

Diss. ETH

Diss. ETH No 8345

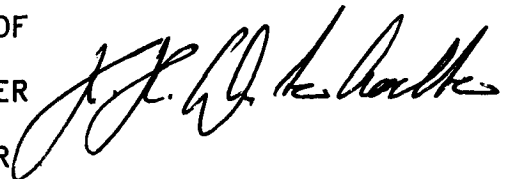
THE STRUCTURE OF TYPE IX COLLAGEN

A DISSERTATION SUBMITTED TO THE
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

PRESENTED BY
SUSANNA RUTH HUBER
DIPL. NATW. ETH
BORN 21ST FEBRUARY 1959
CITIZEN OF BALTERSWIL TG, AND OBERWANGEN TG

ACCEPTED ON THE RECOMMENDATION OF
PROF. K.H. WINTERHALTER, EXAMINER
PD DR. B. STEINMANN, CO-EXAMINER
DR. L. VAUGHAN, CO-EXAMINER



1987



Car

6. SUMMARY

The elucidation of the type IX collagen structure, with respect on defining the site of glycosaminoglycan attachment, was the subject of this study. This theme led naturally from the demonstration that type IX collagen from chick sternal cartilage was shown to contain glycosaminoglycan chain(s) and to be immunologically identical with proteoglycan Lt.

The identification of the three distinct polypeptide chains of type IX collagen was obtained through comparison of their tryptic fingerprints on high performance liquid chromatography with the similarly treated C2, C3 and C5 chains of its peptic fragment HMW. The chondroitin sulphate carrying 115 kDa polypeptide was identified as the α_2 (IX)chain. The 84 kDa- and the 68 kDa polypeptides corresponded to the α_1 (IX) and α_3 (IX)chains, respectively. In addition, the results provide evidence for both the C3 and C4 components of HMW being derived from the α_2 (IX)chain.

Subsequently, the glycosaminoglycan-containing peptide was purified upon collagenase digestion and characterized by amino acid and protein sequence analysis. The comparison between the here reported sequence and the predicted amino acid sequences for NC1 α_1 , NC2 α_1 , NC3 α_1 , NC1 α_2 and NC2 α_2 (derived from cDNA and genomic clones, pYN 1731, pYN 1738) revealed the NC3 domain of α_2 (IX) as the attachment site. This NC3 region had a length of 17 residues instead of 12 found for NC3 α_1 . The five additional residues included the only one serine necessary for the glycosaminoglycan-protein linkage. This result was supported by the binding of a monoclonal antibody, recognizing sulphated stubs, to the kink (NC3) of type IX collagen, viewed by the rotary shadowing technique. The sulphated stubs are generated by chondroitinase ABC digestion of glycosaminoglycan chains. Additional evidence was gained from the homology between the peptide sequence and the predicted amino acid sequence for NC3 α_2 derived from cDNA and genomic clones.

The relative amounts of glycosylated type IX collagen and type II collagen in extracts of sternal cartilage were found to be 31% and 69%, with one fifth of type IX collagen lacking the glycosaminoglycan chain. Studies into the characterization of myotendinous antigen (tenascin), a major glycoprotein in sternal cartilage, were also initiated.

In conclusion, the localization of the glycosaminoglycan attachment site in type IX collagen, together with the increasing knowledge on the extracted fibrils and additional matrix protein such as myotendinous antigen will provide the basis for an improved understanding of cartilage matrix assembly.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befasst sich mit der Struktur von Typ IX Kollagen und im speziellen mit der Bindungsstelle des Glykosaminoglykan. Sie gründet auf dem Befund, dass Typ IX Kollagen, extrahiert aus embryonalen Hühner-Sterna, Glykosaminoglykane enthält und zugleich immunologisch identisch ist mit Proteoglykan Lt.

Die Identifizierung der drei verschiedenen Polypeptidketten von Typ IX Kollagen gelang wie folgt. Die tryptischen Fingerprints der isolierten Ketten wurden auf HPLC mit den in gleicherweise behandelten HMW-Ketten (C2, C3 und C5) verglichen. Auf diese Weise konnte die Chondroitinsulfat enthaltende 115 kDa-Kette als α_2 (IX) identifiziert werden. Die 84 kDa- und 68-kDa-Poly-peptide entsprachen der α_1 (IX), respektive α_3 (IX)-Kette. Zusätzlich ergab sich ein Hinweis auf eine gemeinsame Herkunft der HMW-Komponenten C3 und C4 von der α_2 (IX)-Kette.

Das Glykosaminoglykan enthaltende Peptid wurde nach einer Kollagenase-Verdauung von Typ IX isoliert und mittels Aminosäuren- und Sequenzanalyse charakterisiert. Vergleiche zwischen der gefundenen Peptid-Sequenz und den aufgrund von cDNA und genomischen Klonen, pYN 1731 und pYN 1738 vorausgesagten

Aminosäure-Sequenzen für $NC1\alpha_1$, $NC2\alpha_1$, $NC3\alpha_1$, $NC1\alpha_2$ und $NC2\alpha_2$ deuten auf die NC3-Region als Glykosaminoglykan-Bindungsstelle. Die Länge dieser Domäne beträgt 17 Aminosäurereste im Gegensatz zu den 12 Resten für NC3 in α_1 (IX). In den fünf zusätzlichen Aminosäuren ist auch das für die Glykosaminoglykan-Bindung zuständige Serin enthalten. Dieser Befund wurde durch Rotary-Shadowing Studien mit einem monoklonalen Antikörper, der sulfatierte Reste erkennt, bestätigt. Die Bindungsstelle dieses Antikörpers befindet sich in der Kink-Region (NC3) von Typ IX Kollagen. Diese sulfatierten Reste sind das Produkt von Chondroitinase ABC-verdauten Glykosaminoglykanen. Eine weitere Bestätigung lieferte die Übereinstimmung der von cDNA und genomischen Klonen vorausgesagten Sequenz für $NC3\alpha_2$ mit der hier beschriebenen Peptid-Sequenz. Die Extrakte der Hühner-Sterna enthielten Typ IX und Typ II Kollagen in einem relativen Verhältnis von 31:69%. Der Anteil des Typ IX Kollagens ohne Glykosaminoglykan war ein Fünftel. Untersuchungen zur Charakterisierung von Myotendinous antigen (Tenascin), einer Hauptglykoprotein-Komponente im Knorpel, wurden eingeleitet.

Abschliessend kann gesagt werden, dass die Lokalisierung der Glykosaminoglykan-Kette in Typ IX Kollagen zusammen mit den Erkenntnissen über die extrahierten Fibrillen und weitere Matrixproteine, z.B. Myotendinous antigen, einen Beitrag zum Verständnis des Aufbaus der Knorpelmatrix leisten.