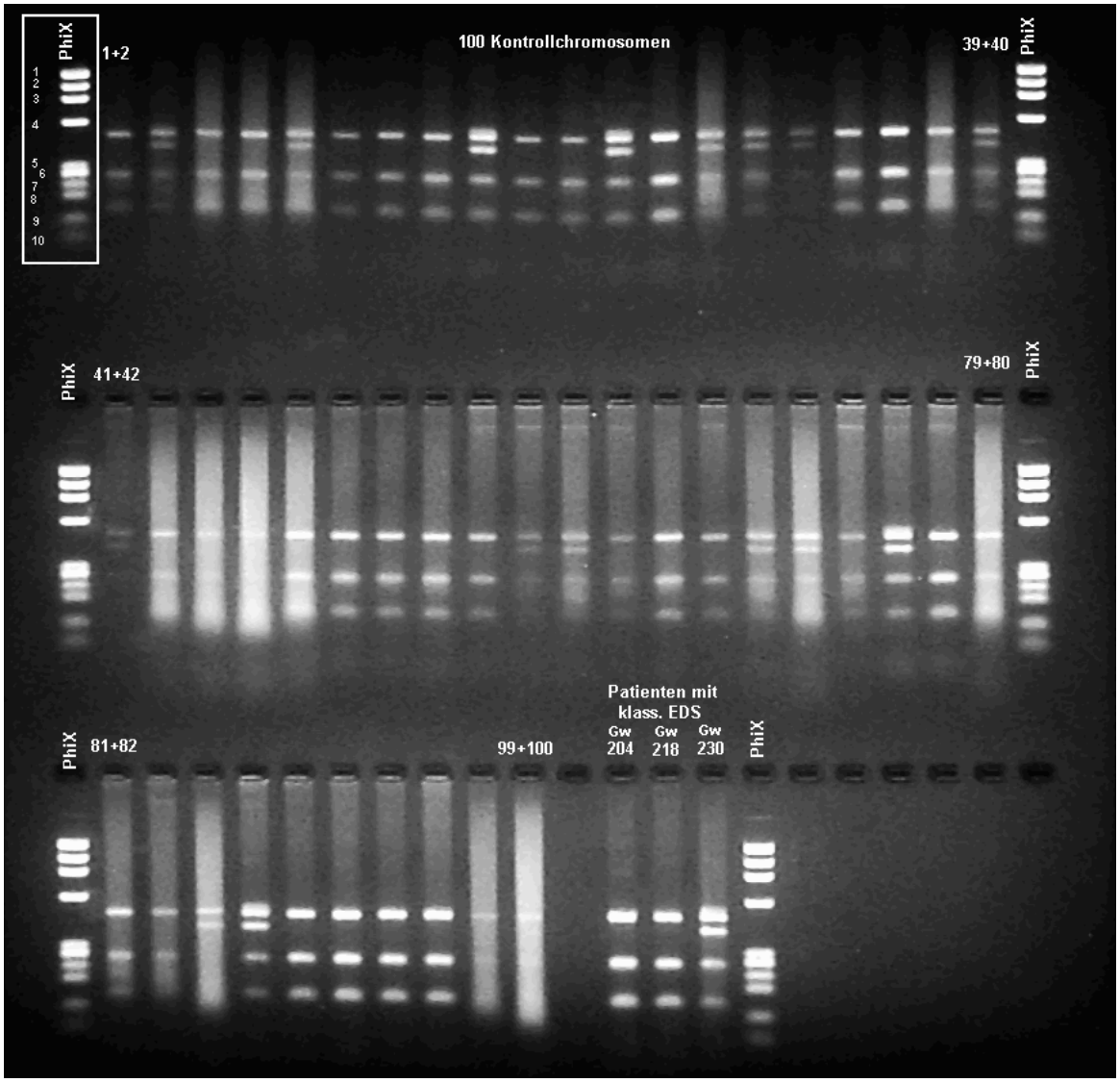


Abbildung 9: Gelektrophorese der Spaltprodukte des Verdaus von 100 Kontrollchromomen mit dem Enzym *Rsa*I. Dieses erkennt die Position des Polymorphismus (siehe Text) als Schnittstelle, sofern an dieser Stelle KEINE Insertion vorliegt. Als Marker wurde PhiX-174/*Hae*III verwendet (die Größe der Marker-Banden von oben nach unten: 1=1358 bp, 2=1078 bp, 3=872 bp, 4=603 bp, 5=310 bp, 6=281 bp, 7=271 bp, 8=234 bp, 9=194 bp, 10=118 bp, 11=72 bp bp; siehe Kasten oben links im Bild). Exemplarisch sind Kontrollchromosomen 1+2, 39+40, 41+42, 79+80 sowie 81+82 und 99+100 gekennzeichnet, ebenso die Patienten mit den Nummern Gw 204, Gw 218 und Gw 230. (bp = base pairs; EDS = Ehlers-Danlos-Syndrom)

Bei dieser Untersuchung war die Sequenzvariante jedoch auch unter den 50 gesunden Kontrollpersonen darstellbar, so dass es sich hierbei um einen Polymorphismus und nicht um eine Mutation handelt. Dieser Polymorphismus kann damit als (alleinige) Ursache für eine Erkrankung an EDS I/II ausgeschlossen werden.

Ansonsten zeigte sich im Bereich vom Transkriptionsstart bis zum Beginn des 5' gelegenen Homopurinelementes bei allen Patienten eine Übereinstimmung mit der Referenzsequenz. Auch die Sequenz des zweiten TNF-Response-Elements im Bereich von Exon Ib wies bei keinem der Patienten Veränderungen auf.
Die Sequenzierung des Homopurin-/Homopyrimidinelementes gestaltete sich schwierig. Trotz Veränderungen in der Reaktionstemperatur, der Auswahl eines neuen, nahe am Element gelegenen Sequenzierprimers sowie der Auftrennung der einzelnen Allele durch bakterielle Klonierung erbrachte unsere Untersuchung nur für zwei der fünf Patienten einen eindeutigen Ausschluss einer Mutation in diesem Bereich des Promoters.
Bei den anderen drei Patienten zeigten sich während der Sequenzierung verschiedene Abweichungen von der Referenz-Sequenz, vornehmlich in Form von Verdopplungen oder Verdreifachung einzelner Motive (beispielsweise GAAA, GA o.ä.) oder Einzelbasenaustausch (G>A, A>G). Diese Veränderungen erwiesen sich jedoch als inkonstant durch die Reihe der verschiedenen Sequenzierungsversuche an ein- und derselben Ausgangs-DNA. Sie sind damit vermutlich technischer Genese, beispielsweise bedingt durch fehlerhafte PCR-Amplifikation, Probleme der Polymerase bei einem Homopurin/-pyrimidin-Abschnitt oder Auswertungsschwierigkeiten des ALF-Sequencers. Eine tatsächlich vorhandene Mutation, Insertion oder auch Deletion im Bereich des Homopurin-/Homopyrimidinelements kann jedoch für diese drei Patienten aufgrund unserer Ergebnisse nicht letztendlich ausgeschlossen werden.

3.3. Northern-Blot Analyse der Expression von Lumican, Transforming Growth Factor-β und Interleukin-1β in Patienten mit klassischem EDS

Nachdem für das kleine, leucinreiche Proteoglykan Decorin bereits eine Downregulation der Expression bei Patienten mit klassischem EDS nachgewiesen werden konnte (Walter 2004), untersuchten wir als weiteres Gen aus der Gruppe der SLRP *LUM* auf seine Expressionsrate bei einer Gruppe von 16 Patienten mit klassischem EDS sowie bei 7 Patienten mit Spontaner Dissektion der Arteria carotis interna in der Vorgeschichte. Weitere Expressionsanalysen widmeten sich dem als Zytokin wirkenden Interleukin-1β (*IL1B*) in einer Gruppe von 12 Patienten mit klassischem EDS, verglichen mit einer Kontrollgruppe von 11 Personen.

Die Daten der Hybridisierung mit TGF-β waren aufgrund einer zu geringen Signalstärke im Northern Blot nicht verwertbar und werden deswegen im Folgenden nicht mehr erwähnt. Es ist allerdings denkbar, dass eine Messung der *TGF-ß*-Transkriptmenge über Real-Time PCR hier auswertbare Daten produziert hätte. Diese wurden jedoch nicht durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden Gesamt-RNA und/oder mRNA der oben beschriebenen Patienten sowie von Kontrollpersonen aus in einer speziellen Zellkultur gezogenen Fibroblasten isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und im Northern-Blot-Verfahren auf Filtern fixiert. Diese wurde dann mit radioaktiv markierten DNA-Sonden der oben genannten Gene hybridisiert, mittels eines Imaging-Programms (Phosphorimager) quantitativ ausgewertet und zum Schluss gegen das ebenfalls auf diese Weise untersuchte Haushaltsgen Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) als internen Standard normalisiert. Die Signifikanz der Abweichung der so normalisierten Messwerte gegenüber der Kontrollgruppe wurde mittels des Mann-Whitney-Tests geprüft.

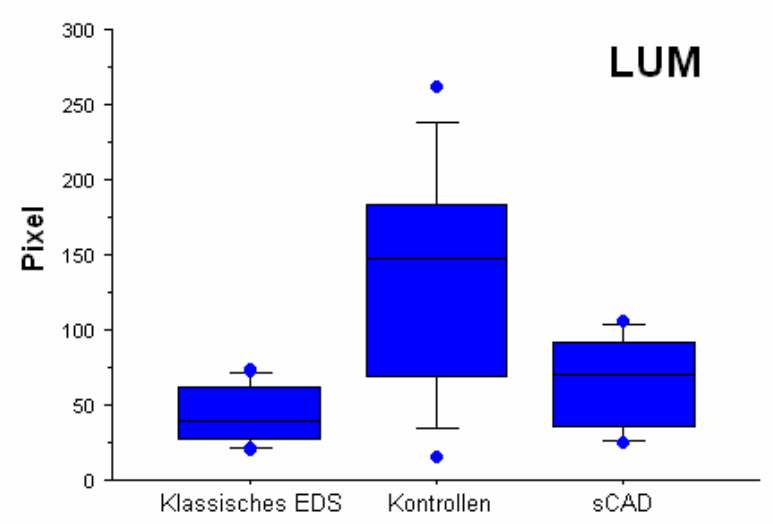
Es zeigte sich für *LUM* bei Patienten mit klassischem EDS eine hochsignifikante ($p=0.0012$) Verminderung der relativen Transkriptmengen auf im Mittel nur etwa 32% derjenigen von gesunden Kontrollpersonen (Kontrollen (n=12): arithmetisches Mittel 134,45, Median 147,39, Minimum 15,90, Maximum 261,44, Standardabweichung 76,40; Patienten mit klassischem EDS (n=16): arithmetisches Mittel 43,68, Median 36,33, Minimum 19,66, Maximum 73,28, Standardabweichung 19,19). Hierbei zeigten sich die Messwerte innerhalb der Kontrollgruppe deutlich stärker gestreut als in der Patientengruppe.

Bei Patienten mit Spontaner Dissektion der Arteria carotis interna konnte zwar eine Expressionsminderung von *LUM* hin gemessen werden, die Expressionsrate bei Patienten mit sCAD betrug im Mittelwert etwa 51% der Expression in der Kontrollgruppe (Kontrollen (n=12): siehe oben; Patienten mit sCAD (n=7): arithmetisches Mittel 68,187, Median 70,120, Minimum 25,530, Maximum 106,380, Standardabweichung 31,924). Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant (p=0.0759), was möglicherweise aber auch auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen ist. Außerdem handelt es sich um eine heterogene Patientengruppe, da in ihr spontane Dissektionen unterschiedlicher Ursache zusammengefasst sind. Möglicherweise würde eine weitere Unterscheidung der Patienten nach Ursache für eine dieser Untergruppen eine signifikante Minderexpression zeigen. Für eine solche Unterscheidung ist jedoch in unserem Fall die Gesamtzahl der untersuchten Patienten zu klein.

Für *IL1B* konnten keine signifikant veränderten Transkriptmengen (p=0.325) bei Patienten mit klassischem EDS gemessen werden (Kontrollen (n=11): arithmetisches Mittel 87,07, Median 88,41, Minimum 71,14, Maximum 100,00, Standardabweichung 9,90; Patienten mit klassischem EDS (n=12): arithmetisches Mittel 100,30, Median 93,75, Minimum 63,10, Maximum 154,17, Standardabweichung 27,33).

Für die Patienten mit einer spontanen Carotis-Dissektion lag bei dieser Untersuchung nur ein einzelner Messwert vor, der für eine Messung mit statistischer Auswertung nicht verwendet werden konnte.

a)



b)

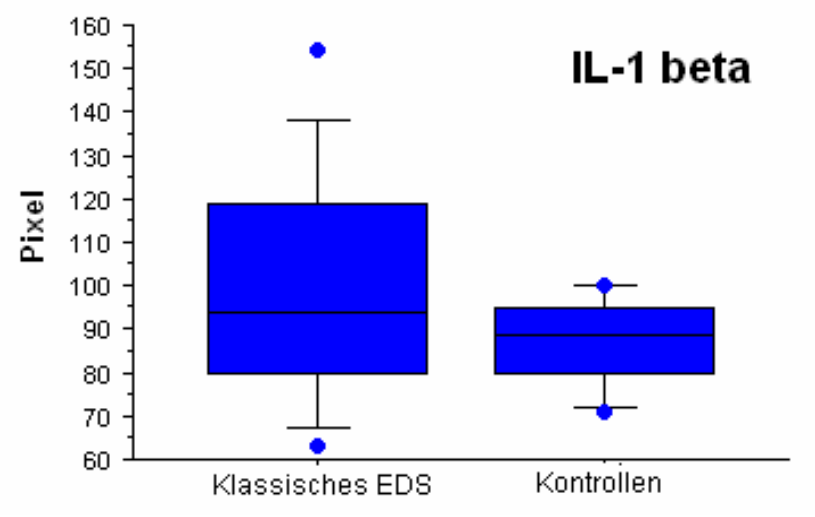


Abbildung 10: Box-Whisker-Plot-Darstellung für die Messergebnisse (densitometrisch in Pixel) der im Text beschriebenen Expressionsanalysen. Dargestellt sind jeweils der Median (mittlerer Balken), oberes und unteres Quartil (obere und untere Begrenzung des blauen Rechtecks), 10%- und 90%-Quantil (Querstrich am oberen und unteren Ende der zusammenhängenden Figur) sowie Minimum und Maximum (blaue Punkte). Unter a) sind die Messwerte für *LUM* dargestellt, bei denen sowohl die Messungen für das klassische EDS als auch für die sCAD auswertbar waren. Hier zeigt sich auch graphisch eine große Variabilität der Messwerte innerhalb der Kontrollgruppe gegenüber homogeneren Messwerten innerhalb der Patientengruppen. Der statistische Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde für das klassische EDS mit p=0.0012 signifikant, für die sCAD mit p=0.0759 gerade nicht mehr. Unter b) finden sich die Messwerte für IL-1β, die nur für das klassische EDS statistisch ausgewertet werden konnten. Hier findet sich eine ausgesprochene Homogenität der Messwerte innerhalb der Kontrollgruppe. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde kein signifikanter Unterschied für die Patienten mit klassischem EDS festgestellt (p=0.325). (LUM = Lumican; EDS = Ehlers-Danlos-Syndrom; sCAD = spontaneous cervical artery dissection; IL-1β = Interleukin-1 beta)

4 Diskussion

In den Experimenten zu dieser Arbeit konnte in zwei betroffenen Familien ein Hinweis auf die Co-Segregation eines klassischen Ehlers-Danlos-Syndroms mit genetischen Markern aus der Region des *COL5A2*-Gens erbracht werden, was ein Hinweis auf *COL5A2*-Mutationen als Ursache dieser Erkrankung sein kann.

Weiterhin wird für fünf an klassischem EDS erkrankte Patienten eine Mutationsanalyse des Promoters des Decorin-Gens (*DCN*) beschrieben. Eine signifikante Downregulation dieses Gens konnte in derselben Patientengruppe bereits gezeigt werden (Walter 2004). Eine ursächliche Mutation im kodierenden Bereich des Gens selbst wurde jedoch bei diesen Patienten ausgeschlossen. Auch die jetzige Sequenzanalyse des Promoters erbrachte keinen sicheren Hinweis auf Veränderungen der genomischen Sequenz, die als Ursache einer Downregulation in Frage kämen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit in einem Patientenkollektiv mit klassischem EDS sowie zum Teil auch für Patienten mit einer spontanen Dissektion der Arteria carotis interna eine Untersuchung der Transkriptmengen anderer Gene durchgeführt. Ausgewählt wurden hierfür solche, die dem Decorin entweder funktionell verwandt sind oder in nachgewiesener oder vermuteter unmittelbarer oder mittelbarer Interaktion mit ihm stehen.

Hierbei ergab sich eine signifikante Expressionsänderung für Lumican (*LUM*) sowohl bei Patienten mit klassischem EDS als auch bei Patienten mit sCAD. Das Expressionsniveau für Interleukin 1 beta (*IL-1β*) zeigte sich beim klassischen EDS unverändert im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (hier erfolgten keine auswertbaren Untersuchungen für Patienten mit sCAD).

In der vorgelegten Arbeit werden die oben beschriebenen Ergebnisse in den Zusammenhang mit bisherigen Erkenntnissen und der aktuellen Forschung gestellt und dabei ihre mögliche Bedeutung und Aussagekraft diskutiert, insbesondere im Hinblick auf Regulationsmechanismen im Stoffwechsel des Bindegewebes.

Diskussion zur Methodik

Bevor die Diskussion der erhobenen Daten selbst und ihrer Bedeutung beginnt, soll hier kurz das Thema der Datengewinnung angesprochen werden, um die Verlässlichkeit der erhobenen Daten zu beleuchten. Besondere Aufmerksamkeit gilt hierbei den Expressionsanalysen durch Northern Blot, die im Gegensatz zu Sequenzierung und Southern Blot nicht einen Nachweis oder Ausschluss, sondern die zahlenmäßige Quantifizierung eines Vorgangs zum Ziel haben. Die Daten sollen außerdem den Vergleich dieser Zahlen zwischen verschiedenen Gruppen ermöglichen. Um methodenbedingte Fehlerquellen daher möglichst auszuschließen, die zu einer regelmäßigen oder unregelmäßigen Verfälschung der Ergebnisse führen können, sind hohe Anforderungen an die Standardisierung zu stellen.

Beim Northern-Blot-Verfahren handelt es sich um eine Methode, die unempfindlicher ist als die heutzutage häufig verwandte Real-Time-PCR. Der große Vorteil des als "Goldenen Standard" betrachteten Northern Blots liegt aber in der Linearität der Transkriptmengen-Messung, welche im Gegensatz zur exponentiell verlaufenden Real-Time-PCR genauere Dosismessungen erlaubt. Auch lassen sich qualitative Merkmale wie Transkript-Länge, etwaige Splice-Varianten sowie auch deren Verhältnis zueinander mit der RT-PCR nicht darstellen (Bookout et Mangelsdorf 2003).

Ein Problem bei der Auswertung der Daten einer Northern-Blot-Analyse ist die Wahl der passenden internen Kontrolle, gegen die die Messwerte normalisiert werden. Grundsätzliche Einwände richten sich bei der Verwendung von so genannten Haushaltsgenen als interner Referenz gegen die unter Umständen große Variabilität ihrer Expression in den jeweils untersuchten Zelltypen. In einer vergleichenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass für die Normalisierung von Northern-Daten aus RNA, die aus Fibroblasten gewonnen wurde, aufgrund seiner hohen Expressionsstabilität besonders das von uns verwandte *GAPDH* oder aber die Hypoxanthin-Phoshoribosyl-Transferase I (*HPRTI*) als Referenzgene geeignet sind (Vandesompele et al. 2002).

Um weiterhin eine möglichst hohe Vergleichbarkeit und Expressionsstabilität zu gewährleisten, wurden in der Zellkultur nur standardisierte Medien verwendet, deren Bestandteile alle der gleichen Charge entstammten und die im immer gleichen Verhältnis der Bestandteile angesetzt wurden. Hierbei enthielt das den

Medien zugesetzte Fetal Calf Serum (FCS) zwar potentiell expressionsverfälschende Wachstumsfaktoren und Interleukine. Deren Konzentrationen waren jedoch zu jedem Zeitpunkt und im Medium jeder Zelllinie für Kontrollfibroblasten oder EDS-Fibroblasten vergleichbar. Auch wurde durch eine regelmäßige und häufige Subkultivierung der Zellen verhindert, dass die Fibroblasten den Zustand der Konfluenz erreichten, welcher nachweislich das Expressionsniveau verschiedener Proteine wie beispielsweise Decorin verändern kann (Mauviel et al. 1995). Die untersuchten Fibroblasten befanden sich somit bis zu ihrer Aufarbeitung zur RNA-Gewinnung immer in der Phase der Proliferation. Nichtsdestotrotz zeigte der Vergleich von Einzelmessungen derselben Zelllinie, dass eine vollständige Expressionsstabilität der untersuchten Gene oder aber auch eine vollständige Reproduzierbarkeit der Messergebnisse in der Northern Hybridisierung nicht immer möglich sind.

Schließlich verwendeten wir zur statistischen Auswertung unserer Daten den der relativ geringen Stichprobengröße angepassten Rangsummentest nach Mann-Whitney, der für alle hier gezeigten Ergebnisse gute bis sehr gute Signifikanzniveaus erbrachte (siehe Kapitel Ergebnisse). Um die Qualität der Daten zu beschreiben, wurden außer dem Mittelwert zahlreiche Eckdaten wie beispielsweise Minimum und Maximum angegeben, die die unterschiedliche Homogenität der Daten innerhalb der untersuchten Gruppen anzeigen.

Ätiologie des klassischen Ehlers-Danlos-Syndroms

Das Auffinden von Mutationen in *COL5A1* wie auch *COL5A2* bei Patienten mit klassischem EDS zeigt, dass es sich hier nicht, wie früher durch die Unterscheidung in EDS I und II, um zwei voneinander unabhängige Erkrankungen, sondern um das große phänotypische Ausprägungsspektrum verschiedener Defekte handelt. Ein relativ großer Teil dieser Defekte ist in der Gruppe der Kollagene der Gruppe V zu finden (Malfait et al. 2005; de Paepe et al. 1997; Burrows et al. 1996). Die Konsequenz daraus, dass hier allelische Erkrankungen vorliegen, spiegelt sich in der Zusammenfassung beider Syndrome zum „klassischen“ EDS wider. Selten konnten in Einzelfällen Mutationen an anderer Stelle nachgewiesen werden, zum Beispiel im Kollagen Typ I (Nuytinck et al. 2000), diese Fälle sind jedoch bisher eine Ausnahme. Auch bei Patienten mit spontaner Dissektion der A. carotis interna konnten vereinzelt Mutationen in

Genen der Kollagene der Gruppe V nachgewiesen werden (Grond-Ginsbach et al. 2002; Grond-Ginsbach et al. 1999).

Bei etwa der Hälfte aller untersuchten Patienten mit manifestem klassischen EDS konnten Mutationen in Genen aus der Kollagen-V-Gruppe als Ursache jedoch nicht gefunden beziehungsweise ausgeschlossen werden, so dass weitere Defekte existieren müssen, die zum klinischen Bild eines klassischen Ehlers-Danlos-Syndroms führen können.

Das Augenmerk der Forschung hat sich bei der Sequenzierung bisher vorwiegend auf die codierenden Teile der untersuchten Gene konzentriert. Denkbar wären aber auch Mutationen im Bereich des dazugehörigen Promoters, die eine Minderexpression eines Allels verursachen und somit ebenfalls ursächlich für seine Haploinsuffizienz sein könnten, ohne dass die codierende Sequenz des Gens an sich beschädigt ist. Ebenso könnten Sequenzvariationen in Introns vorliegen. Es könnten 5’ oder 3’ Splicestellen selbst in ihrer Sequenz verändert sein und damit ihre Funktion verlieren. Aber auch Sequenzelemente, die verstärkende (intronic splicing enhancers, ISE) oder inhibitorische (intronic splicing silencers, ISS) Wirkung auf die Erkennung einer Splicestelle ausüben, könnten durch Mutationen beschädigt sein.

Diese Ausführungen gelten natürlich auch für andere Gene, die am Bindegewebsstoffwechsel beteiligt sind und durch eine Störung ihrer Expression durch Mutation zur Entstehung eines klassischen EDS beitragen könnten.

4.1. Co-Segregation des klassischem EDS mit Allelen aus der *COL5A2*-Genregion

Bei den Mitgliedern der von uns untersuchten Familien mit familiärem EDS konnten wir mittels Mikrosatellitenanalyse eine Co-Segregation der Erkrankung mit der Vererbung eines bestimmten *COL5A2*-Allels vom erkrankten Elternteil auf die ebenfalls erkrankten Kinder zeigen. Unsere Daten legen nahe, dass auch in dieser Familie Veränderungen im Gen *COL5A2* vorliegen, wie sie oben für Patienten mit klassischem EDS bereits beschrieben wurden. Dies sind natürlich keine Daten aus einer klassischen Kopplungsanalyse, da für diese Fragestellung die Anzahl informativer Meiosen viel zu gering war. Meine Ergebnisse unterstreichen jedoch weiter die Bedeutung der Kollagene der Gruppe V für die Pathogenese des klassischen Ehlers-Danlos-Syndroms. Durch Sequenzanalyse und Untersuchung

zur Expression des Gens *COL5A2* könnten weitere Hinweise auf Defekte dieses Gens auch in diesen beiden Familien gefunden werden. Die relativ aufwändige *COL5A2*-Sequenzierung wurde jedoch von unserem Kollaborationspartner aus ökonomischen Gründen jedoch vorläufig zurückgestellt.
Nicht gänzlich auszuschließen ist natürlich die zufällige Übereinstimmung in der Vererbung der Erkrankung und einem der beiden Allele von COL5A2 in unserer Untersuchung. Im Hinblick auf bisherige Forschungsergebnisse scheint dies jedoch wenig wahrscheinlich.

4.2. Mutationsanalyse des Promoters Ib des *DCN*-Gens

Eine Verminderung der Decorin-Expression konnte bereits für verschiedene Bindegewebserkrankungen gezeigt werden. So wurden in Zellen eines Patienten mit homozygotem Marfan-Syndrom deutlich reduzierte Mengen von mRNA sowie Protein nachgewiesen (Pulkkinen et al. 1990), ebenso bei Patienten mit infantiler Progerie (Beavan et al. 1993) und schwerer Osteogenesis imperfecta (Dyne et al. 1996). Über die möglichen Ursachen der Expressionsminderung wurden jedoch jeweils keine Aussagen gemacht. Eine signifikante Downregulation konnte auch in Fibroblasten von Patienten mit klassischem EDS gezeigt werden. Sowohl innerhalb der Exons als auch im Bereich der Exon-Intron-Übergänge des Decorin-Gens wurde eine Mutation bei diesen Fällen als Ursache der Minderexpression ausgeschlossen (Walter 2004).
Eine nachweisbare Expressionsminderung könnte jedoch nicht nur durch eine Mutation des Gens selbst und einen eventuell dadurch ausgelösten nonsense-mediated mRNA decay entstehen, sondern beispielsweise auch durch Mutationen in konservierten DNA-Motiven, über die verschiedene nukleäre Faktoren die Transkriptmenge des Gens steuern können. Solche Motive finden sich vor allem im Promoterbereich eines Gens, der dem ersten Exon vorgelagert ist. Zur Klärung, ob eine derartige Störung bei der von uns untersuchten Patientengruppe mit klassischem EDS in Frage kommt, bei der eine Minderexpression von *DCN* bereits nachgewiesen wurde, diente die Sequenzierung des *DCN*-Promoters Ib.
Das Decorin-Gen des Menschen besitzt zwei erste Exons, Exon Ia und Ib, deren jeweilige Expression durch alternatives Splicing gesteuert wird. Es wurde hierbei gezeigt, dass lediglich die Region im 5'-Bereich vor Exon Ib Promoteraktivität ausbildet (Santra et al. 1994). Die Existenz beider Spliceformen von *DCN* wurde in

zahlreichen Zellen und Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen, so beispielsweise in Fibroblasten, Herzmuskelzellen, Dickdarm, Aorta und Plazenta. Die Exon Ib enthaltende Spliceform erscheint hierbei um ein Vielfaches häufiger im Zellstoffwechsel als diejenige von Exon Ia. Wenige Gewebe wie einige Zellen epithelialen Ursprungs oder Lymphomzellen exprimieren das Gen entweder gar nicht oder aber bilden nur eine der beiden Spliceformen (Danielson et al. 1993).
Im Bereich von etwa 1000 bp oberhalb (5') von Exon Ib befinden sich zwei TATA-Boxen als Motive für zwei alternative Transkriptionsstartstellen, eine CAAT-Box sowie die Enhancer-Elemente AP1 und AP5. Ebenso finden sich Bindungsstellen für TGF-β und NF-κB. Weiterhin liegt an seinem 5'-Ende ein 147 bp langes Homopurinelement (non-coding strand) (Santra et al. 1994). Das Auftreten solcher Strukturen im Bereich oberhalb der Transkriptions-Startposition wurde bereits für viele Gene beschrieben (Johnson et al. 1988; Mavrothalassitis et al. 1990). Verschiedene Faktoren können durch Bindung an die gefundenen Motive ihre Wirkung entfalten.

Zellzyklusabhängige Expression

Die Expressionserhöhung von Decorin, welche allein beim Übergang der Zellen von der Proliferation in den Ruhezustand erfolgt, bedarf lediglich des Vorhandenseins der proximalsten 140 bp vor dem Transkriptionsstart, quasi eines „minimalen Promoters" (Mauviel et al. 1995). Es ist daher zu vermuten, dass die vermittelnden nukleären Faktoren hierfür in diesem Bereich angreifen.

TNF-α

Für TNF-α wurde in ruhenden Fibroblasten eine dosisabhängige, reprimierende Wirkung auf den Decorin-Promoter gezeigt (Expressionsreduktion ca. 60%), während er in proliferierenden Fibroblasten ohne Einfluss auf die Decorin-Expression blieb (Mauviel et al. 1995). Seine Wirkung wird über den Faktor c-jun vermittelt, dessen Expression durch TNF-α stimuliert wird (Brenner et al. 1989). Dessen Blockierung kehrt außerdem die reprimierende Wirkung von TNF-α auf die Decorin-Expression um (Mauviel et al. 1996). TNF-α benötigt für seine Wirkung das AP1-Motiv im 48 bp langen Bereich zwischen –188 und –140 bp des Decorin-Promoters. Die Stimulation von AP1 allein reicht jedoch nicht aus: die Expressionsminderung wird erst gemeinsam mit dem exonnächsten, 140 bp umfassenden minimalen Promoter hervorgerufen (Mauviel et al. 1995). Alternativ entfaltet TNF-α seine Wirkung auch über ein weiteres Response-Element

(TNFRE) ähnlich dem des Osteocalcin-Gens (Li et Stashenko 1993) Dieses ist kurz hinter dem Transkriptionsstart innerhalb von Exon Ib gelegen und kann ebenfalls nur gemeinsam mit dem Basispromoter TNF-α-Wirkung vermitteln (Mauviel et al. 1995).

IL-1β

Es konnte gezeigt werden, dass IL-1β am Decorin-Promoter expressionssteigernd wirkt und diese Wirkung über das gleiche AP1-Element entfaltet, über welches TNF-α seine reprimierende Wirkung vermittelt (Lin et al. 1997). IL-1β benötigt hierfür jedoch nicht zusätzlich den minimalen Promoter (Mauviel et al. 1996). Hierbei wurde offenbar, dass die Wirkung von IL-1β nicht über direkte Stimulation, sondern über zwischengeschaltete Faktoren vermittelt wird, da eine Hemmung der Proteinsynthese die Wirkung von IL-1β aufheben konnte (Lin et al. 1997).

IL-1β induziert über die c-Jun N-terminale kinase (JNK) aus der Gruppe der mitogen-aktivierten Kinasen die Bildung von c-jun, welches Teil des AP1-Komplexes ist (Kida et al. 2005; Conca et al. 1989). c-jun selbst verursacht aber eine Expressionsminderung am Decorin-Promoter (siehe oben) und eine Blockade von c-jun vervielfacht die transkriptionelle Antwort auf eine IL-1β-Stimulation (Mauviel et al. 1996). Daher müssen an der Vermittlung der IL-1β-Antwort des Decorin-Gens andere Mechanismen beteiligt sein, die nicht nur die reprimierende Wirkung von c-jun antagonisieren, sondern auch selbst stimulierend auf die Expression von DCN einwirken. Beispielsweise konnte in menschlichen gingivalen Fibroblasten eine Stimulation durch IL-1β für weitere mitogen-aktivierte Kinasen wie die extracellular signal-regulated kinase (ERK) und die p38 MAP-Kinase gezeigt werden. Diese war von einer Expression von c-fos and c-jun mRNA und, in unterschiedlichem Ausmass, einer Bindung des AP-1-Komplexes an seine DNA-Motive gefolgt. Auch die Expression weiterer Interleukine wie *IL-6* und *IL-8* sowie der Metalloproteinase 1 (*MMP-1*) und Prostaglandin E2 (*PGE2*) wurde über die oben erwähnten Signalwege stimuliert (Kida et al. 2005). Gene aus diesen Signaltransduktionswegen könnten also theoretisch ebenfalls an einer Stimulation der *DCN*-Expression beteiligt sein.

Weiterhin ist eine Stimulierung der Promoteraktivität verschiedener Gene durch IL-1β mittels Aktivierung der *NF-κB*-induzierenden Kinase und damit über die Bindungsstelle von NF-κB beschrieben (Kida et al. 2005; Stylianou et Saklatvala 1998), so dass auch dieses Motiv eine Rolle in der IL-1β-Stimulation der *DCN*-

Expression spielen könnte. Im Fall von Decorin konnte jedoch keine Induktion von *NF-κB* durch IL-1β nachgewiesen werden (Lin et al. 1997).

Antagonismus TNF-α und IL-1β

TNF-α und IL-1β heben sich in ihrer Wirkung auf den Decorin-Promoter gegenseitig auf, und zur Vermittlung dieses Antagonismus ist das Vorhandensein der AP1-Sequenz offenbar ausreichend (Mauviel et al. 1996).

TGF-β

Auch TGF-β kann eine teilweise Suppression der Decorin-Gen-Expression (Reduktion um ca. 60%) hervorrufen, wie es Expressionsanalysen von ruhenden Fibroblasten zeigen (Mauviel et al. 1995). Dazu passend wurde die Konsensus-Sequenz des für den DCN-Promoter beschriebenen TGF-β-negativen Elements auch schon als aktivierendes Motiv im Stromelysin-Promoter nachgewiesen (Kerr et al. 1990), so dass TGF-β offensichtlich unter bestimmten Bedingungen über dieses Element wirken kann. Weitere Untersuchungen mit Promoter-Reportergen-Konstrukten haben jedoch gezeigt, dass TGF-β keine Aktivitätsminderung des isolierten Decorin-Promoters verursachen kann (Mauviel et al. 1995), so dass zusätzliche Mechanismen oder aber weitere Angriffspunkte für diesen Wachstumsfaktor im Decorin-Gen existieren müssen.

Unsere Sequenzierung des Decorin-Promoters bei fünf ausgewählten Patienten mit klassischem EDS, bei denen eine Downregulation des Decorin-Gens beschrieben war, ergab keine Mutationen im Bereich zwischen Transkriptionsstart und Beginn des Homopurinelements, ebenso keine des zweiten TNF-Response-Elements innerhalb von Exon 1b. Ein möglicher Wirkungsausfall stimulierender (IL-1β) oder eine Verstärkung der Wirkung inhibierender Faktoren (TNF-α, TGF-β) auf die Decorin-Expression ist somit bei unseren Patienten nicht durch eine Sequenzveränderung derjenigen DNA-Motive verursacht, über die diese Proteine ihre Wirkung vermitteln können. Es wurde allerdings, wie oben erwähnt, bereits gezeigt, dass im Falle von TGF-β zur Downregulation der DCN-Expression der Promoter des Gens gar nicht notwendig ist (Mauviel et al. 1995). Fehlende Veränderungen in dem beschriebenen Negativ-Element schließen daher eine Störung in der Signaltransduktion seiner Wirkung oder die Mutation eines nicht innerhalb des Promoters befindlichen Wirkungsmotivs nicht aus.

Eine Mutation, Insertion oder Deletion im Homopurinelement konnte nicht bei allen untersuchten Personen vollständig ausgeschlossen werden. Dieser DNA-Abschnitt bildet seine Tertiärstruktur möglicherweise durch Paarung palindromischer Basenfolgen („mirror repeats“) innerhalb des Homopyrimidin-Strangs, welcher dadurch in eine sogenannte Haarnadelform übergeht, die sich nach innen in die große Vertiefung der DNA einstülpt. Der komplementäre Homopurin-Strang hingegen liegt hier auf dieser Länge als Einzelstrang vor (Wells et al. 1988). Das Vorhandensein dieses Einzelstrangs konnte für das Homopurinelement des Decorin-Promoters auch schon experimentell bestätigt werden (Santra et al. 1994). Im Bereich der einsträngigen DNA finden sich verschiedene Motive, beim Decorin-Promoter beispielsweise ähnlich der GAGA-Konsensus-Sequenz des Ultrabithorax-Gens von *Drosophila melanogaster* (Biggin et Tijan 1988), die als Bindungsmotiv für nukleäre Proteinkomplexe fungieren und so an der Transkriptionsregulation teilnehmen können. Die Veränderung einer solchen Erkennungssequenz durch Mutation und eine darauf folgende fehlerhafte oder gar fehlende Ausbildung der charakteristischen Konformation könnte einen Wirkungsverlust aktivierender Faktoren bedingen. Dass das Homopurinelement des Decorin-Gens tatsächlich transkriptionssteigernde Aktivität ausbildet, wurde bereits nachgewiesen (Santra et al. 1994).

Es bleiben als andere Möglichkeiten die Störung in der Signaltransduktionskette einzelner Faktoren oder einer Verminderung oder Erhöhung der Faktoren-Konzentrationen. Beispielsweise wäre eine Funktionsstörung des bisher nicht näher charakterisierten, oben aber postulierten Faktors möglich, der die stimulierende IL-1β-Wirkung auf die *DCN*-Expression vermittelt. Ein solcher Ausfall könnte die Konstellation der von uns gemessenen normalen IL-1β-Konzentrationen und der dennoch erniedrigten Decorin-Expression erklären. Auch eine Überstimulation durch TGF-β bei intakten Motiven zur Signaltransduktion wäre eine mögliche Ursache für eine *DCN*-Minderexpression.

Eine weitere Überlegung bezüglich der verminderten Decorin-Expression wäre ein Imprinting des maternalen oder paternalen Allels. In der Plazenta der Maus konnte ein solches Imprinting für *Dcn* bereits nachgewiesen werden (Mizuno et al. 2002), während bei Rindern kein Imprinting von *DCN* in fetalen oder adulten Geweben stattfand (Khatib 2005). Untersuchungen an der menschlichen Plazenta konnten jedoch zeigen, dass *DCN* zumindest in verschiedenen Stadien der intrauterinen

Entwicklung biallelisch exprimiert wird und keine Zeichen eines Imprinting aufweist (Monk et al. 2006).

Genetische Veränderungen im *DCN*-Gen selbst sind als Ursache der verminderten Expression in unserem Fall nicht wahrscheinlich. *DCN* ist jedoch vermutlich Teil einer komplexen Regulationskette und in dieser Funktion primär oder sekundär in seiner Expression vermindert. Daher möchte ich die Diskussion hier vorerst unterbrechen und die mögliche Rolle von DCN später in Zusammenschau mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen von *LUM* und *IL-1β* nochmals beleuchten.

4.3. Expressionsanalyse von Lumican und Interleukin-1β

Wie oben bereits erwähnt, unterliegen Aufbau und Modulation der Bindegewebsmatrix einer komplexen Regulation durch zahlreiche Stoffe und Mechanismen. Aus der großen Anzahl dieser Faktoren untersuchten wir Lumican (*LUM*) und Interleukin-1β (*IL-1β*) mittels Northern-Blot-Analyse auf das Maß ihrer Expression bei denselben Patienten mit klassischem Ehlers-Danlos-Syndrom, bei denen eine signifikante Minderexpression von Decorin bereits gezeigt werden konnte (Walter 2004). Weiterhin wurde die Expression von *LUM* auch für eine Gruppe von Patienten mit sCAD untersucht, bei welchen keine Minderexpression von *DCN* nachgewiesen werden konnte, obschon die mikroskopischen Bindegewebsveränderungen denen bei klassischem EDS glichen (Walter 2004).

Bei unseren Untersuchungen ergab sich eine signifikante Minderexpression für *LUM* bei Patienten mit klassischem EDS, bei denen das Expressionsniveau im Durchschnitt bei nur 32% desjenigen von gesunden Kontrollpersonen lag. Bei den Patienten mit einer sCAD war das Expressionsniveau von *LUM* mit im Durchschnitt 51% im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen nicht signifikant verändert. Allerdings wurde das Signifikanzniveau hier nur knapp verfehlt ($p=0.0759$; $\alpha=0.05$).

Auch die Expression von *IL-1β* war bei den untersuchten Patienten mit klassischem EDS im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Für Patienten mit sCAD waren die Daten von *IL-1β* aufgrund einer geringen Stichprobengröße leider statistisch nicht auswertbar.

4.3.1. Lumican

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, resultiert die Defizienz von *Lum* in Knock-Out-Modellen der Maus in einer Alteration der Bindegewebsstruktur mit verminderter Reißfestigkeit und reduziertem Fibrillendurchmesser ähnlich den mikroskopischen Befunden beim klassischen EDS (Chakravarti et al. 1998). Außerdem wurde für Lumican-defizientes Kornealgewebe eine verzögerte Wundheilung (Saika et al. 2000) und verminderte Immunaktivierung (Vij et al, 2005) gezeigt. Diese könnte theoretisch mit der für das klassische EDS ebenfalls beschriebenen abnormen Wundheilung unter Bildung atropher Narben (Brinckmann et al. 1999) korrespondieren. Hierfür müsste man allerdings annehmen, dass sich die Abläufe der Immunreaktion und ihre Mittler in Kornea und Bindegewebe grundsätzlich gleichen, was aufgrund des immunologisch privilegierten Status der Kornea fraglich ist.

Die von uns nachgewiesene Minderexpression von *LUM* in einem Patientenkollektiv mit klassischem EDS könnte dennoch durchaus ursächlich beteiligt sein an der Ausprägung des Phänotyps.

Während allerdings im *Lum*$^{-/-}$-Mausmodell die Schädigung der Kornealstruktur das vorherrschende Merkmal ist, liegt der Schwerpunkt bei Patienten mit klassischem EDS auf einer teilweise ausgeprägten Symptomatik der Haut ohne korneale Trübungen oder andere Störungen. Im *Dcn*$^{-/-}$-Knockout-Maus-Modell finden sich hingegen die Veränderungen mit großer Ähnlichkeit vorwiegend in Bindegewebe und Haut, nicht aber in der Kornea der Tiere (Danielson et al. 1997). Auch bei den von uns untersuchten Patienten sind keine Störungen der kornealen Struktur dokumentiert.

Bei Patienten mit klassischem EDS aufgrund einer Haploinsuffizienz von *COL5A1* oder *COL5A2* sowie im *Col5a1*-haploinsuffizienten Mausmodell konnten jedoch Veränderungen der Kornea im Sinne einer verminderten Dicke, verminderten Deposition der betroffenen Kollagen-V-Komponente sowie verdickten Kollagen-Fibrillen nachgewiesen werden, nicht aber eine Trübung der Kornea (Segev et al. 2006). Auch im *Lum*-defizienten Mausmodell zeigte sich eine Verminderung der kornealen Stroma-Dicke um etwa 40% (Chakravarti et al. 2000).

Beim Vergleich mit Knockout-Modellen ist zu bedenken, dass das Knockout-Modell immer den Phänotyp bei vollständigem Fehlen des untersuchten Genprodukts darbietet. Eine Verminderung und nicht völliges Fehlen des gleichen

Genprodukts durch Fehler in seiner Regulation wird phänotypisch vermutlich weniger schwerwiegend ausfallen, wie es beispielsweise beim *Col5A1*-Knockout-Modell gezeigt wurde (Wenstrup et al. 2004a). Außerdem ist in jedem Fall die Frage einer vollständigen Übertragbarkeit des Maus-Modells auf den Menschen zu berücksichtigen.

Ob aufgrund der nachgewiesenen Minderexpression von *LUM* bei den von uns untersuchten Patienten ultrastrukturelle korneale Veränderungen vorliegen, die aber nicht zu einer Visusbeeinträchtigung führen und deswegen bisher unerkannt blieben, ist unklar. Möglicherweise wird der zugrunde liegende, bisher unbekannte Mechanismus der Expressionsreduktion aufgrund unterschiedlicher Interaktionen der beteiligten Proteine und anderer Transkriptionsstimuli in der Kornea der Patienten auch nicht wirksam. Oder aber eine Reduktion der *LUM*-Expression reicht nicht aus, um das volle Ausmaß derjenigen Kornealschädigung hervorzurufen, welche ein vollständiges Fehlen von *Lum* im Mausmodell verursacht. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist die Tatsache, dass im *Col5A1*$^{+/-}$-Mausmodell die Haploinsuffizienz von *Col5A1* in der Kornea der Tiere nicht zu einer maßgeblichen Störung der Fibrillogenese führte. Dies wurde dem im Vergleich zur Dermis physiologischerweise deutlich erhöhten Verhältnis von Kollagen V zu Kollagen I (etwa 5:1) in der Kornea zugeschrieben und eine damit verbundene bessere Kompensation der Haploinsuffizienz postuliert (Wenstrup et al. 2006). Die Menge der einzelnen Einflussfaktoren sowie die Regulation der Fibrillogenese unterscheiden sich also offensichtlich deutlich zwischen den verschiedenen Geweben.

Als Ursache für die Reduktion der *LUM*-Expression könnten daher verschiedene Mechanismen unterstellt werden.

Einerseits wäre eine primäre Störung von *LUM* im Sinne von Mutationen im Gen oder seinem Promoter möglich. Der menschliche *LUM*-Promoter enthält ein atypisches TATCA-Element sowie eine GC-Box, welche beide notwendig sind für die Initiation der Transkription von *LUM* (Grover et al. 2000). Hierbei bindet das Zinkfingerprotein Sp3 als Transkriptionsfaktor an das GC-Element. Mutationen im Bereich dieser Elemente könnten eine verminderte Transkription von *LUM* bedingen. Über das Vorhandensein solcher Mutationen könnte eine Sequenzanalyse bei erkrankten Personen Klarheit verschaffen, die wir jedoch bisher nicht durchgeführt haben.

Im distalen LUM-Promoter konnte weiterhin eine Sequenzfolge (GATA binding sequence, GBS) mit reprimierender Wirkung auf die Transkription nachgewiesen werden, welche durch Bindung eines Transkriptionsfaktors aus der GATA-Familie selektiv die Expression von *LUM* in humanen fetalen Lungenfibroblasten verhindert. Die gleiche Bindungsstelle vermittelt jedoch in adulten humanen Chondrozyten keine Repression der *LUM*-Expression mehr, so dass vermutlich ein weiterer, nur in der Fetalzeit exprimierter Kofaktor notwendig ist, um die Unterdrückung der *LUM*-Expression hervorzurufen (Grover et al. 2000). Solche Kofaktoren wurden für Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie bereits beschrieben (Holmes et al. 1999). Durch eine Re-Aktivierung des Repressorelements, beispielsweise aufgrund einer irregulären Expression dieses Kofaktors, könnte es zu einer Unterdrückung der Lumican-Expression kommen.
Eine weitere mögliche Ursache für die reduzierte Expression wäre auch eine Hypermethylierung von *LUM*. Transkriptionssteuerung durch Veränderungen im Methylierungsgrad eines Gens wurde zum Beispiel in Kolon-Karzinomzellen für das Proteoglycan Decorin nachgewiesen, dessen verstärkte Expression mit einer Hypomethylierung des Decorin-Genlocus einherging (Adany et al. 1990).
Auch ein Imprinting des *LUM*-Gens wäre denkbar. Im Gegensatz zu *DCN*, dessen Imprinting zumindest in humaner Plazenta bereits untersucht wurde, liegen hierzu aber bisher keine Daten für *LUM* vor.
All diese Mechanismen spekulieren in jedem Fall auf eine primäre Störung im Bereich des *LUM*-Gens.

Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, dass die Reduktion von LUM bei den untersuchten Patienten einen sekundären Effekt im Sinne einer fehlenden Transkriptionsstimulation oder verstärkten Transkriptionsverminderung des Gens durch andere, primär veränderte Faktoren darstellt. Für diesen Ansatz spricht, wie schon oben erwähnt, unter anderem das Fehlen von visusbeeinträchtigenden Kornealveränderungen bei den von uns untersuchten Patienten mit klassischem EDS, welches sich durch das Vorhandensein zwischengeschalteter Schritte leichter erklären ließe.
In Anbetracht der gleichzeitigen Erniedrigung der Expression von *LUM* und *DCN* wäre eine weitere, sozusagen einen Mittelweg darstellende Idee, dass beide Gene, LUM und DCN, einer gemeinsamen Genregulation unterliegen. Vergleicht

man die Promotoren der beiden Gene miteinander, so weisen sie nach bisherigen Erkenntnissen zumindest keine korrespondierenden Elemente auf, die Hinweise auf eine gekoppelte Regulation der beiden Gene geben könnten.

Für EDS-Patienten mit einer primären Störung der *COL5*-Expression konnten, wie bereits oben erwähnt, auch Veränderungen der Kornea im Sinne einer verminderten Dicke und gestörten Ultrastruktur nachgewiesen werden (Segev et al. 2006). Für mindestens drei Patienten, deren Daten in die Auswertung unserer Expressionsanalyse von *LUM* eingingen, konnte weiterhin eine Co-Segregation der Erkrankung an klassischem EDS mit der Vererbung des Genlocus für COL5A2 gezeigt werden, wie unter Punkt 4.1 dieser Arbeit beschrieben. Zusätzlich wurde eine Spleiß-Mutation (Deletion 54 bp) im Gen *COL5A2* bei einer Patientin gefunden, die Teil jenes Patientenkollektivs war, für welches eine signifikante Minderexpression von DCN bereits beschrieben wurde (Walter 2004).

Es wäre daher eine mögliche Überlegung, dass die Expression von *LUM* und *DCN* durch Kollagene der Gruppe V reguliert wird. Mögliche Ursachen für eine Fehlregulation könnten dabei dann nicht nur Störungen im Kollagen-Gen selbst, sondern auch Störungen in den für die Regulation notwendigen, bisher nicht weiter bekannten Signaltransduktionskaskaden sein. Nachdem ja nur für einen Teil der Patienten mit klassischem EDS COL5-Mutationen beschrieben werden konnten, wäre letztere Situation ein mögliches Szenario für die Fälle, in denen eine direkte Störung der Kollagen-V-Komponente nicht nachweisbar ist. Der fehlende Nachweis einer Mutation oder Haploinsuffizienz von *COL5A1* oder *COL5A2* wäre so trotzdem vereinbar mit dem Phänotyp eines klassischen EDS. Hierbei müsste man allerdings davon ausgehen, dass nicht allein die Reduktion oder der Funktionsausfall der Kollagen-V-Komponente die Störung im Aufbau des Bindegewebes verursacht, sondern dass die fehlerhafte Regulation von nachgeschalteten Komponenten, wie möglicherweise DCN oder LUM, regelhaft an der Pathogenese und der Ausprägung des Phänotyps beteiligt ist.

Es darf in diesem Zusammenhang nicht unterschlagen werden, dass in Experimenten mit haploinsuffizienten *Col5a1*$^{+/-}$-Mäusen ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen *Col5A1*-Expression und dem Prozentsatz geschädigter Kollagenfibrillen in der Elektronenmikroskopie nachweisbar war. Außerdem fand in Col5a1$^{-/-}$-Knockout-Mausmodell so gut wie keine Kollagenfibrillogenese statt, was zu einem Absterben der Embryonen noch während der uterinen Entwicklung

führte. Dies spricht beides für eine herausragende Bedeutung von *COL5A1*, einen engen Zusammenhang zwischen der Bindegewebsschädigung und der *Col5A1*-Expression und damit für eine zumindest teilweise direkte Wirkung dieser Kollagen-V-Komponente (Wenstrup et al. 2004a). Die Kollagen-Fibrillogenese erfolgt allerdings in mehreren Schritten. Kollagen der Gruppe V wird dabei höchstwahrscheinlich schon zu einem früheren Zeitpunkt benötigt als *DCN* oder *LUM*. Korrespondierend hierzu sind *Dcn*$^{-/-}$-Knockout-Mäuse immerhin lebensfähig und zeigen eine, wenn auch gestörte, Kollagenfibrillogenese, während *Col5a1*$^{-/-}$-Knockout-Mäuse noch intrauterin absterben und bei ihnen keine relevante Bildung von Kollagenfibrillen nachweisbar ist.

Daher ist wahrscheinlich eine Schädigung der Fibrillogenese zu verschiedenen Zeitpunkten möglich. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant, ob und gegebenenfalls wie sich die elektronenmikroskopischen Befunde bei EDS-Patienten in ihrer Art und Ausprägung danach unterscheiden, ob eine Schädigung der Kollagen-V-Gene nachgewiesen werden konnte oder nicht.

Die Expression von *LUM* in der Patientengruppe mit sCAD zeigte sich in der statistischen Auswertung als nicht signifikant vermindert, das Signifikanzniveau wurde jedoch nur knapp verfehlt. Auch für DCN konnte in einer Gruppe von Patienten mit sCAD keine signifikante Minderexpression gezeigt werden, wobei die Patientenanzahl mit 10 ebenfalls klein war. Eine Tendenz hin zu niedrigeren Werten für sCAD im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch auch hier festgestellt werden (Walter 2004).

Für manche Patienten mit sCAD wurde aber eine Veränderung der Bindegewebsstruktur berichtet (Brandt et al. 1998), und Mutationen in Kollagenen der Gruppe V waren selten nachweisbar (Grond-Ginsbach et al. 1999).

Die Beurteilbarkeit der Relevanz unserer Ergebnisse wird außerdem eingeschränkt durch die Tatsache, dass es sich bei der sCAD um ein sehr heterogenes Kollektiv von Patienten handelt. Nicht bei allen Personen konnten Veränderungen der Bindegewebsstruktur nachgewiesen werden (Schievink et al. 1998; Hausser et al. 2004). Die Eingruppierung erfolgte lediglich aufgrund der stattgehabten spontanen Dissektion der Arteria carotis interna. Außerdem zeigten sich bei den Bindegewebsveränderungen, wenn solche nachgewiesen wurden, unterschiedliche Erscheinungsbilder bei den einzelnen Patienten. Diese entsprechen möglicherweise auch verschiedenen zugrunde liegenden Störungen

(Hausser et al. 2004). Es wäre also durchaus möglich, dass eine Selektion der zu untersuchenden Patienten nach dem Vorhandensein von typischen Bindegewebsveränderungen im Sinne eines klassischen EDS eine Untergruppe erzeugen würde, in der die Expressionsniveaus von *DCN* als auch *LUM* tatsächlich signifikant vermindert wären. Möglicherweise ist das Vorliegen einer (vor dem Ereignis möglicherweise nicht diagnostizierten) Bindegewebserkrankung wie dem klassischen EDS ein Risikofaktor für die sCAD, die Veränderung der Expression von *DCN* und *LUM* jedoch kein typisches Merkmal für alle Fälle von sCAD.

4.3.2. Interleukin-1β

Für die Expression von *DCN* konnte eine Stimulierung durch Interleukin-1β bereits gezeigt werden (Mauviel et al. 1996). Die einzelnen Wege, über die eine solche Stimulation möglicherweise stattfinden könnte, wurden im Abschnitt 4.2 dieser Arbeit ausführlich erläutert.

In unseren Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Veränderung der IL-1β-Expression bei Patienten mit klassischem EDS. Diese Konstellation einer Minderexpression von *DCN* und einer gleichzeitig unzureichenden Antwort der *DCN*-Expression auf eine IL-1β-Stimulation wurde auch bei dem oben bereits erwähnten Kind mit schwerem Marfan-Syndrom beschrieben. Das fehlende Ansprechen der *DCN*-Expression auf die IL-1β-Stimulation war hierbei spezifisch für diese Interaktion (Pulkkinen et al. 1990). Auch wurde in einem Fall von EDS mit Hautulzerationen eine Störung in der Signalübertragung von IL-1β postuliert, nachdem die Expressionsraten von *DCN* bei dem Patienten stark erniedrigt waren und IL-1β die *DCN*-Expression in Fibroblasten des Patienten weniger stark stimulieren konnte als in Kontrollfibroblasten (Wu et al. 2001).

Nachdem *IL-1β* in seiner Expression nicht erhöht ist, *DCN* jedoch erniedrigt, stellt sich auch in unserer Untersuchung die Frage, inwieweit diese Veränderungen miteinander zusammenhängen könnten, da für IL-1β ja eigentlich eine stimulierende Wirkung auf die *DCN*-Expression nachgewiesen wurde (Mauviel et al. 1996).

Möglich wäre auf der einen Seite, dass der Grund für die fehlende Stimulierung der *DCN*-Expression in diesem Fall in der Übermittlungskaskade des IL-1β-Stimulus auf die *DCN*-Expression zu suchen ist. Es könnten einer oder mehrere

Teilschritte dieser Kaskade fehlen oder fehlerhaft sein. Allerdings handelt es sich bei vielen bisher bekannten, von IL-1β genutzten um vielseitig eingesetzte Signalwege (MAPK, NF-kappaB). Störungen hätten hier wahrscheinlich weit reichende, nicht nur den Bindegewebsstoffwechsel betreffende Folgen.

Betrachtet man hierzu jedoch die gleichzeitig bestehende *LUM*-Expressionsminderung in unserem Patientengut, ist nicht auszuschließen, dass hier ein spezifischer Zusammenhang existiert, der mehrere der SLRP involviert. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Störung des zwischengeschalteten Faktors, der für die dem TNF-α entgegengesetzte Wirkung von IL-1β am DCN-Promoter postuliert wurde. Bei dem hierbei gesuchten Transduktionsweg könnte es sich möglicherweise um den Fas-FasL-Signalweg handeln. Bekannt ist dieser für seine wichtige Funktion in der Regulation der Apoptose, jedoch spielt er nach neueren Erkenntnissen vermutlich auch für die Signaltransduktion in anderen Bereichen eine Rolle. In einem Mausmodell zur Induktion einer chronischen Arthritis durch Kollagen zeigte sich beispielsweise, dass Fas-defiziente Mäuse (*Fas*$^{-/-}$) trotz stark erhöhter Spiegel des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1β einen milderen Verlauf der chronischen Arthritis als die Kontrollen ausbildeten, so dass eine ineffiziente Aktivierung des IL-1-Rezeptors in Abwesenheit eines funktionierenden Fas-FasL-Signalwegs gefolgert wurde (Ma et al. 2004). Interessant ist hierbei, dass für die Kornea der Maus außerdem eine Abhängigkeit der Fas-FasL-Signalübertragung und der Induktion von Fas durch FasL vom Vorhandensein von *Lum* nachgewiesen wurde (Vij et al. 2004). In *Lum*-defizienten Mäusekorneas wurden reduzierte Spiegel von TNF-α und IL-1β gemessen, die ebenfalls Folge einer Einschränkung des Fas-FasL-Signalwegs sein könnten (Park et al. 2003; Hohlbaum et al. 2001). Das Fehlen von Lumican im Kornealgewebe war weiterhin assoziiert mit einer Downregulation des Fas-Rezeptors (CD 95) (Vij et al. 2004) und eine hierdurch behinderte Signaltransduktion über den Fas-FasL-Signalweg. Vermutlich ist Lumican für die Interaktion zwischen Fas und Fas-Ligand notwendig, indem es den Fas-Liganden bindet, konzentriert und präsentiert, somit dessen biologische Wirksamkeit erhöht und gleichzeitig die Induktion von Fas erleichtert (Vij et al. 2005).

So gesehen könnte die von uns gezeigte Verminderung der *LUM*-Expression über eine Ausschaltung der stimulierenden IL-1β-Wirkung eine mögliche Ursache der verminderten *DCN*-Expression sein. Hierdurch ließe sich als eine Möglichkeit die

Konstellation normaler IL-1β-Spiegel gepaart mit erniedrigten Spiegeln für DCN und LUM erklären. Hierbei muss jedoch erneut darauf hingewiesen werden, dass die Verhältnisse in der Kornea als immunologisch privilegiertem Gewebe nicht unbedingt auf die Situation in normalem Bindegewebe übertragbar sind.

Natürlich wäre es auch möglich, die Ursache für die fehlende Stimulationswirkung im Gen DCN selbst zu suchen. Möglicherweise sind Angriffspunkte für den IL-1β-Stimulus am *DCN*-Gen selbst fehlerhaft. Solche Schäden jedoch konnten wir zumindest für das AP1-Motiv und weitere Bindungsmotive im Bereich des DCN-Promoters im von uns sequenzierten Patientengut widerlegen. Inbegriffen sind hier unter anderem die Strukturen, über welche die DCN-Expression unter IL-1β-Stimulation gesteigert werden konnte (Mauviel et al. 1996). Das Homopurin-Element des DCN-Promoters, der einzige Abschnitt, in welchem wir Mutationen durch unsere Untersuchungen nicht vollständig ausschließen konnten, scheint nicht an der Signaltransduktion für IL-1β beteiligt zu sein. Experimente mit DCN-Promoter-Reportergen-Konstrukten zeigten, dass eine schrittweise Deletion des Homopurin/Homopyrimidin-Abschnittes unter IL-1β-Stimulation zu keiner Veränderung der Reportergen-Expression führte (Mauviel et al. 1996).

Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass der Transduktionsweg der Expressionsstimulation von *DCN* durch IL-1β intakt ist. Die Minderexpression von *DCN* müsste dann anderweitig bedingt sein und wäre möglicherweise noch ausgeprägter, wenn die Stimulation durch IL-1β nicht einen teilweisen Gegeneffekt erzeugte. Als Mechanismus für die Expressionsreduktion käme hier beispielsweise eine übermäßige Wirkung nachweislich reprimierender Faktoren wie TNF-α infrage. Letzterer jedoch zeigte nur in ruhenden, nicht aber in proliferierenden Fibroblasten, wie wir sie in unserer Untersuchung verwendet haben, eine reprimierende Wirkung auf die DCN-Expression (Mauviel et al. 1995). Auch war die Induktion von TNF-α in der Kornea von Lum-defizienten Mäusen genauso wie die von IL-1β erniedrigt (Vij et al. 2004).

Möglich wäre eine irreguläre Verstärkung der TNF-α-Wirkung auch in proliferierenden Fibroblasten, beispielsweise durch eine Überexpression von c-jun, welches ja die reprimierende TNF-α-Wirkung vermittelt (Brenner et al. 1989). Ebenso könnte aber auch der Verlust einer anderweitigen Expressionsstimulation die Ursache sein. Diese Überlegung führt unter anderem zurück zu der im vorherigen Abschnitt 4.3.1 geäußerten Vermutung, dass eine gemeinsame

Regulation von DCN und LUM durch Kollagene der Gruppe V erfolgen könnte, deren Signaltransduktion im Falle einer Minderexpression von *DCN* und *LUM* gestört ist.

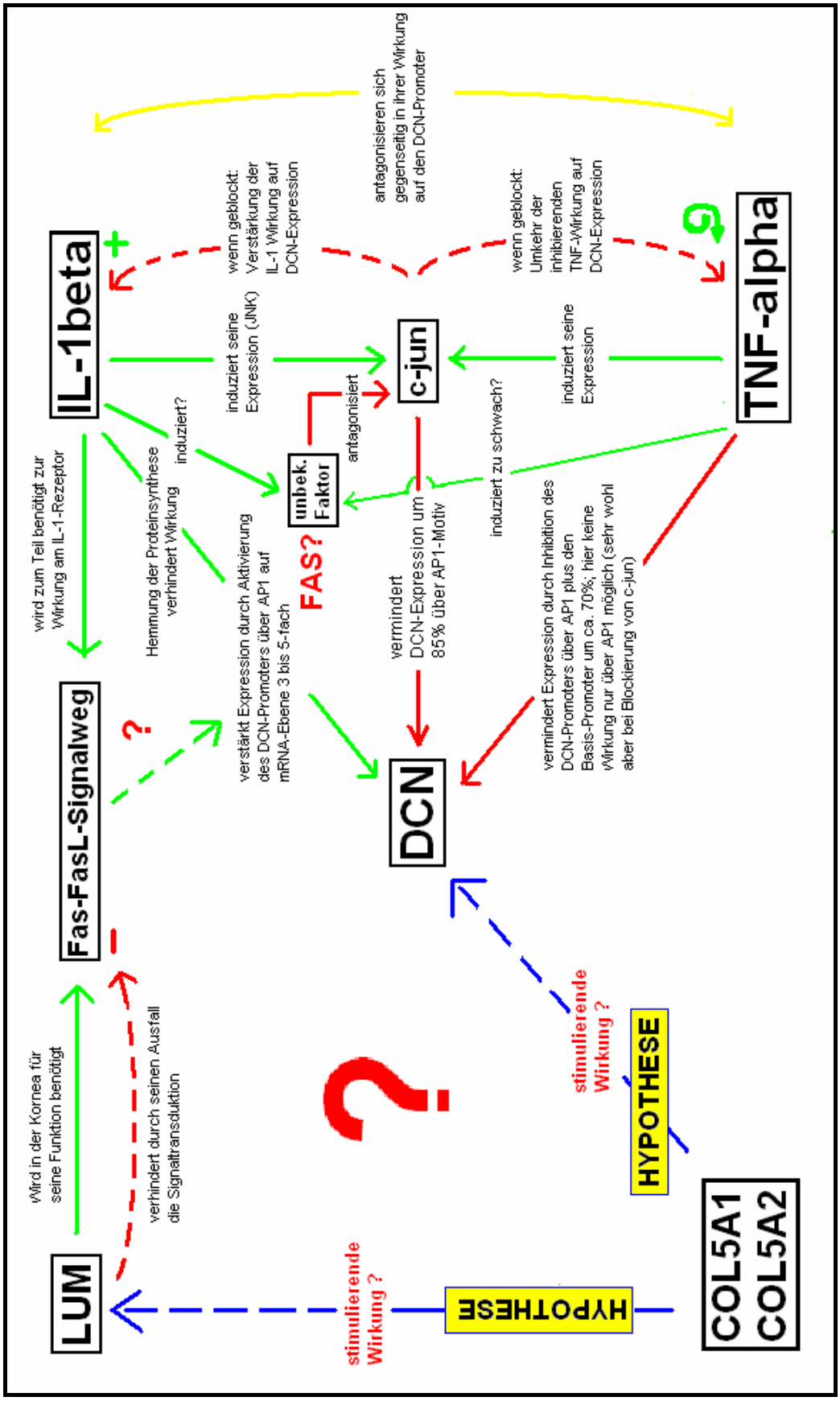


Abbildung 11: Kooperationsschema der verschiedenen bisher beschriebenen Interaktionen für DCN, LUM, TNF-α und IL-1β. Farblegende: grün – Stimulation, rot – Hemmung, gelb – funktioneller Antagonismus, blau – hypothetischer Zusammenhang (DCN = Decorin; LUM = Lumican; TNF-α = Tumor Necrosis Factor alpha; IL-1β = Interleukin-1 beta; AP1 = Aktivatorprotein 1; mRNA = messenger Ribonukleinsäure; JNK = Jun-Kinase; FasL = Fas Ligand)

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier gezeigten Ergebnisse liefern weiteren Anhalt dafür, dass den Veränderungen der Bindegewebsstruktur bei Patienten mit klassischem EDS vermutlich eine komplexe Fehlregulation auf verschiedenen Ebenen zugrunde liegt, wobei den Kollagenen der Gruppe V eine besonders gewichtige Rolle zukommt. Die einzelnen Störungen und ihr Zusammenhang untereinander bleiben in vieler Hinsicht spekulativ. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen weisen jedoch außer dem zweifelsohne bedeutsamen *COL5A1* auf bestimmte andere Komponenten des Systems hin, denen in weiterführenden Untersuchungen Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte. Zu diesen gehören *DCN* und *LUM* sowohl als Effektoren als auch als regulierte Gene. Interessant wäre auch, in größeren Patientenkollektiven zu untersuchen, ob sich die Expressionsminderung der genannten SLRP proportional zu der mikroskopisch nachweisbaren Schädigung der Bindegewebsmatrix verhält, so wie es sich für das *Col5a1*$^{+/-}$-haploinsuffiziente Mausmodell bereits zeigen ließ. Dies könnte einen Hinweis liefern auf die Bedeutung der Expressionsveränderungen für die tatsächliche Ausbildung des Phänotyps im klassischen EDS. Ebenfalls von Interesse wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung beider oben genannten SLRP auf der Ebene des jeweils zugehörigen Proteins, da durch posttranskriptionelle Regulation die Menge an Protein in anderem Ausmass verändert sein könnte als die RNA-Expression.

Auch die Kollagene der Gruppe V sollten weitergehend untersucht werden. Sie fungieren nachgewiesenermaßen nicht nur als strukturelle Matrixkomponente, sondern sind als bedeutender regulierender Faktor an der Fibrillogenese beteiligt. Es wäre zusätzlich auch möglich, dass sie außerdem noch steuernd in weitergehende Stoffwechselabläufe eingreifen und damit ihre Schlüsselrolle in der Regulation des Bindegewebsstoffwechsels bestätigt wird.

Eine Quantifizierung der *TGF-β*-Expression bei Patienten mit klassischem EDS sollte erneut unter Verwendung anderer Verfahren als dem Northern Blot erfolgen. Für diesen Wachstumsfaktor wurde eine Einflussnahme auf die *DCN*-Expession im Sinne einer Verminderung gezeigt, womit er zu den möglichen Kandidaten für eine Beeinflussung der Genexpression der SLRPs im Falle des klassischen EDS

gehört, zumal nun für beide Kandidaten *DCN* und *LUM* eine Expressionsminderung nachgewiesen werden konnte.

Interessant im Hinblick auf die Argumentation mit Untersuchungen aus dem Kornealgewebe der Mausmodelle wäre außerdem, inwieweit die dort beschriebenen Zusammenhänge erstens in humaner Kornea und zweitens vor allem in humanen Fibroblasten der Haut analog gelten und somit die Ergebnisse solcher Untersuchungen überhaupt untereinander übertragbar sind.

Im *Col5a1*-defizienten Mausmodell sowie in Zelllinien von nachgewiesenermaßen *COL5A1*-haploinsuffizienten EDS-Patienten könnten die Expressionsraten von *DCN* und *LUM* sowie *TNF-α*, *TGF-β* und *IL-1β* speziell daraufhin untersucht werden, inwieweit deren Expression vom Vorhandensein der Kollagen-V-Komponente abhängt und in welchem Ausmaß sie gegebenenfalls verändert sind. Eine weitere Möglichkeit wäre in dieser Hinsicht, in Fibroblasten von gesunden Kontrollpersonen die Expression der oben genannten Gene unter Stimulation mit Kollagenen der Gruppe V zu untersuchen, beispielsweise durch eine Überexpression dieser Matrixkomponente. Hierzu könnten künstlich eingebrachte Promoter-Gen-Konstrukte dienen, auch könnte die Etablierung einer konditionalen Überexpression mittels Cre-Rekombinase erfolgen. Gewebsspezifische Promotoren wären geeignet, eine gewebsspezifische Überexpression zu ermöglichen. Sollte diese Überexpression der Kollagene V eine Einflussnahme auf die Expression der weiter oben genannten Gene zeigen, könnte eine weitergehende Differenzierung helfen, die vermittelnden Faktoren herauszuarbeiten und in Zelllinien von Patienten mit klassischem EDS mögliche Defekte aufzudecken.

Durch die Zusammenschau der Ergebnisse solcher Untersuchungen wäre es möglich, die Regulation des Bindegewebsstoffwechsels in seiner Komplexität schrittweise noch besser zu erfassen.

5 Zusammenfassung

Beim klassischen Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) handelt es sich um eine Bindegewebserkrankung, die sich durch übermäßig streckbare Gelenke, stark überdehnbare Haut und leichte Verletzbarkeit derselben auszeichnet und mit einer elektronenmikroskopisch nachweisbaren Desorganisation des Bindegewebes einhergeht. Es umfasst zwei früher unterschiedene Typen des EDS, wobei der Typ I mit schwerwiegenden, der Typ II mit leichteren Bindegewebsveränderungen einhergeht. Der Krankheit wird ein heterogenes Spektrum an Ursachen unterstellt, in dem jedoch Veränderungen in den Kollagenen der Gruppe V eine zentrale Rolle einnehmen. In etwa der Hälfte der Fälle mit nachgewiesenem klassischen EDS konnten Mutationen in den Genen *COL5A1* (collagen type 5 alpha 1) oder *COL5A2* (collagen type 5 alpha 2) nachgewiesen werden, in Einzelfällen Mutationen in anderen Genen wie *COL1A1* (collagene type 1 alpha 1).

Wir untersuchten in unserer Arbeit die Weitergabe von *COL5A1* und *COL5A2* in zwei Familien, in denen jeweils ein Elternteil und beide Kinder an klassischem EDS erkrankt waren. Hierbei zeigte sich eine Kosegregation der Erkrankung mit einem bestimmten Allel von *COL5A2*, welche für *COL5A1* nicht nachgewiesen werden konnte. Dies spricht für eine Beteiligung des Gens *COL5A2* an der Pathogenese des klassischen EDS in den von uns untersuchten Fällen.

Weiterhin führten wir eine Sequenzierung des Promoters des Gens Decorin (*DCN*) bei fünf Patienten mit klassischem EDS durch. Bei *DCN* handelt es sich um ein kleines, leucinreiches Proteoglykan, welches vornehmlich in der Bindegewebsmatrix vorkommt. Nachdem das Knockout-Maus-Modell von *Dcn* einen dem klassischen EDS sehr ähnlichen makro- und mikroskopischen Phänotyp hervorbrachte, wurde eine Beteiligung an der Pathogenese des klassischen EDS auch beim Menschen postuliert. Expressionsanalysen ergaben eine Expressionsreduktion bei Patienten mit klassischem EDS, eine Mutation des Gens konnte jedoch bei diesen Patienten gleichzeitig ausgeschlossen werden. Unsere Sequenzierungen des *DCN*-Promoters ergaben ebenfalls keine Fehler in der Sequenz verglichen mit der Referenz. Lediglich im distal gelegenen Homopurinelement konnten Sequenzabweichungen nicht sicher ausgeschlossen, aber auch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse machen eine Störung der Signaltransduktion durch Mutationen im Promoterbereich des Gens sehr unwahrscheinlich.

Im letzten Teil der Arbeit untersuchten wir Lumican (*LUM*) und Interleukin-1 beta (*IL-1β*) mittels Northern Blot und Northern Hybridisierung auf ihre Expression im gleichen Kollektiv von Patienten mit klassischem EDS, in welchem eine *DCN*-Minderexpression bereits nachgewiesen werden konnte. *LUM* gehört wie *DCN* zur Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane (SLRP), während für das Interleukin IL-1β eine stimulierende Wirkung auf die *DCN*-Expression nachgewiesen werden konnte. Es zeigte sich eine Reduktion der *LUM*-Expression auf im Durchschnitt nur 32% der Kontrollgruppe, während die Expression von *IL-1β* zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich war. Angesichts der gleichsinnigen Veränderungen beider SLRP könnte eine gemeinsame Expressionsregulation, beispielsweise durch Kollagene der Gruppe V möglich sein.

Die Zusammenschau der Ergebnisse legt eine komplexe Regulation des Bindegewebsstoffwechsels nahe, in der die einzelnen Faktoren durch wechselseitige Interaktion in ihrer Expression verändert sind.

6 Literaturverzeichnis

1. **Adany R, Heimer R, Caterson B, Sorrell JM, Iozzo RV**
   Altered expression of chondroition sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma
   J Biol Chem 265: 11389 – 11396 (1990)

2. **Andrikopoulos K, Liu X, Keene DR, Jaenisch R, Ramirez F**
   Targeted mutation in the col5a2 gene reveals a regulatory role for type V collagen during matrix assembly
   Nat Genet 9: 31 – 36 (1995)

3. **Beavan LA, Quentin-Hoffmann E, Schönherr E, Snigula F, Leroy JG, Kresse H**
   Deficient expression of decorin in infantile progeroid patients
   J Biol Chem 268: 9856 – 9862 (1993)

4. **Beighton P, De Paepe A, Danks D, Finidori G, Gedde-Dahl T, Goodman R, Hall JG, Hollister DW, Horton D, McKusick VA**
   International nosology of heritable disorders of connective tissue, Berlin, 1986
   Am J Med Genet 29: 581 – 594 (1988)

5. **Beighton P, De Paepe A, Hall JG, Hollister DW, Pope FM, Pyeritz RE, Steinmann B, Tsipouras P**
   Molecular nosology of heritable disorders of connective tissue
   Am J Med Genet 42: 431 – 448 (1992)

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

7. **Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M**
Binding of proteoglycan decorin to collagen type VI
J Biol Chem 267: 5250 – 5256 (1992)

8. **Biggin MD, Tijan R**
Transcription factors that activate the ulthrabithorax promoter in developmentally staged extracts
Cell 53: 699 – 711 (1988)

9. **Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, Doane KJ, Linsenmayer TF**
Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter
J Cell Sci 95: 649 – 657 (1990)

10. **Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR**
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 (1992)

11. **Böhm S, Behrens P, Martinez-Schramm A, Löhr JF**
Das Ehlers-Danlos-Syndrom
Der Orthopäde 31: 108 – 121 (2002)

12. **Bookout AL, Mangelsdorf DJ**
Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signalling pathways
Nucl Recept Signal 1: e012 (2003) epub (DOI 10.1621/nrs. 01012)

13. **Border W, Noble NA, Yamamoto T, Harper Jr, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti D**
Natural inhibitor of transforming growth factor-β protects against scarring in experimental kidney disease
Nature 360: 361 – 364 (1992)

14. **Brandt T, Hausser I, Orberk E, Grau A, Hartschuh W, Anton-Lamprecht I, Hacke W**
Ultrastructural connective tissue abnormalities in patients with spontaneous cervicocerebral artery dissections
Ann Neurol 44: 281 – 285 (1998)

15. **Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M**
Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor alpha
Nature 337: 661 – 663 (1989)

16. **Brinckmann J, Behrens P, Brenner R, Bätge B, Tronnier M, Wolff HH**
Ehlers-Danlos-Syndrom
Hautarzt 50: 257 – 265 (1999)

17. **Burch GH, Gong Y, Liu W, Dettman RW, Curry CJ, Smith L, Miller WL, Bristow J**
Tenascin-X deficiency is associated with Ehlers-Danlos syndrome
Nat Genet 17: 104 – 108 (1997)

18. **Burrows NP, Nicholls AC, Yates JR, Gatward G, Sarathachandra P, Richards A, Pope FM**
The gene encoding collagen alpha1(V) (COL5A1) is linked to mixed Ehlers-Danlos syndrome type I/II
J Invest Dermatol 106: 1273 – 1276 (1996)

19. **Burrows NP, Nicholls AC, Richards AJ, Luccarini C, Harrison JB, Yates JRW, Pope FM**
A point mutation in an intronic branch site results in aberrant splicing of COL5A1 and in Ehlers-Danlos syndrome type III in two british families
Am J Hum Genet 63: 390 – 398 (1998)

20. **Byers PH, Duvic M, Atkinson M, Robinow M, Smith LT and Schwarze U**
Ehlers-Danlos syndrome type VIIA and VIIB result from splice-junction mutations or genomic deletions that involve exon 6 in the COL1A1 and COL1A2 genes of type I collagen
Am.J Med Genet 72: 94 – 105 (1997)

21. **Carlson EC, Liu CY, Chikama T, Hayashi Y, Kao CW, Birk DE, Funderburgh JL, Jester JV, Kao WW**
Keratocan, a cornea-specific keratan sulfate proteoglycan, is regulated by lumican
J Biol Chem 280: 25541 – 25547 (2005)

22. **Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cornuet P, Hassell JR**
Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22
Genomics 27: 481 – 488 (1995)

23. **Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H**
Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican
J Cell Biol 141: 1277 – 1286 (1998)

24. **Chakravarti S, Petroll WM, Hassell JR, Jester JV, Lass JH, Paul J, Birk DE**
Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma
Invest Ophtalmol Vis Sci 41: 3365 – 3373 (2000)

25. **Colige A, Sieron AL, Li SW, Schwarze U, Petty E, Wertelecki E, Wilcox W, Krakow D, Cohn DH, Reardon W, Byers PH, Lapiere CM, Prockop DJ, Nusgens BV**
Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I-N-proteinase gene
Am J Hum Genet 65: 308 – 317 (1999)

26. **Conca W, Kaplan PB, Krane SM**
Increases in levels of procollagenase messenger RNA in cultured fibroblasts induced by human recombinant interleukin 1 beta or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis
J Clin Invest 83: 1753 – 1757 (1989)

27. **Cooper DN, Ball EV, Stenson PD, Phillips AD, Howells K, Mort ME, Thomas NST**
The human gene mutation database at the Institut of Medical Genetics in Cardiff
World Wide Web URL: http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
Cardiff University (2007)

28. **Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S**
Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts
Cell Growth Differ 4: 483 – 493 (1993)

29. **Danielson KG, Fazzio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV**
The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23
Genomics 15: 146 – 160 (1993)

30. **Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV**
Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility
J Cell Biol 136: 729 – 743 (1997)

31. **Denko CW**
Chernogubovs syndrome: a translation of the first modern case report of the Ehlers-Danlos syndrome
J Rheum Fall 5: 347 – 352 (1978)

32. **De Paepe A, Nuytinck L, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Naeyaert JM**
Mutations in the COL5A1 gene are causal in the Ehlers-Danlos syndromes I and II
Am J Hum Genet 60: 547 – 554 (1997)

33. **Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV**
Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells
Nature 316: 701 – 705 (1985)

34. **Dickinson ME, Kobrin MS, Silan CM, Kingsley DM, Justice MJ, Miller DA, Ceci JD, Lock LF, Lee A, Buchberg AM**
Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci
Genomics 6: 505 – 520 (1990)

35. **Droguett R, Cabello-Verrugio C, Riquelme C, Brandan E**
Extracellular proteoglycans modify TGF-β bio-availability attenuating its signalling during skeletal muscle differentiation
Matrix Biol 25: 332 – 341 (2006)

36. **Dyne KM, Valli M, Forlino A, Mottes M, Kresse H, Cetta G**
Deficient expression of the small proteoglycan decorin in a case of severe/lethal osteogenesis imperfecta
Am J Med Genet 63: 161 – 166 (1996)

37. **Feshchenko S, Brinckmann J, Lehmann HW, Koch HG, Kugler S**
Identification of a new heterozygous point mutation in the COL1A2 gene leading to skipping of exon 9 in a patient with joint laxity, hyperextensibility of skin and blue sclerae
Hum Mutat 12: 138 (1998) (Brief)

38. **Frischmeyer PA, Dietz HC**
Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease
Hum Mol Genet 8: 1893 – 1900 (1999)

39. **Funderburgh JL, Caterson B, Conrad GW**
Distribution of proteoglycans antigenically related to corneal keratan sulfate proteoglycan
J Biol Chem 262: 11634 – 11640 (1987)

40. **Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW**
Arterial lumican
J Biol Chem 266: 24773 – 24777 (1991)

41. **Funderburgh JL, Funderburgh ML, Brown SJ, Vergnes JP, Hassell JR, Mann MM, Conrad GW**
Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein
J Biol Chem 268: 11874 – 11880 (1993)

42. **Grond-Ginsbach C, Weber R, Haas J, Orberk E, Kunz S, Busse O, Hausser I, Brandt T, Wildemann B**
Mutations in the COL5A1 coding sequence are not common in patients with spontaneous cervical artery dissections
Stroke 30: 1887 – 1890 (1999)

43. **Grond-Ginsbach C, Thomas-Feles C, Werner I, Weber R, Wigger F, Hausser I, Brandt T**
Mutations in the tropoelastin gene (ELN) were not found in patients with spontaneous cervical artery dissections
Stroke 31: 1935 – 1938 (2000)

44. Grond-Ginsbach C, Wigger F, Morcher M, Von Pein F, Grau A, Hausser I, Brandt T

Sequence analysis of the COL5A2 gene in patients with spontaneous cervical artery dissections

Neurology 58: 1103 – 1105 (2002)

45. Grond-Ginsbach C, Engelter S, Werner I, Hausser I, Müller US, Brandt T, Lyrer P

Alpha-1-antitrypsin deficiency alleles are not associated with cervical artery dissections

Neurology 62: 1190 – 1192 (2004)

46. Grover J, Chia-Yang L, Kao WWY, Roughley PJ

Analysis of the human lumican gene promoter

J Biol Chem 275: 40967 – 40973 (2000)

47. Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM

Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts

J Cell Physiol 174: 353 – 361 (1998)

48. Hausser H, Gröning A, Hasilik A, Schönherr E, Kresse H

Selective inactivity of TGF-β/decorin complexes

FEBS Letters 353: 243 – 245 (1994a)

49. Hausser I, Anton-Lamprecht I

Differential ultrastructural aberrations of collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome types I – IV as a means of diagnostics and classification

Hum Genet 3: 394 – 407 (1994b)

50. Hausser I, Müller U, Engelter S, Lyrer P, Pezzini A, Padovani A, Moormann B, Busse O, Weber R, Brandt T, Grond-Ginsbach C
Different types of connective tissue alterations associated with cervical artery dissections
Acta Neuropathol (Berlin) 107: 509 – 514 (2004)

51. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E
Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor β
Biochem J 302: 527 – 534 (1994)

52. Hohlbaum AM, Gregory MS, Ju ST, Marshak-Rothstein A
Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors
J Immunol 167: 6217 – 6224 (2001)

53. Holmes M, Turner J, Fox A, Chisholm O, Crossley M, Chong B
hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation
J Biol Chem 274: 23491 – 23498 (1999)

54. **Hubbard TJP, Aken BL, Beal1 K, Ballester1 B, Caccamo M, Chen Y, Clarke L, Coates G, Cunningham F, Cutts T, Down T, Dyer SC, Fitzgerald S, Fernandez-Banet J, Graf S, Haider S, Hammond M, Herrero J, Holland R, Howe K, Howe K, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Kokocinski F, Kulesha E, Lawson D, Longden I, Melsopp C, Megy K, Meidl P, Overduin B, Parker A, Prlic A, Rice S, Rios D, Schuster M, Sealy I, Severin J, Slater G, Smedley D, Spudich G, Trevanion S, Vilella A, Vogel J, White S, Wood M, Cox T, Curwen V, Durbin R, Fernandez-Suarez XM, Flicek P, Kasprzyk A, Proctor G, Searle S, Smith J, Ureta-Vidal A and Birney E**

Ensembl 2007 (release 45)

World Wide Web URL: http://jun2007.archive.ensembl.org/index.html

Nucleic Acids Res: Database issue (2007)

55. **Iozzo RV**

The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth

Crit Rev Biochem Mol Biol 32: 141 – 174 (1997)

56. **Iozzo RV**

Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function

Annu Rev Biochem 67: 609 – 652 (1998)

57. **Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA**

Gene therapy by sceletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kindey

Nat Med 2: 419 – 423 (1996)

58. **Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg H, Birk DE, Chakravarti S**

A syndrom of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice

J Biol Chem 277: 35532 – 35540 (2002)

59. Johnson AC, Jinno Y, Merlino GT
Modulation of epidermal growth factor receptor proto-oncogene transcription by a promoter site sensitive to S1 nuclease
Mol Cell Biol 8: 4174 – 4184 (1988)

60. Kähäri VM, Heino J, Vuorio E
Interleukin-1 increases collagen production and mRNA levels in cultured Skin fibroblasts
Biochim Biophys Acta 929: 142 – 147 (1987)

61. Kähäri VM, Larjava H, Uitto J
Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-β 1 up-regulates biglycan (PGI) and versican (large fibroblast PG) but downregulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture
J Biol Chem 266: 10608 – 10615 (1991)

62. Kahai S, Vary CP, Gao Y, Seth A
Collagen, type V, alpha1 (COL5A1) is regulated by TGF-beta in osteoblasts
Matrix Biol 23: 445 – 455 (2004)

63. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM
TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence
Cell 61: 267 – 278 (1990)

64. Khatib, H
The COPG2, DCN and SDHD genes are biallelically expressed in cattle
Mamm Genome 16: 545 – 552 (2005)

65. **Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K**
Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts
Cytokine 29: 159 – 168 (2005)

66. **Kobe B, Deisenhofer J**
Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine rich repeats
Nature 366: 751 – 756 (1993)

67. **Krusius T, Ruoslahti E**
Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan deduced from cloned cDNA
Proc Natl Acad Sci USA 83: 7683 – 7687 (1986)

68. **Kuhlenbaumer G, Konrad C, Kramer S, Kis B, Nabavi D, Dittrich R, Ringelstein EB**
The collagen 1A2 polymorphism rs42524, which is associated with intracranial aneurysms, shows no association with spontaneous cervical artery dissection (sCAD)
J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 124 – 125 (2006)

69. **Kuivaniemi H, Prockop DJ, Wu Y, Madhatheri SL, Kleinert C, Earley JJ, Jokinen A, Stolle C, Majamaa K, Mylylla VV et al.**
Exclusion of mutations in the gene for type III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections: results from sequence analysis of the coding sequence from type III collagen of 55 unrelated patients
Neurology 43: 2652 – 2658 (1993)

70. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ
Mutations in fibrillar collagens (type I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming-collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels
Hum Mutat 9: 300 – 315 (1997)

71. Kumar SD, Kumar V, Kaye W
Bilateral internal carotid artery dissection from vomiting
Am J Emerg Med 16: 669 – 670 (1998)

72. Kuroda K, Shinkai H
Downregulation of decorin expression in dermal fibroblasts by interleukin-4
Arch Dermatol Res 289: 476 – 480 (1997)

73. Leys D, Lucas C, Gobert M, Deklunder G, Pruvo JP
Cervical artery dissections
Eur Neurol 37: 3 – 12 (1997)

74. Li YP, Stashenko P
Characterization of a tumor necrosis factor-responsive element which down-regulates the human osteocalcin gene
Mol Cell Biol 13: 3714 – 3721 (1993)

75. Lin JM, Yamauchi M, Sato S
Effects of recombinant interleukin-1β on decorin gene expression in human periodontal ligament fibroblast and its possible transscriptional regulation
J Periodont Res 32: 225 – 232 (1997)

76. Lindor NM, Bristow J
Tenascin-X deficiency in autosomal recessive Ehlers-Danlos syndrome
Am J Med Genet A 135: 75 – 80 (2005)

77. **Longoni M, Grond-Ginsbach C, Grau AJ, Genius J, Debette S, Schwaninger M, Ferrarese C, Lichy C**
The ICAM-1 E469K gene polymorphism is a risk factor for spontaneous cervical artery dissection
Neurology 66: 1273 – 1275 (2006)

78. **Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Cole SM, Pope RM**
Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation
Nat Immunol 5: 380 – 387 (2004)

79. **Malfait F, Coucke P, Symoens S, Loeys B, Nuytinck L, De Paepe A**
The molecular basis of classic Ehlers-Danlos syndrome: a comprehensive study of biochemical and molecular findings in 48 unrelated patients
Hum Mutat 25: 28 – 37 (2005)

80. **Malfait F, de Paepe A**
Molecular genetics in classical Ehlers-Danlos syndrome
Am J Med Genet C Semin Med Genet 139: 17 – 23 (2005)

81. **March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K,** et al.
Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs
Nature 215: 641 – 647 (1985)

82. **Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV**
Transscriptional regulation of decorin gene expression
J Biol Chem 270: 11692 – 11700 (1995)

83. Mauviel A, Korang K, Santra M, Tewari D, Uitto J, Iozzo RV
Identification of a bimodal regulatory element encompassing a canonical AP1 binding site in the proximal promoter region of the human decorin gene
J Biol Chem 271: 24824 – 24829 (1996)

84. Mavrothalassitis GJ, Watson DK, Papas TS
Molecular and functional characterization of the promoter of ETS2, the human c-ets-2 gene
Proc Natl Acad Sci USA 87: 1047 – 1051 (1990)

85. McKusick VA
Heritable disorders of connective tissue
C.V. Mosby, St. Louis (1972)

86. Melching LI, Roughley PJ
Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes
Matrix Biol 18: 381 – 390 (1999)

87. Michalickova K, Susic M, Willing MC, Wenstrup RJ, Cole WG
Mutations of the α2(V) chain of type V collagen impair matrix assembly and produce Ehlers-Danlos syndrome type I
Hum Mol Genet 7: 249 – 255 (1998)

88. Mizuno Y, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Kono T, Meguro M, Oshimura M, Kawai J, Tomaru Y, Kiyosawa H, Nikaido I, Amanuma H, Hayashizaki Y, Okazaki Y
Asb4, Ata3, and Dcn are novel imprinted genes identified by high-throughput screening using RIKEN cDNA microarray
Biochem Biophys Res Commun 290: 1499 – 1505 (2002)

89. Mokri B, Sundt TM Jr, Houser OW, Piepgras DW
Spontaneous dissection of the internal carotid artery
Ann Neurol 19: 126 – 138 (1986)

90. **Mokri B, Piepgras DG, Wiebers DO, Houser OW**
Familial occurrence of spontaneous dissection of the internal carotid artery
Stroke 18: 246 – 251 (1987)

91. **Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, Stanier P, Feil R, Moore GE**
Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta
Proc Natl Acad Sci USA 103: 6623 – 6628 (2006)

92. **Narcisi P, Richards AJ, Ferguson SD, Pope FM**
A family with Ehlers-Danlos syndrome type III/articular hypermobility syndrome has a glycine 637 to serine substitution in type III collagen
Hum Mol Genet 3: 1617 – 1620 (1994)

93. **Map Viewer**
National Center of Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine (Bethesda, MD), Build 36.2 (2006)
World Wide Web URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606

94. **Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC**
The primary structure of the core protein of the small leucine-rich proteoglycan (PGI) from bovine articular cartilage
J Biol Chem 264: 8653 – 8661 (1989)

95. **Neame PJ, Kay CJ, McQuillan DJ, Beales MP, Hassell JR**
Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican
Cell Mol Life Sci 57: 859 – 863 (2000)

96. **Neau JP, Masson C, Vandermarcq P, Dumas P, Levillain P, Tantot AM, Masson N, Gil R**
Familial occurence of dissection of cervical arteries (Letter)
Cerebrov Dis 5: 310 – 312 (1995)

97. **Nicholls AC, Oliver JE, McCarron S, Harrison JB, Greenspan DS, Pope FM**
An exon skipping mutation of a type V collagen gene (COL5A1) in Ehlers-Danlos syndrome
J Med Genet 33: 940 – 946 (1996)

98. **Nietfeld JJ**
Cytokines and proteoglycans
Experientia 49: 456 – 469 (1993)

99. **Norris JW, Beletsky V, Nadareishvili ZG**
Sudden neck movement and cervical artery dissection. The Canadian Stroke Consortium.
CMAJ 163: 38 – 40 (2000)

100. **Nuytinck L, Freund M, Lagae L, Pierard GE, Herrmanns-Le T, de Paepe A**
Classical Ehlers-Danlos syndrome caused by a mutation in type I collagen
Am J Hum Genet 66: 1398 – 1402 (2000)

101. **Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (™)**
McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD)
World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/ (2006)

102. **Park DR, Thomsen AR, Frevert CW**
Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages
J Immunol 170: 6209 – 6216 (2003)

103. Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BL
In situ hybridization analysis of TGF-beta 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF beta 1 and beta 2
Development 110: 609 – 620 (1990)

104. Penttinen RP, Kobayashi S, Bornstein P
Transforming growth factor β íncreases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability
Proc Natl Acad Sci 85: 1105 – 1108 (1988)

105. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers P
Clinical and genetic features of Ehlers-Danlos syndrome IV, the vascular type
N Engl J Med 342: 673 – 680 (2000)

106. Pezzini A, Caso V, Zanferrari C, De Zotto E, Paciaroni M, Bertolino C, Grassi M, Agnelli G, Padovani A
Arterial hypertension as risk factor for spontaneous cervical artery dissection: a case-control study
J Neurol Neurosurg Psychiatry 77: 95 – 97 (2006)

107. Pope FM, Martin GR, Lichtenstein JR, Penttinen R, Gerson B, Rowe DW
Patients with Ehlers-Danlos syndrome type IV lack type III collagen
Proc Natl Acad Sci USA 72: 1314 – 1316 (1975)

108. Pulkkinen L, Kainulainen K, Krusius T, Mäkinen P, Schollin J, Gustavsson KH, Peltonen L
Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome
J Biol Chem 265: 17780 – 17785 (1990)

109. Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR
Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins
Exp Eye Res 56: 635 – 648 (1993)

110. Ricchetti A, Becker M, Dulguerov M
Internal carotid artery dissection following rigid esophagoscopy
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125: 805 – 807 (1999)

111. Saika S, Shiraishi A, Saika S, Chia-Yang L, Funderburgh JL, Kao CWC, Converse RL, Kao WWY
Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing
J Biol Chem 275: 2607 – 2612 (2000)

112. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Hiquchi R, Horn GT, Mullis KB Erlich HA
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science 239: 487 – 491 (1988)

113. Santra M, Danielson K, Iozzo RV
Structural and functional characterization of the human decorin gene promoter
J Biol Chem 269: 579 – 587 (1994)

114. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV
De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells
Proc Natl Acad Sci 92: 7016 – 7020 (1995)

115. Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, van Haren B, Miller W, Bristow J
A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency
N Eng J Med 345: 1167 – 1175 (2001)

116. Schievink WI, Björnsson J, Piepgras DG

Coexistence of fibromuscular dysplasia and cystic medial necrosis in a patient with Marfans syndrome and bilateral carotid artery dissections

Stroke 25: 2492 – 2496 (1994)

117. Schievink WI, Wijdicks EF, Michels VV, Vockley J, Godfrey M

Heritable connective tissue disorders in cervical artery dissections: a prospective study

Neurology 50: 1166 – 1169 (1998)

118. Schönherr E, Hausser H, Beavan L, Kresse H

Decorin-type I collagen interactions. Presence of separate core protein binding domains

J Biol Chem 270: 8877 – 8883 (1995)

119. Schwarze U, Atkinson M, Hoffman GG, Greenspan DS, Byers PH

Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II)

AM J Hum Genet 66: 1757 – 1765 (2000)

120. Scott JE

Proteodermatan And proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen

Biochemistry 35: 8795 – 8799 (1996)

121. Segev F, Heon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR, Rootman DS, Whitaker-Menezes D, Chervoneva E, Birk DE

Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations

Invest Ophtalmol Vis Sci 47: 565 – 573 (2006)

122. Stylianou E, Saklatvala J
Interleukin-1
Int J Biochem Cell Biol 30: 1075 – 1079 (1998)

123. Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, Fässler R, Heinegard D, Oldberg A
Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organisation and altered lumican deposition in tendon
J Biol Chem 174: 9636 – 9647 (1999)

124. Takahara K, Schwarze U, Imamura Y, Hoffman GG, Toriello H, Smith L T, Byers PH, Greenspan DS
Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two exon-skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-α1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I
Am J Hum Genet 71: 451 – 465 (2002)

125. Takeshita A, Zhon GN, Hanazawa S
Effect of interleukin-1β on gene expressions and function of fibroblastic cells derived from human periodontal ligament
J Periodont Res 27: 250 – 255 (1992)

126. Takeushi Y, KodamaY, Matsumoto T
Bone matrix decorin binds transforming growth factor and enhances its bioactivity
J Biol Chem 269: 32634 – 32638 (1994)

127. Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R
Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene
Nucleic Acid Res 13: 2485 – 2502 (1985)

128. **Ulbricht D, Diederich NJ, Hermanns-Le T, Metz RJ, Macian F, Pierard GE**
Cervical artery dissection: a atypical presentation with Ehlers-Danlos-like collagen pathology?
Neurology 63: 1708 – 1710 (2004)

129. **Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F**
Accurate normalization of real-time RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes
Genome Biol 3: RESEARCH 0034 (2002) epub (Pfad: http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034.1)

130. **van Meek'ren J**
Heel-en Geneeskonstige Aanmerkkingen
Amsterdam, Netherlands: C. Commelijn, 170 – 172 (1668)

131. **Vij N, Roberts L, Joyce S, Chakravarti S**
Lumican suppresses cell proliferation and aids fas-fas ligand mediated apoptosis: Implications in the cornea
Exp Eye Res 78: 957 – 971 (2004)

132. **Vij N, Roberts L, Joyce S, Chakravarti S**
Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating fas-fas ligand signaling
Invest Ophtalmol Vis Sci 46: 88 – 95 (2005)

133. **Vila N, Millan M, Ferrer X, Riutort N, Escudero D**
Levels of alpha-1-antitrypsin in plasma and risk of spontaneous cervical artery dissections: a case-control study
Stroke 34: 168 – 169 (2003)

134. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D

Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycans of tendon

Biochem J 223: 587 – 597 (1984)

135. Von Pein F, Valkkila M, Schwarz R, Morcher M, Klima B, Grau A, Ala-Kokko L, Hausser I, Brandt T, Grond-Ginsbach C

Analysis of the COL3A1 gene in patients with spontaneous cervical artery dissections

J Neurol 249: 862 – 866 (2002)

136. Walker LC, Overstreet MA, Siddiqui A, De Paepe A, Ceylaner G, Malfait F, Symoens S, Atsawasuwan P, Yamauchi M, Ceylaner S, Bank RA, Yeowell HN

A novel mutation in the lysyl hydroxylase 1 gene causes decreased lysyl hydroxylase activity in an Ehlers-Danlos VIA patient.

J Invest Dermatol 124: 914 – 918 (2005)

137. Walter S

Molekulargenetische Untersuchungen am Decorin-Gen bei verschiedenen Formen des Ehlers-Danlos Syndrom

Dissertation an der Universität Ulm, 2004

138. Weber I, Harrison RW, Iozzo RV

Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis

J Biol Chem 271: 31767 – 31770 (1996)

139. Wegrowski Y, Paltot V, Gillery P, Kalis B, Randoux A, Maquart FX

Stimulation of sulfated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant interleukin-4

Biochem J 307: 673 – 678 (1995)

140. Wells RD, Collier DA, Hanvey JC, Shimizu M, Wohlrab F
The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine.oligopyrimidine sequences
FASEB J 2: 2939 – 2949 (1988)

141. Wenstrup RJ, Langland GT, Willing MC, D'Souza VN, Cole WG
A splice junction mutation in the region of COL5A1 that codes for the carboxyl propeptide of proα1(V) chains results in the gravis form of the Ehlers-Danlos syndrome (type I)
Hum Mol Genet 5: 1733 – 1736 (1996)

142. Wenstrup RJ, Florer JB, Willing MC, Giunta C, Steinmann B, Young F, Susic M, Cole WG
COL5A1 haploinsufficiency is a common molecular mechanism underlying the classical form of EDS
Am J Hum Genet 66: 1766 – 1776 (2000)

143. Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, Bell SM, Chervoneva I, Birk DE
Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly
J Biol Chem 279: 53331 – 53337 (2004a)

144. Wenstrup RJ, Florer JB, Cole WG, Willing MC, Birk DE
Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome
J Cell Biochem 92: 113 – 124 (2004b)

145. Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, Chervoneva I, Birk DE
Murine model of the Ehlers Danlos Syndrome
J Biol Chem 281: 12888 – 12895 (2006)

146. Winnemöller M, Schmidt G, Kresse H
Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin
Eur J Cell Biol 54: 10 – 17 (1991)

147. **Winnemöller M, Schon P, Vischer P, Kresse H**
Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment
Eur J Cell Biol 59: 47 – 55 (1992)

148. **Wu J, Utani A, Endo H, Shinkai H**
Deficiency of the decorin core protein in the variant form of Ehlers-Danlos syndrome with chronic skin ulcer
J Dermatol Sci 27: 95 – 103 (2001)

149. **Yamaguchi Y, Ruoslahti E**
Expression of human proteoglycan in chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation
Nature 336: 244 – 247 (1988)

150. **Yamaguchi Y, Mann D, Ruoslahti E**
Negative regulation of transforming growth factor-β by the proteoglycan decorin
Nature 346: 281 – 284 (1990)

151. **Zweers MC, Bristow J, Steijlen PM, Dean WB, Hamel BC, Otero M, Kucharecková M, Boezeman JB, Schalkwijk J**
Haploinsufficiency of TNXB is associated with hypermobility type of Ehlers-Danlos syndrome
Am J Human Genet 73: 214 – 217 (2003)

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Historisches Bild Ehlers-Danlos-Syndrom 1
Abbildung 2: Symptombilder des klassischen EDS 4
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Bilder Kollagennetzwerk 5
Abbildung 4: 3-D-Strukturmodell Decorin 11
Abbildung 5: Gruppenstruktur SLRP 12
Abbildung 6: Stammbäume COL5A2 49
Abbildung 7: DCN-Promoter 51
Abbildung 8: Sequenzierkurven DCN-Promoter 53
Abbildung 9: Restriktionsanalyse Polymorphismus 54
Abbildung 10: Statistische Auswertung Northern Blot 58
Abbildung 11: Interaktionschema.....77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Villefranche-Klassifikation des Ehlers-Danlos-Syndrom 2
Tabelle 2: Typische Symptomatik des klassischen Ehlers-Danlos-Syndrom..... 3
Tabelle 3: Positionen Sequence tagged sites für die Segregationsanalyse 50