

**BIOSINTESE VAN 'N AFWYKENDE VORM VAN
TIPE I PROKOLLAGEEN IN 'N FAMILIE MET
OSTEOGENESIS IMPERFECTA**

DEUR

WILHELMINE NANCY DE VRIES

**Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening
aan die vereistes vir die graad Magister Scientiae
(Biochemie) aan die Potchefstroomse
Universiteit vir Christelike Hoër
Onderwys**

Studieleier: Prof. dr. W.J. de Wet

Potchefstroom

Junie 1986

Aan U behoort die hemel,
aan U behoort ook die aarde,
die wêreld en alles daarin
U het alles gemaak.

Ps. 89:12

Aan my ouers, Jannie en Marie-Lou de Vries

I N H O U D S O P G A W E

HOOFSTUK 1 : INLEIDING	1
HOOFSTUK 2 : LITERATUUROORSIG	4
2.1 BINDWEEFSELTOESTANDE	4
2.1.1 Die verskillende bekende bindweefsel= toestande	4
2.1.2 Osteogenesis Imperfecta	4
2.1.3 'n Abnormale kollageenstruktuur en -metabo= lisme as onderliggende oorsaak van die waar= genome fenotipe	11
2.2 NORMALE KOLLAGEENSTRUKTUUR EN -METABOLISME ..	13
2.2.1 Struktuur van die kollagene	13
2.2.1.1 Die kollageentipes	13
2.2.1.2 Tipe I prokollageen	18
2.2.1.2.1 Proteïenstruktuur	18
2.2.1.2.2 Geenstruktuur	23
2.2.1.2.3 Ko- en posttranslasionele proses= sering	28
2.2.1.2.3 Tipe III prokollageen	34
2.3 GEDETAILLEERDE STUDIES VAN AFWYKENDE KOLLAGEENPROTEÏEN- EN GEENSTRUKTUUR	36
2.3.1 Inleiding	36
2.3.2 Delesies	37
2.3.2.1 Delesies in pro α 1(I)-kettings	37
2.3.2.2 Delesies in pro α 2(I)-kettings	40
2.3.3 Invoegings in prokollageenkettings	43
2.3.4 'n Leesraamverskuiwing in die pro α 2(I)-geen.	44
2.3.5 Veranderinge in gekoördineerde uit= drukking van die tipe I prokollageengene ..	45
2.3.6 Puntmutasies in prokollageenkettings	48

2.3.7	Ander mutasies	51
2.3.7.1	Inleiding	51
2.3.7.2	Verhoogde hidroksilering van lisien in tipe I en tipe III kollageen	51
2.3.7.3	Tipe III kollageen in been	53
2.3.7.4	Oormatige mannosilering in die C-terminale propeptied van tipe I prokollageen	53
2.3.8	Polimorfismestudies	54
2.4	PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE	57
HOOFSTUK 3 : METODEDES		62
3.1	INLEIDING	62
3.2	DIE VESTIGING, VERMEERDERING EN BEWARING VAN FIBROBLASTWEEFSELKULTURE	62
3.2.1	Motivering	62
3.2.2	Vestiging van primêre kulture	62
3.2.3	Subkulture	63
3.2.4	Bewaring van fibroblaste	64
3.2.5	Heropkweek van selle na bevriesing	64
3.3	METODES VIR DIE DIREKTE ANALISE VAN PROKOLLAGEEN IN DIE MEDIA SOWEL AS IN DIE SELLAE	65
3.3.1	Merkingsprosedure	65
3.3.2	Behandeling van die media	65
3.3.3	Behandeling van die sellae	66
3.4	PROTEASEBEHANDELING VAN SELLULÊRE- EN MEDIAPROTEÏENE	67

3.4.1	Pepsienbehandeling	67
3.4.2	Vertering met tripsien en chimotripsien	69
3.5	TWEEDIMENSIONELE GELELEKTROFORSESE	70
3.5.1	Analise onder reduserende en nie-reduserende kondisies	70
3.5.2	CNBr-peptiedkartering met gebruikmaking van tweedimensionele analise	70
3.5.3	Tweedimensionele analise met vertebrat- kollagenaseverteerde materiaal in die eerste dimensie en CNBr-vertering in die tweede dimensie	71
3.6	BEPALING VAN DIE TERMIESE STABILITEIT VAN TIPE I PROKOLLAGEEN	72
3.7	BEPALING VAN DIE KINETIKA VAN SEKRESIE VAN TIPE I PROKOLLAGEEN	73
3.8	PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN DEUR ENDOGENE N-PROTEÏENASE	75
HOOFSTUK 4 : SIFTING VAN PASIËNTE MET TIPE I OI		77
4.1	BENADERINGSWYSE	77
4.1.1	Keuse van pasiënte	77
4.1.2	Die families	77
4.1.2.1	Familie 012 (figuur 4.1)	77
4.1.2.2	Familie 0181 (figuur 4.2)	79
4.1.2.3	Familie 2094 (figuur 4.3)	79
4.1.2.4	Familie 1500 (figuur 4.4)	79
4.1.2.5	Familie 2139 (figuur 4.5)	83
4.1.3	'n Oorsig oor die siftingsprogram	83
4.2	RESULTATE VAN DIE SIFTINGSPROGRAM	87

4.2.1	Analise van ongeprosesseerde [^3H]-prolien= gemarkte prokollageen	87
4.2.2	Analise van gepepsineerde [^3H]-prolienge= merkete proteïenmateriaal	97
4.2.2.1	Inleiding	97
4.2.2.2	Analise van gereduseerde gepepsineerde materiaal	99
4.2.2.3	Onderbroke elektroforese van pepsienbe= handelde proteïenmateriaal	102
4.2.2.4	Analise van ongereduseerde gepepsineerde materiaal	105
4.3	SAMEVATTING	108
HOOFSTUK 5 : KARAKTERISERING VAN DIE BYKOMENDE BAND EN BEPALING VAN DIE LOKALITEIT VAN DIE MUTASIE		109
5.1	INLEIDING	109
5.2	INVLOED VAN VARIËRENDE KONDISIES VIR PROTEOLITIESE VERTERING OP DIE BYKOMENDE BAND	112
5.3	TWEEDIMENSIONELE ANALISE VAN PEPSIENBEHANDELENDE PROTEÏENMATERIAAL	123
5.4	SAMEVATTING	131
HOOFSTUK 6 : EFFEK VAN DIE MUTASIE OP DIE TERMIESE STABILITEIT, SEKRESIE EN PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN		132
6.1	BENADERINGSWYSE	132
6.2	TERMIESE STABILITEIT VAN SELLULÊRE PROKOLLAGEEN	132
6.3	SEKRESIE VAN PROKOLLAGEEN DEUR KONTROLE EN OI FIBROBLASTE	139

6.4	PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN DEUR N-PROTEÏENASE	149
6.5	SAMEVATTING	157
HOOFSTUK 7 : BESPREKING		158
7.1	INLEIDING	158
7.2	POSISIE EN AARD VAN DIE MUTASIE	158
7.3	DIE EFFEK VAN DIE MUTASIE OP DIE KARAKTERIS- TIEKE VAN TIPE I PROKOLLAGEEN	163
7.3.1	Inleiding	163
7.3.2	Termiese stabiliteit	165
7.3.3	Kinetika van sekresie	167
7.3.4	Prosessering van tipe I prokollageen deur N-proteïenase	168
7.4	'N SAMEVATTENDE MODEL	169
7.5	KLINIESE MANIFESTASIE VAN DIE MUTASIE IN DIE FAMILIE	173
7.6	SLOTSOM	177
OPSOMMING		182
BYLAAG I : 'N FENOTIPIESE BEELD VAN FAMILIE 2139		185
BYLAAG II: AFKORTINGS		195
LITERATUURLYS		197
BEDANKINGS		210

ABSTRACT

BIOSYNTHESIS OF AN ABNORMAL TYPE I PROCOLLAGEN IN A FAMILY WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA

(Original title: Biosintese van 'n afwykende vorm van tipe I prokollageen in 'n familie met osteogenesis imperfecta).

Osteogenesis imperfecta (OI) is a heterogeneous group of heritable disorders of connective tissue which are characterized by increased fragility of bone and are frequently associated with other clinical features, such as skeletal deformities, blue sclerae, hearing impairment and dentinogenesis imperfecta. OI can be divided into at least four different subtypes: type I, type II, type III and type IV. A variety of observations, made on cultured skin fibroblasts, showed that some forms of the heritable disorders of connective tissues involve changes in the metabolism of type I procollagen.

Synthesis of procollagen was examined in skin fibroblasts from a patient with type I OI. Treatment of the procollagen with pepsin, followed by SDS-PAGE, revealed the presence of type I collagen in which two $\alpha 1(I)$ chains were linked through interchain disulfide bonds. Fragmentation of the disulfide bonded $\alpha 1(I)$ dimers with vertebrate collagenase and cyanogen bromide, demonstrated the presence of a cysteine residue in $\alpha 1(I)CB8$, a fragment containing amino acid residues 124 - 402 of the $\alpha 1(I)$ collagen chain.

The presence of one mutant pro $\alpha 1(I)$ chain in trimers of type I procollagen was found to reduce the thermal stability of the protein with 2,5° C. In contrast, the presence of two mutant pro $\alpha 1(I)$ chains was found to reduce the thermal

stability of type I procollagen with 1°C. Three kinds of type I trimers were therefore formed: a normal type with normal pro α 1(I) chains; a type I trimer with one normal and one mutant pro α 1(I) chain and a type I trimer with two mutant pro α 1(I) chains. Type I trimers containing one mutant pro α 1(I) chain were secreted at a slower rate than normal. A fraction of 63% was secreted in the fast phase of secretion as opposed to the normal fraction of 96%. The presence of the mutant pro α 1(I) chains in type I trimers had no adverse effect on processing by N-proteinase. The most likely explanation for these disruptive changes in the physical stability and secretion of the mutant procollagen is that a cysteine residue is substituted for a glycine in half of the pro α 1(I) chains synthesized by the patient's fibroblasts.

Radiological examination of the proband and seven other family members, representing three generations of a large pedigree, revealed a large variation in phenotype. Analysis of the collagen from fibroblasts of less and more severely affected members, all showed the presence of the cysteine containing pro α 1(I) chains.

Results from this study will be published in the following journals:

1. De Vries, W.N. and De Wet, W.J.

"The molecular defect in an autosomal dominant form of osteogenesis imperfecta : synthesis of type I procollagen containing cysteine in the triple-helical domain of pro α 1(I) chains" (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9056.

2. De Vries, W.N. and De Wet, W.J.

"Cysteine in $\alpha 1(I)$ chains of human type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta" (1986) In : Development and diseases of cartilage and bone matrix: UCLA symposia on molecular and cellular biology, New series, Vol. 46, in press.

Results from this study have also been presented at one international and various local scientific meetings:

1. De Vries, W.N. and De Wet, W.J.

"Cysteine in $\alpha 1(I)$ chains of human type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta" UCLA Symposia on molecular and cellular biology: Development and Diseases of Cartilage and Bone Matrix, Lake Tahoe, California : (1986). Abstract no. H - 20.

2. De Vries, W.N. and De Wet, W.J.

"Synthesis of altered type I procollagen in a family with osteogenesis imperfecta" 25th Annual Pathology Congress of the South African Society of Pathologists, Johannesburg : (1985). Abstract no. C - 17.

3. De Vries, W.N. and De Wet, W.J.

"The molecular defect in an autosomal dominant form of osteogenesis imperfecta": The First Joint Congress of the South African Biochemical Society, South African Genetics Society and The South African Society for Microbiology, Johannesburg : (1986).

4. De Vries, W.N., Gericke, G.S., Hamersma, H., Du Toit, J. and De Wet, W.J.

"Clinical heterogeneity in a family with osteogenesis imperfecta": The First Joint Congress of the South African Biochemical Society, South African Genetics Society and The South African Society for Microbiology, Johannesburg : (1986)

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Osteogenesis imperfecta (OI) is 'n heterogene groep bindweefsel siektetoestande wat veral gekenmerk word deur brosheid van bene. OI word verder geassosieer met ander kliniese simptome waaronder skeletale misvorming, blou sklera, progressiewe gehoorverlies en dentinogenesis imperfecta (Sillence, 1981). Vier subtipes, naamlik tipe I, tipe II, tipe III en tipe IV, word onderskei. Sowaat 90% van alle OI-gevalle is as tipe I klassifiseerbaar.

Bindweefselstrukture soos been, vel en tendon word almal in 'n mindere of 'n meerdere mate in OI aangetas. Tipe I kollageen is 'n belangrike strukturele komponent van hierdie bindweefselstrukture (Prockop, 1984; Prockop en Kivirikko 1984). Tipe I prokollageen bestaan uit twee $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ -kettings en een $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -ketting. Hierdie kettings word gekombineer in 'n tripelheliese struktuur wat bestaan uit globulêre N- en C-propeptiedgebiede en 'n sentrale tripelheliese domein met 'n Gly-X-Y herhalingskarakter. Proteolitiese verwydering van die N- en C-propeptiede het tipe I kollageen, wat vervolgens in kollageenfibrille vervat word, as eindproduk.

Die gene vir $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ en $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ kom onderskeidelik op chromosoom 17 en 7 as een per haploïde genoom voor (Ramirez *et al*, 1985a). Hierdie gene vertoon 'n komplekse eksonintronstruktuur waar die $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ -geen uit 51 eksone en die $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -geen uit 52 eksone van wisselende grootte saamgestel is (Chu *et al*, 1985a). Intron grootte van die twee gene verskil verder in so 'n mate dat die $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ -geen ongeveer 17 kbp lank is en die $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -geen ongeveer 38 kbp.

Die feit dat bindweefselstrukture by OI aangetas is, het die gedagte laat ontstaan dat 'n abnormale kollageenmetabo-

lisme en -struktuur die onderliggende molekulêre basis van OI vorm. 'n Aantal gedetailleerde studies van tipe I kollageen wat deur fibroblaste van pasiënte met tipe I, II en III OI gesintetiseer word, het hierdie gedagte bevestig. In die meeste van hierdie gevalle kon die defek ook op geenvlak aangedui word. So het Williams en Prockop (1983) gevind dat fibroblaste van 'n tipe II OI-pasiënt (CRL 1262) verkorte pro α 1(I)-kettings sintetiseer wat hulle oorsprong in 'n deleisie van eksons 27, 28 en 29 het. 'n Tweede tipe II OI-pasiënt (GM 2962) se fibroblaste sintetiseer verkorte pro α 2(I)-kettings (De Wet *et al.*, 1983b). Vervolgens is aangetoon dat volgordes van ekson 25 nie in sommige van die pasiënt se pro α 2(I)-mRNA voorkom nie. Sippola *et al.*, (1984) het aangetoon dat 'n pasiënt wat heterosigoties is vir 'n milde vorm van OI se fibroblaste verkorte pro α 2(I)-kettings sintetiseer wat spruit uit 'n deleisie van ekson 41 uit sommige van die pro α 2(I)-mRNA's. Deak *et al.*, (1983) het 'n leesraamverskuiwing in die pro α 2(I)-geen beskryf wat daartoe lei dat fibroblaste van 'n pasiënt met tipe III OI tipe I prokollageen sintetiseer wat net uit pro α 1(I)-trimere bestaan. Ten slotte het Steinmann *et al.*, (1984) die sintese van tipe I prokollageen met 'n Cys-residu in α 1(I)CB6 deur fibroblaste van 'n tipe II OI-pasiënt beskryf.

'n Verlaging in termiese stabiliteit, sekresie en/of 'n verandering in prosesseerbaarheid deur N-protefenase kon vir elke geval aangetoon word waar gemuteerde pro α 1(I)- of pro α 2(I)-kettings in trimere gefinkorporeer is.

'n Tipe I OI-pasiënt waarvan die fibroblaste gemuteerde pro α 1(I)-kettings sintetiseer, is deur middel van 'n siftingsprogram geïdentifiseer (hoofstuk 4). Vervolgens is die aard en die fragmentposisie van die mutasie in die pro α 1(I) kettings bepaal (hoofstuk 5). Die effek van hierdie mutasie op die termiese stabiliteit, kinetika van sekresie en die ekstrasellulêre prosesseerbaarheid van die

pasiënt se prokollageen is ook bepaal (hoofstuk 6). Die moontlike betekenis van en verklaring vir die resultate en hul onderlinge verband word ten slotte in hoofstuk 7 bespreek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 BINDWEEFSELTOESTANDE

2.1.1 Die verskillende bekende bindweefseltoestande

Osteogenesis imperfecta (OI), die Ehlers-Danlos-sindrome (EDS) en die Marfan-sindroom (MS) is die belangrikste bekende bindweefselstoestande. Voorbeelde van ander sodanige siektetoestande is cutis laxa, epidermolysis bullosa en Menkes-sindroom. 'n Opsomming van die belangrikste gewens van die toestande, behalwe OI, word in tabel 2.1 saamgevat. Uit tabel 2.1 is dit duidelik dat 'n groot mate van heterogeniteit ten opsigte van die erflikheidspatroon, genotipe en fenotipe selfs binne bepaalde siektetoestande voorkom. Uitgebreide oorsigte oor hierdie toestande word gegee deur Byers *et al* (1981a), Eyre (1981), Kirsch *et al* (1982), Prockop en Kivirikko (1984), Cheah (1985) en Ramirez *et al* (1985a en c). Aangesien hierdie studie in besonder op OI gerig is, word die toestand in meer detail in die volgende afdeling bespreek.

2.1.2 Osteogenesis Imperfecta

OI word gekenmerk deur 'n verswakte beenstruktuur. Vanaf die agtiende eeu is verskillende vorme van OI deur klinici beskryf. Een van die eerste familiestudies is teweens in 1788 deur Olaus Jacob Ekman gepubliseer (Peltier,

Subtipe	Oorerwing ²	Etiologie	Kliniese simptome
Ehlers Danlos Sindrome			
I: Gravis	OD	Onbekend	<u>Vel</u> : sag en fluweelagtig; opvallende hiperrekbaarheid; "cigarette paper" littekens; kneus maklik; ekchimose; pseudotumors; <u>Gewrigte</u> : hipermobiliteit van klein en groot gewrigte; <u>kardiovaskulêre betrokkenheid</u> ; myterklepprolaps; spatate; slagaarbreuke; <u>Breuke</u> ; <u>skelet</u> : pes planus; kifoskoliose; osteoarthritis; <u>Premature geboortes</u> as gevolg van skeuring van fetale membrane.
II: Mitis	OD	Onbekend	<u>Vel</u> : Sag; matige hiperrekbaarheid; kneus maklik; <u>gewrigte</u> : Matige hipermobiliteit van groot en klein gewrigte; <u>Kardiovaskulêre betrokkenheid</u> : selfde as I - minder ernstig; <u>Breuke</u> : minder algemeen; <u>Premature geboortes</u> : minder algemeen; <u>skelet</u> : Selfde as I maar minder ernstig.
III: Nie-kwaadaardige familiële hipermobiliteit	OD	Onbekend	<u>Vel</u> : sag; verder minimaal geaffekteer; <u>gewrigte</u> : verhoogde hipermobiliteit van klein en groot gewrigte; ontwrigting kom algemeen voor; <u>Ander</u> soos aangetref in I en II kom nie voor nie.
IV: Ekchimo-tiese of arteriële	OD OR	Verlaagde of afwesige sintese van tipe III kollageen; veranderde sekresie van tipe III kollageen.	<u>Vel</u> : dun en/of deurskynend; are duidelik sigbaar oor romp, buik, arms en bene; herhaalde ekchimose; nie hiperrekbaar nie; <u>Gewrigte</u> : normale mobiliteit; <u>Slagaarbreuke en kolonbreuke</u> : is algemeen en lei tot dood.
V: X-gekoppeld	XR	Onbekend	<u>Vel</u> : hewige hiperrekbaarheid; kneus baie maklik; <u>Inwendige organe</u> onder andere misvorming van die hart en groot bloedvate; <u>Ander</u> : selfde as tipe II
VI: Okulêr	OR	Lisielhidroksilasedefek: verlaagde inhoud van hidrosilisien in vel, tendon en been kollagene	<u>Skelet</u> : hewige skoliose; <u>Gewrigte</u> : hipermobiliteit; <u>Blindheid</u> : as gevolg van retinale losheid, okulêre breuke en keratokonus; <u>Vel</u> : sag fluweelagtig en hiperrekbaar; minder littekens as tipe I EDS; <u>Gewrigte</u> : hipermobiliteit van gewrigte.

Subtipe	Oorerwing	Etiologie	Kliniese simptome
VII: Arthrochalasis multipleks congenita	OD OR	Mutasies van die N-terminale splytingspunt van prokollageen moontlik as gevolg van 'n N-protefenase defek.	<u>Vel</u> : sag, byna normale littekens; <u>Gewrigte</u> : hewige gewrigshiermobilititeit; aangebore heupontwrigting; <u>kort postuur</u> .
VIII: Periodontale vorm	OD	Onbekend	<u>Vel</u> : hewige broosheid; abnormale atrofiese gepigmenteerde littekens; minimale hiperrekbaarheid; <u>Gewrigte</u> : matige "hiermobilititeit" algemene periodontitis.
XI:		Defekte kopermetabolisme wat lei tot lisielhidroksilasedefek en defekte kruisbinding	
X:		Fibronektiendefek	
<u>Marfan sindrome:</u>			
1. Klassieke astenies	OD	Heterogeen: onder andere verhoogde kollageenoplosbaarheid; abnormale $\alpha 2(I)$ -kettingsintese	<u>Skeletale veranderinge</u> : aragnodaktilie; dolichostenomelia; skoliose; pectus excavatum en/of pectus carinatum; defekte of onvolledige ontwikkeling van gesigsbene; hiermobilititeit van gewrigte; <u>Kardiovaskulêre abnormaaliteite</u> : aorta- en myterklep defekte; aortabreuke lei tot dood; verwyding van aorta; <u>Okulêre veranderinge</u> : miopie; ektopie lentis en losskeur van retina.
2. Non-astenies of kardiovaskulêre vorm			
3. Saamtrekkende aragnodaktilie			
4. Marfanofede hiermobilitêre sindroom.			
<u>Cutis laxa</u>	OR	Onbekend	<u>Vel</u> : Los vel; <u>longe</u> : progressiewe emfiseem; longslag-aarvernouing; cor pulmonale; <u>Breuke</u> : gastrointestinale en/of urogenitale kanaal <u>deverticula</u> ; <u>karakteristieke gesigstruktuur</u> : lang bolip; hakneus; omgekeerde neusvleuels; dood tree vroeg in as gevolg van longsiektes.
	OD	Onbekend	<u>Vel</u> : los; geen ander sistemiese abnormaliteite nie.
	XR	Heterogeen: verhoogde kollageenoplosbaarheid; verlaagde lisieloksidase vlakke	<u>Vel</u> : milde losheid; <u>Skeletale abnormaliteite</u> : gewrigshiermobilititeit; pectus carinatum/excavatum; abnormale sleutelbene; ontwrigte speekbeenkoppe.
<u>Menkes sindroom</u>		Defekte kopermetabolisme: lisieloksidasedefek en defekte kruisbinding	

Subtipe	Oorerwing	Etiologie	Kliniese simptome
<u>Epidermolysis bullosa:</u>	OR	Oormatige sintese en sekresie van kollagenase deur velfibroblaste. Uitgebreide afbraak van velkollageen met gepaardgaande trauma.	
<hr/>			
<u>Die Osteochondroplasias:</u>			
<u>Menslike verdwergings afwykings</u>			
Achondroplasie:			Kort-ledemaat dwergagtigheid geassosieer met 'n groot kop, breë voorkop, ingedrukte neusbrug, relatiewe prognatisme en drietandvurk voorkoms van die hand.
<hr/>			
Diastrofiese Dwergagtigheid	OR		<u>Skeletale afwykings:</u> Buiging en verdraaiing van die langbene; progressiewe kifoskolirose; kontrakture van die groot gewigte; hewige klompvoetmisvorming; "duimryer" duimafwyking; <u>Kraakbeen:</u> vroeë of distrofiese ossifisering van verskeie kraakbeenstrukture soos die oor, larinks, ribbes en ander kraakbeen.
<hr/>			
Fatale Dwergagtigheid	Nuwe OD mutasies		Dodelike kort ledemaat dwergagtigheid. Geaffekteerde babas word gebore met: groot kop; hewige dwergagtigheid met mikromelie; uiters klein, abnormaal buigbare ribbekas wat lei tot respiratoriese probleme en dood; pypbene kort en gaan gepaard met onreëlmatige hede; plat rugwerwels; kort ribbes en smal toraks.
<hr/>			
"Spandybepiphyseal" Displasia	OD of XD		Platyspondyly; groot aantal displastiese epifese; groot kliniese heterogeniteit

- Hierdie tabel is saamgestel uit die volgende artikels:
 Hollister, D.W., Byers, P.H. en Holbrook, K.A. (1982). Adv. Hum. Genet. 12, 1 - 87.
 Byers, P.H., Barsh, G.S. en Holbrook, K.A. (1981a). Coll. Res. 5, 475 - 489.
 Byers, P.H., Barsh, G.S. en Holbrook, K.A. (1981b). Birth Defects: Original Article Series, Vol. XVII, March of Dimes Birth Defects Foundation, 147
 Kirsch, E., Ihme, A., Muller, P. en Krieg, Th. (1982). Enzyme 27, 239
 Cheah, K.S.E. (1985). Biochem. J. 229, 287
- Oorerwingspatrone wat voorkom is dié van outosomaal dominant (OD), outosomaal resessief (OR), X-gekoppel dominant (XD) en X-gekoppel dominant (XD) en X-gekoppel resessief (XR),

1981). Die oudste bekende geval is dié van 'n Egiptiese mummie wat dateer uit ongeveer 1000 vC (Albright en Millar, 1981). Tot onlangs was dit nie seker of hierdie as een of meerdere siekte-toestande beskou behoort te word nie. Die verwarring blyk daaruit dat tot 36 sinonieme gebruik is vir die beskrywing van OI (Weil, 1981). 'n Aantal sisteme vir die ordelike klassifisering van die verskillende fenotipes wat met OI gepaard gaan, is voorgestel. Sillence *et al* (1979) het byvoorbeeld op grond van uitgebreide kliniese en genetiese data 'n klassifisering van OI in vier subtipes voorgestel. Hierdie subtipes is intussen uitgebrei (Sillence, 1981; Sillence *et al*, 1984). Die Sillence-klassifisering, soos weergegee in tabel 2.2, word klinies algemeen gebruik as 'n riglyn vir die onderskeid tussen verskillende manifestasies van OI.

Meer as 90% van alle gevalle is as tipe I klassifiseerbaar sodat hierdie tipe as die prototipe van OI beskou kan word. Die berekende minimum frekwensie van voorkoms van tipe I in Australië is 3,7 per 100 000 geboortes (Sillence *et al*, 1979). 'n Frekwensie van 0,1 per 100 000 geboortes is egter vir die Swart Suid-Afrikaanse populasie gevind (Beighton en Versveld, 1985). Hierdie gegewens weerspreek die verwagting dat daar nie 'n groot verskil in die voorkoms van OI in die verskillende populasies sal wees nie. Tipe II is meer seldsaam met 'n frekwensie van 1,6 uit 100 000 geboortes. Hierdie tipe is aanvanklik as outosomaal resesief beskou, maar onlangse gegewens dui eerder op 'n meer heterogene erflikheidspatroon waarin nuwe mutasies 'n groot rol speel (Barsh en Byers, 1981; Williams en Prockop, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Sillence *et al*, 1984). Die bindweefselstrukture is sodanig verswak of swak ontwikkel dat dood neo- of perinataal intree. Radiologies is konsertina-agtige femurs, sowel as kraalagtige ribbes, en

TABEL 2.2: Voorgestelde klassifikasie van OI sindrome volgens Sillence¹ 9

Numeriese of Subtipe	Kwalifiserende agtervoegsels	Benaming	Erflikheidspatroon	Sinonieme	Kliniese simptome
I	Congenita (tarda)	Dominant; blou sklera	Otosomaal dominant	Dominant oorgeërfde OI met blou sklera Van der Hoeve's sindroom Trias fragilis ossium OI tarda levis OI tarda tipe II OI (milde langbeen misvorming). Eddowe's sindroom	<u>A</u> : Brosbene met aanvang van breuke na geboorte; blou sklera; ± presiniële doofheid; normale tande. <u>B</u> : Brosbene met aanvang van breuke na geboorte; blou sklera; ± presiniële doofheid; DI.
II	Congenita (altyd)	Dodelike perinataal	Heterogeen: Otosomaal dominant Otosomaal resessief.	Letale (dodelike) perinatale OI. OI letalis Vrolik Letale (dodelike) OI congenita.	<u>Algemeen</u> : Uitermatige brosheid van bene en verswakte bindweefselstrukture; vertraagde groei <u>in utero</u> ; perinatale dood. Op grond van kliniese en radiologiese bevindinge <u>A</u> : Kort, breë, "opgefrommelde" langbene; buiging van tibia en aanloopende kraaagtige ribbes. <u>B</u> : Kort, breë, "opgefrommelde" femora; buiging van tibiae; normale ribbes of onvolledige kraaagtigheid. <u>C</u> : Lang, dun, onvolledige gevormde reghoekige langbene; veelvuldige beenbreuke en dun kraaagtige ribbes.
III	Congenita (tarda)	Progressiewe misvorming	Heterogeen: Otosomaal dominant. Otosomaal resessief.	Progressief misvormende OI met normale sklera. OI congenita OI tarda gravis OI (erge langbeen misvorming) OI congenita tipe Vrolik Periosteal dysplasie van Porak en Duranta. Osteopsathyrosis idiopathica van Lobstein	Brosheid van bene; normale sklera; uitermate gestremde groei; skeletale misvorming waar onder kyphoscoliosis, ± DI.
IV	Congenita (tarda)	Dominant, wit sklera	Otosomaal dominant	Dominant oorgeërfde OI met normale sklera Osteopsathyrosis idiopathica van Lobstein. Ekman-Lobsteinsiekte	<u>A</u> : Brosbene; normale sklera; ± presiniële doofheid; ± groei gestremdheid; ± skeletale misvorming; - DI. <u>B</u> : Brosbene; normale sklera; ± presiniële doofheid; ± groei gestremdheid; ± skeletale misvorming; + DI.

1. Tabel saamgestel na aanleiding van Sillence (1981) en uitgebrei op grond van Sillence et al (1984).

verlaagde ossifisering van die kraniale en gesigsbene in utero duidelik waarneembaar. Daarom is hierdie die enigste tipe wat gereedelik deur radiologiese- en/of ultrasonografiese ondersoeke, prenataal geïdentifiseer kan word (Shapiro *et al*, 1982; Elejalde en de Elejalde, 1983; Patel *et al*, 1983; Rawson *et al*, 1983; Stephens *et al*, 1983; Woo *et al*, 1983a). Tipe III OI is, net soos tipe II, seldsaam en word gekenmerk deur progressiewe misvorming en brosheid van die langbene, skedel en rugstring, sowel as wit sklera. Die gehoor is gewoonlik normaal, terwyl dentinogenesis imperfecta (DI) mag voorkom. Die erflikheidspatroon is hetero-geen van aard. In 'n sekere sin kan hierdie tipe OI beskou word as 'n minder ernstige variant van tipe II. Die gebrekkige ossifisering van die skedel is byvoorbeeld nie so uitgesproke nie, die ledemate is nie verminderd verkort en misvorm nie, en die lengte en massa by geboorte is meer normaal. Beighton en Versveld (1985) het in tipe III 'n frekwensie van 0,48 uit 100 000 geboortes gevind, teenoor Sillence *et al* (1979) se frekwensie van 0,6 uit 100 000 geboortes. Tipe IV OI word gekenmerk deur osteopenie wat lei tot 'n varieerbare brosheid van bene. Die sklera is gewoonlik normaal of die aanvanklike blou kleur neem progressief af totdat dit die normale kleur aanneem by volwassenes. Presiniele doofheid kom minder dikwels voor. As gevolg van progressiewe misvorming het die persone 'n korter postuur as normaal. 'n Vergelyking van die klassifiserende kliniese simptome van tipe I en tipe IV toon duidelik dat die onderskeid tussen die twee tipes baie vaag is. In wese is dit slegs die kleur van die sklera wat hierdie twee tipes onderskei.

Beighton *et al* (1985) het die voorkoms van 'n moontlike tipe V OI voorgestel. In 'n Indiërfamilie is die algemene

kliniese simptome van tipe III, tesame met blindheid, beskryf. Hierdie mag 'n voorbeeld wees van oorklassifisering, aangesien slegs een familie met dié simptome beskryf is. Daar moet ook op gewys word dat al die simptome wat in tabel 2.2 vir 'n spesifieke tipe OI gelys is, nie noodwendig by 'n enkele pasiënt voorkom nie. In der waarheid bestaan daar in sommige gevalle 'n groot mate van oorvleueling van fenotipiese kenmerke wat 'n starre klassifisering tot 'n spesifieke tipe aan bande lê. 'n Voorbeeld hiervan is 'n familie waar die aangetaste lede almal simptome van DI, blou sklera en Wormiaanse bene sonder beenbreuke openbaar (Beighton, 1981). Alhoewel hierdie vorm van OI volgens die outeur nie onder een van die vier bestaande tipes geklassifiseer kan word nie, mag die familie tog wel as tipe I OI geklassifiseer word. Tewens een van die lede het meervoudige beenbreuke vertoon, terwyl presiniële doofheid by twee ander familieledes waargeneem is (Beighton, 1981). Twee ander voorbeelde van fenotipiese heterogeniteit binne 'n bepaalde familie is deur Gillerot *et al* (1983) en Paterson *et al* (1983) vir 'n tipe I en 'n tipe IV familie, onderskeidelik, beskryf.

Die heterogene aard van die kliniese manifestasies van OI, soos blyk uit tabel 2.2, en tewens van die ander bindweefseltoestande (tabel 2.1) mag daarop dui dat die molekulêre basis van die verskillende toestande mag verskil.

2.1.3 'n Abnormale kollageenstruktuur en -metabolisme as onderliggende oorsaak van die waargenome fenotipe

Bindweefselstrukture soos been, vel, tendon en ligamente word almal in 'n mindere of 'n meerdere mate in OI aangetas.

Tipe I prokollageen is 'n belangrike strukturele komponent van bindweefsel en maak sowat die helfte van die droë massa van been en 80% van die droë massa van vel, tendon en ligamente uit (Prockop, 1984; Prockop en Kivirikko, 1984). Dit kan derhalwe verwag word dat mutasies wat lei tot 'n abnormale kollageenstruktuur en metabolisme 'n aanleidende oorsaak van OI mag wees. Aanduidings dat daar 'n verband tussen die bindweefsel-siekte-toestande en die kollageen-metabolisme mag bestaan, is gedurende die vorige dekade gevind. Daar is onder andere aangetoon dat tipe III en tipe V kollageen in been van OI pasiënt voorkom, terwyl normale been net tipe I kollageen bevat (Müller *et al*, 1977; Pope *et al*, 1980). In teenstelling met kontrole-individue is tipe III kollageen in dentien van OI-pasiënte aangetref (Sauk *et al*, 1980). Verder het elektronmikroskopiese analises getoon dat die matriksstruktuur van dentien by OI pasiënte abnormaal is; daar is ook 'n kwalitatiewe verandering in die organiese samestelling van die dentienmatriks waargeneem (Takagi *et al*, 1980). Verder is 'n verhoogde beenafbraak met 'n verlaagde beenvorming deur osteoblaste in kinders met OI beskryf (Baron *et al*, 1983). Meer biochemies gerigte benaderings het 'n relatiewe verlaging in die sintese van tipe I prokollageen (Penttinen *et al*, 1975; Steinmann *et al*, 1979) sowel as 'n verlaging in die relatiewe hoeveelheid tipe I kollageen in die vel aangetoon (Sykes *et al*, 1977). In velbiopsies van pasiënte met OI is veranderinge in die relatiewe verhouding van $\alpha 1(\text{III})$ tot $\alpha 1(\text{I})$ sowel as die verhouding van $\alpha 1(\text{I})$ -tot $\alpha 2(\text{I})$ -kollageenkettings (Francis *et al*, 1981; Krieg *et al*, 1981) tesame met verhoogde hoeveelhede hidrosilisien en geglikosileerde hidrosilisien waargeneem (Trelstad *et al*, 1977; Kirsch *et al*, 1981). Ander voorbeelde van die betrokkenheid van abnormale kollageenmetabolisme by OI is oormatige voorkoms van mannose in die COOH-terminale propeptied van tipe I kollageen (Peltonen *et al*, 1980) en die verlaagde voorkoms van kruisbindings in velkollageen (Fujii en Tanzer, 1977). Met hierdie aan-

duidings as vertrekpunt is gedetailleerde studies van die presiese aard van 'n verskeidenheid van kollageenmutasies op beide proteïen- en nukleïensuurvlak gedurende die afgelepe 4 jaar uitgevoer. Hierdie werk word in afdeling 2.3 bespreek

Om die abnormale kollageenmetabolisme en -struktuur toe te lig, is dit eers noodsaaklik om 'n kort oorsig oor die normale kollageenmetabolisme en -struktuur te gee.

2.2 NORMALE KOLLAGEENSTRUKTUUR EN -METABOLISME

2.2.1 Struktuur van die kollagene

2.2.1.1 Die kollageentipes

Die kollagene is belangrike strukturele proteïene wat wydverspreid in bindweefselstrukture en in die ekstrasellulêre matriks voorkom (Miller, 1976; Bornstein en Sage, 1980; Minor, 1980; Burgeson, 1982; Glanville, 1982; Prockop en Kivirikko, 1984; Martin *et al*, 1985). 'n Onderskeidende eienskap van hierdie proteïene is dat 'n groot deel van die primêre struktuur uit die herhalings-eenheid Gly-X-Y saamgestel is. Hierdie herhalingskarakter asmede die hoë voorkoms van Pro en Hyp in posisies X en/of Y, dwing die Gly-X-Y-bevattende gebiede in 'n tipe II trans-heliks, waarin die pirrolidoonringsisteme van die prolielresidue na buite om die heliks gerig is. Vir al die kollagene assosieer die herhalingsvolgordes om tripelstringige superhelikse te vorm. Hierdie superheliese strukture reflekteer die sekondêre struktuur van

poli-L-prolien behalwe dat die klein aminosuur Gly telkens aan die binnekant van die tripelheliks geleë is en die aminosure X en Y na buite gerig is. Die heliks met ongeveer drie residue per heliksdraai, word gestabiliseer deur interstring waterstofbrugbindings, waartoe die hidroksigroepe van Hyp kan bydra. Dit beteken dat daardie herhalingsvolgordes met 'n hoë inhoud aan Pro en veral Hyp 'n digter, meer stabiele tripelheliks sal vorm.

Benewens vir hierdie Gly-X-Y volgordes, is die kollagene in hul preprovorm ook saamgestel uit aminosuurvolgordes wat 'n meer globulêre struktuur aanneem. Op grond van die besondere lengte van die Gly-X-Y gebiede, die aminosuursamestelling in posisies X en Y, die aard en grootte van die N- en C-terminale propeptiede en in sommige gevalle die teenwoordigheid van globulêre domeins tussen opeenvolgende tripelheliese gebiede, is daar tot dusver tussen ten minste tien verskillende kollageentipes onderskei (tabel 2.3).

Vir al die kollageentipes assosieer die tripelheliese eenhede tot supramolekulêre komplekse. Daardie kollagene wat veral met bindweefsels geassosieer word, naamlik tipes I, II, III en V, vorm fibriële strukture deurdat die individuele kollagene in parallelometriese oorvleuelende rangskikkings gekruisbind word. Hierdie kollagene is in hul finaal-geprosesseerde vorm uit alleenlik Gly-X-Y volgordes saamgestel en vertoon as groep analoë supra-molekulêre struktuur en funksie.

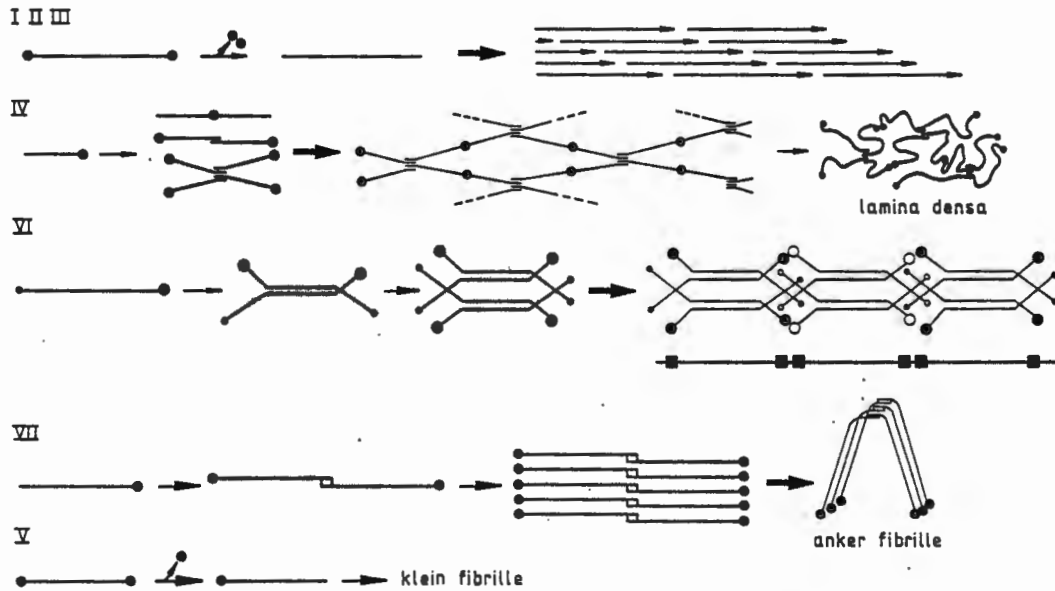
Daarteenoor behou die nie-fibriële kollagene soos getipeer deur tipe IV, hul N- en C-propeptiede (Weber *et al*, 1984). Verder word tipes IV (Babel en Glanville, 1984), VII (Burgeson *et al*, 1985) en IX (Mayne *et al*, 1985; Van der

Rest *et al*, 1985) se tripelheliese volgordes deur een of meer globulêre domeins onderbreek. Hierdie globulêre domeins vertoon nie die Gly-X-Y-herhalingskarakter nie. Die supramolekulêre struktuur van tipe IV kollageen is onlangs met behulp van veral elektronmikroskopie bestudeer. Hierdie tipe kollageen, wat veral in basaalmembrane voorkom, vorm skynbaar 'n netwerk waarin die N- en C-terminale propeptiede as hegtingspunte tussen die individuele kollageenmolekules dien (Weber *et al*, 1984). Daarteenoor, vorm tipe VII kollageen hoefvormige aggregate deurdat die N-propeptiede deur disulfiedbrûe gekoppel word. Hierdie hoefvormige minifibrille dien as ankerstrukture in basaalmembrane (Burgeson *et al*, 1985). Die verskillende nie-fibriële kollagene vertoon elk 'n eie supramolekulêre struktuur en funksie. 'n Skematiese voorstelling van die verskillende strukture word in figuur 2.1 gegee.

Hierdie verskil in die struktuur en funksie van die fibriële en nie-fibriële kollagene blyk ook uit die weefselverspreiding van die verskillende kollageentipes, soos saamgevat in tabel 2.3. Die fibriële kollagene word oorewegend geassosieer met bindweefselstrukture, soos been, tendon, kraakbeen, die retikulêre laag van die dermis en tunica intima, media en adventitia. Daarteenoor mag die nie-fibriële kollagene meer wydverspreid in bindweefselstrukture of selfs tussen selle voorkom. Tipe IV kollageen kom byvoorbeeld in die meeste organe as deel van die basaalmembrane voor. Aangesien OI geassosieer word met 'n abnormale struktuur van die bindweefsels en veral dan been en dermis, sal 'n meer uitvoerige bespreking van die struktuur van tipe I en tipe III kollageen in die volgende gedeelte voorgehou word.

TABEL 2.3: Die kollageentipes

Tipe	Samestellende polipeptiede	Molekulêre samestelling	Voorkoms
I	proa1(I) proa2(I)	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ $[\alpha 1(I)]_3$	Been, vel, tendon, bloedvate Chondrosietkulture
II	proa1(II)	$[\alpha 1(II)]_3$	Kraakbeen
III	proa1(III)	$[\alpha 1(III)]_3$	Vel, bloedvate, cornea
IV	proa1(IV) proa2(IV)	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Basaal membrane
V	proa1(V) proa2(V) proa3(V) proa4(V) (?)	$[\text{proa1(V)}]_3$ $[\text{proa1(V)}]_2 \text{proa2(V)}$ $[\text{proa1(V)} \text{proa2(V)} \text{proa3(V)}]$ $[\text{proa4(V)}]_3?$	Been, tendon, perisellulêre ruimte
VI	proa1(VI)	$[\text{proa1(VI)}]_2 \text{proa2(VI)}$	Intima, vel, plasentale villi
VII	proa1(VII)	$[\text{proa1(VII)}]_3$	Vel, chondrioamnionmembrane, as ankerfibrille in basaal= membrane
VIII	?	?	Vel, bloedvate, karsinoma's; endoteelselle
IX	proa1(IX) proa2(IX) proa3(IX)	$[\text{proa1(IX)}]_2 \text{proa2(IX)}$ $[\text{proa1(IX)}]_2 \text{proa3(IX)}$	Kraakbeen
X	proa1(X)	$[\text{proa1(X)}]_3$	Eindplaat van langbene, embrioniese been (afwesig in nie-skeletale weefsel)



FIGUUR 2.1 Skematiese voorstelling van die verskil in samestelling en ultrastruktuur van die belangrikste kollageentipes. (Inligtingstuk tot Gordon Research Conference: Structural Macromolecules - Collagen, Julie 1985).

2.2.1.2 Tipe I prokollageen

2.2.1.2.1 Proteïenstruktuur

Ongeveer 90% van die kollagene is tipe I kollageen. Soos saamgevat in tabel 2.3, is hierdie tipe kollageen 'n belangrike komponent van sulke gespesialiseerde bindweefselstrukture soos been, vel en tendon. Die intrasellulêre vorm, tipe I prokollageen, is 'n heteropolimeer saamgestel uit twee pro α 1(I)-polipeptiede en een pro α 2(I)-polipeptied (figuur 2.2). Hierdie prokollageenvorm ondergaan intrasellulêr uitgebreide chemiese modifisering en word daarna in die ekstrasellulêre ruimte uitgeskei (figuur 2.3A). Ekstrasellulêr word die N- en C-terminale propeptiede proteolities deur N- en C-proteïenases onderskeidelik verwyder. Die produk van hierdie proteolitiese splyting, tipe I kollageen, ondergaan intermolekulêre kruisbinding om kollageenfibrille met 'n parallelometriese oorvleuelende rangskikking te vorm (figuur 2.2B).

Die mensgene vir pro α 1(I) en pro α 2(I) is onlangs geïsoleer en beskryf (Chu *et al.*, 1984b; Ramirez *et al.*, 1985b; De Wet *et al.*, 1986). Deur analise van die gene was dit moontlik om die detailsamestelling van hierdie groot polipeptiede vas te stel. Elk van die polipeptiede is in ses onderskeibare funksionele domeins onderverdeelbaar, naamlik die seinpeptied, N-terminale propeptied, N-terminale telopeptied, die sentrale tripelheliese domein, C-terminale telopeptied en C-terminale propeptied (figuur 2.2). Die lengtes van die bogenoemde domeins word in tabel 2.4 saamgevat. Volgens Chu *et al.* (1984b) is die pro α 1(I)-propeptied in twee verdere subdomeins verdeelbaar. Die eerste 86 aminosure na die seinpeptidase-

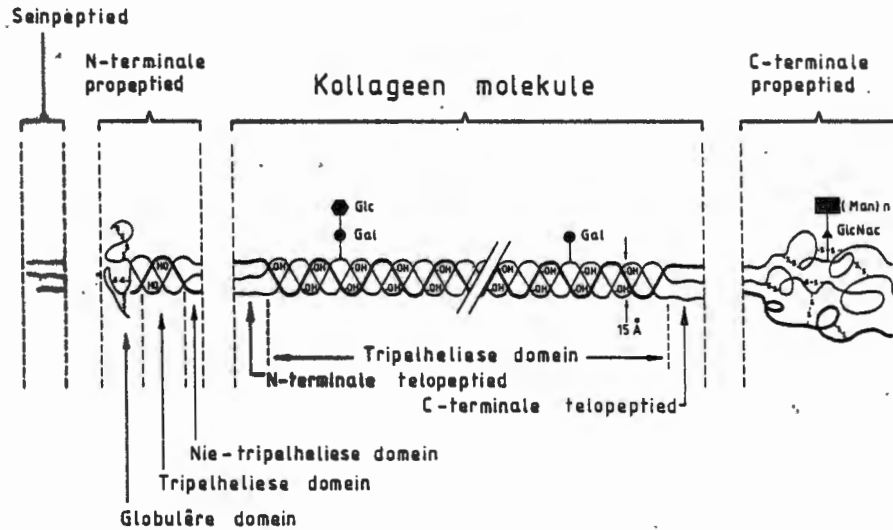
TABEL 2.4

Vergelyking van Proa1(I), Proa2(I) en Proa1(III)

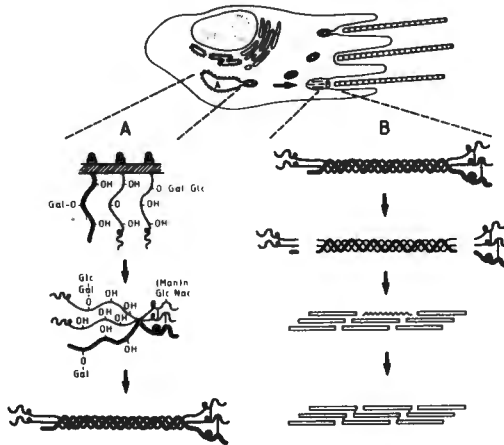
Geentipe	Proa1(I) ^{1,2} (Koderingspoten- siaal)	Proa2(I) ^{2,3}	Proa1(III) ^{5,6}
Seinpeptied	22	22	23
N-propeptied	86	8	
N-terminale tripelheliese gebied	45(51)	39(45)	140 (?)
N-terminale telopectied	25 (19)	20(14)	
Tripelheliese gebied	1014	1014	1023
C-terminale telopectied	26	15	28
C-propeptied	246	247	245
TOTAAL	1464	1365	1459 (?)

VOETNOTA'S

1. Chu, M.L., De Wet, W., Bernard, M., Ding, I.F., Morabito, M., Myers, J., Williams, C en Ramirez, F. (1984b) *Nature* 310 337 - 340.
2. Bernard, M.P., Chu, M.L., Myers, J.C., Ramirez, F., Eikenberry, E.F. en Prockop, D.J. (1983) *Biochemistry* 22, 5213 - 5223.
3. Tate, V.E., Finer, M.H., Boedtke, H. en Doty, P. (1983). *Nucl Acids Res* 11, 91 - 103.
4. Bernard, M.P., Myers, J.C., Chu, M.L., Ramirez, F., Eikenberry, E.F. en Prockop, D.J. (1983) *Biochemistry* 22 1139 - 1145.
5. Yamada, Y., Mudryi, M. en de Crombrughe, B. (1983) *J. Biol Chem* 258, 14914 - 14919.
6. Chu, M.L., Weil, D., De Wet, W., Bernard, M., Sippola, M. en Ramirez, F. (1985b) *J. Biol Chem* 260, 4357 - 5363.
7. Seyer, J.M. en Kang, A.H. (1984) *Biochemistry* 20, 2621 - 2627.



FIGUUR 2.2 Skematiese voorstelling van die funksionele domeins van tipe I prokollageen (Prockop *et al*, 1979).



FIGUR 2.3 Intra- en ekstrasellulêre prosessering van tipe I prokollageen. A : 'n Skematiese voorstelling van die assosiasie van die C-propeptiede, hidroksileringsgebeure en daaropvolgende tripelheliksforming van prokollageen. B : 'n Voorstelling van die ensimatiese splyting na kollageen, fibrilforming en die rangskikking van die fibrille in 'n parallelometriese oorvleuelende wyse bekend as 4D-spasiëring (Prockop en Kivirikko, 1984).

uitkenningspunt het 'n meer globulêre struktuur wat deur vyf disulfiedbrûe gestabiliseer word. Die daarvolgende 51 aminosure, wat ook proksimaal van die N-terminale telopeptied geleë is, het 'n Gly-X-Y herhalingskarakter met 'n hoë inhoud aan Pro en Hyp. Hierdie subdomein neem dan ook 'n tripelheliese vorm in tipe I prokollageen aan. 'n Belangrike verskil tussen die pro α 1(I) en pro α 2(I) polipeptiede is geleë in die lengte van die globulêre domein van die N-propeptied. In die pro α 2(I) is hierdie subdomein slegs agt aminosure lank (tabel 2.4). Die N-terminale tripelheliese gebied van die pro α 2(I) is ook twee Gly-X-Y eenhede korter as dié van die pro α 1(I).

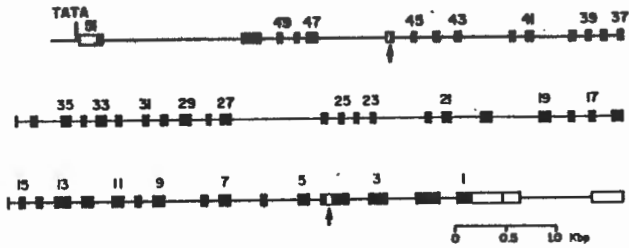
In teenstelling met die subdomeins van die N-propeptied, het die telopeptiede 'n varieerbare tersiêre struktuur om as koppelstuk tussen die N-terminale en die sentrale tripelheliese domeins te kan optree. Die N-terminale telopeptied dien verder as uitkenningspunt vir die ekstrasellulêre N-proteïenase. Distaal van die N-terminale telopeptied volg die sentrale tripelheliese gebied, saamgestel uit 338 ononderbroke Gly-X-Y eenhede in beide pro α 1(I) en pro α 2(I) (figuur 2.2). Die sentrale tripelheliese gebied word aan die C-terminale globulêre propeptied gekoppel deur die C-terminale telopeptied. Hierdie telopeptied volgordes vertoon ook 'n varieerbare tersiêre struktuur en beskik oor die uitkenningspunt vir die ekstrasellulêre C-proteïenase. Die C-propeptied het 'n hoë inhoud aan hidrofobe aminosure (Bernard *et al*, 1983a en 1983b), sodat hierdie domein 'n sferiese globulêre struktuur aanneem. Soos vir die N-terminale globulêre domein, word die C-propeptied verder deur twee intramolekulêre disulfiedbrûe gestabiliseer.

2.2.1.2.2 Geenstruktuur

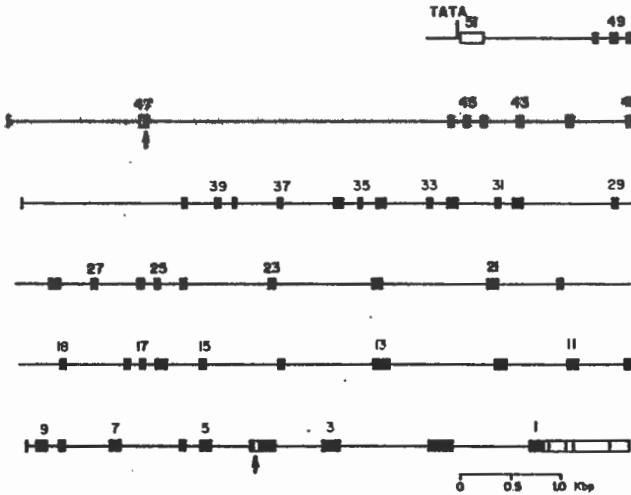
Die gene vir *proa1(I)* en *proa2(I)* vertoon 'n komplekse eksonintronstruktuur (figuur 2.4). Vyftig introns onderbreek die koderingsvolgordes van die *proa1(I)*-geen, terwyl die *proa2(I)*-geen uit 52 eksone saamgestel is (Chu 1984b; Ramirez *et al.*, 1985b; De Wet *et al.*, 1986). 'n Opvallende verskil tussen dié twee gene is dat die *proa1(I)*-geen ongeveer 17 kbp lank is en dat die *proa2(I)*-geen ongeveer 38 kbp lank is. Desnieteenstaande is die koderingsvolgordes van die *proa1(I)* langer as dié van die *proa2(I)*; 4392 bp en 4095 bp onderskeidelik. Soos duidelik uit figuur 2.4 blyk, is die introns van die *proa2(I)*-geen in die algemeen aansienlik langer as die ooreenstemmende introns van die *proa1(I)*-geen. Ongeveer 90% van die *proa2(I)*-geen is intronvolgordes teenoor ongeveer 70% vir die *proa1(I)*-geen.

Net soos vir die proteïenstruktuur, is die eksone van beide gene in 'n aantal subgroepe klassifiseerbaar. Vir die doel van die verdere bespreking word die eksonnumering soos deur Chu *et al.*, (1984b) gebruik gehandhaaf (die 3'-terminale ekson is no. 1, terwyl die 5'-terminale ekson no. 51 is). Die eerste drie eksone kodeer uitsluitlik vir die C-propeptied. Ekson 4, net soos ekson 46 in die *proa1(I)*-geen en ekson 47 in die *proa2(I)*-geen, is 'n oorgangsekson in die sin dat hierdie ekson vir die laaste 15 aminosure van die sentrale tripelheliese domein, die aminosure van die C-terminale telopeptied en dié vir die N-terminale ongeveer 50 aminosure van die C-propeptied kodeer (Myers *et al.*, 1983; Chu *et al.*, 1984b; Ramirez *et al.*, 1985). Die 5'-terminale oorgangsekson, ekson 46 in die *proa1(I)*-geen en ekson 47 in die *proa2(I)*-geen, kodeer vir die eerste drie aminosure van die sentrale tripelheliese gebied, die aminosure van die N-terminale telopeptied en die laaste vier aminosure van die N-propeptied.

A



B



FIGUUR 2.4 Komplekse ekson-intronstructuur van die mens *proα1(I)* (A) en *proα2(I)* (B) gene (Ramirez *et al*, 1985a). Die eksone is van die 3'-kant genommer.

Eksons 47 - 51 van die *proa1(I)*-geen en eksons 48 - 52 van die *proa2(I)*-geen kodeer vir die restant van die N-propeptied. In beide gevalle kan die laaste ekson ook as 'n oorgangsekson beskou word aangesien dié ekson vir die seinpeptied, die seinpeptidase-volgordes en die N-terminale aminosure van die N-propeptied kodeer.

Eksons 5 - 45 van die *proa1(I)*-geen en eksons 5 - 46 van die *proa2(I)*-geen kodeer vir die sentrale tripelheliese domein. Hierdie eksons is almal veelvoude of afgeleides van 'n 54 bp premordiale eksoneenheid (Yamada *et al.*, 1983). Die groottes van hierdie eksons is 162 bp (3 x 54bp), 108 bp (2 x 54 bp), 99₄bp ((2 x 54bp) - 9bp), 54bp en 45bp (54bp - 9bp). Die rangskikking van die verskillende eksons in die *proa1(I)*- en *proa2(I)*-gene is amper dieselfde, behalwe dat daar vanaf ekson 18 in beide 'n verskil in die gedetailleerde rangskikking is (figuur 2.4). Dit blyk ook uit die voorkoms van die verskillende grootte-tipes eksons in beide gene, soos weergegee in tabel 2.5. Die belangrikste verskil in die eksonrangskikking is dat aminosuurresidue 585 - 620 in die *proa1(I)*- en *proa2(I)*-polipeptiede onderskeidelik deur 'n 108 bp ekson (ekson 19) en twee 54 bp eksons (eksons 19 en 20) gekodeer word. (Ramirez *et al.*, 1985b). Hierbenewens het 'n gedetailleerde vergelyking van die eksonvolgordes soos teenwoordig in die cDNA-klone, Hf-1131, Hf-404 en Hf-32, 'n 50% konservering van nukleotied-volgordes tussen die sentrale tripelheliese domeins van die *proa1(I)*- en *proa2(I)*-polipeptiede aan die lig gebring. Dit, asmede die opvallende konservering van die eksonrangskikking, mag daarop dui dat beide gene hul oorsprong gehad het in 'n gemeenskaplike multi-ekson premordiale kollageengeen (Chu *et al.*, 1984b). Verder mag die konservering van eksonstruktuur indirek dui op sterk selektiewe druk ter handhawing van

TABEL 2.5

GROOTTES VAN EKSONS WAT VIR DIE SENTRALE TRIPLHELIESE
DOMEIN KODEER

GROOTTE (bp)	AANTAL EKSONS		KODERINGSVERMOË (aa)	
	PRO α 1(I)	PRO α 2(I)	PRO α 1(I)	PRO α 2(I)
45	5	5	75	75
54	21	23	378	414
99	5	5	165	165
108	9	8	324	288
162	1	1	54	54
TOTAAL	41	42	996	996

die struktuur van die sentrale tripelheliese domein in beide polipeptiede. In teenstelling met die ander domeins, was dit nog nie moontlik om in die sentrale tripelheliese domein funksionele subdomeins pertinent te definieer nie. Dit wil egter voorkom asof die kruisbindingspunte, met die algemene struktuur Gly-X-Lys-Gly-His-Arg (in eksone 7 en 41 van die *proa1(I)*-geen) voorbeelde van sodanige funksionele domeins mag wees (Chu *et al.*, 1984b).

Die gene vir *proa1(I)* en *proa2(I)* kom onderskeidelik op chromosome 17 (q21 - q22) en 7(q21 - q22) as een geen per haplofede genoom voor (Ramirez, *et al.*, 1985a). Onlangs is vasgestel dat die verhouding waarin die *proa1(I)*-mRNA en *proa2(I)*-mRNA in mensfibroblaste voorkom 2:1 is (De Wet *et al.*, 1983b). Dit is ook die verhouding waarin die *proa1(I)*-en *proa2(I)*-polipeptiede gesintetiseer word. Die moontlikheid dat hierdie grotere uitdrukking van die *proa1(I)*-geen die uitvloeisel van 'n verskil in die transkripsietempo van die twee gene is, word tans ondersoek. Vir beide gene is die transkripsieprodukte in fibroblaste heterogeen in grootte. Twee grootte-tipes is vir die *proa1(I)*-mRNA beskryf, naamlik 5.8 en 4.8 kb (Chu *et al.*, 1985a). Netso is drie grootte-tipes, 5.2, 4.6 en 4.4 kb, vir die *proa2(I)*-mRNA met behulp van agarose-elektroforese geïdentifiseer (Myers *et al.*, 1983). Volgorde analise van die 3'-terminale ekson van beide gene het getoon dat die polimorfe mRNA's verskil in die lengte van die 3'-nie-transleerbare gebied (Myers, *et al.*, 1983; Chu *et al.*, 1985a). Die mRNA's word in fibroblaste deur membraangebonde ribosome getransleer tot die ooreenstemmende preprokollageen-polipeptiede.

2.2.1.2.3 Ko- en Posttranslasionele Prosessering

Die preprokollageenpolipeptiede ondergaan uitgebreide ko- en posttranslasionele modifisering (tabel 2.6). Kort na die oordrag van die seinpeptied na die lumen van die endoplasmiese retikulum (RER), tree die seinpeptidase op om die seinpeptied te verwyder (stap I in tabel 2.6) (Blobel, 1980). Tydens en na translasie ondergaan die (Gly-X-Y)-volgordes uitgebreide hidroksilering deur mikrosomale proliel- en lisiel-spesifieke hidroksilasies. Hierdie ensieme benut Fe^{2+} en askorbaat as kofaktore, terwyl suurstof en α -ketoglutaraat as kosubstrate dien. Die bekendste van hierdie hidroksilasies, proliel-4-trans-hidroksilase, hidroksileer sommige prolielresidue wat in die Y-posisie voorkom tot 4-trans-hidroksiprolielderivate, mits die prolielresidu deel van die minimum substraatvereiste, X-Pro-Gly, uitmaak (stap II, tabel 2.6).

Ongeveer 48% van prolielresidue in tipe I kollageen en ongeveer 54% van prolielresidue in tipe III kollageen word tot 4-trans-hidroksiderivate gehidroksileer (Burgesson *et al*, 1976; Chung en Miller, 1974). In teenstelling hiermee word 'n enkele prolielresidu (aminosuurresidu 983) in pro α 1(I)-kettings deur proliel-3-hidroksilase gehidroksileer (stap III, tabel 2.6). Die minimum substraat volgorde hier is Gly-Pro-Pro en die Pro in die X-posisie word gemodifiseer. Net soos vir pro α 1(I), word enkele prolielresidue in pro α 2(I) tot 3-hidroksiprolielien gehidroksileer. 'n Derde hidroksilase, lisielhidroksilase, hidroksileer lisielresidue wat in die Y-posisie van die volgordes X-Lys-Gly, X-Lys-Ser of X-Lys-Ala voorkom tot 5-hidroksilisien (stap IV, tabel 2.6). Hy1 maak ongeveer 27%, 38% en 14% van die totale lisielresidue in α 1(I), α 2(I) en α 1(III) kollageen onderskeidelik uit.

TABEL 2.6 Ko- en Post-translacionele prosessering van tipe I preprokollageen

Stap	Tipe Modifisering	Ensiem
I	Verwydering van seinpeptiedvolgordes	Seinpeptidase
II	Vorming van 4-trans-hidroksiprolielresidue	Proliel-4-hidroksilase
III	Vorming van 3-hidroksiprolielresidue	Proliel-3-hidroksilase
IV	Hidroksilering van lisielresidue	Lisielhidroksilase
V	Galaktosilering van hidroksilisielresidue	Galaktosielhidroksilisiel - Galaktosieltransferase
VI	Glukosilering van galaktosielhidroksilisielresidue	Galaktosielhidroksilisiel - Glukosieltransferase
VII	Assosiasie van C-propeptiede	-
VIII	Vorming van disulfiedbrûe	Mikrosomale disulfiedisomerase
IX	Tripelheliksvorming	-
X	Vorming van $(\text{Man})_n (\text{GlcNAc})_2 \text{Asn}$ -residue in C-propeptiede	Oligosakkariedtransferase

	Translokasie na Golgiapparaat	
	Verpakking in Sekresievesikels	
	Eksositose	

XI	Verwydering van N-propeptiede	N-Protiefenase
XII	Verwydering van C-propeptiede	C-protiefenase
XIII	Fibrilvorming	-
XIV	Vorming van allisiel- en hidroksiallisielresidue	Lisieloksidase
XV	Vorming van intermolekulêre kruisbindings	-

Slegs prokollageenpolipeptiede in die stochastiese konformasie dien as substraat vir die bogenoemde hidroksilasies, sodat tripelheliese prokollageen nie verder hidroksileerbaar is nie (Murphy en Rosenbloom, 1973). Terselfdertyd wissel die omvang waarmee prokollageen hidroksileer word. Die omvang van hidroksilering van bepaalde proliel- en lisielresidue word waarskynlik oorwegend deur die tempo van tripelheliksforming bepaal. 'n Vertraging in die vorming van stabiele tripelheliese prokollageen lei tot 'n hoër vlak van hidroksilering (Kirsch *et al.*, 1981).

Deur die gebruik van inhibeerders van prolielhidroksilase soos α, α' -dipiridiel, is vasgestel dat die teenwoordigheid van 4-trans-prolielresidue aanmerklik tot die termiese stabiliteit van tripelheliese tipe I prokollageen bydra. Waar ongehidroksileerde prokollageen by 24°C denatureer, lei die hidroksilering van ongeveer 40% van die prolielresidue tot 'n denaturasietemperatuur van 38°C (Hurych en Chavapil, 1965; Kivirikko en Prockop, 1969; Rosenbloom *et al.*, 1973; Minor, 1980). Dat Hyp bydra tot die vorming van intermolekulêre waterstofbrugbindings, is reeds in afdeling 2.2.1.1 genoem. Hidroksilisielresidue in prokollageen mag as glikosileringspunte vir die hegting van galaktosiel- en galaktosielglukoseresidue dien, en mag aan die ekstrasellulêre vorming van interketting kruisbindings deelneem. Die stabiliteit van die kollageen-fibrille word derhalwe grootliks deur die omvang van proliel- en lisielhidroksilering beïnvloed. Ketting-assosiasie en sekresie van prokollageen kan wel plaasvind in die afwesigheid van hidroksilering, maar dan by 'n verlaagde temperatuur of teen 'n verlaagde tempo (Prockop *et al.*, 1976).

Hyl-residue tree as die glikosileringspunte in die tripelheliese domein op. Twee glikosieltransferases, hidroks-

silisiel- galaktosieltransferase en galaktosielhidrok- silisiel-glukosieltransferase, is by hierdie glikosiler- ing betrokke. Die eersgenoemde ensiem kataliseer die vorming van $\alpha(1,2)$ -glikosidiese binding tussen Hyl en galaktose (stap V, tabel 2.6) (Butler en Cunningham, 1966). In 'n daaropvolgende stap dien sommige galaktosielhidrok- silisielresidue as substraat vir die tweede ensimatie- se aktiwiteit ter hegting van 'n verdere glukosielresidu in 'n $\alpha(1,2)$ -glikosidiese binding (stap VI, tabel 2.6). Die volgende glikosileringspunte is geïdentifiseer in die $\alpha 1(I)$ -ketting: Hyl 87 en Hyl 681, met die gemeenskaplike uitkenningsvolgorde : Gly-X-Hyl-Gly-X-Arg (Fietzek en Kühn, 1976). Vir die $\alpha 2(I)$ -ketting word Hyl 87, Hyl 174, Hyl 219 sowel as 'n hidrosilisielresidu in die CB3,5- peptied geglikosileer (Fietzek en Kühn, 1976). 'n Gemeen- skaplike volgorde vir die $\alpha 2(I)$ -glikosileringspunte is soos volg: Gly-X-Hyl-Gly-X-Y, waar Y Arg of 'n hidrofobe aminosuur is. Die omvang van galaktosilering is ongeveer 0,3 mol per mol glikosileringspunte, terwyl die omvang van disakkariedhegting selfs nog laer is. Net soos vir die hidrosilases, kan die bogenoemde glikosieltrans- ferases slegs prokollageen in die nie-tripelheliese kon- formasie as substraat benut. Dit is wel bekend dat beide die mono- en dihidroksialdimienkruisbindings geglikosi- leerd is. Die rol van glikosilering tydens kruisbindings- vorming is onseker.

Die reeds genoemde modifiserings vind beide ko- en post- translasioneel plaas. Na die volledige sintese van die prokollageenpolipeptiede, assosieer die C-propeptiede van twee pro $\alpha 1(I)$ en een pro $\alpha 2(I)$ met mekaar om 'n gemeen- skaplike C-propeptiedstruktuur te vorm. Hierdie struk- tuur word aanvanklik deur hidrofobe interaksies gestabili- seer en is 'n noodsaaklike stap vir die korrekte vorming

van tripelheliese prokollageen. Waarskynlik vind die assosiasie tussen die pro α -kettings stapsgewyse plaas, om eerstens 'n pro α -intermediêr, bestaande uit 'n pro α 1(I)- en 'n pro α 2(I)-ketting, te vorm. Assosiasie met 'n verdere pro α 1(I) lei tot die pro γ -vorm, waarin pro α 1(I) en pro α 2(I) in die verhouding 2:1 teenwoordig is. Aggregate bestaande uit meer as een pro α 2(I)-ketting vorm nie of is onstabiel. Daarenteen kan pro α 1(I)-trimere wel gevorm word, maar teen 'n verlaagde tempo (Deak *et al*, 1983).

Hierdie assosiasie vind in die lumen van die RER plaas (stap VII, tabel 2.6). Terselfdertyd tree die mikrosomale ensiem, disulfiedisomerase, skynbaar op ter vorming van intra- en interdisulfiedbrûe in die pro α -struktuur (stap VII, tabel 2.6). Die disulfiedbrûe is in tipe I prokollageen beperk tot die N- en C-propeptiede, aangesien geen Cys-residue in die sentrale tripelheliese domein van tipe I kollageen voorkom nie. In die N-propeptied gedeelte van die pro α 1(I)-kettings kom slegs intramolekulêre disulfiedbrûe voor, terwyl intermolekulêre disulfiedbrûe in die C-propeptieddomein die assosiasie van die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings in die pro γ -vorm stabiliseer.

Die C-terminale gedeelte van die sentrale tripelheliese domein, net proksimaal van die C-telopeptied, bevat vyf ononderbroke Gly-Pro-Pro volgordes waarvan die Pro in die Y-posisie meestal gehidroksileer is. Hierdie subdomein dien as beginpunt vir die stabiele vorming van die tripelheliese konformasie (stap IX, tabel 2.6). Geordende tripelheliksvorming verloop vanaf hierdie beginpunt in die rigting van die N-propeptied. 'n Soortgelyke Gly-Pro-Pro opeenvolging in die N-terminale tripelheliese domein dien as beginpunt vir die tripelheliese ordening van daardie kort Gly-X-Y-volgordes.

Tripelheliksvorming is 'n slagboom in die posttranslasionele prosesering van prokollageen, aangesien 'n aantal stappe (stappe II - VI, tabel 2.6) hierdeur beëindig word, terwyl tripelheliese prokollageen sekreteerbaar is. Hegting van 'n oligosakkaried, met 'n hoë inhoud aan mannose, aan 'n Asn-residu in die C-propeptied van alle fibriële kollagene fassiliteer waarskynlik die sekresie van prokollageen (stap X, tabel 2.6). Die oligosakkariedtransferase, ken 'n sterk gekonserveerde volgorde, Ala-Ser-Gln-ASN-ILE-THR-Tyr-His-Cys-Lys-Asn-Ser-Val-X-Tyr-Met-Asp, uit (Bernard *et al*, 1983a, 1983b; Yamada *et al*, 1983).

Vanaf die Golgi-apparaat word prokollageen via sekresie-vesikels gesekreet. Waar die sintese, posttranslasionele modifisering en tripelheliksvorming ongeveer 7 minute duur (Bruckner *et al*, 1981), is onlangs vasgestel dat tipe I prokollageen met 'n halftyd van 36 minute deur mensfibroblaste in weefselkulture gesekreet word (De Wet *et al*, 1983a). Twee meganismes vir die sekresie van prokollageen is geïdentifiseer. Ongeveer twee-derdes van die prokollageen word relatief vinnig gesekreet, terwyl die resant met 'n halftyd van ongeveer 4 uur vrygestel word (De Wet *et al*, 1983a). Ongehidroksileerde prokollageen word slegs volgens die stadiger meganisme uitgeskei. Hieruit wil dit voorkom asof die konformasie van prokollageen sekresiesnelheid beïnvloed.

In die ekstrasellulêre matriks word die N- en C-terminale propeptiede proteolities deur N- en C-proteïenase onderskeidelik, verwyder (stappe XI en XII, tabel 2.6). Die snitpunte is in beide gevalle in die telopeptiede geleë. Resente gegewens dui daarop dat fibrilvorming (stap XIII, tabel 2.6) interverweef is met die optrede van N- en C-proteïenases (Miyahara *et al*, 1983; 1984). Na die verwy-

dering van die groot C-propeptiede deur C-protefenase, is die pN-kollageen polimeriseerbaar tot dun, plat fibrille. Verdere laterale assosiasie word na die optrede van N-protefenase moontlik gemaak. In die fibrille kom die individuele kollageenmolekules in 'n parallelometriese oorvleuelende wyse, ook bekend as die 4D-spasiëring, voor (figuur 2.3B). Hierdie 4D-spasiëring word na fibrilvorming gestabiliseer deur intermolekulêre kruisbindings (stap XV, tabel 2.6). Die vorming van kruisbindings word voorafgegaan deur die oksidatiewe deaminering van sommige lisiel- en hidroksilisielresidue tot die ooreenstemmende aldehiede deur die ekstrasellulêre ensiem, lisieloksidase (stap XIV, tabel 2.6). Beide aldol- en aldimienkondensering vind tussen die kruisbindingspunte plaas. Hyl 87 en Hyl 927, sowel as His 89 en His 929, is kruisbindingspunte. Lys 327 en Lys 564 mag ook as kruisbindingspunte dien.

Tripelheliese tipe I kollageen is ongeveer 3000Å lank en 15Å in deursnee en is in die vorm van 'n linkshandige heliks. Daarenteen is tipe I fibrille gewoonlik tussen 500Å en 4000Å in deursnit.

2.2.1.3 Tipe III Prokollageen

In teenstelling met tipe I prokollageen, is tipe III prokollageen 'n homotrimeer bestaande uit drie pro α 1(III)-kettings. Hierdie tipe kollageen vorm dunner fibrille as tipe I kollageen en kom hoofsaaklik in velstrukture en bloedvate voor (tabel 2.3). Die primêre struktuur van α 1(III) is met behulp van aminosuurvolgordebepaling volledig bepaal (Seyer en Kang, 1981). 'n Belangrike verskil tussen α 1(III) en die tipe I kettings is dat α 1(III) uit

341 Gly-X-Y volgordes saamgestel is.

Onlangs is groot gedeeltes van die hoender (Yamada *et al*, 1984) en mens tipe III prokollageengene (Chu *et al*, 1985b) beskryf. Benewens gedetailleerde verskille in nukleotied=volgorde en intronlengte, stem die gene van die pro α 2(I) en pro α 1(III) grootliks ooreen ten opsigte van totale lengte en die grootte en rangskikking van die eksone wat vir die tripelheliese domein kodeer (Yamada *et al*, 1984; Chu *et al*, 1985b). 'n Vergelyking van die koderingspotensiaal van die tipe I en tipe III gene is in tabel 2.4 saamgevat. Die belangrikste verskil is geleë in die detailstruktuur van die C- en veral N-propeptiedgedeeltes. Dit blyk ook uit die verskil in die grootte en rangskikking van daardie eksone wat vir die propeptiede kodeer (Yamada *et al*, 1984; Ramirez *et al*, 1985b). Die pro α 1(III)-geen kom op chromosoom 2 (q23) as een geen per haploïede genoom voor (Ramirez *et al*, 1985a), en word tot twee polimorfe mRNA's (5.4 kb en 4.8 kb) in mensfibroblaste getranskribeer (Chu *et al*, 1985b).

Die sintese en prosessering van tipe III prokollageen verloop analoog aan dié van tipe I prokollageen. In mens fibroblaste is die verhouding waarin tipe III tot tipe I prokollageen gesintetiseer word ongeveer 1:5 (Uitto *et al*, 1985), alhoewel hierdie waardes aansienlik kan wissel. 'n Interessante verskynsel is dat die α 1(III)-kettings deur disulfiedbindings kovalent gekoppel is (residu 1023 van die sentrale tripelheliese domein, sowel as die naasliggende eerste aminosuur van die C-telopeptied is Cys). Daarteenoor is die Tipe I α -kettings nie disulfiedgebonde nie. Dit vorm die basis van 'n eenvoudige en dramatiese onderskeid tussen α 1(I) en α 1(III) met behulp van SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies (Sykes *et al*, 1976).

2.3 GEDETAILLEERDE STUDIES VAN AFWYKENDE KOLLAGEENPROTEÏEN- EN GEENSTRUKTUUR

2.3.1 Inleiding

Uit die vorige afdeling is dit duidelik dat 'n groot hoeveelheid kennis aangaande die struktuur en funksie van die kollagene, veral tipe I kollageen, bekend is. Soos reeds genoem, bestaan daar egter nog vrae rondom die molekulêre basis wat die heterogene aard van die kliniese manifestasies van OI en die ander bindweefseltoestande onderlê. Die spesifieke funksie van die verskillende domeins van kollageen is verder ook nie duidelik nie. Gedetailleerde studies van afwykende kollageenproteïen en -geenstruktuur mag 'n bydrae lewer om die twee leemtes te vul. 'n Aantal sodanige studies is reeds voltooi en daar is hierdeur aangetoon dat die molekulêre basis van OI inderdaad verskil. Die funksie van 'n aantal van die kollageendomeins is verder opgeklaar naamlik: die feit dat 'n normale C-propeptiedstruktuur van die pro α 2(I)-ketting krities is vir die normale assosiasie van die samestellende polipeptiedkettings van tipe I kollageen; dat die voorkoms van pro α 2(I)-kettings in tipe I kollageen nie noodsaaklik is vir lewe nie (Deak *et al*, 1983) en dat 'n normale N-propeptiedstruktuur noodsaaklik is vir prosessering deur N-proteïenase (Williams en Prockop, 1983; Sippola-Thiele, 1985). Bogenoemde resultate is verkry met studies oor deleisies, invoegings, leesraamverskuiwings en puntmutasies.

2.3.2 Delesies

2.3.2.1 Delesies in pro α 1(I)-kettings

Daar is gevind dat fibroblaste van 'n tipe II OI-pasiënt (CRL 1262) 'n verlaagde hoeveelheid tipe I kollageen sekreter (Penttinen *et al*, 1975; Steinmann *et al*, 1979; Barsh en Byers, 1981). Barsh en Byers (1981) sowel as Williams en Prockop (1983) het aangetoon dat 'n abnormale pro α 1(I)-ketting wat ongeveer 10% korter is as die normale ketting, gesintetiseer word. Die verkorting is gelokaliseer in die oorgang tussen α 1(I)CB8 en α 1(I)CB3, wat onderskeidelik vir aminosuurresidue 124 - 402 en 403 - 551 van die α 1(I)-ketting kodeer. Verdere ondersoek deur Southern oordrag het getoon dat 'n delesie van ongeveer 0,5 kb in 'n 8,5 kb Hind III-fragment van die pro α 1(I)-kollageengeene voorkom (Chu *et al*, 1983). Opeenvolgende klonerings-eksperimente het gewys dat die delesie van 643 bp in die gebied wat kodeer vir aminosure 328 tot 411 voorkom (Chu *et al*, 1985a). Die delesie begin en eindig in twee introns en resulteer in die uitsnyding van eksone 27, 28 en 29. Hierdie is 'n nuwe heterogene mutasie en uitsluiting van alle eksone kom net in een allele voor. Gevolglik word die hoeveelheid normale pro α 1(I)-kettings met die helfte verminder. Inkorporering van die verkorte pro α 1(I)-kettings in tipe I prokollageen lei tot die vorming van drie tipes trimere: 'n tipe I trimeer met twee normale pro α 1(I)-kettings; 'n tipe I^S trimeer met een normale en een verkorte pro α 1(I)-ketting en 'n tipe I^{SS} trimeer met twee verkorte pro α 1(I)-kettings (Williams en Prockop, 1983). Die trimere kom in 'n verhouding van 1:2:1 voor.

Die deleisie lei daartoe dat die Gly-X-Y triplete "aanskuif", sodat die tripelheliese domein aaneenlopend is en nie deur 'n borrelstruktuur onderbreek word nie. Gevolglik is kettings aan die N-terminale kant van die tripelheliese gebied uit fase en is die struktuur van die N-propeptied versteur. Hierdie strukturele defek het die volgende effekte op die post-translasionele lotgevalle van die prokollageenkettings gehad:

- (i) Vertraagde helixvormingstempo (Williams en Prockop, 1983)
- (ii) Oorhidroksilering van prokollageenkettings deur proliel- en lisielhidroksilases (Williams en Prockop, 1983). Omdat 'n vertraagde helixvormingstempo voorkom, bly hierdie ensieme langer aktief aangesien prokollageenkettings in die nie-tripelheliese konformasie as substrate vir hierdie ensieme dien (stappe II - IV, tabel 2.6; afdeling 2.2.1.2.3).
- (iii) Die termiese stabiliteit van die trimere wat verkorte pro α 1(I)-kettings bevat, word van ongeveer 42°C (41 - 43°C) tot 39°C verlaag (Williams en Prockop, 1983).
- (iv) 'n Verlaagde sekresie, sodat die tempo van sekresie deur die OI-selle 50% van dié van normale selle is (Barsh en Byers, 1981).
- (v) Verlaagde prosesseeerbaarheid van die trimere deur N-protefenase wat dui op 'n abnormale N-terminale propeptiedkonformasie (Williams en Prockop, 1983).

- (vi) Kompensatoriese verhoging in die sintese en sekresie van tipe III prokollageen (Barsh en Byers, 1981; Williams en Prockop, 1983).

Die helfte van die pro α 1(I)-kettings wat gesintetiseer word, is verkort. Soos reeds beskryf, assosieer een of twee van hierdie abnormale pro α 1(I)-kettings met 'n pro α 2(I)-ketting vir die vorming van tipe I prokollageen. Dit kom dus daarop neer dat 75% in plaas van die verwagte 50%, van alle tipe I prokollageen 'n abnormale struktuur het. Hierdie mutasie is die eerste prototipiese voorbeeld van protefeneliminasië (Eng:protein suicide) soos voorgestel deur Prockop (1984).

'n Strukturele defek van die tipe I prokollageen van 'n EDS VII-pasiënt kon herlei word tot die delesie van 24 aminosure, wat strek vanaf Asn-136 tot Met-159 in die aminoterminalen pN α 1(I)CBO,1 CNBr-peptied (Cole *et al*, 1986). Die helfte van die pro α 1(I)-kettings is verkort. 'n Ondersoek van die pasiënt se mRNA deur elektronmikroskopiese R-lusanalise het die delesie van ekson 46 in sommige van die pro α 1(I)-mRNA's aangetoon (De Wet, W.J., ongepubliseerde waarneming). Ekson 46 kodeer vir die 24 aminosure wat weggelaat is uit die N-terminale pN α 1(I)CB 0,1 CNBr-peptied. Hierdie peptied bevat die kort C-terminale globulêre domein van die NH₂-propeptied, die prokollageen N-protefenase snitpunt by die Pro-Gln binding (posisie 139 - 140), die NH₂-telopeptied en die eerste triplet van die sentrale tripelheliks van die α 1(I)-ketting (Chu *et al*, 1984b). Die verlies aan die N-protefenase snitpunt lei tot 'n onvolledige prosessering van die prokollageen deur N-protefenase (stap XI, tabel 2.6). Dit verklaar die voorkoms van pN α 1(I)-kettings in die dermis van die pasiënt. Hierdie is weer eens 'n nuwe heterogene mutasie aangesien

nie een van die ouers die kliniese of genetiese defek openbaar nie.

2.3.2.2 Delesies in pro α 2(I)-kettings

Behalwe die delesies wat beskryf is vir die pro α 1(I)-kettings, is daar vier voorbeelde beskryf van delesies in die pro α 2(I)-kettings.

Verkorte pro α 2(I)-kettings word gesintetiseer deur fibroblaste van 'n pasiënt met tipe II OI (GM 2962) (De Wet *et al*, 1983a). Die verkorting kom voor in die sianogeenbromied-fragment α 2(I)CB3,5^A, wat strek van aminosuurresidu 358 tot 775. 'n Ondersoek van die pasiënt se pro α 2(I)-mRNA is deur elektronmikroskopiese R-lusanalise en nuklease S₁-kartering gedoen (De Wet *et al*, 1986a). Die ondersoek het getoon dat die volgordes van 'n 54 - bp ekson, ekson 25, nie in sommige van die pasiënt se pro α 2(I)-mRNA voorkom nie. Delesie van ekson 25 lei tot die sintese van pro α 2(I)-kettings waarin aminosure 448 tot 465 weggelaat is. Inkorporering van die verkorte pro α 2(I)-kettings in tipe I prokollageen lei tot 'n verandering van die karakteristieke eienskappe van tipe I prokollageen, naamlik:

- (i) Verhoogde hidroksilering van proliel- en lisielresidue (De Wet *et al*, 1983a).
- (ii) 'n Verlaagde sekresie van tipe I prokollageen. Kontrole fibroblaste sekreteer 63% prokollageen in die vinnige fase, terwyl die OI-fibroblaste 30% in die vinnige fase en 70% in die stadige fase sekreteer (De Wet *et al*, 1983a).

- (iii) 'n Verhoogde sintese van tipe IV kollageen (De Wet *et al*, 1983a).
- (iv) 'n Weerstandbiedendheid van die tipe I prokollageen teen N-proteïenasewerking (Sippola-Thiele, 1985).

Verkorte pro α 2(I)-kettings word nie deur fibroblaste van die moeder of die vader gesintetiseer nie (De Wet *et al*, 1983a). Die sintese van verkorte pro α 2(I)-kettings deur die pasiënt se fibroblaste kan herlei word tot 'n spontane nuwe mutasie van 'n pro α 2(I)-allele.

'n Pasiënt wat heterosigoties is vir 'n milde vorm van OI is deur Sippola *et al*, (1984) ondersoek. Verkorte sowel as normale pro α 2(I)-kettings word deur die selle gesintetiseer. 'n Delesie van ongeveer 30 aminosure is waargeneem in die α 2(I)CB4-fragment, wat aminosure 7 - 327 bevat. Elektronmikroskopiese R-lusanalise van die pasiënt se mRNA het getoon dat die delesie die gevolg is van die uitsnyding van ekson 41, 'n 54-bp ekson, uit die pro α 2(I)-mRNA. (De Wet *et al*, 1986a). Ekson 41 kodeer vir aminosuurrest 73 tot 90 van die α 2(I)-ketting. Die voorkoms van die verkorte pro α 2(I)-kettings in tipe I prokollageen trimere lei daartoe dat 50% van die tipe I prokollageen struktureel abnormaal is. Strukturele abnormaliteit van die tipe I prokollageen lei onder andere tot die volgende verskynsels:

- (i) 'n Verlaging in termiese stabiliteit, soos weerspieël in 'n T_m-waarde van 34°C teenoor 'n normale T_m-waarde van 39,7°C (Sippola *et al*, 1984).

- (ii) Weerstandbiedendheid teen N-protefenase-werking (Sippola *et al*, 1984; Sippola-Thiele, 1985). 'n Gedeeltelike ontvouing van die N-terminale gebied of die aanskuif van die Gly-X-Y triplete is hiervoor verantwoordelik.

Nog 'n voorbeeld van 'n verkorting in die $\alpha 2(I)CB4$ fragment is beskryf vir 'n individu met 'n milde vorm van OI (Byers *et al*, 1983). Beide verkorte en normale pro $\alpha 2(I)$ -kettings is deur die pasiënt se fibroblaste gesintetiseer. Op grond van die verskil in molekulêre massa van die abnormale en normale $\alpha 2(I)CB4$ -fragmente, het die outeurs voorgestel dat 'n delesie van 18 aminosure tot die verkorting lei. Effektiewe translasië van die pasiënt se pro $\alpha 2(I)$ - en pro $\alpha 1(I)$ -mRNA's is in selvrye sisteme verkry (Byers *et al*, 1983). Die verlaagde verhouding wat verkry is vir tipe I tot tipe III kollageen in die fibroblaste van die pasiënt kan verklaar word deur 'n verhoogde intrasellulêre afbraak van tipe I prokollageen wat verkorte pro $\alpha 2(I)$ -kettings bevat. Lig- en elektronmikroskopiese analises het getoon dat die kollageenfibrildeursnit in die dermis die helfte is van dié van kontroles. Verder is die fibrille in beenbiopsies van die pasiënt abnormaal gerangskik. Die verkorte pro $\alpha 2(I)$ -kettings lei dus tot 'n verlaagde molekulêre stabiliteit en versteurde intermolekulêre interaksies.

Elektronmikroskopiese R-lusanalise van die pro $\alpha 2(I)$ -mRNA van 'n EDS VII-pasiënt het getoon dat 'n delesie van ekson 47 voorkom (De Wet, W.J., ongepubliseerde waarneming). Ekson 47 kodeer vir aminosure in die N-terminale gebied van pro $\alpha 2(I)$ -kettings. 'n Delesie in die gebied sal aanleiding gee tot 'n abnormale N-terminale konformasie van

tipe I prokollageen. Op sy beurt mag die abnormale konformasie lei tot 'n weerstandbiedendheid van die tipe I prokollageen teenoor N-protefenasevertering.

2.3.3 Invoegings in prokollageenkettings

In teenstelling met die voorkoms van delesies in prokollageenkettings, is twee gevalle van invoegings in prokollageenkettings deur Byers *et al* (1981c) en Stolle *et al* (1985) beskryf. Byers *et al* (1981c) het getoon dat fibroblastweefselkulture van 'n pasiënt met 'n vorm van MS normale sowel as abnormale pro α 2(I)-kettings sintetiseer. 'n Invoeging van ongeveer 20 aminosure is in die α 2(I)CB3,5 fragment aangetref. Die verhoogde ekstraheerbaarheid van kollageen uit die vel van die pasiënt mag volgens die outeurs die gevolg wees van 'n effek van die mutasie op die kruisbinding van die kollageen.

'n Strukturele verandering in die pro α 1(III) wat lei tot 'n verlaagde migrasie van die α 1(III)-kettings is ook gevind in 'n pasiënt met EDS IV (Stolle *et al*, 1985). Dat 'n verlaagde migrasietempo voorkom dui daarop dat hier 'n invoeging, wat met dié van Byers *et al*, (1981c) mag ooreenstem, mag voorkom. Die defek kom in α 1(III)CB5^A voor wat strek van aminosuurre residu 555 tot 775, die vertebratkollagenase snitpunt. Vier tipes trimere wat meer spesifiek vir aspesifieke proteasevertering is, word gevorm: trimere wat geen, een, twee of drie pro α 1(III)SM kettings bevat (Stolle *et al*, 1985). Die trimere kom in die verhouding 1:3:3:1 voor. 'n Verlaagde sekresie van tipe III prokollageen deur die pasiënt se fibroblaste is waargeneem. Kontrole fibroblaste het 90% tipe III prokollageen in die vinnige fase gesekreter. Slegs 53% tipe

III prokollageen is deur die EDS fibroblaste in die vin-nige fase gesekreter, terwyl die res (47%) in die stadige fase gesekreter is.

2.3.4 n Leesraamverskuiwing in die pro α 2(I)-geen

Fibroblastweefselkulture van n pasiënt met tipe III OI sekreter tipe I prokollageen wat net uit pro α 1(I)-trimere bestaan (Nicholls *et al*, 1979). Geen pro α 2(I)-kettings word deur die fibroblaste gesekreter nie, tog is verkorte pro α 2(I)-kettings in die sellag waargeneem (Deak *et al*, 1983). Verder het Noordelike oordrag en SLOT-BLOT-analise aangetoon dat die fibroblaste normale vlakke pro α 2(I)-mRNA bevat (Chu *et al*, 1984a). Dieselfde outeurs het ook gevind dat effektiewe translasi van die mRNA in n selvrye sisteem verkry kan word. S₁-nuklease kartering in die C-propeptiedgebied van die pro α 2(I)-mRNA het n klein gebied van mispassing, ongeveer 35 aminosure opstroom van die terminasiekodon, in ekson 1 getoon (Dickson *et al*, 1984). Genomiese klonering en volgorde-analise van die pasiënt se DNA het n delesie van 4 baspare in ekson 1 aangetoon (Pihlajaniemi *et al*, 1984). Delesie van 4 nukleotiede in pro α 2(I)-mRNA lei tot n leesraamverskuiwing. Hierdie leesraamverskuiwing kom aan die einde van die transleerbare gebied, naby die terminasiekodon, voor. Dit lei tot die gebruik van n nuwe terminasiekodon (UGA) vier nukleotiede afstroom ten opsigte van die oorspronklike UAA-kodon. Behalwe dat die primere struktuur van die C-propeptied verander, word die laaste Cys-residu in die pro α 2(I)-propeptied geëlimineer (Pihlajaniemi *et al*, 1984).

Tripelheliksvorming word gefinisieer deur die assosiasie van die C-terminale propeptiede (stap VII, tabel 2.6). Die deleisie gee derhalwe daartoe aanleiding dat assosiasie tussen pro α 1(I)- en verkorte pro α 2(I)-kettings nie kon plaasvind nie. 'n Byna volledige afbraak van die pasiënt se pro α 2(I)-kettings kom daarom voor. Dit blyk daaruit dat die verhouding van pro α 1(I)- tot pro α 2(I)-kettings in die pasiënt se fibroblaste $7,18 \pm 0,58$ SD is (Deak *et al*, 1983). Hierteenoor is die waarde vir kontrole fibroblaste $2,25 \pm 0,16$ SD. Dieselfde tendens word deur die fibroblaste van die fenotopies normale ouers geopenbaar in die sin dat 'n abnormale hoë verhouding van pro α 1(I) tot pro α 2(I) ook waargeneem is (Pope en Nicholls, 1981). Die pasiënt is homosigoties vir die mutasie, terwyl die ouers, wat verwant is, heterosigoties is.

2.3.5 Veranderinge in die gekoördineerde uitdrukking van die tipe I prokollageene

'n Veranderde verhouding van pro α 1(I)- tot pro α 2(I)-kettings, sowel as van α 1(I)- tot α 1(III)-kettings, is vir 'n aantal mutante beskryf. In twee gevalle kon aangetoon word dat die veranderde verhouding die gevolg is van 'n nie-funksionele pro α 2(I)-allele (De Wet *et al*, 1983b) en 'n pro α 1(I)-allele (Barsh *et al*, 1982) onderskeidelik.

Bo-en-behalwe die verkorting in die pro α 2(I)-kettings, vertoon GM 2962-fibroblaste 'n verhoogde verhouding van pro α 1(I)- tot pro α 2(I)-kettings (De Wet *et al*, 1983a en 1983b). Die relatiewe tempo van sintese van die twee kettings was $2,99 \pm 0,43$ SD, terwyl die mRNA verhouding $3,05 \pm 0,45$ SD is. Die ooreenstemmende kontrole-waardes

was $1,84 \pm 0,13$ SD en $1,94 \pm 0,34$ SD onderskeidelik. 'n Bepaling van die verhoudings van die mRNA's vir die twee kettings is ook vir die moeder en vader gedoen. 'n Normale verhouding is vir die moeder verkry, terwyl 'n verhouding van $2,93 \pm 0,36$ SD, wat ooreenstem met dié van die pasiënt, vir die vader verky is (De Wet *et al*, 1983b). Die gegewens is in ooreenstemming met die verlaagde proa2(I)-kettingsintese wat by die pasiënt en die vader waargeneem is. Na aanleiding van die data en die feit dat slegs verkorte proa2(I)-kettings waargeneem is, is voorgestel dat die pasiënt 'n saamgestelde heterosigaat is (De Wet *et al*, 1983a). Die een proa2(I)-allele vertoon 'n delesie van ekson 25 en die ander allele kom nie tot uitdrukking nie. Analise van die vader en die moeder se fibroblaste suggereer dat die nie-funksionele allele van die vader afkomstig is en dat die ander allele 'n spontane mutasie ondergaan het.

Barsh *et al*, (1982) het die verhouding van proa1(I)- tot proa2(I)-kettings se sintese in pasiënte met tipe I OI nagegaan. 'n Verhouding van ongeveer 1,0 is vir die intrasellulêre proa1(I) tot proa2(I) gevind. Alhoewel 'n verhoogde degradering van die proa1(I)-ketting moontlik is, het die outeurs voorgestel dat een van die proa1(I)-allele nie-funksioneel is nie. Afskakeling van 'n proa1(I)-allele lei tot 'n halvering in die vorming van trimere.

Jaenisch en sy medewerkers het muisembrio's op verskillende tye na bevrugting met die M-MuLV retrovirus (Malo-ney murine leukemia virus) ingespuut. 'n Totaal van 14 muislyne, waar 'n enkele kopie van die retrovirus op verskillende chromosomale gebiede geïnkorporeer is, is verkry. 'n Enkele selyne, waar die retrovirus later in die embrionale ontwikkelingsstadia ingespuut is, het 'n

dramatiese resultaat gelewer. Heterosigote (Mov 13/wt) muise, sowel as homosigote (Mov 13/Mov 13) muise is verkry met invoeging van die retrovirusgenoom op een of twee allele. Die invoeging van die retrovirusgenoom op twee allele het tot 'n dodelike embrionale mutasie gelei (Löhler *et al*, 1984). Embrios is na die twaalfde tot veertiende dag van dragtyd dood. Die belangrikste oorsaak van die dood van die homosigote was breuke van die belangrikste bloedvate (7 van 13 homosigotiese embryo's). 'n Ander belangrike kenmerk van die embryo's was 'n progressiewe afsterf van hemopoëtiese- en eritropoëtiese selle sowel as van mesenchiemsele. Immunohistologiese metodes het die afwesigheid van tipe I prokollageen in die homosigote getoon (Löhler *et al*, 1984). Harbers *et al*, (1984) het aangetoon dat die dodelike mutasie deur die invoeging van die retrovirusgenoom in die eerste intron (5'-terminale intron) van die $\alpha 1(I)$ kollageengeen veroorsaak word. Volgordeanalises en S_1 -nukleasekartering het getoon dat die invoeging 19bp afstroom van die intron-eksongrens, na by 'n Xba I-punt van die pro $\alpha 1(I)$ -geen voorkom. Die chromaatiestruktuur van kollageenproduserende selle en selle wat nie kollageen produseer nie, is deur Breindl *et al*, (1984) met behulp van 'n DNase I-hipersensitiewe toets ondersoek. Drie hipersensitiewe punte, naamlik HS1, HS2 en HS3, kom aan die 5'-kant van die $\alpha 1(I)$ -kollageengeen voor. Eersgenoemde twee punte kom voor onafhanklik daarvan of die geen getranskribeer word of nie. HS3, daarteenoor, kom slegs voor in die geval van aktiewe transkripsie. Dit is 5' van die inisiëringspunt van transkripsie geleë. Hierdie hipersensitiewe punt ontbreek waar invoeging van die retrovirusgenoom plaasgevind het en gevolglik kom geen stabiele $\alpha 1(I)$ -kollageen-mRNA voor nie. Die afwesig-

heid van die $\alpha 1(I)$ -kollageen-mRNA en gevolglike verlaagde sintese van tipe I kollageen lei tot die dodelike mutasie. mRNA vir pro $\alpha 2(I)$ -kettings kom wel voor en geaffekteerde embryo's bevat pro $\alpha 2(I)$ -kettings. Afbraak van hierdie kettings vind egter vinnig plaas omdat hulle nie in tripelhelikse gefinkorporeer kan word nie (Löhler *et al*, 1984). Dit kom ooreen met die waarneming van Barsh *et al*, (1982) dat intrasellulêre afbraak van pro $\alpha 2(I)$ -kettings in die afwesigheid van pro $\alpha 1(I)$ -kettings voorkom.

2.3.6 Puntmutasies in prokollageenkettings

Vier moontlike voorbeelde van puntmutasies is reeds beskryf. In die eerste plek het Bateman *et al*, (1984) sewe tipe II OI pasiënte se fibroblaste ondersoek vir 'n abnormale kollageensintese. Die pasiënte kon in twee groepe verdeel word, naamlik vier pasiënte waarvan fibroblaste normaal migrerende sowel as stadiger migrerende $\alpha 1(I)$ -en $\alpha 2(I)$ -kettings sintetiseer en drie pasiënte wat slegs stadiger migrerende kettings sintetiseer. Stadiger migrering is waarskynlik die gevolg van oorhidroksilering van veral die lisielresidue. Een van die pasiënte het 'n moontlike strukturele abnormaaliteit in die $\alpha 1(I)CB8$ -fragment geopenbaar in die sin dat twee vorme van die peptied met twee-dimensionele elektroforese onderskeidbaar was. Benewens die normale vorm van $\alpha 1(I)CB8$, is ook 'n meer basiese vorm met gelyke intensiteit waargeneem. Die meer basiese vorm van $\alpha 1(I)CB8$ mag toegeskryf word aan 'n puntmutasie, maar mag ook die gevolg wees van 'n baie klein invoeging of deleisie. Sippola *et al*, (1984) het byvoorbeeld met dieselfde tweedimensionele elektroforesetegniek aan-

getoon dat daar twee vorme van die $\alpha 2(I)CB4$ -fragment voorkom. 'n Delesie van 30 aminosure uit dié fragment is verantwoordelik vir die waargenome tweede fragment.

Bonadio *et al*, (1985) het die moontlike voorkoms van 'n puntmutasie in óf die $\text{pro}\alpha 1(I)$ -óf die $\text{pro}\alpha 2(I)$ -ketting van 'n tipe II OI pasiënt voorgestel. 'n Oormodifisering van die $\text{pro}\alpha 1(I)$ -en $\text{pro}\alpha 2(I)$ -kettings kom voor, sowel as 'n verlaagde termiese stabiliteit en sekresie van die tipe I prokollageen. In dié geval, net soos in die geval van Bateman *et al*, (1984), is die voorkoms van 'n klein delesie of invoeging nie uitgesluit nie.

Die eerste werklike voorbeeld van 'n puntmutasie wat in detail beskryf is, is dié van 'n tipe II OI-pasiënt se fibroblaste wat sistefen-bevattende $\text{pro}\alpha 1(I)$ -kettings, sowel as normale $\text{pro}\alpha 1(I)$ -kettings, sintetiseer (Steinmann *et al*, 1984). Die sistefen kom in die C-terminale sianogeenbromiedpeptied $\alpha 1(I)CB6$ voor. Identifisering van die sistefen is moontlik gemaak deurdat tipe I prokollageentripelhelikse wat twee abnormale $\text{pro}\alpha 1(I)$ -kettings bevat, disulfiedbrúe in die tripelheliese domein vorm. Resulterende $\alpha 1(I)$ -dimere is onder nie-reduserende kondisies en na pepsienvertering as 'n afsonderlike entiteit tussen $[\alpha 1(III)]_3$ en $\alpha 1(I)$ -kettings in SDS-PAGE waarneembaar. Verdere ondersoek het getoon dat glisien 988 van dié $\alpha 1(I)$ -ketting met 'n sistefen vervang is (Cohn, D. *et al* ongepubliseerde waarneming). Die teenwoordigheid van die sistefenresidu in die $\text{pro}\alpha 1(I)$ -kettings gee aanleiding tot 'n aantal verskynsels:

- (i) 'n Vertraagde en versteurde tripelheliksforming.
- (ii) Verhoogde lisielhidroksilering en hidroksili-sielglikosilering.
- (iii) Intracellulêre akkumulering van struktureel abnormale kollageen.

- (iv) 'n Verlaagde sekresie van prokollageentripelhelikse wat gemuteerde pro α 1(I)-kettings bevat.
- (v) 'n Verhoogde afbraak van nuutgesintetiseerde tipe I kollageen kom voor.
- (vi) 'n Verlaging in die smeltemperatuur van tripelhelikse wat mutante pro α 1(I)-kettings bevat, van 41°C tot 38°C.
- (vii) Ultrastrukturele veranderinge van die dermis van die pasiënt, soos bepaal deur elektronmikroskopie, is waargeneem. Die dikte van die dermis van die pasiënt is die helfte van die normale. Verder was die deursnee van die normaal gerangskikte kollageenfibrille duidelik kleiner as dié van kontroles (50 nm teenoor 80 nm).

Die pasiënt se moeder is 'n Marfan-pasiënt terwyl die vader normaal is. Analise van die moeder en die vader se proteïene het egter nie dieselfde resultaat gelewer nie. Die mutasie wat by die pasiënt voorkom, kan verklaar word as 'n nuwe mutasie van 'n pro α 1(I)-kollageengeen. Die rol van die "Marfan"-geen in die verandering van die fenotipe is onduidelik en daarom behoort al die fenotipiese eienskappe, soos hierbo genoem, nie goedsmoeds aan die puntmutasie toegeskryf te word nie.

Nicholls *et al* (1984) het 'n tipe I OI-pasiënt beskryf waar 'n disulfiedgebonde α 1(I)-dimeer, sowel as normale α 1(I)-kettings, in die weefselkulture gevestig vanaf vel- en beenbiopsies, voorkom. Fibroblastweefselkulture van die aangetaste moeder sintetiseer ook die α 1(I)-dimeer. In teenstelling hiermee vertoon fibroblastweefselkulture van die vader en suster, wat albei fenotipies normaal is, nie die α 1(I)-dimeer nie. Hierdie gegewe is in ooreenstemming met wat verwag sou word van 'n dominante erflik-

heidspatroon. Verdere analise het getoon dat die abnormale Cys-residu in die $\alpha 1(I)CB6$ -fragment voorkom. Die teenwoordigheid van die Cys-residu in die tripelheliese domein het geen invloed op die termiese stabiliteit van tipe I kollageen gehad nie (Pope, F.M., ongepubliseerde data). Dit mag daarop dui dat 'n ander aminosuur as Gly met 'n Cys vervang is. Verdere inligting aangaande die sintese, sekresie en prosessering van die gemuteerde $\alpha 1(I)$ -kettings is nie bekend nie.

2.3.7 Ander mutasies

2.3.7.1 Inleiding

'n Aantal ander mutasies waarvan die presiese aard en lokaliteit nie bekend is nie, is ook beskryf. Hieronder is veral 'n verhoogde hidroksilering van die verskillende kettings beskryf, sowel as die voorkoms van tipe III kollageen in been van pasiënte.

2.3.7.2 Verhoogde hidroksilering van lisien in tipe I en tipe III kollageen

'n Verhoogde hidroksilering van $pro\alpha 1(I)$ -en $pro\alpha 2(I)$ -kettings, wat veral gepaard gaan met 'n verhoogde hidroksilisielinhoud van die kettings, kom algemeen in assosiasie met 'n strukturele abnormaliteit van die prokollageenkettings voor. 'n Strukturele abnormaliteit van $pro\alpha 1(I)$ -of $pro\alpha 2(I)$ -kettings lei daartoe dat 'n vertraging in die tempo van tripelheliksvorming ontstaan. Die hidroksilase-ensieme benut nie-tripelheliese prokollageen as substrate. 'n

Vertraagde tripelheliksvorming lei daartoe dat die ensieme langer aktief bly en meer prolielresidue en veral lisielresidue word gehidroksileer (stappe II - IV, tabel 2.6). Hierdie oorhidroksilering kan in 'n sin gesien word as 'n kompensatoriese meganisme aangesien verhoogde hidroksilering lei tot 'n verhoogde termiese stabiliteit van die gemuteerde prokollageen. Die afname in termiese stabiliteit is gevolglik nie so drasties as wat dit sou wees in die geval van 'n normale of selfs 'n subnormale hidroksilering nie. Oorhidroksilering word veral waargeneem as 'n verlaagde migrering van die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings met gebruikmaking van SDS-PAGE analyses (vergelyk: De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Bateman *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984). Hierdie oorhidroksilering en gevolglik ook die stadige migrering van die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings word opgehef deur α, α' -dipiridiel. Dié cheleermiddel vorm 'n chelaat met Fe^{2+} , een van die kofaktore van lisiel- en prolielhidroksilase en die ensieme word gefnaktiveer. Kirsch *et al* (1981) het 'n tipe II OI pasiënt beskryf waar verhoogde hidroksilering ook gepaard gegaan het met glikosilering van al die hidroksilisielresidue van die pro α 1(I)-kettings en in 'n mindere mate van die pro α 2(I)-kettings.

Bonadio en Byers (1985) het oormodifisering van die tipe I kollageenkettings in 15 tipe II OI-pasiënte ondersoek. 'n Gradiënt van oormodifisering is waargeneem waar 'n toename in oorhidroksilering voorkom namate die afstand tussen die mutasie en die C-propeptied verklein. Die pasiënte is in drie groepe verdeel op grond van die mate van oormodifisering. Oormodifisering van die totale tripelheliks kom in groep A voor; vir groep B kom die oormodifisering aan die C-

terminale kant van die vertebratkollagenase snitpunt voor, en vir groep C het die oormodifisering in fragment $\alpha 1(I)CB7$ voorgekom. 'n Verlaagde sekresie en termiese stabiliteit is verder by al die sellyne waargeneem. Die grootste verlaging in termiese stabiliteit het in groep A voorgekom.

2.3.7.3 Tipe III kollageen in been

'n Pasiënt met tipe I OI se been bevat en sintetiseer tipe III kollageen (Müller *et al*, 1977). Normale been bevat slegs tipe I kollageen. Tipe III kollageen kon in dié geval in duidelik onderskeidbare gebiede in gedemineraliseerde beensnitte deur middel van immunofluoresensie gelokaliseer word. Die gebiede het as duidelike sirkelvormige strukture, addisioneel tot die fibriële gebiede, in die kompakte gebied van been voorgekom. 'n Verhoogde Hyp-inhoud wat verder as bewys kan dien vir die teenwoordigheid van tipe III in been, is aangetref. Verder het Sauk *et al* (1980) getoon dat tipe III kollageen in dentien van OI-pasiënte voorkom. Normale dentien bevat slegs tipe I kollageen. 'n Verhoogde sintese van tipe III kollageen in fibroblastweefselkulture is verder deur Müller *et al* (1975), Penttinen *et al* (1975) en Williams en Prockop (1983) aangetoon.

2.3.7.4 Oormatige mannosilering in die C-terminale propeptied van tipe I prokollageen

'n Twee- tot drievoudige toename in die mannose-inhoud van tipe I prokollageen is waargeneem vir 'n pasiënt met tipe III OI (Peltonen *et al*, 1980). Die oormaat

mannose is gelokaliseer in die C-terminale propeptied. Verder is vasgestel dat tipe I prokollageen met die verhoogde mannose-inhoud stadiger as normale tipe I prokollageen gesekreter word. Die molekulêre basis van dié verskynsel is onbekend.

2.3.8 Polimorfismestudies

Polimorfismes in die lengte van fragmente wat vorm na behandeling van genomiese DNA met verskillende restriksie-endonukleases (RFLP's; Eng: restriction fragment length polimorfisms) word as merkers van bepaalde allele of chromosome benut (Kan en Dozy, 1978; Boehm *et al*, 1983). 'n Hoë frekwensie van polimorfismes lei daartoe dat koppelingstudies van die voorkoms van 'n spesifieke RFLP in assosiasie met 'n genetiese toestand en die oorerwing daarvan in 'n familie, gedoen kan word. So is daar byvoorbeeld gevind dat 60% van die Amerikaanse Negers 'n RFLP vir die β -globiengene openbaar wat ge-
paard gaan met die eliminerings van 'n HpaI-snitpunt. Die RFLP kan gekoppel word aan die voorkoms van sekelselanemie, waar aangetaste persone slegs 'n 13,0 kb fragment vertoon, terwyl normale persone 'n 7,6 kb fragment openbaar. Hierdie koppeling kan gebruik word vir die prenatale diagnose van geaffekteerde fetusse.

In teenstelling met die groot aantal RFLP's wat geassosieer word met die PKU- en β -globiengene (Kan en Dozy, 1978; Jeffreys, 1979; Antonarakis *et al*, 1982; Lidsky *et al*, 1985) is 'n relatief klein aantal RFLP's vir die tipe I kollageengene bekend. Tewens, daar is nog nie een RFLP in die pro α 1(I)-kollageengene opgespoor nie. In 'n studie deur Tsipouras *et al* (1983) is

die leukosiet-DNA van 61 normale individue ondersoek vir die voorkoms van 'n RFLP aan die 3' en 5' kante van die *proa2(I)*-geen. Slegs een individu met 'n polimorfismepunt (vir Pst I) aan die 3' kant van die geen is geïdentifiseer. 'n Eco RI-polimorfismepunt met 'n alleliese frekwensie van 0,38 is egter aan die 5' kant van die *proa2(I)*-geen gevind. In 'n verdere analise van die DNA van 'n normale familie is aangetoon dat die Eco RI-polimorfisme as 'n dominante eienskap seegreger. Verder is 'n Msp I-polimorfismepunt aan die 3' kant van die *proa2(I)*-geen waargeneem (Tsipouras *et al*, 1984; Brebner *et al*, 1985). Ander polimorfismepunte wat waargeneem is, is Bgl II, Stu I en Rsa I (Brebner *et al*, 1985; Falk *et al*, 1985).

Die Eco RI RFLP is gebruik om 10 families met die outosomaal dominante vorme van OI (tipe I en tipe IV) te ondersoek (Tsipouras *et al*, 1983; Tsipouras *et al*, 1984). 'n Koppelingsheterogeniteit is vir die families aangetoon. In twee van die families (tipe IV) kon 'n koppeling tussen die *proa2(I)*-geen RFLP en die kliniese fenotipe aangetoon word. Koppeling kon oor die algemeen nie vir die tipe I families aangetoon word nie. Statisties is getoon dat daar 'n sterk koppeling tussen tipe IV OI en die Eco RI RFLP bestaan. (Die lod punte-telling was 3,91 met 'n rekombinasiefraksie van 0) (Falk *et al*, 1985). 'n Koppeling tussen 'n Rsa I RFLP en 'n outosomaal dominante OI is verder aangetoon

'n RFLP is oor die algemeen 'n sekondêre verskynsel wat mag koseggreger met die onderliggende geendefek wat vir die fenotipe verantwoordelik is. Só is die molekulêre defekte van die families wat deur Tsipouras *et al* (1983 en 1984) bestudeer is, nie bekend nie en staan

waarskynlik ook nie in verband met die Eco RI-polimorfisme nie. Tewens, tot dusver was dit nog nie moontlik om 'n RFLP te koppel met 'n bekende molekulêre afwyking in die kollageengene nie. Dit kan deels toegeskryf word aan die redelike lae frekwensie waarin die enkele bekende polimorfismes in die tipe I kollageengene waargeneem is. Byvoorbeeld, die Eco RI-polimorfismepunt het 'n frekwensie van slegs 0,38 (Tsipoures *et al*, 1983) terwyl die Msp I-polimorfisme 'n frekwensie van 0,17 het (Grobler-Rabie *et al*, 1984). Daarenteen is veel hoër frekwensies vir Msp I, en Hind III in die feniellalanienhidroksilaselokus onlangs beskryf (Woo *et al*, 1983b). Die frekwensiewaardes was 0,556; 0,741 en 0,706 onderskeidelik. Lidsky *et al* (1985) het nog meer onlangs aangetoon dat die frekwensie van tien RFLP's wat met die feniellalanienhidroksilaselokus geassosieer word, sodanig hoog is dat 83% van alle Kaukasieërs heterosigoties vir die RFLP's sal wees. 'n Hoë frekwensie van 'n groot verskeidenheid RFLP-tipes is noodsaaklik vir akkurate prenatale diagnose van 'n geendefek wat in assosiasie met 'n RFLP voorkom. Terwyl die hoë voorkoms van polimorfismes in die feniellalanienhidroksilasegeen uitgebreide benutting van hierdie tipe analyse vir prenatale diagnose toelaat, is dit duidelik dat 'n sodanige benadering nie vir die kollageengene moontlik is nie. Die frekwensie van die beperkte aantal polimorfismepunte is hiervoor te laag. Polimorfismestudies is daarom 'n ontoereikende metode in die bestudering van die molekulêre defekte wat by OI mag voorkom.

2.4 PROBLEEMSTELLING EN BENADERINGSWYSE

'n Siftingsprogram om die molekulêre basis van tipe I OI op 'n sistematiese wyse na te gaan, is nog nie onderneem nie. Inteendeel, vorige siftingsprogramme wat vir OI onderneem is, was ðf meer op kliniese aspekte gerig ðf het gehandel oor die resessief oorerflike tipes OI (tipe II en III). Hierdie studie is daarom onderneem om die voorkoms en aard van molekulêre defekte in tipe I OI na te gaan. 'n Belangrike verdere doel van hierdie studie was om 'n mutant met 'n duidelike afwykende kollageenmetabolisme te identifiseer en die presiese aard, lokaliteit en karakteristieke van die mutasie te ondersoek.

'n Wye verskeidenheid benaderingswyses is in die verlede gevolg om die etiologie van OI te ondersoek (Fujii en Tanzer, 1977; Brown, 1981; Hollister, 1981).. Ongelukkig was die meeste hiervan nie baie suksesvol of nie spesifiek genoeg nie. Hierdie studies het veral gehandel oor beenmineralisering, beenmatrikschemie en algemene afwykings van sellulêre metabolismiese funksies van bindweefsel (Brown, 1981; Hollister, 1981; Baron *et al*, 1983). Histochemiese en biochemiese analise van die glukosaminoglikaaninhoud van kraakbeen en die epifise van langbene is onder andere gedoen (Spencer, 1962; Engfeldt en Hjerpe, 1976; Cetta *et al*, 1977). Na aanleiding hiervan is die voorkoms van radio-aktiefgemerkte glikosaminoglikane ook in fibroblast weefselkulture ondersoek (Brown, 1981). Teenstrydige resultate is egter met hierdie metodes verkry en daarom word algemeen aanvaar dat hierdie tipe studies onbevredigend vir die vasstelling van die aard en omvang van genetiese defekte in OI is. Histologiese ondersoeke is ook aangewend om die morfologie van fibroblaste in weefselkulture te onder-

soek om sodoende 'n moontlike verskil tussen die normale- en OI-fibroblaste aan te toon (Boright *et al*, 1984). Hierdie histologiese metodes het geen klinkklare verwantskap met OI aangetoon nie. Die tande van OI pasiënte is vir veranderinge in die organiese dentienmatriks, onder andere deur middel van immunohistochemiese metodes, ondersoek (Sauk, 1980; Takagi *et al*, 1980). Alhoewel 'n veranderde kollageenmetabolisme in die dentienmatriks van pasiënte met OI wat gepaard gaan met dentinogenesis imperfecta gevind is, was die resultate weer eens nie spesifiek genoeg nie. Ook is strukturele analise van kollageenfibrille met behulp van ligmikroskopiese-, transmissie elektronmikroskopiese en skandeer elektronmikroskopiese ondersoeke gedoen (Holbrook en Byers, 1982; Steinmann *et al*, 1984). Kollageenfibrille met 'n kleiner deursnee as die normale, sowel as fibrille met 'n normale deursnee is waargeneem. Tot dusver kon daar egter geen patroon hier aangetoon word nie. 'n Benadering wat algemeen toegepas is, was om die voorkoms van hidroksilisien en hidroksiprolien in uriene te bepaal. Alhoewel 'n verhoogde voorkoms van hierdie derivate in die uriene van pasiënte met OI gevind is, was hierdie nie 'n baie bevredigende metode nie, aangesien hierdie benadering nie geskik was vir die bepaling van die aard en omvang van die defekte kollageenmetabolisme nie. Alhoewel hierdie verskillende benaderingswyses nie baie spesifiek was nie, het die resultate tog daarop gedui dat daar 'n verband tussen 'n afwykende kollageenmetabolisme en OI bestaan.

Onlangse ontwikkelinge in die rekombinante DNA-tegnologie het gelei tot die daarstelling van hoogs spesifieke metodes om die presiese aard en voorkoms van mutasies of van defekte allele vas te stel. 'n Benaderingswyse wat

vry algemeen in die mensgenetika toegepas word is RFLP-analise. Die resultaat van 'n aantal sodanige studies wat in die onlangse verlede met behulp van die mens kollageengene of cDNA's uitgevoer is, het egter getoon dat dit tot dusver 'n hoogs onbevredigende benadering was vir die ondersoek van OI (kyk afdeling 2.3.8). Eendersyds is daar 'n beperkte aantal polimorfismes met 'n lae frekwensie in die pro α 2(I)-geen bekend en andersyds is daar tot op datum nog geen polimorfismes in die pro α 1(I)-geen gevind nie. Ander tegnologieë wat wel met sukses vir die analyse van OI-gevalle aangewend is, is elektronmikroskopiese R-lusanalise (De Wet *et al*, 1985; De Wet *et al*, 1986), nuklease S₁-analise (Chu *et al*, 1983; Dickson *et al*, 1984; De Wet *et al*, 1986) en genomiese klonering (Pihlajaniemi *et al*, 1984; Chu *et al*, 1985c). Hierdie direkte analise van RNA en DNA kan nie as vertrekpunt vir 'n studie soos hierdie gebruik word nie, aangesien daar eers vasgestel moet word of die mutasie in die pro α 1(I)-of pro α 2(I)-geen voorkom.

'n Benaderingswyse wat reeds met groot vrug aangewend is vir die bestudering van OI, Marfan se sindroom, en EDS tipes IV en VII, is die analise van [³H]-prolienge-merkte fibroblastproteïenmateriaal deur SDS-PAGE (Peltonen *et al*, 1980; Barsh en Byers, 1981; Barsh *et al*, 1981; Barsh *et al*, 1982; Deak *et al*, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Nicholls *et al*, 1984; Sippola *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984; Stolle *et al*, 1985; Cole *et al*, 1986). So byvoorbeeld is die verskillende mutasies wat in afdeling 2.3 bespreek is, met behulp van hierdie benaderingswyse geïdentifiseer en ondersoek. Hierdie benaderingswyse laat ook die detailondersoek van die eienskappe van prokollageen tot 'n groot mate toe, sodat hierdie metode effektief aangewend kan word in 'n siftingsprogram. Derhalwe is daar

in hierdie studie van hierdie benaderingswyse gebruik gemaak. 'n Gedetailleerde uiteensetting van dié benaderingswyse word in afdeling 4 (hoofstuk 4), in samehang met figuur 4.6, toegelig.

Verder, voortvloeiend uit die direkte analise van [^3H]-proliengemerkte fibroblastprotefenmateriaal, is die bogenoemde benaderingswyse op verskillende wyses deur 'n aantal outeurs gewysig om die aard en omvang van kollageenmutasies te ondersoek. So, byvoorbeeld, het CNBr-peptiedkartering op een-dimensionele SDS-gelle (De Wet *et al*, 1983a; Stolle *et al*, 1985; Cole *et al*, 1986) of op twee-dimensionele SDS-gelle (Barsh en Byers, 1981, Barsh *et al*, 1981; Barsh *et al*, 1982; Deak *et al*, 1983; Sippola *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984) die bepaling van die lokaliteit van 'n aantal mutasies in òf tipe I òf tipe III prokollageen toegelaat. Met geringe aanpassing van die benaderingswyse was dit ook moontlik om veranderinge in die sekresie (Peltonen *et al*, 1980; Barsh en Byers, 1981; Deak *et al*, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Steinmann *et al*, 1984; Stolle *et al*, 1985) sowel as die termiese stabiliteit (Williams en Prockop, 1983; Sippola *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984) te bepaal. Prosessering van prokollageen deur N-protefenase is ook met behulp van die analise van [^3H]-proliengemerkte fibroblastmateriaal op SDS-PAGE nagegaan.

Derhalwe is die analise van [^3H]-proliengemerkte fibroblastprotefenmateriaal nie slegs vir die aanvanklike siftingsprogram benut nie (kyk hoofstuk 4), maar is ook toegepas om die aard en fragmentposisie van 'n mutasie in die pro α 1(I)-kettings van 'n pasiënt met tipe I OI te peil (kyk hoofstuk 5). Aanpassings van die basiese

prosedure, volgens die metode voorskrifte in hoofstuk 3, is verder aangewend om die effek van die mutasie op die termiese stabiliteit, kinetika van sekresie, asook die ekstrasellulêre prosesseerbaarheid van die pasiënt se prokollageen te kwantifiseer (kyk hoofstuk 6).

HOOFSTUK 3

METODES

3.1 INLEIDING

In hoofstukke 4, 5 en 6 word die metodes wat vir elke tipe analise gebruik is, slegs kortliks weergegee. Daarom word hierdie hoofstuk gewy aan die detailbeskrywing van die eksperimentele protokol wat in die verloop van die studie gebruik is.

3.2 DIE VESTIGING, VERMEERDERING EN BEWARING VAN FIBROBLASTWEEFSELKULTURE

3.2.1 Motivering

Velbiopsies wat van pasiënte uit vyf geselekteerde families verkry is, is gebruik vir die vestiging van fibroblastweefselkulture. Aangesien fibroblaste as beginpunt van alle eksperimentele protokolle dien, is die detailbeskrywing van metodes wat in die hantering daarvan gebruik is, van belang.

3.2.2 Vestiging van primêre kulture

Velbiopsies is verkry vanaf die binnekant van die arm en in 'n buis geplaas wat 10% Pen-Strep ($5\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ Streptomisien en $5\ 000\ \text{U}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ Penisillien, (Gibco) en 1%

Fungizone ($250 \mu\text{g} \cdot \text{m}\ell^{-1}$, Flow Laboratories of Gibco) in DMEM medium (Gibco) bevat. Die velbiopsies is op ys vervoer en vir nie langer as 24 uur in die yskas by 4°C bewaar nie. Die biopsie is met 'n skalpel in klein stukkie gesny terwyl dit onder medium gehou is. Daarna is die stukkie vel met behulp van 'n pasteurpipet oorgedra in 'n 25 cm^2 weefselkultuurflask en die oortollige medium is afgesuig. 'n Druppel fetale kalfserum (Flow Laboratories of M.A. Laboratories) is op elke stukkie vel geplaas en vir 'n halfuur tot 'n uur by 37°C geïnkubeer. 'n Volume van $2,5 \text{ m}\ell$ volledige medium (10% fetale kalfserum - 10% Pen-strep - 1% Fungizone in DMEM) is versigtig by die vel gevoeg sonder om die vel te versteur. Die vel is vir 'n week gelaat sodat hegting van die vel aan die flesoppervlak kan plaasvind en die uitgroei van die fibroblaste só bevorder kan word. Die medium is hierna een maal per week geruil totdat die selle die samevloeiende fase bereik het.

3.2.3 Subkulture

Subkulture is verkry deur gebruikmaking van die neutrale protease, Dispase II (Boehringer Mannheim) met 'n spesifieke aktiwiteit van ongeveer $0,5 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. 'n Konsentrasie van $4,8 \text{ mg} \cdot \text{m}\ell^{-1}$ is gebruik. (Spesifieke aktiwiteit van ongeveer $2,44 \text{ U} \cdot \text{m}\ell^{-1}$). Die ensiem is opgemaak in PBS sonder Ca^{2+} en Mg^{2+} , en die oplossing is gesteriliseer deur filtrering deur 'n $0,2 \mu\text{m}$ membraan. (Die ensiem kan vir vier weke by 4°C bewaar word.) Die medium van die primêre kulture is afgegooi en $1 - 2 \text{ m}\ell$ dispase is by die fles gevoeg. Na inkubasie vir 10 minute by 37°C is die fles geskud. Fibroblaste wat vrykom is oorgedra in 'n koniese sentrifugebuis en vir 7 minute by $2\ 000 \text{ o.p.m.}$ in 'n

tafelsentrifuge (Minor, MSE) gesentrifugeer. Die gepresipiteerde selle is in volledige medium gehersuspendeer en in 'n tweede 25 cm² fles oorgedra. 'n Volume van 5 ml volledige medium is by die oorspronklike fles gevoeg. Die medium is elke vierde dag geruil en die subkultureringsproses is herhaal sodra die fibroblaste weer die samevloeiingsfase bereik het.

3.2.4 Bewaring van fibroblaste

Fibroblaste is opgekweek in 25 cm² of 75 cm² flesse tot en met die samevloeiingsfase. Die fibroblaste is van mekaar en van die flesoppervlak geskei deur die toevoeging van 1 ml dipase by 25 cm² flesse en 3 ml dispase by 75 cm² flesse. Daarna is dit vir 15 minute by 37°C geïnkubeer en geskud. Die fibroblast-ensiememngsel is in 'n koniese sentrifugebuis oorgedra en soos voorheen afgeswaai. Fibroblaste wat só gepresipiteer is, is in 3 ml vriesmedium per 25 cm² fles en 5 ml vriesmedium per 75 cm² fles gehersuspendeer. (Vriesmedium: 20% fetale kalfserum - 7,5% DMSO in DMEM medium). Die selsuspensie is in 1 ml hoeveelhede in Nunc-buise verdeel en gevries deur dit in 'n etanol-droë ys mengsel te plaas. Die selle is in vloeibare stikstof (-196°C) of in die ultralaevrieskas (-70°C) bewaar.

3.2.5 Heropkweek van selle na bevriesing

Die fibroblaste is so vinnig as moontlik in 'n 37°C waterbad ontvries. (Dit verseker dat die maksimum hoeveelheid selle oorleef). Die Nunc-buise is hierna in 70% etanol gedompel om kontaminasie te voorkom. Hierna is die selsuspensie in 'n koniese sentrifugebuis oorgedra en medium by 37°C is druppelsgewys by die selsuspensie gevoeg. Die

fibroblaste is hierna soos voorheen gepresipiteer, in volledige medium gehersuspendeer en in 'n 25 cm² fles oorgedra. Verdere opkweeking en verkryging van subkulture is soos voorheen beskryf, uitgevoer.

3.3 METODES VIR DIE DIREKTE ANALISE VAN PROKOLLAGEEN IN DIE MEDIA SOWEL AS IN DIE SELLAE

3.3.1 Merkingsprosedure

Fibroblastweefselkulture wat in 25 cm² flessies gekweek is, is vir 4 uur gemerk in die teenwoordigheid van 50 - 100 $\mu\text{Ci.mL}^{-1}$ L - [4,5 - ³H]-prolien (14 - 32 Ci/mmol; Amer-sham of Commissariat a L'energie Atomique). Die merking is verder gedoen in die teenwoordigheid van 50 mg.m²⁻¹ askorbiensuur en in die afwesigheid van fetale kalfserum. Die inkubasieperiode is voorafgegaan deur 'n pre-inkubasieperiode van 30 minute sonder die radioaktiewe aminosuur. Vir elke pasiënt is gebruik gemaak van twee 25 cm² flessies ten einde merking in die teenwoordigheid of afwesigheid van 0,3 mM α, α' -dipiridiel moontlik te maak.

3.3.2 Behandeling van die media

Na die merkingsperiode is die media onttrek en by 'n tiende volume protease-inhibeerders (0,4 M EDTA - 1 M Tris.Base - 0,11 M NEM - 9 mM pAB - 11mM PMSF - pH 7) gevoeg. Presipitering van die media is gedoen deur die toevoeging van ammoniumsulfaat tot 'n finale konsentrasie van 30%. Na presipitering vir twee dae by 4°C, is die presipitate by 13 000 g vir twee uur afgeswaai. Die

sediment is geheruspendeer in selhomogeniseringsmedium (0,27 M NaCl - 22 mM NEM - 1,8 mM PAB - 2,2 mM PMSF - 0,1% Triton X - 100 - 80 mM EDTA - 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hitte gedenateerde kollageen (Cooper Biomedical, graad CLCS)- in 0,27 M Tris. HCl (pH7.4)). Alvorens die preparate aan SDS-PAGE (Laemmli, 1970) onderwerp is, is die geheruspendeerde preparate gekook in 'n finale konsentrasie van 2% SDS. Hierna is die preparaat weer eens vir 3 minute in die teenwoordigheid van 'n tiende volume 10x elektroforese monsterbuffer (0,5 M Tris.HCl (pH 6.8) - 10% SDS - 10% β ME - 50% gliserol - 0,01% BFB) gekook. Vervolgens is die monsters oornag gedialiseer teenoor elektroforesemonsterbuffer (0,05 M Tris.HCl (pH 6.8)-1% SDS - 1% β ME - 5% gliserol - 0,001% BFB). Die preparate wat op dié wyse verkry is, is geskei op 4 - 8% SDS-PAGE. Skeiding is gedoen vir 16 uur by 60 V. Fluorografie van poliakriëlamiedgelle is deurgaans volgens die metode van Laskey en Mills (1975) uitgevoer op Cronex 4 of Kodak XAR 5 X-straal film.

3.3.3 Behandeling van die sellae

Die sellae is gewas met PBS en geskraap in 0,5 ml selhomogeniseringsmedium. Die sellae is hierna by voorafverhitte SDS en β ME tot 'n finale konsentrasie van 2% en 2% onderskeidelik gevoeg en die sellae is gehomogeniseer met 'n glas en teflon homogeniseerder. Daarna is die monsters vir 3 minute gekook en 'n tiende volume 10x elektroforesemonsterbuffer is bygevoeg en die monsters is weer gekook. Die selhomogenate is gedialiseer en onderwerp aan SDS-PAGE soos beskryf in afdeling 3.3.2.

3.3.4 Behandeling van proteïenmateriaal vir skeiding onder nie-reducerende kondisies

Dieselfde merkingsprosedure as vir analise van prokolla-geen onder reducerende kondisies (afdeling 3.3.1 - 3.3.3) is gevolg. Al verskil in hierdie prosedure is dat alle β ME uit die prosedure weggelaat is. Hieruit volg dus dat die sellaaag voor homogenisering slegs in SDS gekook is. Verder is geen β ME by die elektroforesemonsterbuffer gevoeg nie. As 'n verdere voorsorgmaatreël is dialise ge- doen teenoor 'n elektroforesemonsterbuffer wat soos volg saamgestel is: 0,05 M Tris.HCl (pH 6,8) - 1% SDS - 5% gliserol - 100 mM Jodo-asetamied - 0,001% BFB. Die Jodo-asetamied, wat bind met alle swaelverbindinge wat moont- lik in die omgewing mag voorkom en dus reduksie van disul- fiedbindings tot gevolg kan hê, is slegs vir eksperimente in hoofstuk 4 gebruik.

3.4 PROTEASEBEHANDELING VAN SELLULÊRE- EN MEDIAPROTEÏENE

3.4.1 Pepsienbehandeling

Pepsienbehandeling van sellulêre- en mediaproteïene het 'n belangrike onderbou van die studie gevorm en is soos volg uitgevoer. Fibroblastweefselkulture wat in 75 cm² fiese gekweek is, is vir 4 uur met 100 μ Ci. $\text{m}l^{-1}$ L-[4,5-³H]-prolien gemerk. Merking is gedoen in die teenwoordigheid van 50 mg. $\text{m}l^{-1}$ askorbiensuur en in die afwesigheid van fetale kalfserum. Na die merkingsperiode is die medium onttrek en by 'n tiende volume protease-in- hibeerders gevoeg. Die sellaaag is drie maal met PBS by 20°C gewas. Hierna is die sellaaag vir 20 minute by 20°C

met PBS gefinkubeer. Na die inkubasieperiode is die sel-laag geskraap in selhomogeniseringsmedium en gehomogeniseer. 'n Gelyke volume 0,2 M asynsuur is hierby gevoeg en die pH is met 6N HCl ingestel tot 'n pH van 2-3. 'n Tiende volume pepsien ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in water) tot 'n finale konsentrasie van $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ is by die selhomogenaat gevoeg. Vertering is vir twee uur by 18°C uitgevoer (De Wet *et al*, 1983a; Stolle *et al*, 1985). Die reaksie is getermineer deur die pH in te stel tot pH 7-8 met 1 M NaOH. Die reaksiemengsel is hierna oornag by 4°C gelaat. Hierna is die selhomogenate in 'n finale konsentrasie van 2% SDS gekook. Indien SDS-PAGE onder reduserende kondisies uitgevoer is, is selhomogenate met 'n tiende volume elektroforesebuffer met β ME gekook. Vir analise onder nie-reduserende kondisies is die selhomogenate egter met 'n tiende volume elektroforesemonsterbuffer sonder β ME gekook. Hierna is die selhomogenate gedialiseer teenoor elektroforesemonsterbuffer met of sonder β ME. Skeiding is hierna gedoen op 5-8% SDS-poliakriëlamiedgelle op een van drie maniere:

- (i) Onder reduserende kondisies vir 16 uur by 60V.
- (ii) Onder nie-reduserende kondisies vir 16 uur by 60V.
- (iii) Met behulp van onderbroke elektroforese (Sykes *et al*, 1976). Hier is skeiding van ongereduseerde materiaal vir 2 uur by 100V gedoen. Die elektroforeseproses is hierna vir 'n uur onderbreek waartydens die gel met 10% β ME geïmpregneer is. Die skeiding van die gereduseerde proteïene is daarna volvoer by 50V vir 10 uur.

Mediaproteïene is vir 2 dae met ammoniumsulfaat gepresipiteer. Daarna is die presipitate by $13\ 000 \text{ g}$ vir 2 uur afgeswaai en gehersuspendeer in 'n klein volume selhomogeniseringsmedium. Pepsienbehandeling is hierna op dieselfde

wyse uitgevoer as vir die sellaaag. Die preparate sodoende verkry is weer eens aan die drie skeidingsprosedures onderwerp, naamlik reduserende en nie-reduserende kondisies sowel as onderbroke elektroforese.

3.4.2 Vertering met tripsien en chimotripsien

Tripsien- en chimotripsienvertering is uitgevoer soos voorheen beskryf (Bruckner *et al*, 1981; Williams en Prockop, 1983; Stolle *et al*, 1985). Fibroblastweefselkulture wat in 25 cm² flessies gekweek is, is vir 2 uur met 100 $\mu\text{Ci.m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ³H]-prolien gemerk. Die sellaaag is hierna vir 30 minute by 20°C in PBS geïnkubeer, waarna die PBS afgetrek is. Hierna is die sellaaag in 500 $\mu\ell$ Krebs-Ringer II - 100 mM EDTA - 0,1% NP 40 geskraap en die selmengsel is vir 1 minuut heftig met behulp van 'n Vortexmenger vermeng. Die selmengsel is hierna tot 20°C op ys afgekoel. Volgens is 'n tiende volume chimotripsien-tripsien mengsel (2,5 mg.m ℓ^{-1} chimotripsien (Cooper Biomedical, graad CDI) en 1 mg.m ℓ^{-1} tripsien (Cooper Biomedical, graad TPCK)) in Krebs-Ringer II - 2% NP 40 - 200 mM EDTA by die selmengsel gevoeg en vertering is vir 2 minute by 20°C uitgevoer. Hierna is die reaksie gestop deur die toevoeging van 'n tiende volume 5 mg.m ℓ^{-1} sojaboontripsieninhibeerder (Cooper Biomedical, graad TRL) en die mengsel by 'n tiende volume voorafverhitte 2% SDS te voeg. Voorbereiding vir skeiding op SDS is soos voorheen beskryf uitgevoer en die skeiding is op 'n 4-8% SDS-poliakriëlamiedgel gedoen. Hier is deurgaans van nie-reduserende kondisies gebruik gemaak.

3.5 TWEEDIMENSIONELE GELELEKTROFORESE

3.5.1 Analise onder reduserende en nie-reduserende kondisies

Ongeveer 200 μl pepsienbehandelde materiaal is onder nie-reduserende kondisies met behulp van 4 - 8% SDS-PAGE of 5% SDS-PAGE geskei. Die gel is direk gedroog, waarna die stroke wat die pepsienbehandelde materiaal bevat, uitgesny is. Hierdie gelstroke is gerehidreer en vir 5 tot 7 uur in 'n ekwilibreringsbuffer (100 mM Tris.HCl (pH 6.8) - 30% gliserol - 1% β ME - 0,001% BFB) geëkwilibreer. Vervolgens is hierdie gelstrook op 'n tweede breër 4 - 8% of 5% SDS-poliakriëlamiedgel onder reduserende kondisies geskei.

3.5.2 CNBr-peptiedkartering met gebruikmaking van tweedimensionele analise

Dié metode is gebruik aangesien skeiding van die verskillende kettings in die eerste dimensie peptiedkartering van elke band in die tweede dimensie toelaat. 'n Groot volume pepsienbehandelde materiaal is in die eerste dimensie onder nie-reduserende kondisies op 'n 5% strookgel geskei. Die gelstrook is hierna onderwerp aan CNBr-vertering (Barsh en Byers, 1981; Barsh *et al*, 1981). Ekwilibreer van die gel is eers gedoen in vyftienvoudige volume-oormaat 70% (V/V_v) mieresuur deur die gel drie maal vir 30 minute met 70% (V/V_v) mieresuur te was. Hierna is die gel aan CNBr-vertering onderwerp in 70% (V/V_v) mieresuur wat 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ CNBr bevat. Vertering is by 25°C vir 6 uur gedoen, waarna die reaksie getermineer is deur die gel in ekwilibreringsbuffer (100 mM Tris.HCl (pH 6.8) - 30% gliserol - 0,001% BFB) te was. Vir skeiding in die tweede dimensie onder reduserende kondisies is

5% SME ingesluit in die ekwilibreringsbuffer. Die wasstappe is herhaal totdat die gel blou verkleur het, waarna die gelstrook op 'n tweede, breër 8 - 14% gradiëntgel geplaas is. Die gelstrook is met monsterbuffer (100 mM Tris. HCl (pH 6.8) - 20% gliserol - 5% SDS - 0,001% BFB) bedek en skeiding is vir 20 uur by 60V uitgevoer.

3.5.3 Tweedimensionele analise met vertebraat-kollagenaseverteerde materiaal in die eerste dimensie en CNBr-vertering in die tweede dimensie

Pepsienbehandelde mediaproteïene of sellulêre materiaal is vir vertebraatkollagenasevertering benut (De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Stolle *et al*, 1985). Die pepsienbehandelde materiaal is oornag teenoor drie ruilings vertebraatkollagenase dialisebuffer (0,05 M Tris (pH 7.5) - 0,01 M CaCl_2) gedialiseer. Na die dialisestap is die materiaal vir 24 uur by 22°C met 'n agtste volume geaktiveerde vertebraatkollagenase verter. Die reaksie is gestop met die toevoeging van 0,2 M EDTA en deur die monster in 'n tiende volume voorafverhitte 20% SDS te kook. Hierna is die monsters voorberei vir elektroforese en onder nie-reducerende kondisies op 'n 6% strookgel geskei. CNBr-vertering en skeiding van die fragmente in die tweede dimensie op 'n 4 - 14% SDS-poliakriëlamiedgel is hierna gedoen volgens die metode soos beskryf in afdeling 3.5.2.

3.6 BEPALING VAN DIE TERMIESE STABILITEIT VAN INTRASELLULÊRE TIPE I PROKOLLAGEEN

Die bepaling van die termiese stabiliteit van intrasellulêre tipe I prokollageen is gedoen volgens 'n metode wat 'n wysiging is van metodes wat reeds beskryf is (Bruckner en Prockop, 1981; Williams en Prockop, 1983; Steinmann *et al.*, 1984). Fibroblastweefselkulture wat in 175 cm² flesse gekweek is, is vir 3 uur by 37°C met 100 $\mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ³H]-prolien gemerk. Die media is hierna afgetrek en by protease-inhibeerders gevoeg en met 'n eindkonsentrasie van 30% ammoniumsulfaat gepresipiteer. Die sellag is vir 20 minute by 20°C in PBS geïnkubeer, waarna dit in 3,3 ml aangepaste Krebs-Ringer II medium (Krebs-Ringer II-10 mM EDTA - 0,1% NP 40) geskraap en gehomogeniseer is. Selhomogenate soos verkry is vir 5 minute by 9 000 o.p.m. afgeswaai en die supernatant is in 16 x 200 $\mu\ell$ deelvolumes verdeel en by 0°C bewaar. 'n Deelvolum is gebruik vir elke temperatuurinkrement, waar die deelvolumes by temperatuur wat gewissel het tussen 34°C en 43°C vir 10 minute geïnkubeer is. Hierna is elke deelvolum vinnig op ys tot 20°C afgekoel en tripsien-chimotripsienvertering is uitgevoer soos beskryf in afdeling 3.4.2. Die monsters is hierna voorberei vir en onderwerp aan SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies.

'n Aantal beligtings van alle fluorogramme is volgens voorskrifte met 'n Biorad densitometer afgetas. Sorg is gedra dat die lineêre gebied van blootstelling nie oorskrei is in die blootstellingstyd van fluorogramme wat vir die aftasting gebruik is nie. Pieke wat op die manier verkry is of geweeg of daar is van piekoppervlakte in die verwerking gebruik gemaak.

3.7 BEPALING VAN DIE KINETIKA VAN SEKRESIE VAN TIPE I PROKOLLAGEEN

Die bepaling van die kinetika van sekresie van tipe I prokollageen is gedoen soos voorheen beskryf (Stolle *et al.*, 1985). Fibroblastweefselkulture wat vir hierdie eksperimentele prosedure gebruik is, is in 25 cm² flessies gekweek. Twee flessies is vir die pasiënt sowel as die kontroles gebruik, sodat merking in die teenwoordigheid en afwesigheid van α, α' -dipiridiel gedoen is. Merking in die teenwoordigheid van α, α' -dipiridiel is in die afwesigheid van askorbiensuur gedoen. Die merkingsperiode is voorafgegaan deur 'n pre-inkubasiereperiode van 30 minute waar die selle in vars medium in die afwesigheid van fetale kalfserum en in die teenwoordigheid van 50 mg.m ℓ^{-1} askorbiensuur of 30 mM α, α' -dipiridiel gekubeer is. Hierna is die selle vir 3 uur met 100 $\mu\text{Ci.m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ³H]-prolien in die teenwoordigheid van askorbiensuur of α, α' -dipiridiel gemerk. Na die merkingsperiode is die media in 2 x 850 $\mu\ell$ hoeveelhede in Eppendorfbuisies onttrek en by 85 $\mu\ell$ protease-inhibeerders en 10 $\mu\ell$ 2 mg.m ℓ^{-1} ge-denatureerde kollageen gevoeg. Die radio-aktiewe media is met 1,5 ml vars media by 37°C, met 10 mM prolien sowel as askorbiensuur of α, α' -dipiridiel, vervang. Inkubasie is hierna vir 20 minute, 20 minute, 20 minute, 60 minute, 60 minute, 60 minute en 120 minute voortgesit, en die media is telkens na die bepaalde inkubasietyd vervang met vars media met 10 mM prolien. Die media wat onttrek is, is telkens by 85 $\mu\ell$ protease-inhibeerders en 10 $\mu\ell$ 2 mg.m ℓ^{-1} ge-denatureerde kollageen gevoeg. Hierdie mengsels is telkens afgeswaai om van selle wat moontlik in die media mag voorkom, ontslae te raak. Na die swaaistap is ammoniumsulfaat tot 30% by die media gevoeg en is dit twee keer oornag by 4°C gelaat. Hierna is mediaproteïene

vir 2 uur by 13 000g afgeswaai en die sediment is in selhomogeniseringsmedium gehersuspendeer en na twee dae aan pepsienvertering onderwerp. Die sellae daarenteen is na die verloop van die 6 uur jaagperiode in selhomogeniseringsmedium geskraap en gehomogeniseer, aan pepsinerings onderwerp en met 30% ammoniumsulfaat gepresipiteer. Na die presipiteringsperiode is die selhomogenate vir 2 uur afgeswaai en die sediment in selhomogeniseringsmedium gehersuspendeer. Al die monsters is hierna voorberei vir SDS-PAGE en na dialise is die volumes van al die monsters gelyk gestel. n Gelyke volume van elke monster is hierna met behulp van 4 - 8% SDS-PAGE vir 16 uur by 60V onder nie-reduserende kondisies geskei. Fluorogramme is afgetas om die fraksie tipe I prokollageen wat by verskillende tydsintervalle in die sellae teenwoordig is, te kwantifiseer. Die hoeveelheid tipe I prokollageen in die fibroblaste by tyd 0 is as 100% geneem.

Die data wat só vir tipe I prokollageen verkry is, is gebruik om die snelheidskonstantes te bereken soos voorheen beskryf (Kao *et al*, 1977; De Wet *et al*, 1983a) met gebruikmaking van die vergelyking

$$T = Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t}$$

waar T die persentasie radio-aktief gemerkte tipe I prokollageen is wat in die selle oor is na die verskillende jaagtye; A en B die konstantes is wat die fraksie tipe I prokollageen wat tydens die vinnige (A) en stadige (B) fases gesekreteer word, weerspieël; k_1 en k_2 eerste orde snelheidskonstantes is; en t die jaagtyd is. Die waardes wat verkry is vir die sekresie van tipe I prokollageen deur kontrole fibroblaste én die waardes verkry vir die sekresie van die mengsel van normale tipe I prokollageen en tipe I prokollageen wat een Cys-bevattende en

een normale proal(I)-ketting bevat (tipe I^C) deur die pasiënt se fibroblaste by verskillende jaagtye is gebruik om die sekresie van tipe I^C te simuleer. Die vergelyking wat hiervoor gebruik is, sien soos volg daaruit:

$$I^C = \frac{3}{2} \left[\left(\frac{1}{3} I + \frac{2}{3} I^C \right) - \frac{1}{3} I \right]$$

waar I^C die gesimuleerde persentasie tipe I^C prokollageen is wat in die pasiënt se fibroblaste teenwoordig is ná die verskillende jaagtye; $\left(\frac{1}{3} I + \frac{2}{3} I^C \right)$ is die persentasie radio-aktief gemerkte tipe I en tipe I^C prokollageen in die pasiënt se fibroblaste en I is die persentasie tipe I prokollageen wat in die kontrole fibroblaste teenwoordig is by die verskillende jaagtye.

3.8 PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN DEUR ENDOGENE N-PROTEÏENASE

Die fibroblastweefselkulture wat in dié ondersoek gebruik is, is tot ná die samevloeiingsfase gekweek. Hierdie fibroblaste is vir twee dae in die teenwoordigheid van 10% fetale kalfserum en 50 mg.mℓ⁻¹ askorbiensuur geïnkubeer. Die media van die kontrole flesse is gekombineer, by 0°C bewaar en prolien is tot 'n finale konsentrasie van 10 mM bygevoeg. Vervolgens sal daar na die prolien-bevattende media as koue media verwys word. Die fibroblaste is vir 3 uur in die teenwoordigheid van askorbiensuur en in die afwesigheid van fetale kalfserum met 100 μCi.mℓ⁻¹ L-[4,5-³H]-prolien gemerk. Hierna is die radio-aktiewe media onttrek en by 0°C bewaar. Vervolgens is twee eksperimentele prosedures gelyktydig gevolg.

In die eerste prosedure is 1,5 mℓ van die koue media by die sellae gevoeg en is die inkubasie vir 4, 8, 16 en 24

uur voortgesit. Die media is na die tydsintervalle onttrek en by 'n tiende volume protease-inhibeerders en $20 \mu\text{l}$ gedenatureerde kollageen gevoeg en die mengsels is vinnig by -70°C gevries. Na die 24 uur inkubasietyd voltooi is, is die verskillende deelvolumes by 37°C ontvries en met 30% ammoniumsulfaat gepresipiteer. Die media is na twee dae afgeswaai en die sediment is in selhomogeniseringsmedium gehersuspendeer, waarna die media van elke tydspunt in twee verdeel is. Een helfte is slegs met 2% SDS gekook; terwyl die ander helfte met 2% SDS en 2% βME gekook is. Hierna is die twee helftes voorberei vir en onderwerp aan SDS-PAGE onder nie-reduserende en reduserende kondisies onderskeidelik.

In die tweede prosedure is hoeveelhede radio-aktiewe media met 'n gelyke volume koue media vermeng. Hierdie mengsels is vir 0, 4, 8, 16 en 24 uur onderskeidelik by 37°C gefinkubeer. Om die ensiemreaksies te termineer is 'n tiende volume protease-inhibeerders en $40 \mu\text{l}$ gedenatureerde kollageen ($7,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) by elke mediamengsel gevoeg, waarna die mengsels by -70°C gevries is. Die verdere analise is uitgevoer soos hierbo in die eerste benadering beskryf is.

Fluorogramme wat verkry is, is afgetas met behulp van 'n Biorad densitometer om die persentasie omsetting van $\text{pro}\alpha(\text{I})$ na $\text{pCa}(\text{I})$ te bepaal.

HOOFSTUK 4

SIFTING VAN PASIËNTE MET TIPE I OI

4.1 BENADERINGSWYSE

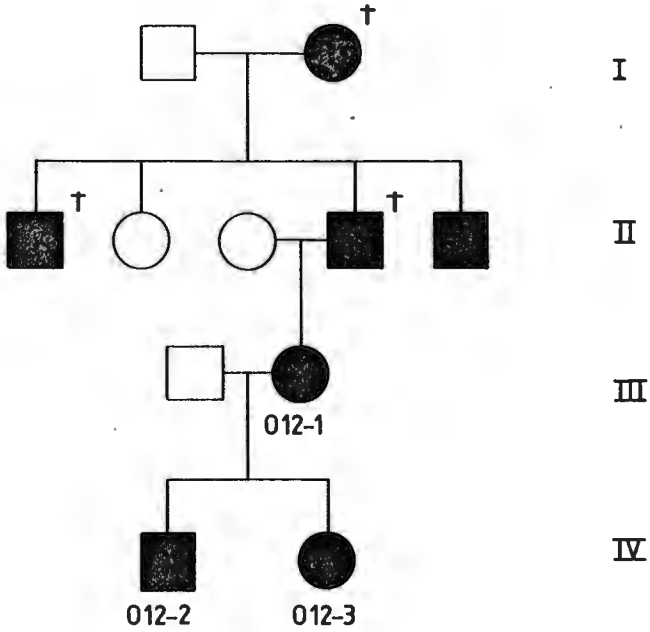
4.1.1 Keuse van pasiënte

Selektering van pasiënte is gedoen in samewerking met die Suid-Afrikaanse Brosbeenvereniging en die Afdeling Genetiese Dienste van die Departement van Gesondheid en Bevolkingsontwikkeling. Families met 'n dominante erflikheidspatroom is vir hierdie ondersoek gekies. Klinies presenteer die families almal as tipe I OI, waar die voorkoms van blou sklera as 'n nuwe-vereiste vir sodanige klassifikasie nagekom is. 'n Kort geskiedenis van die vyf families wat by die siftingsprogram betrek is, word vervolgens gegee.

4.1.2 Die families

4.1.2.1 Familie 012 (Figuur 4.1)

Die vader is nie 'n OI-pasiënt nie, terwyl die moeder sowel as die twee kinders tipe I OI vertoon. Dit was moontlik om die geskiedenis van die afwyking oor vier generasies te herlei. Die pasiënte het almal blou sklera, 'n opvallende dun velstruktuur en 'n vroeë geskiedenis van veelvuldige beenbreuke. Vervorming van die langbene sowel as van die borskasstruktuur kom ook voor. Velbiopsies van al drie pasiënte is geneem maar slegs die selle van die



FIGUUR 4.1 Verkorte stamboom van familie 012

○Vrouwlik □Manlik ●OI †Oorlede

dogter (012 - 3) is hier geanaliseer.

4.1.2.2 Familie 0181 (Figuur 4.2)

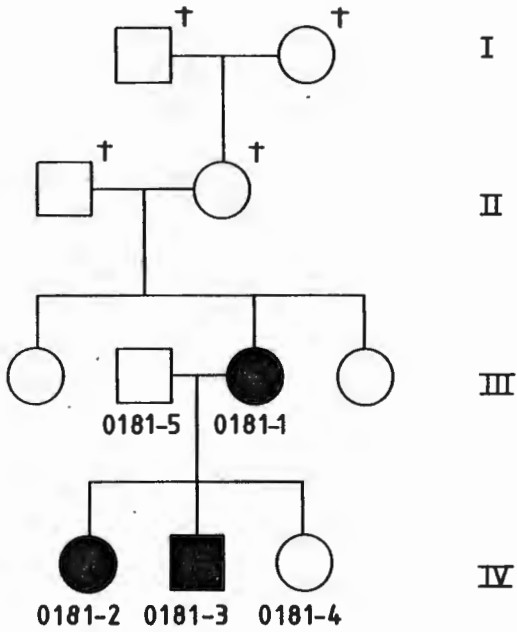
Die vader (0181 - 5) en een van die dogters (0181 - 4) is fenotipies normaal, terwyl die moeder (0181 - 1), 'n seun (0181 - 3) en 'n dogter (0181 - 2) tipe I OI vertoon. Die moeder is waarskynlik 'n nuwe mutant aangesien daar geen familiegeskiedenis van OI in vorige geslagte voorkom nie. Benewens 'n wisselende getal beenbreuke (32 vir 0181 - 3 en 5 vir 0181 - 2), vertoon die pasiënte blou sklera, tekens van presinieel doofheid en osteoporose. In teenstelling met die meeste OI-gevalle is die pasiënte van 'n normale lengte sonder enige opvallende vervorming van die borskasstruktuur of langbene. Fibroblastkulture van die hele gesin is hier geanaliseer.

4.1.2.3 Familie 2094 (Figuur 4.3)

Die vader is fenotipies normaal, terwyl die moeder (2094 - 1) en die enigste seun (2094 - 2) blou sklera, meervoudige beenbreuke, los gewrigte, presinieel doofheid, dun velstruktuur en 'n effens korter postuur as normaal vertoon. Die moeder het 'n geskiedenis van drie miskrame by twee verskillende eggenotes. Geen ernstige misvorming van die borskasstruktuur of langbene is waargeneem nie. 'n Velbiopsie is slegs van pasiënt 2094 - 1 geneem vir analise.

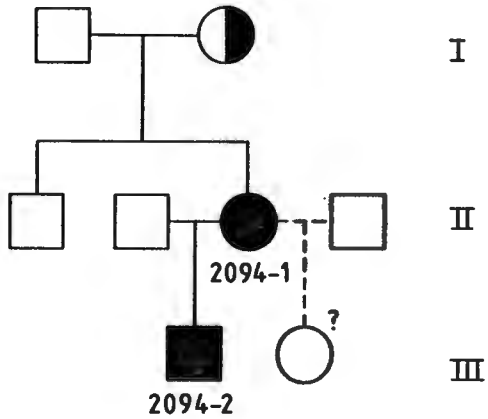
4.1.2.4 Familie 1500 (Figuur 4.4)

Die vader is fenotipies normaal, terwyl die moeder skynbaar 'n nuwe mutasie is. Geen aanduidings van OI kom in die vorige geslagte van die familie voor nie. Een van die kin-



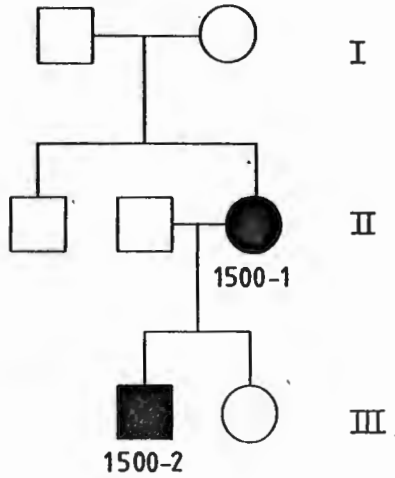
FIGUUR 4.2 Verkorte stamboom van familie 0181

○Vrouwlik □Manlik ●OI †Oorlede



FIGUUR 4.3 Verkorte stamboom van familie 2094

○Vroulik □Manlik ●OI ◐Milde fenotipiese aanduidings van OI sonder beenbreuke
 ? Fenotipe onbekend



FIGUUR 4.4 Verkorte stamboom van familie 1500

○Vroulik □Manlik ●OI ◐Milde fenotipiese aanduidings van OI sonder beenbreuke

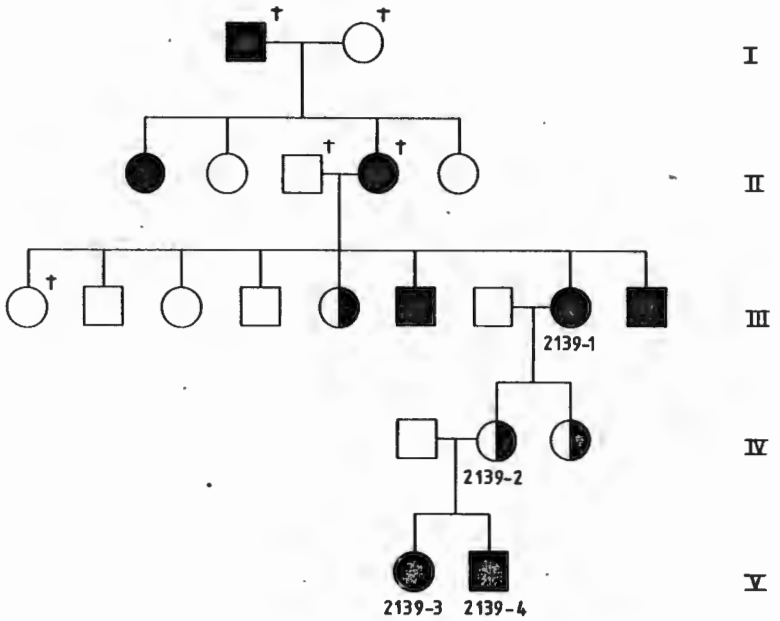
ders, 'n seun (1500 - 2) is aangetas, terwyl die dogter (1500 - 3) fenotipies normaal blyk te wees. Die moeder en seun vertoon blou sklera, verkorte postuur, verslaptel ligamente, veelvuldige beenbreuke en versteurde borskasstruktuur. Fibroblastkulture van slegs die moeder is hier ondersoek.

4.1.2.5 Familie 2139 (Figuur 4.5)

Die familiegeskiedenis verloop oor ten minste vyf generasies. Hiervan is drie generasies nog beskikbaar vir analise. 'n Opvallende kenmerk van die familietak is die variasie wat tussen die verskillende familieledede voorkom wat fenotipiese kenmerke betref. Die ouma (2139 - 1) se oorlede man was fenotipies normaal, terwyl die dogter (2139 - 2), benewens blou sklera en presinieel doofheid geen sigbare tekens van OI vertoon nie. Daarenteen presenteer beide die ouma sowel as die twee kleinkinders (2139 - 3 en 2139 - 4) as tipiese OI-pasiënte. Benewens blou sklera, 'n erg verkorte postuur, ernstige versteurde borskasstruktuur was daar 'n geskiedenis van meervoudige beenbreuke. 'n Velbiopsie van slegs pasiënt 2139 - 1 is geneem vir die opweek van fibroblastweefselkulture vir analise. 'n Meer uitvoerige toeligting van die familie word in Hoofstuk 7 en ook in Bylaag I gegee.

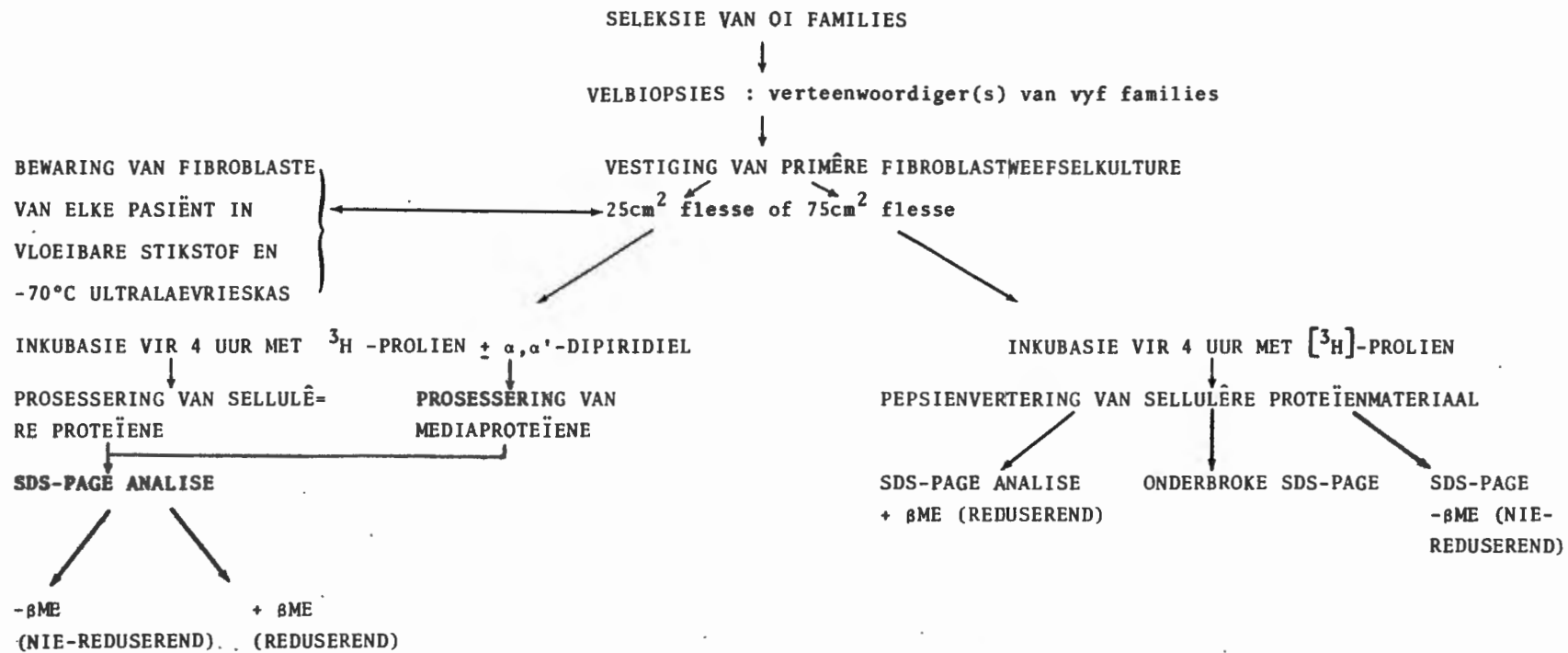
4.1.3 'n Oorsig van die siftingsprogram

'n Skematiese voorstelling van die siftingsprogram wat hier gevolg is, word in figuur 4.6 weergegee. Velbiopsies is verkry van die lede uit die families soos aangetoon in 4.1.2, sowel as van kontrole persone wat geen kollageenafwykings vertoon nie. Die velbiopsies is ge-



FIGUUR 4.5 Verkorte stamboom van familie 2139

○Vroulik □Manlik ●OI †Oorlede
 ●Milde fenotipiese kenmerke van OI son=
 der beenbreuke



FIGUUR 4.6 Vloeidiagram van die siftingsprogram wat gevolg is. Die samehang van die onderskeie stappe word in die teks toegelig (kyk afdeling 4.1.3), terwyl 'n gedetailleerde beskrywing van elke metodestap in hoofstuk 3 weergegee word.

bruik vir die vestiging van fibroblastweefselkulture soos in hoofstuk 3 beskryf is. 'n Belangrike oorweging vir die vestiging van sodanige weefselkulture is dat meerdere analises van die kollageen van elke individu gedoen moet word. Verder kan die fibroblastweefselkulture, nadat subkulture gevestig is, vir 'n onbepaalde tyd in vloeibare stikstof bewaar word. In hierdie siftingsprogram is van subkulture 3 - 7 gebruik gemaak.

Vir die radioaktiewe merking van nuutgesintetiseerde proteïene, is die fibroblaste vir 4 uur met [^3H]-proliën gefinkubeer. [^3H]-proliën is gebruik as radio-aktiewe merker aangesien proliën dikwels in die tripelheliese gebied van kollageen voorkom, sodat die radioaktiewe aminosuur oorwegend in prokollageen geïnkorporeer is. Inkubasie is gedoen in die teenwoordigheid van askorbiensuur en die afwesigheid van fetale kalfserum. Merking is verder ook in die aan- of afwesigheid van α, α' -dipiridiel gedoen aangesien α, α' -dipiridiel met Fe^{2+} cheleer. Fe^{2+} is 'n kofaktor van daardie ensieme wat betrokke is by die hidroksilering van Lys en Pro sodat Hyl en Hyp nie gevorm kon word nie. Pepsienvertering van sellulêre proteïenmateriaal en van mediaproteïene is ook uitgevoer. Sellulêre proteïenmateriaal sowel as mediaproteïene wat op die bogenoemde wyses verkry is, is deur middel van SDS-PAGE geanaliseer. Analise is gedoen onder reduserende of nie-reduserende kondisies. Daar is deurgaans gebruik gemaak van gradiënt-gelle.

Die benadering soos hierbo uiteengesit, wat saamgestel is om die tegnieke vir die identifisering van al die moontlike mutasies te akkomodeer, is gevolg. Die verskillende tegnieke is reeds met sukses deur verskeie navorsers aangewend vir die identifisering van die volgende tipes mutasies:

- (1) Delesies van 18 of meer aminosure in die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings (Barsh en Byers, 1981; Byers *et al*, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Cole *et al*, 1986).
- (2) Invoegings van 18 of meer aminosuurresidue in die pro α 1(I)-of pro α 2(I)-kettings (Byers *et al*, 1981c; Stolle *et al*, 1985).
- (3) Afwykings in die verhouding van pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings (De Wet *et al*, 1983a en 1983b; Barsh *et al*, 1982).
- (4) Oormodifisering van tipe I prokollageen (Kirsch *et al*, 1981; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Bateman *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984; Bonadio en Byers, 1985).
- (5) Teenwoordigheid van Cys-residue in die tripelheliese domein (Nicholls *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984).

4.2 RESULTATE VAN DIE SIFTINGSPROGRAM

4.2.1 Analise van ongeprosesseerde [^3H]-prolien-gemerke prokollageen

In die eerste rondte van die siftingsprogram is weefselkulture van die teikenpasiente in die teenwoordigheid van [^3H]-prolien, en in die teenwoordigheid of afwesigheid van α, α' -dipiridiel gefinkubeer. Na inkubasie is die sellulêre en mediaproteïene direk vir SDS-PAGE geprosesseer, aan SDS-PAGE onderwerp en fluorogramme van die akrielamiedgelle is verkry. Die resultate van hierdie

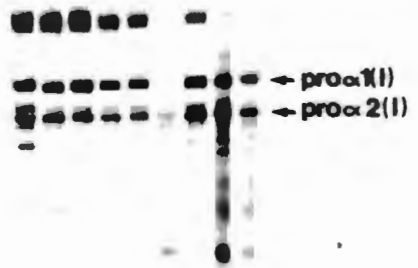
ondersoek word in figuur 4.7 tot 4.9 getoon.

Uit dit wat in afdeling 4.1.3 gesê is, sou die resultate wat sodoende verkry word van hierdie eerste rondte van die siftingsprogram tot die identifisering van die volgende tipes mutasies in tipe I prokollageen kan lei:

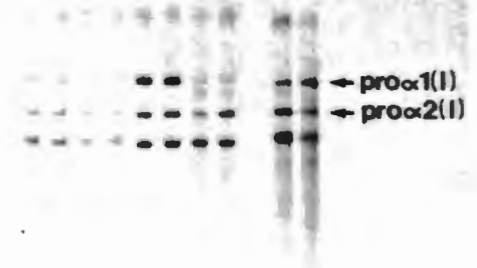
- (i) Delesies van ten minste 18 aminosuurresidue in pro α 1(I) of pro α 2(I).
- (ii) Invoegings in een van die twee kettings van tipe I prokollageen.
- (iii) Oormodifisering van die pro α 1(I)- en/of pro α 2(I)-kettings.
- (iv) Afwykings in verhoudings van die pro α 1(I)- tot pro α 2(I)-kettings.

In figuur 4.7 word die voorkoms van gereduseerde radio-aktiefgemerkte prokollageen in die media (A) en in die sellulêre kompartement (B) vervat. Vertraagde migrering van veral die pro α 1(I)-kettings en in 'n mindere mate die pro α 2(I)-kettings word vir al die pasiënte relatief tot die kontroles waargeneem. Stadiger migrering mag die gevolg wees van 'n groter molekulêre massa van die pro α 1(I)- of pro α 2(I)-kettings óf kan toegeskryf word aan 'n verandering in die aard van die SDS-protiefenkomplekse. Die eerste verskynsel is die gevolg van die invoeging van aminosuurvolgordes in die prokollageenkettings, soos verkry deur Byers *et al.* (1981c) en Stolle *et al.* (1985). Dit is ook welbekend dat stadiger migrering in die afwesigheid van α, α' -dipiridiel die gevolg van oorhidroksilering van prokollageen is. Dit lei tot 'n verandering in die interaksie tussen SDS en die protefene sodat die elektrofore-

A
1 2 3 4 5 6 7 8 9



B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



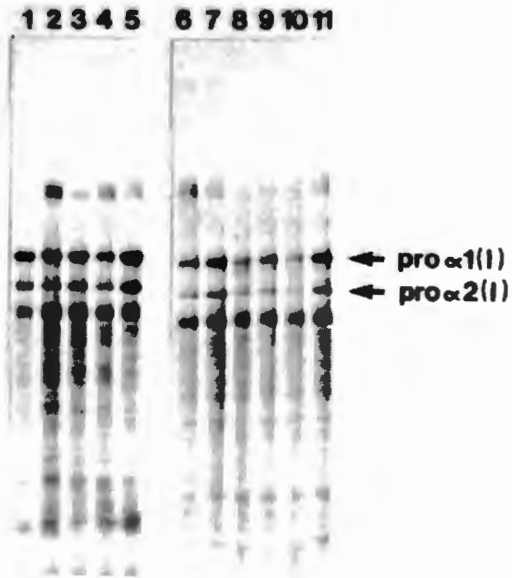
FIGUUR 4.7 Voorkoms van prokollageen in die media (A) en sellulêre komponent (B) van [^3H]-prolien-gemerkte fibroblaste na SDS-PAGE. Verteenwoordigende bane van al die pasiënte wat in die siftingsprogram betrek is, word getoon. Fibroblastweefselkulture is in 25cm^2 flessies in die teenwoordigheid van $50 \mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5- ^3H]-prolien en $50 \text{mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ askorbiensuur, en in die afwesigheid van α, α' -dipiridiel en fetale kalfserum gemerk. Na 'n merkingsperiode van 4 uur is die media onttrek en by 'n tiende volume protease-inhibeerders (afdeling 3.3.2) gevoeg. Die mediaproteïene is gepresipiteer met 30% ammoniumsulfaat en in 'n Eppendorfsentrifuge afgeswaai. Laasgenoemde twee stappe is by 4°C uitgevoer. Hierna is die sediment in $90 \mu\ell$ selhomogeniseringsmedium (afdeling 3.3.2) gehersuspendeer en voorberei vir elektroforese soos beskryf in afdeling 3.3.2. Die sellae is in $500 \mu\ell$ selhomogeniseringsmedium geskraap, gehomogeniseer en in die teenwoordigheid van 2% SDS en 2% βME gekook. Die monsters is voorberei vir elektroforese soos beskryf in afdeling 3.3.2 en is hierna vir 16 uur by 60V op 'n 4 - 8% SDS-poliakriëlamiedgel geëlektrofoereer. Fluorografie van die gelle is volgens die metode van Laskey en Mills (1975) uitgevoer op Cronex 4 X-straal film.

A: baan 1 2139 - 1, baan 2 01481 (kontrole),
baan 3 2094 - 1, baan 4 0181 - 4 (kontrole),
baan 5 0181 - 3, baan 6 0181 - 5 (kontrole),
baan 7 1500 - 1, baan 8 01481, baan 9 012 - 3
 B: baan 1 0181 - 2, baan 2 0181 - 4 (kontrole)
baan 3 2094 - 1, baan 4 01481 - 4 (kontrole)
baan 5 2139 - 1, baan 6 1500 - 1, baan 7
 0181 - 3 (kontrole), baan 8 0181 - 3, baan 9
 012 - 3, baan 10 0181 - 5 (kontrole)

tiese mobiliteit van die SDS-protiefenkomplekse afneem. Ten einde tussen hierdie twee verskynsels te onderskei word merking in die teenwoordigheid van α, α^1 -dipiridiel uitgevoer. Hierdeur word hidroksilering opgehef. Die resultaat van só 'n ondersoek word in figuur 4.8 gegee.

Uit die resultaat verkry in figuur 4.8 is dit duidelik dat, behalwe vir die pro α 2(I)-ketting van pasiënt 2139 - 1, die verlaagde mobiliteit relatief tot die kontroles, opgehef is. Dit impliseer dat die veranderde mobiliteit van die pro α 1(I)-en pro α 2(I)-kettings gesien in figuur 4.7 'n oorhidroksilering van tipe I prokollageen reflekteer. Geen bewys vir invoegings is in figuur 4.8 gevind nie.

Aanduidings van abnormale verhoudings van pro α 1(I) tot pro α 2(I) kan in figuur 4.7A en B vir verskillende pasiënte gesien word. Deur visuele inspeksie van figuur 4.7A kan 'n verhouding van ongeveer 1:1 vir die pro α 1(I) tot pro α 2(I) vir pasiënt 012 - 3 (Baan 1) waargeneem word. Dit wyk af van die normale verhouding van 2:1 wat verwag word. 'n Herhaling van hierdie resultaat is nie weer in verdere ondersoeke gesien nie. In figuur 4.7B kan daar weer eens 'n verhouding van ongeveer 1:1 vir die pro α 1(I)-tot pro α 2(I)-kettings vir pasiënte 0181 - 2 en 0181 - 3 ('n suster en broer) waargeneem word (Bane 1 en 8). Soms was dit moontlik om 'n dubbelband in die pro α 1(I)-gebied vir hierdie pasiënte te onderskei. 'n Voorbeeld hiervan kan in figuur 4.7B vir pasiënt 0181 - 2 (Baan 1) gesien word. Die dubbelband mag dui op 'n verlaagde voorkoms van pro α 1(I), sodat die naasliggendmigrerende pro α 1(III) as die bykomende band identifiseerbaar is. Verdere analyses van hierdie sellyne op dieselfde wyse het 'n variasie in die voorkoms van die veranderde verhouding getoon. Die verhouding het gewissel van normaal tot 1:1.



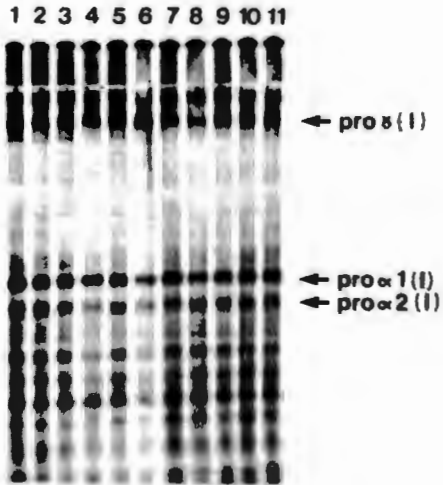
FIGUUR 4.8 Fluorografie van ongeprosesseerde sellulêre prokollageen. Die selle is soos vir figuur 4.7 geïnkubeer en geprosesseer vir 4 - 8 h SDS-PAGE, behalwe dat die merkingsmedia 0,3 mM α, α' -dipiridiel bevat het. Fluorografie is op Cronex 4 X-straalfilm uitgevoer.

baan 1 1500 - 1, baan 2 0181 - 4 (kontrole),
baan 3 012 - 3, baan 4 01481 (kontrole),
baan 5 2139 - 1, baan 6 01481 (kontrole)
baan 7 012 - 3, baan 8 0181 - 4 (kontrole),
baan 9 0181 - 3, baan 10 0181 - 5 (kontrole),
baan 11 0181 - 2.

In figuur 4.7B word daar verder opgemerk dat die pro α 2(I)-kettings van pasiënt 2139 - 1 (baan 5) vinniger migreer relatief tot die kontrole. 'n Verbreding van die pro α 2(I)-band kan in die teenwoordigheid van α, α' -dipiridiel steeds waargeneem word (figuur 4.8 Baan 5). Aangesien daar nie 'n dubbelband onderskei kan word nie, kan daar nie uit hierdie resultaat alleen bepaal word of die verbreding voorkom as gevolg van 'n deleisie in die pro α 2(I)-ketting of as gevolg van die komigrering van normale pro α 2(I)-kettings met 'n ander proteïene nie.

Dit is belangrik om daarop te wys dat analyses soos dié in figuur 4.7 en 4.8 nie tussen vrye en geassosieerde prokollageenpeptiede kan onderskei nie. Disulfiedbrûe in die C-propeptiede koppel die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings kovalent. Behandeling van die proteïene met β ME tydens voorbereiding vir SDS-PAGE soos in figuur 4.7 en 4.8 lei tot 'n verbreking van die disulfiedbrûe. 'n Meer geskikte metode om geassosieerde en vrye prokollageen-kettings te ondersoek, is om die analise onder nie-reducerende kondisies uit te voer.

Nadere ondersoek van die fluorogram in figuur 4.9 toon dat geen noemenswaardige verskille in die skeidingspatrone van die kontroles en pasiënte waargeneem kan word nie. Onderskeid tussen geassosieerde kettings in die vorm van pro γ (I)-prokollageen en vrye pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings is wel moontlik. In die geval van die pasiënte sowel as die kontroles is beduidende hoeveelhede ongeassosieerde pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings sigbaar. 'n Kwantifisering om die relatiewe verhoudings van pro γ (I), pro α 1(I) en pro α 2(I) te bepaal is weens die hoë radio-aktiwiteits-agtergrond van hierdie tipe gelle nie uitvoerbaar nie. Dat 'n gedeelte van die prokollageenkettings ongeassosieerd mag voorkom, is reeds deur Williams en Prockop (1983) en Deak *et al* (1983) waargeneem. Die meeste



FIGUUR 4.9 Fluorogram van [^3H]-proliengemerkte sellulêre proteïene wat onder nie-reduserende kondisies geskei is ter onderskeiding van vrye en geassosieerde prokollageenkettings. Fibroblastweefselkulture is in 25cm^2 flessies op dieselfde wyse as vir figuur 4.7 gemerk en geprosesseer, behalwe dat geen BME in enige voorbereidingsproses vir elektroforese gebruik is nie. Jodo-asetamied, tot 'n finale konsentrasie van 100 mM, is by die dialisebuffer gevoeg. Elektroforese en fluorografie is gedoen soos beskryf in figuur 4.7.

baan 1 2094 - 1, baan 2 1500 - 1, baan 3 012 - 3,
baan 4 01481 (kontrole), baan 5 2139 - 1,
baan 6 0181 - 5 (kontrole), baan 7 0181 - 1,
baan 8 0181 - 4 (kontrole), baan 9 0181 - 3,
baan 10 0181 - 4 (kontrole), baan 11 0181 - 2.

prokollageenkettings het egter in die vorm van $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ -molekules of aggregate daarvan voorgekom, sodat geen bewys vir 'n mutasie van die tipe, soos beskryf deur Deak *et al* (1983), gevind is nie.

Ten opsigte van die resultate in figuur 4.7 tot 4.9 kan die volgende afleidings ten opsigte van drie pasiënte uit twee families gemaak word. Die dubbelband wat in die geval van pasiënte 0181 - 2 en 0181 - 3 waargeneem is mag, soos reeds genoem, die gevolg wees van 'n verlaagde voorkoms van $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$. Die $\text{pro}\alpha 1(\text{III})$ word normaalweg net as 'n skouer van die $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ -band waargeneem en word gewoonlik oorheers deur die veel hoër teenwoordigheid van $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$. In die geval van pasiënt 2139 - 1 mag 'n verkorting van die $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -ketting voorkom, soos gesien uit die vinniger migrering en/of afwaartse verbreding van die $\text{pro}\alpha 2(\text{I})$ -band.

Om hierdie twee verskynsels verder te kon ondersoek, is die radioaktiefgemerkte prokollageen van dié pasiënte aan pepsienbehandeling onderwerp voor SDS-PAGE.

4.2.2 Analise van gepepsineerde [^3H]-prolien-gemerkte proteïenmateriaal

4.2.2.1 Inleiding

In teenstelling met die globulêre N- en C-propeptiede, is die sentrale tripelheliese domein van die fibrillêre kollagene weerstandbiedend teen milde proteolitiese behandeling, mits die kettings in die $\text{pro}\alpha$ -vorm voorkom. Milde behandeling van $\text{pro}\alpha 1(\text{I})$ - molekules met pepsien of 'n mengsel van tripsien en chimotripsien lei daarom tot die

proteolitiese verwydering van nie-tripelheliese volgordes (Sykes *et al*, 1976; Bruckner *et al*, 1981). Hierdie selektiewe verwydering van die propeptiede om pro α -kettings in α -kettings te omvorm, is deur 'n aantal outeurs benut in die identifisering en verdere analise van mutante prokol-lageen. Voorbeelde hiervan is soos volg:

- (1) Verkorting van pro α -kettings tot α -kettings vergroot die relatiewe bydrae van delesies tot die totale peptiedgrootte, sodat die delesies makliker identifiseerbaar sal wees (Williams en Prockop, 1983; De Wet *et al*, 1983a, Sippola *et al*, 1984).
- (2) Gemuteerde tripelheliese gebiede in die pro γ -vorm mag meer sensitief vir proteolise wees aangesien stabiele tripelheliksvorming nie in die gemuteerde gebied of aan die N-terminale kant van die gemuteerde gebied kan plaasvind nie. 'n Voorbeeld van die splyting van tripelheliese volgordes in gemuteerde pro α -molekules is beskryf deur Williams en Prockop (1983). So sal dit byvoorbeeld moontlik wees om mispassing tussen die tripelheliese domeins van die individuele pro α -kettings in die pro γ -vorm langs hierdie weg te identifiseer.
- (3) Pro γ (I) is disulfiedgebonde deur middel van die C-propeptiede van die pro α 1(I)- en pro α 2(I)-kettings. In die γ -vorm is α 1(I)-kettings nie disulfiedgebonde nie, terwyl die α 1(III)-kettings steeds deur disulfiedbrûe in die tripelheliese domein kovalent gekoppel is. Soos reeds genoem, kan pro α 1(I)- en pro α 1(III)-kettings moeilik met behulp van SDS-PAGE van mekaar onderskei word. Daarenteen is dit moontlik om met behulp van onderbroke elektroforese of elektroforese onder nie-reducerende kondisies α 1(I)- en α 1(III)-

kettings duidelik van mekaar te skei (Sykes *et al*, 1976). Sodoende is die verhouding van tipe I tot tipe III meer geredelik bepaalbaar.

- (4) 'n Disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -dimeer is deur Steinmann *et al* (1984) en Nicholls *et al* (1984) aangetoon. Dié Cys-bevattende dimeer word slegs waargeneem ná pepsienbehandeling met daaropvolgende skeiding deur middel van SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies. Onderbroke elektroforese lei ook tot die skeiding van sodanige dimeer van $\alpha 1(I)$ en $\alpha 1(III)$.

Na aanleiding van die vier punte hierbo genoem is proteïenmateriaal van pasiënt 2139 - 1 en 0181 - 2 aan pepsienbehandeling onderwerp. SDS-PAGE analise is gedoen en fluorogramme so verkry is ondersoek vir:

1. die moontlike voorkoms van verkorte $\alpha 2(I)$ -kettings in die geval van pasiënt 2139 - 1 en
2. moontlike verhoudingsvariasies van $\alpha 1(I)$ tot $\alpha 2(I)$, sowel as die identiteit van die waargenome dubbelband in die geval van pasiënt 0181 - 2.

4.2.2.2 Analise van gereduseerde gepepsineerde materiaal

'n Bykomende band wat vinniger as die normale $\alpha 2(I)$ -band migreer kan steeds na pepsienbehandeling onder reducerende kondisies vir pasiënt 2139 - 1 waargeneem word (figuur 4.10). Hierdie band mag 'n verkorte $\alpha 2(I)$ -ketting verteenwoordig, maar kom nie tot dieselfde mate as die normale $\alpha 2(I)$ voor nie. Aangesien 'n meer normale verspreiding van die normale en verkorte kettings verwag word, is die bykomende vinnige

FIGUUR 4.10 SDS-PAGE van pepsienbehandelde [^3H]-prolienge-merkte sellulêre proteïenmateriaal. Fibroblastweefselkulture is in 75cm^2 flesse vir 4 uur met $100 \mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ^3H]-proliën onder standaardkondisies gemerk. Soos beskryf in afdeling 3.4.1, is die sellag vir 20 minute in PBS by 20°C gefinkubeer, waarna die sellag in $1 \text{ m}\ell$ selhomogeniseringsmedium geskraap en gehomogeniseer is. 'n Gelyke volume $0,2 \text{ M}$ asynsuur is by die homogenaat gevoeg en die pH is ingestel tot $\text{pH} 2 - 3$ met 6N HCl . Hierna is $200 \mu\ell$ pepsien ($1\text{mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$) by die selhomogenaat gevoeg en vertering is vir 2 uur by 18°C uitgevoer. Die reaksie is getermineer deur die toevoeging van 1 M NaOH tot 'n pH van $7 - 8$. Vervolgens is die mengsel oornag by 4°C gelaat. Daarna is elektroforese en fluoroografie van die pepsienbehandelde materiaal uitgevoer soos beskryf in figuur 4.7.

baan 1 1500 - 1, baan 2 0181 - 5 (kontrole),
baan 3 2139 - 1, baan 4 0181 - 5 (kontrole),
baan 5 0181 - 3.

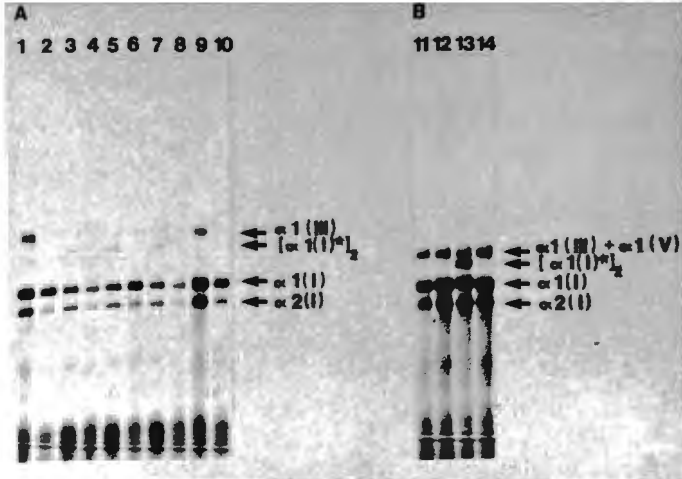
migrerende band waarskynlik nie 'n gemuteerde $\alpha 2(I)$ -ketting nie. Uit die familiediagram is dit duidelik dat die pasiënt 'n heterosigoot is, en Sippola *et al* (1984) het getoon dat 'n eweredige verspreiding van normale en gemuteerde $\alpha 1(I)$ -kettings in 'n heterosigoot voorkom. 'n Verdere verbreding van die $\alpha 1(I)$ -band, wat aan oorhidroksilering toegeskryf kan word, kan ook waargeneem word.

Verder was dit nie moontlik om uit die resultaat, soos getoon in figuur 4.10, 'n afleiding te maak aangaande die verhouding vandie $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 2(I)$ -kettings in fibroblaste van pasiënt 0181 - 2 nie. Die $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 1(III)$ -kettings komigreer steeds onder hierdie kondisies. Ten einde 'n skeiding tussen $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 1(III)$ -kettings te bewerkstellig, is van onderbroke elektroforese gebruik gemaak.

4.2.2.3 Onderbroke elektroforese van pepsien-behandelde protefenmateriaal

Onderbroke elektroforese is uitgevoer soos beskryf in hoofstuk 3 (vergelyk 3.4.1). Verteenwoordigende resultate word in die vorm van twee fluorogramme in figuur 4.11 getoon. Uit hierdie resultate kon afgelei word dat normale verhoudings van $\alpha 1(I)$ tot $\alpha 2(I)$ vir pasiënt 0181 - 2 en 0181 - 3 wel teenwoordig is. Hierdie analyses is in 'n onafhanklike ondersoek herhaal en dieselfde resultaat is verkry (Opperman, D.P.J., ongepubliseerde data). Die oorspronklike afwykende verhouding van 1:1 wat waargeneem is, was dus 'n vals positiewe resultaat.

'n Dramatiese resultaat is egter vir pasiënt 2139 - 1 na onderbroke elektroferese waargeneem. In figuur 4.11A en B kan 'n duidelike bykomende band waargeneem word, wat nie by die kontroles òf by die ander pasiënte voorkom nie.



FIGUUR 4.11 Onderbroke elektroforese van pepsienbehandelde [^3H]-proliengemerkte sellulêre protefene.

Merking en pepsienbehandeling is gedoen soos beskryf in figuur 4.10 en afdeling 3.4.1, behalwe dat verdere voorbereiding vir elektroforese in die afwesigheid van βME uitgevoer is. Hierna is die sellulêre protefenmateriaal op een van die volgende twee wyses deur middel van 4 - 8% SDS-PAGE geskei:

A : Die materiaal is vir 2 uur by 100V geskei, waarna die elektroforeseproses onderbreek, die putte met 10% βME in elektroforesebuffer gevul en vir 1 uur gelaat is. Ná die impregneringsstap is die materiaal verder vir 11 uur by 50V geskei.

B : Die ongereduseerde sellulêre materiaal is vir 90 minute by 120V geskei, waarna die elektroforeseproses onderbreek en die gel vir 1 uur met 10% βME gefimpregneer is. Hierna is die gereduseerde sellulêre materiaal vir 'n verdere 10 uur by 50V geskei.

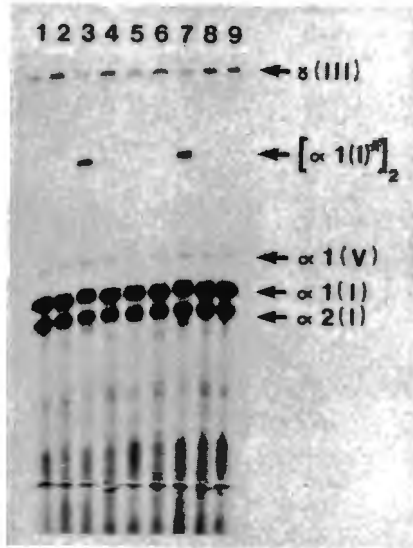
baan 1 0181 - 1, baan 2 01481 (kontrole),
baan 3 2139 - 1, baan 4 0181 - 4 (kontrole),
baan 5 2139 - 1, baan 6 01481 (kontrole),
baan 7 2139 - 1, baan 8 0181 - 4 (kontrole)
baan 9 012 - 3, baan 10 01481 (kontrole),
baan 11 0181 - 3, baan 12 1500 - 1, baan 13
 2139 - 1, baan 14 0181 - 5 (kontrole).

Die kettings migreer vinniger as die normale $\alpha 1(\text{III})$ -kettings en stadiger as die $\alpha 1(\text{I})$ -kettings. Variasies in die elektroforesekondisies, voor en na redusering, lei daartoe dat die presiese migrasieposisie van die bykomende band relatief tot $\alpha 1(\text{I})$ verskil van gel tot gel. Die mobiliteit van die bykomende band word duidelik volgens die resultaat in figuur 4.11 tot dieselfde mate as die $\alpha 1(\text{III})$ -band beïnvloed. 'n Verdere belangrike waarneming is dat die band wat onder reduserende kondisies effens vinniger as $\alpha 2(\text{I})$ migreer, na onderbroke elektroforese nie meer sigbaar is nie.

Om die aard van die bykomende band verder te kan ondersoek, is pepsienbehandelde materiaal van pasiënt 2139 - 1, 1500 - 1 en 'n kontrole vervolgens onder nie-reduserende kondisies aan SDS-PAGE onderwerp.

4.2.2.4 Analise van ongereduseerde gepepsineerde materiaal

Duidelike skeiding van $\alpha 1(\text{V})$, $\alpha 1(\text{I})$ en $\alpha 2(\text{I})$ -bande word verkry (figuur 4.12). Die $\alpha 1(\text{III})$ -kettings is steeds disulfiedbruggebonde en migreer daarom in die vorm van $\gamma(\text{III})$ -molekules. Vir pasiënt 2139 - 1 is die bykomende band, met 'n Mr-waarde van 200 Kd, steeds duidelik sigbaar tussen $\gamma(\text{III})$ en $\alpha 1(\text{V})$. 'n Vergelyking van die fluorogramme in figuur 4.11 en 4.12 toon ook dat die verskil in die migrering van die $\alpha 1(\text{III})$ -band en die bykomende band meer opvallend is onder nie-reduserende kondisies. Figuur 4.11 en 4.12 is verteenwoordigend van resultate wat na drie onafhanklike selmerkings verkry is.



FIGUUR 4.12 Fluorogram van pepsienbehandelde sellulêre proteïene na skeiding met behulp van SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies. Merking, pepsienbehandeling en voorbereiding vir elektroforese, in die afwesigheid van β ME, is uitgevoer soos beskryf in figuur 4.10 en afdeling 3.4.1. Elektroforese en fluorografie is uitgevoer soos beskryf in figuur 4.7.

baan 1 1500 - 1, baan 2 0181 - 5 (kontrolê)
baan 3 2139 - 1, baan 4 0181 - 5 (kontrolê)
baan 5 1500 - 1, baan 6 0181 - 5 (kontrolê),
baan 7 2139 - 1, baan 8 0181 - 5 (kontrolê),
baan 9 1500 - 1

4.3 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is twee belangrike waarnemings gemaak. In die eerste plek is oorhidroksilering van tipe I kollageen vir pasiënte van al vyf die families waargeneem. Oorhidroksilering word algemeen aanvaar as 'n aanduiding van abnormale kollageenmetabolisme as gevolg van 'n strukturele afwyking van die kollageen. Die tweede waarneming wat gemaak is, is die voorkoms van 'n addisionele band in pepsienbehandelde materiaal van pasiënt 2139 - 1 na SDS-PAGE onder nie-reduserende kondisies. Daar kan aanvaar word dat die bykomende band 'n disulfiedgebonde entiteit verteenwoordig. Dit volg daaruit dat die bykomende band nie sigbaar is onder reduserende kondisies, waar disulfiedbrûe vernietig word, nie. Onder nie-reduserende kondisies word die kovalente koppeling deur middel van disulfiedbrûe egter behou. Die aard van die materiaal in die bykomende band word in hoofstuk 5 verder toegelig.

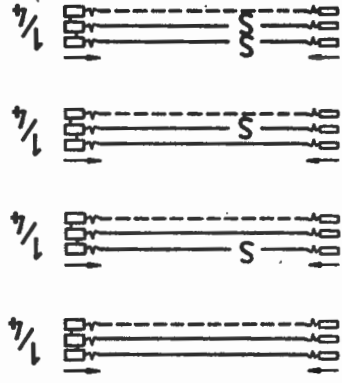
HOOFSTUK 5

KARAKTERISERING VAN DIE BYKOMENDE BAND EN BEPALING VAN DIE LOKALITEIT VAN DIE MUTASIE

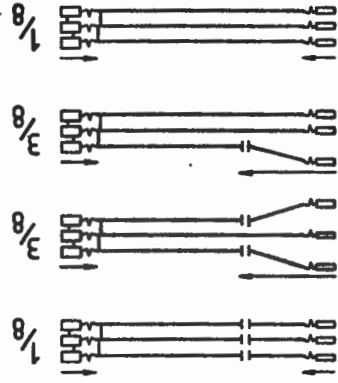
5.1 INLEIDING

Twee moontlike modelle kan voorgestel word om die voorkoms van die addisionele band, met 'n Mr-waarde van 200Kd, in elektroforetogramme van gepepsineerde, ongereduseerde sellulêre of mediaproteïene van pasiënt 2139 - 1 te verklaar:

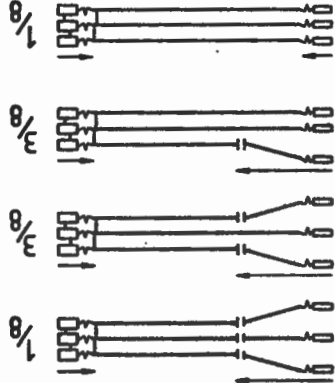
Die bykomende band mag 'n pepsiensensitiewe vorm van γ (III) wees (figuur 5.1, model A en B). Indien een van die twee allele vir pro α 1(III) gemuteerd is, sal gelyke hoeveelhede normale en abnormale kettings gesintetiseer word. Inkorporering van een, twee of drie gemuteerde pro α 1(III)-kettings in tipe III trimere lei tot 'n verstoring in tripelheliksvorming N-terminaal vanaf die punt van die mutasie. Ontvouing van die tripelheliks in dié gebied mag voorkom (figuur 5.1, model A). Die N- en C-terminale propeptiede, sowel as die ontvoude N-terminaalgebied, word deur pepsienbehandeling verwyder. Sewe-agtstes van die resulterende tripelhelikse sal daarom verkort word. Die verkorte γ (III)-vorm mag 'n verklaring bied vir die waargenome bykomende band. 'n Alternatiewe voorstelling is dat 'n gelokaliseerde mispassing van die gemuteerde pro α 1(III)-kettings ten opsigte van die normale pro α 1(III)-kettings voorkom (model B). Ontvouing van die gebied N-terminaal vanaf die mispassing mag voorkom in trimere wat een of twee gemuteerde kettings bevat. 'n Verhoogde sensitiwiteit van hierdie twee vorme van tipe III proteïene



C



B



A

FIGUUR 5.1 Skematiese voorstelling van drie verskillende modelle wat in afdeling 5.1 as vertrekpunt vir die bepaling van die aard van die mutasie in pasiënt 2139 - 1 voorgehou word.

A: 'n Mutasie in pro α 1(III)-kettings lei tot 'n ontvouing van die gebied N-terminaal van die mutasie in tipe III trimere wat een of meer gemuteerde pro α 1(III)-kettings bevat.

B: 'n Gelokaliseerde mispassing in gemuteerde tipe III prokollageen lei tot die ontvouing van die gebied N-terminaal van die mispassing in tipe III trimere wat een of twee gemuteerde pro α 1(III)-kettings bevat.

C: Die teenwoordigheid van 'n sisteïenresidu in die tripelheliese domein van pro α 1(I)-kettings lei tot die vorming van tipe I trimere wat normale pro α 2(I)-kettings sowel as óf twee normale pro α 1(I)-kettings óf een normale en een gemuteerde pro α 1(I)-ketting óf twee gemuteerde pro α 1(I)-kettings bevat.

Die pyle dui die omvang van pepsienvertering op die prokollageen aan. Die breuke verteenwoordig teoretiese waardes vir die relatiewe verhoudings waarin die verskillende moontlike prokollageenmolekules saamgestel kan word uit mutante en normale prokollageenkettings.

lageen vir proteolitiese ensieme mag lei tot die verwydering van die ontvoude gebied na pepsienbehandeling. Trimere wat uit drie gemuteerde pro α 1(III)-kettings bestaan vorm normale tripelhelikse waarvan slegs die N- en C-propeptiede deur pepsien verwyder word. Ses-agtstes van die trimere sal derhalwe in die verkorte γ (III)-vorm voorkom, wat as 'n verklaring vir die bykomende band mag dien.

In model C (figuur 5.1) word voorgestel dat 'n sistefen residu in die tripelheliese domein van die helfte van die pro α 1(I)-kettings teenwoordig is. Inkorporasie van geen, een of twee Cys-bevattende pro α 1(I)-kettings in tipe I prokollageen is dus moontlik. Waar twee Cys-bevattende pro α 1(I)-kettings in die trimeer voorkom, word 'n disulfiedbrug gevorm. Pepsinering gevolg deur behandeling met SDS sal tot vrye α 1(I)-kettings sowel as α 1(I)-dimere lei. Onder nie-reducerende kondisies sal die α 1(I)-dimere vinniger as γ (III) in poliakriëlamiedgelle migreer, maar stadiger as vrye normale en gemuteerde α 1(I)-kettings. Die voorkoms van 'n α 1(I)-dimeer mag 'n verklaring bied vir die bykomende band wat in pepsienbehandelde proteïenmateriaal waargeneem is. (Vergelyk ook Nichols *et al*, 1984 en Steinmann *et al*, 1984).

Om tussen model A en model B en C te kan onderskei, is vasgestel of die mutasie in die pro α 1(III)- of die pro α 1(I)-ketting voorkom.

5.2 INVLOED VAN VARIËRENDE KONDISIES VIR PROTEOLITIESE VERTERING OP DIE BYKOMENDE BAND

Alvorens vasgestel kon word of die mutasie in die pro α 1(I)- of die pro α 1(III)-ketting voorkom, moes daar eers bepaal word of die bykomende band nie 'n artefakt van proteolitiese behandeling is nie. Dit is gedoen deur die eksperimentele

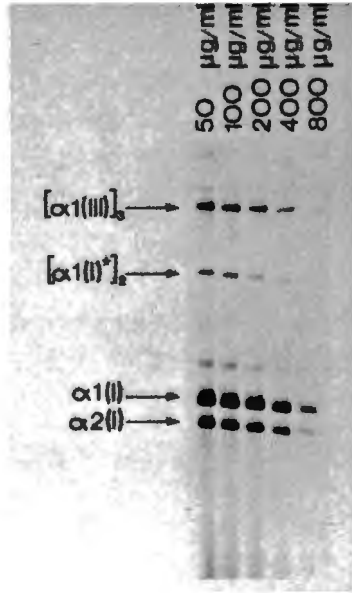
kondisies van pepsienvertering te varieer, en deur gebruik te maak van tripsien en chimotripsien vertering.

In die eerste plek is pepsienvertering vir twee uur by 18°C uitgevoer met 'n wisseling in die pepsienkonsentrasie. Die eindkonsentrasie is gewissel van 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tot 800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, met telkens 'n verdubbeling van elke konsentrasie-inkrement. Daarna is die materiaal aan SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies onderwerp (figuur 5.2).

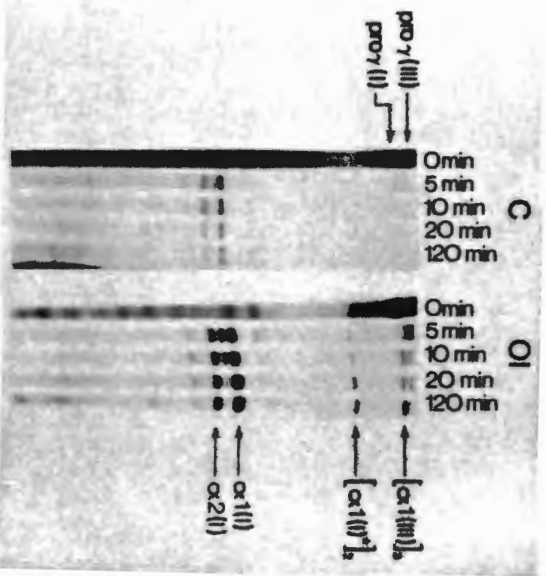
'n Omgekeerd eweredige verhouding tussen die pepsienkonsentrasie en die mate waartoe die bykomende band behoue bly, kan in figuur 5.2 gesien word. Dieselfde tendens word ook vir $\gamma(\text{III})$, en die $\alpha 1(\text{I})$ - en $\alpha 2(\text{I})$ -bande waargeneem. Verder is dit uit die figuur duidelik dat 'n eindkonsentrasie van 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pepsien optimaal is vir die vertering van pasiënt 2139 - 1 se prokollageen. Daarom is dié eindkonsentrasie in die res van die analyses gebruik.

Vervolgens is pepsienvertering by 18°C met wisselende inkubasietye uitgevoer. Figuur 5.3 toon dat die bykomende band toenemend waarneembaar word met toename in inkubasietyd. 'n Toename in die waarneembaarheid van $\gamma(\text{III})$, $\alpha 1(\text{I})$ - en $\alpha 2(\text{I})$ -bande met toename in inkubasietyd kan ook in die resultaat, vir sowel die kontrole as vir pasiënt 2139 - 1, gesien word. Inkubasietye langer as 120 minute het geen merkbare effek op die bykomende - of normale bande gehad nie.

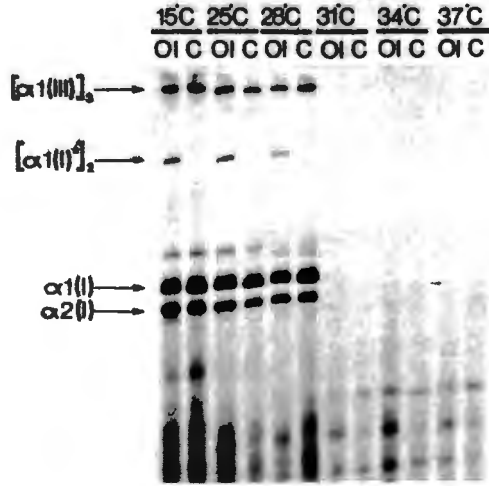
Verder is die temperatuur waarby die pepsienvertering uitgevoer is, gewissel (figuur 5.4). 'n Toename in die temperatuur vir pepsinering het duidelik gelei tot 'n afname



FIGUUR 5.2 Die effek van toenemende pepsienkonsentrasies op die omvorming van prokollageenkettings tot $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ en die bykomende band. Fibroblastweefselkulture is onder standaard= kondisies met $100 \mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ^3H]-prolien gemerk, waarna dit voorberei is vir pepsien= vertering soos beskryf is in afdeling 3.4.1 en figuur 4.10. Die selhomogenate is hierna in vyf deelvolumes van $200 \mu\ell$ elk verdeel. n Tiende volume van n $0,5 \text{ mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$; $1 \text{ mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$; $4 \text{ mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ en $8 \text{ mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ pepsienoplossing is onderskeidelik tot finale konsentrasies van $50 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$; $100 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$; $200 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$; $400 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ en $800 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ by die vyf deel= volumes gevoeg. Pepsinerig en SDS-PAGE, in die afwesigheid van βME , is uitgevoer soos beskryf in figuur 4.10. Fluorografie is op Kodak XAR 5 film uitgevoer.



FIGUUR 5.3 Die tydsafhanklike omvorming van prokollageen tot $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ en die bykomende band in die teenwoordigheid van pepsien. Selhomogenate is in die teenwoordigheid van $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ pepsien by 18°C vir die aangeduide tydsintervalle geïnkubeer. Na elke tydsinterval is die reaksie getermineer deur die toevoeging van 1M NaOH tot 'n pH van 7 - 8. Die kondisies vir die analise was soos in figuur 5.2. OI dui op pasiënt 2139 - 1, terwyl C op die kontrole 0181 - 5, dui.

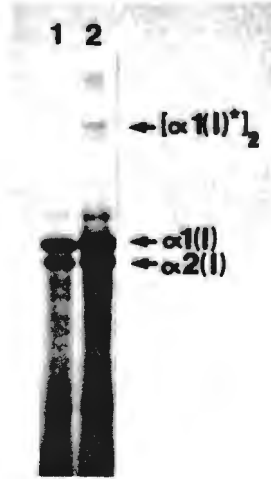


FIGUUR 5.4 Temperatuurafhanklike omvorming van prokol-
lageenkettings tot $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ en die by-
komende band. Selhomogenate is in die teen-
woordigheid van $100 \mu\text{g}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ pepsien vir 2 uur
by die aangeduide temperature gefinkubeer.
Die samestelling en analise van die reaksie-
mengsels is uitgevoer soos in figuur 5.2.
OI dui op pasiënt 2139 - 1, terwyl C op kon-
trole 0181 - 5, dui.

in die voorkoms van die bykomende band sowel as van die $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - en $\gamma(III)$ -bande. Die afname in die voorkoms van die laasgenoemde drie bande is by sowel die kontrole as by pasiënt 2139 - 1 die geval. Die bykomende band is verder net by pasiënt 2139 - 1 waarneembaar en kom glad nie by die kontrole voor nie. Klaarblyklik kom die afsnypunt vir die totale vertering van alle tripelheliese kollageen=spesies by ongeveer 29 - 30°C voor. 'n Totale afbraak kom voor by alle temperature hoër as 31°C.

Samevattend kan gestel word dat die bykomende band tot dieselfde mate as die $\gamma(III)$ -, $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 2(I)$ -vorme deur pepsinerings onder die verskillende kondisies beïnvloed is. Die bykomende band was verder ook deurgaans in die pepsien=behandelde proteïenmateriaal van pasiënt 2139 - 1 waarneembaar. Verder is dit belangrik om daarop te wys dat die bykomende band, met 'n Mr-waarde van 200 Kd, nooit in proteïenmateriaal wat onder hierdie kondisies aan pepsien=behandeling onderwerp is, vir enige kontrole waargeneem is nie. Tog is dit belangrik om daarop te wys dat die molekulêre defek in pasiënt 2139 - 1 slegs na pepsinerings waarneembaar is.

Proteïenmateriaal van beide die kontrole en pasiënt is ook aan 'n alternatiewe proteolitiese behandeling, met tripsien en chimotripsien, soos beskryf in hoofstuk 3, onderwerp (figuur 5.5). Weer eens kan die bykomende band duidelik by pasiënt 2139 - 1 waargeneem word, terwyl die $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 2(I)$ -bande by beide die pasiënt en die kontrole teenwoordig is. In teenstelling hiermee, het behandeling met tripsien en chimotripsien tot die proteolitiese verwydering van die $\gamma(III)$ -vorm gelei.



FIGUUR 5.5 Fluorogram van [^3H]-proliëngemerkte sellulêre protefenmateriaal na vertering met tripsien en chimotripsien. Fibroblastweefselkulture is onder standaardkondisies vir 2 uur met L-[4,5 - ^3H]-prolië gmerk. Die sellag is hierna, soos beskryf in afdeling 3.4.2, vir 30 minute by 20°C met PBS geïnkubeer. Hierna is die sellag in 500 μl aangepaste Krebs-Ringer II buffer (Krebs-Ringer II - 10 mM EDTA - 0,1% NP 40) geskraap en die selmengsel is vir 1 minuut heftig met 'n Vor= texmenger vermeng. Vervolgens is die selmengsel vinnig op ys tot 20°C afgekoel en 50 μl tripsien-chimotripsienmengsel (afdeling 3.4.2) is bygevoeg. Vertering is vir 2 minute by 20°C uitgevoer, waarna die reaksie ge= termineer is deur die toevoeging van 55 μl van 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ sojaboontripsieninhibeerder. Die sellag is direk by 60 μl voorafverhitte 20% SDS gevoeg en vir 5 minute gekook. Die monster is daarna voorberei vir elektrofore= se in die afwesigheid van βME en op 'n 4 - 8% SDS-poliakriëlamiedgel geskei..

baan 1 0181 - 5 (kontrole), baan 2 2139 - 1

Op grond van hierdie resultaat, sowel as die resultate wat verkry is na pepsinerings onder uiteenlopende kondisies, is dit duidelik dat die bykomende band nie 'n artefakt van proteolitiese vertering is nie. Verder bestaan daar aanduidings dat die bykomende band nie 'n verkorte γ (III)-vorm is nie. In die eerste plek kom daar 'n wisseling in die verhouding van γ (III) tot die bykomende band voor. Indien die bykomende band gemuteerde tipe III kollageen sou verteenwoordig, sou 'n konstante verhouding van 1:7 of 1:3 verwag word. (Vergelyk model A en B, figuur 5.1). Tweedens, is die voorkoms van die addisionele band na ðf pepsinerings ðf behandeling met tripsien en chimotripsien, identies. Tipe III kollageen bevat, in teenstelling met tipe I kollageen, 'n tripsiensensitiewe punt in 'n gebied wat nie die normale helisiteit openbaar nie (Miller *et al*, 1976). Daarom lei die proteolitiese vertering tot die verwydering van die α (III)-vorm, soos in figuur 5.5 gesien kan word. Vir tipe I prokollageen word slegs die N- en C-propeptiede afgesplyt na vertering met tripsien en chimotripsien (Bruckner en Prockop, 1980). Dat die addisionele band behoue gebly het, suggereer dat hierdie nie 'n gemuteerde vorm van tipe III kollageen, soos in model A en B voorgestel, is nie.

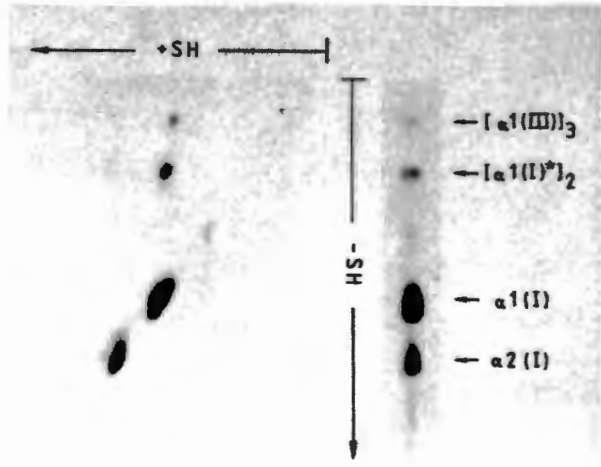
Om bo alle twyfel vas te stel of die bykomende band 'n gemuteerde vorm van tipe I of tipe III prokollageen is, is pepsienbehandelde proteïenmateriaal aan verdere analises onderwerp.

5.3 TWEEDIMENSIONELE ANALISE VAN PEPSIENBEHANDELDE PROTEÏENMATERIAAL

Pepsienbehandelde materiaal is onder nie-reducerende kondisies in die eerste dimensie met behulp van SDS-PAGE geskei. Die gelstrook is daarna met SME gefimpregneer, bo-op

'n tweede gel geplaas en in die tweede dimensie in die teenwoordigheid van BME elektroforeties geskei. Figuur 5.6 toon 'n fluorogram wat so verkry is. Daar kan verwag word dat daardie polipeptiede wat nie disulfiedgebonde is nie, op die diagonaal sal skei. Alle disulfiedgebonde kettings sal onder die diagonaal migreer. In figuur 5.6 kan gesien word dat $\alpha 1(I)$ en $\alpha 2(I)$ op die diagonaal skei, terwyl twee bande onder die diagonaal teenwoordig is. Twee-dimensionele elektroforese van die $\gamma(III)$ -vorm resulteer in 'n band waarvan die migrasieposisie ooreenstem met dié van $\alpha 1(III)$, terwyl die bykomende band materiaal genereer wat komigreer met $\alpha 1(I)$. Indien die bykomende band 'n verkorte tipe III sou verteenwoordig, sou dit in die tweede dimensie op 'n heelwat laer migrasieposisie voorkom. In teenstelling is 'n migrasieposisie wat ooreenstem met dié van $\alpha 1(I)$ duidelik vir die bykomende band waarneembaar. Hierdie migrasieposisie is in sowel 4 - 8% gradiëntgelle as in 5% skeigelle waargeneem. Die migrasieposisie van die bykomende band is daarom te wyte aan die intrinsieke aard van die kettings wat deur die bykomende band verteenwoordig word en is nie 'n produk van die tipe gel wat vir die analise gebruik is nie. Hierdie resultaat dui daarop dat die bykomende band 'n disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -dimeer verteenwoordig.

Om hierdie resultaat te bevestig en uit te bou, is sianogeenbromied (CNBr)-peptiedkartering vervolgens uitgevoer. CNBr-vertering lei tot 'n fragmentering van die kollageenkettings in peptiede van spesifieke groottes, wat lei tot 'n unieke peptiedpatroon vir elk van die $\alpha 1(I)$ -, $\alpha 2(I)$ - en $\alpha 1(III)$ -kettings onderskeidelik. Pepsienbehandelde proteïenmateriaal is in die eerste dimensie onder nie-reducerende kondisies geskei. Hierna is die gelstrook aan CNBr-vertering onderwerp en skeiding in die tweede dimensie is onder reducerende en nie-reducerende kondisies uit-



FIGUUR 5.6 Tweedimensionele analise van pepsienbehandelde [^3H]-proliengemerkte sellulêre materiaal, eers in die afwesigheid en daarna in die teenwoordigheid van β ME. Ongereduseerde pepsienbehandelde materiaal (sien afdeling 3.4.1) is deur middel van 5% SDS-PAGE in die eerste dimensie geskei. Die gelstrook is eers direk gedroog, geherhidreer en daarna vir 7 uur in ekwilibreringsbuffer (100 mM Tris.HCl (pH 6.8) - 30% gliserol - 1% β ME - 0,001% BFB) geëkwilibreer. Die gelstrook is hierna op 'n tweede, breër 5% SDS-poliakrielamiedgel geplaas en die gereduseerde materiaal is vir 14 uur by 55V in die tweede dimensie geskei.

gevoer.

'n Belangrike afleiding wat uit figuur 5.7 gemaak kan word, is dat die peptiedpatroon van die bykomende band ooreenstem met die peptiedpatroon van $\alpha 1(I)$. Hierdie resultaat bevestig bo alle twyfel dat die bykomende band wat in fibroblastmateriaal van pasiënt 2139 - 1 na pepsinering voorkom, wel 'n disulfiedgebonde dimeriese vorm van $\alpha 1(I)$ is. Analises soos dié in figuur 5.7 laat ook die lokalisering van die disulfiedbinding in 'n bepaalde CNBr-fragment toe. Dit kan geïllustreer word aan die hand van die verskil in die peptiedpatroon van tipe III kollageen, soos opgewek in die afwesigheid (figuur 5.7A) en teenwoordigheid (figuur 5.7B) van β ME. Onder nie-reducerende kondisies migreer $\alpha 1(III)CB9$ in die vorm van 'n trimeriese disulfiedgebonde hoë molekulêre massa entiteit wat verval tot die monomeriese vorm na behandeling met β ME. Analise van die peptiedpatroon van die CNBr-behandelde $\alpha 1(I)$ -dimeer onder nie-reducerende kondisies (figuur 5.7A), toon die voorkoms van $\alpha 1(I)CB3$, $\alpha 1(I)CB6$, $\alpha 1(I)CB7$ én 'n hoë molekulêre massa entiteit waarvan die Mr-waarde ooreenstem met dié van 'n dimeriese vorm van $\alpha 1(I)CB8$ (figuur 5.8). Behandeling met β ME voor elektroforese in die tweede dimensie (figuur 5.7B), hef die teenwoordigheid van die $\alpha 1(I)CB8$ dimeer op, sodat 'n dubbelband wat $\alpha 1(I)CB7$ en $\alpha 1(I)CB8$ verteenwoordig, sigbaar is. Dit bevestig dat die $\alpha 1(I)CB8$ -dimeer disulfiedgebonde is.

Alhoewel die resultaat in figuur 5.7A en B skynbaar 'n geredelike onderskeid tussen $\alpha 1(I)CB7$ en $\alpha 1(I)CB8$ moontlik maak, is dit so dat hierdie twee peptiede dikwels komigreer. Om die posisie van die disulfiedbinding in die $\alpha 1(I)$ -dimeer bo alle twyfel vas te stel, is pepsienbehandelde sellulêre materiaal van pasiënt 2139 - 1 éérs aan vertebraatkollagenasebehandeling onderwerp voor



FIGUUR 5.7 CNBr-peptiedkartering van die $[\alpha 1(I)]_2$ -dimeer.

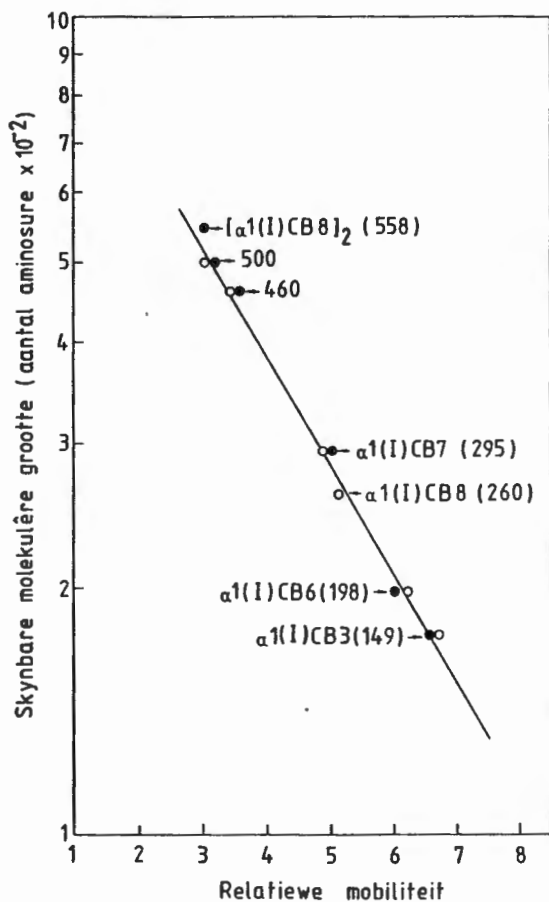
(A) Pepsienbehandelde mediaproteïene wat in die eerste en tweede dimensie in die afwesigheid van β ME geskei is. (B) Pepsienbehandelde mediaproteïene wat in die eerste dimensie in die afwesigheid en in die tweede dimensie in die teenwoordigheid van β ME geskei is. (C) Vertebraatkollagenasebehandelde mediaproteïene wat in die eerste en tweede dimensie in die afwesigheid van β ME geskei is.

Pepsienbehandeling van die mediaproteïene is gedoen soos beskryf in afdeling 3.4.1. Vir vertebraatkollagenasebehandeling is hierdie materiaal oornag teenoor drie ruilings vertebraatkollagenase dialisebuffer (0,05 M Tris. HCl (pH 7.5) - 0,01 M CaCl_2) gedialiseer. Na die dialisestap is 'n agtste volume vertebraatkollagenase by die materiaal gevoeg en vir 24 uur by 22°C verteer. Die reaksie is deur die toevoeging van 0,2 M EDTA getermineer en daarna in 'n finale konsentrasie van 2% SDS gekook. 'n Volume pepsienbehandelde materiaal is met die vertebraatkollagenasemateriaal vermeng, sodanig dat 'n gelyke aantal tellings van die materiaal in die mengsel teenwoordig was. Die monsters is soos volg geskei:

A en B: 600 μl pepsienbehandelde materiaal is op 'n 5% SDS-poliakriëlamiedstrookgel (1,5 mm x 12,5 mm x 150 mm) vir 16 uur by 45V, in die afwesigheid van β ME, geskei.

C: 1 000 μl van die vertebraatkollagenasemengsel is op 'n 6% SDS-poliakriëlamiedstrookgel (1,5 mm x 12,5 mm x 150 mm) vir 16 uur by 45V, in die afwesigheid van β ME, geskei.

Die strookgelle is aan CNBr-vertering, soos beskryf in afdeling 3.5.2, onderwerp, waarna skeiding in die tweede dimensie soos volg uitgevoer is: A is in die afwesigheid van β ME op 'n 8 - 14% SDS-PAGE geskei; B is in die teenwoordigheid van β ME met behulp van 8 - 14% SDS-PAGE geskei en C is in die afwesigheid van β ME met behulp van 4 - 14% SDS-PAGE geskei. Skeiding is in al die gevalle by 70V vir 14 uur uitgevoer.



FIGUUR 5.8 Ykingskromme vir die bepaling van die Mr-waarde van die disulfiedgebonde CNBr-fragment. Die data is verkry uit figuur 5.7.

elektroforese in die eerste dimensie. Na CNBr-vertering is die materiaal daarna in die afwesigheid van β ME in die tweede dimensie geskei (figuur 5.7C). Vertebraatkollagenase bring 'n spesifieke snitpunt tussen aminosure 775 en 776 in tipe I kollageen aan, sodat fragment $\alpha 1(I)CB7$ tot 'n kleiner vorm, $\alpha 1(I)CB7^A$, gesplyt sal word. Fragment $\alpha 1(I)CB8$ word nie deur hierdie behandeling aangetas nie. Analise van die resultaat in figuur 5.7C, toon dat behandeling met vertebraatkollagenase nie die Mr-waarde van die disulfiedgebonde fragment verander nie (figuur 5.8). Tevens die verkorte vorm van $\alpha 1(I)CB7$ is duidelik as $\alpha 1(I)CB7^A$ waarneembaar. Dit bevestig dat $\alpha 1(I)CB8$ disulfiedgebonde is.

5.4 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is bepaal dat fragment $\alpha 1(I)CB8$ van pasiënt 2139 - 1 beskik oor 'n Cys-residu. Normaalweg kom geen Cys-residu in tipe I kollageen voor nie.

HOOFSTUK 6

EFFEK VAN DIE MUTASIE OP DIE TERMIESE STABILITEIT, SEKRESIE EN PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN

6.1 BENADERINGSWYSE

'n Verlaagde tempo van sekresie, 'n verhoogde afbraak van nuutgesintetiseerde kettings en/of 'n verlaging in termiese stabiliteit mag kenmerkend wees van tipe I prokollageen wat gemuteerde pro α 1(I)- of pro α 2(I)-kettings bevat. In sommige gevalle word die prosesbaarheid van mutante tipe I prokollageen deur N- en C-proteïenase beïnvloed (Vergelyk Peltonen *et al*, 1980; Barsh en Byers, 1981; Deak *et al*, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Sippola *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984; Stolle *et al*, 1985). Om die effek van die mutasie in α 1(I)CB8 op die struktuur en metabolisme van tipe I prokollageen te bepaal, is die termiese stabiliteit, sekresie, asook die ekstrasellulêre prosessering deur N- en C-proteïenase vir die mutante tipe I prokollageen, in vergelyking met die geskikte kontroles, nagegaan. Die resultaat van hierdie ondersoek word in hierdie hoofstuk beskryf.

6.2 TERMIESE STABILITEIT VAN SELLULÊRE PROKOLLAGEEN

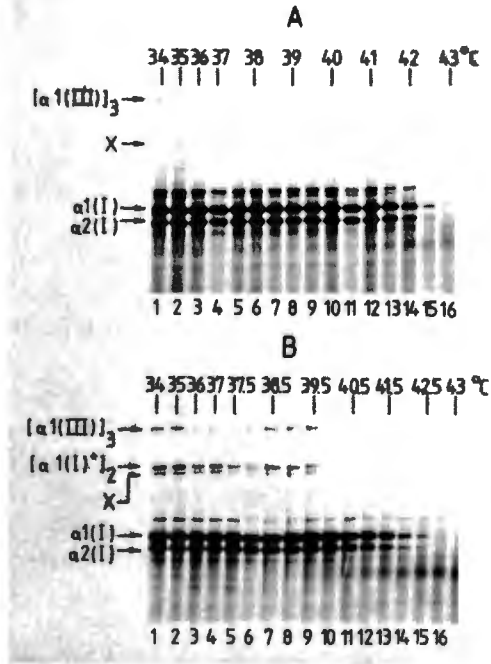
Die individuele kettings in trimeriese kollageen word deur waterstofbrugbindings tussen die aminogroep van elke Gly-residu en die peptied karbonielgroepe op die teenstaande ketting, gekoppel. So is daar 1 014 waterstofbrugbindings tussen die α 2-ketting en twee α 1-kettings in

tipe I kollageen. Hierdie groot aantal waterstofbrugbindings te same met Van der Waals-interaksies en die stabiliserings-effek van die proliel- en hidroksiprolielresidue, impliseer dat die kwaternêre struktuur van tripelheliese kollageen deur koöperatiewe interaksies gestabiliseer word. Derhalwe sal die opheffing van die koöperatiewe interaksies met verhoging in temperatuur oor 'n smal temperatuurvenster daartoe lei dat die geordende heliksstruktuur met 'n karakteristieke en skerp definieerbare T_m -waarde verval. Dit beteken dat die termiese stabiliteit (T_m -waarde) van kollageen ook 'n funksie van die aantal en ordening van waterstofbrugbindings sal wees. Onlangs het 'n aantal outeurs getoon dat mutasies wat lei tot 'n mispassing van die tripelheliese gebiede, 'n verlaagde termiese stabiliteit tot gevolg sal hê (Williams en Prockop, 1983; Sippola *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984; Stolle *et al*, 1985). Soos verder toegelig in hoofstuk 7, mag die bepaling van die termiese stabiliteit van prokollageen as 'n sensitiewe maatstaf van die effek van die mutasie op die kwaternêre struktuur van die tripelheliese domein van prokollageen dien.

Die termiese stabiliteit van sellulêre prokollageen van pasiënt 2139 - 1 en geskikte kontroles is bepaal volgens 'n aanpassing van die metode wat deur Brückner en Prockop (1981) ontwikkel is. Twee beginsels lê die bepaling ten grondslag. Inkubasie by verhoogde temperature lei tot 'n ontvouing van die tripelheliese struktuur. Verder is die tripelheliese domein, in teenstelling met die globulêre propeptiede en nie-tripelheliese Gly-X-Y volgordes, weerstandbiedend teen hidrolise deur tripsien en chimotripsien. Alle prokollageenkettings wat derhalwe nie in die tripelheliese vorm voorkom nie, sal daarom deur die ensieme gehidroliseer word. Vir die bepaling van die T_m -waarde van Tipe I prokollageen, is fibroblaste na merking met [^3H]-pro-

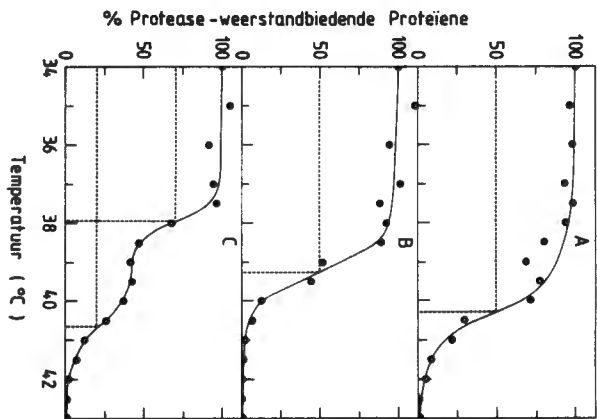
lien, direk in aangepaste Krebs-Ringer II medium gehomogeniseer en in 200 $\mu\ell$ volumes verdeel. Die deelvolumes is daarna afsonderlik vir 10 minute by toenemende temperature gefinkubeer en is daarna vinnig afgekoel tot 20°C. Onmiddellik hierna is 'n kort tripsien-chimotripsien verteringsstap uitgevoer en die materiaal is vir SDS-PAGE in die afwesigheid van β ME voorberei. Fluorogramme is densitometries afgetas om die relatiewe behoud van $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 1(I)$ -dimere by toenemende temperature te kwantifiseer. 'n Gedetailleerde beskrywing van die eksperimentele protokol word in hoofstuk 3 weergegee en die resultate van hierdie ondersoek word in figuur 6.1 en 6.2 vervat.

Die elektroforetogramme in figuur 6.1 toon 'n duidelike afname in die voorkoms van $\alpha 1(I)$ -dimere, $\alpha 1(I)$ - en $\alpha 2(I)$ -spesies na blootstelling aan toenemende temperature. Dit was die geval vir beide die kontrole (figuur 6.1A) en mutante (figuur 6.1B) fibroblaste. Densitometrie van elektroforetogramme, soos dié in figuur 6.1, het die kwantifisering van die onderskeie bande moontlik gemaak. Hieruit is smeltingskrommes vir die kontrole en mutante tipe I prokollageen saamgestel (figuur 6.2). Vir kontroletipe I prokollageen is 'n enkele koöperatiewe oorgang met 'n T_m -waarde van 40,5°C afgelees (figuur 6.2A). Prokollageen wat twee mutante pro $\alpha 1(I)$ -kettings bevat, het eweneens in 'n enkele gladde oorgang gedenatureer, maar by 'n laer T_m -waarde van ongeveer 39°C (figuur 6.2B). In teenstelling met die bogenoemde twee gevalle, het die pasiënt se sellulêre tipe I prokollageen wat nie disulfied gebonde was in $\alpha 1(I)CB8$ nie, 'n dubbelfasiese smeltkromme vertoon (figuur 6.2C). Ongeveer twee-derdes van hierdie materiaal het met 'n T_m -waarde van ongeveer 38°C gedenatureer, terwyl die restant in 'n daaropvolgende koöperatiewe oorgang verval het met 'n T_m -waarde van ongeveer 40.5°C.



FIGUUR 6.1 Termiese stabiliteit van tipe I prokollageen. Fibroblastweefselkulture is in 175cm^2 flesse vir 3 uur met $100\ \mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ^3H]-prolien onder standaardkondisies gemerk. Die sellaaag is vir 20 minute by 20°C met PBS geïnkubeer, waarna die sellaaag in $3,3\ \text{m}\ell$ aangepaste Krebs-Ringer II medium (afdeling 3.6) geskraap en gehomogeniseer is. Selhomogenate wat só verkry is, is vir 5 minute by $9\ 000$ o.p.m. afgeswaai. Die supernatant is in $16 \times 200\ \mu\ell$ deelvolumes verdeel en by 0°C bewaar. 'n Deelvolumen is gebruik vir elke temperatuurinkrement, waar die deelvolumes vir 10 minute by temperature wat gevarieer het van 34°C tot 43°C , geïnkubeer is. Hierna is elke deelvolumen vinnig op ys tot 20°C afgekoel en vir 2 minute met $20\ \mu\ell$ tripsien-chimotripsienmengsel (afdeling 3.6) by 20°C geïnkubeer. Die reaksie is getermineer deur die toevoeging van $22\ \mu\ell$ van $5\ \text{mg}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ sojaboontripsieninhibeerder. Elektroforese in die afwesigheid van βME en fluorografie is uitgevoer soos beskryf in figuur 4.10.

A kontrole 0181 - 5, B pasiënt 2139 - 1.



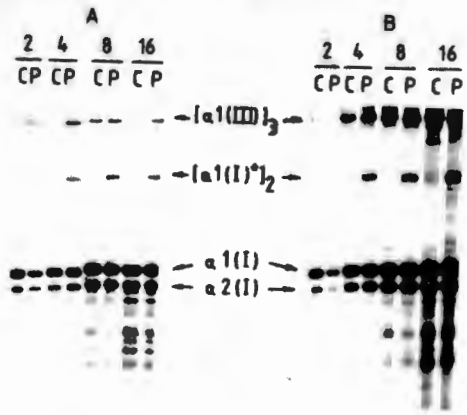
FIGUUR 6.2 Smeltkrommes van normale en gemuteerde tipe I prokollageen. Die data is verkry deur verskillende blootstellings van fluorogramme soos dié in figuur 6.1 met behulp van 'n Biorad densitometer af te tas. (A) Smeltkromme van normale tipe I prokollageen soos afgelei uit densitometrie van $\alpha 1(I)$ -bande. (T_m is ongeveer 40.3°C). (B) Smeltkromme van tipe I prokollageen soos bepaal deur die densitometrie van $\alpha 1(I)$ -dimeer-bande (T_m is ongeveer 39°C) (C) Smeltkromme van die pasiënt se tipe I prokollageen wat nie $\alpha 1(I)$ -dimere bevat nie, soos afgelei uit die densitometrie van $\alpha 1(I)$ -bande. (T_m is ongeveer 40.5°C en 38°C)

Die betekenis van hierdie resultaat in terme van die effek van die mutasie op die struktuur van tipe I prokollageen sal verder in hoofstuk 7 toegelig word.

6.3 SEKRESIE VAN PROKOLLAGEEN DEUR KONTROLE EN OI FIBROBLASTE

'n Aantal outeurs het aangetoon dat 'n opeenhoping van tipe I prokollageen in die sellae van pasiënte se fibroblastweefselkulture as 'n ruwe aanduiding van 'n verlaagde sekresie-tempo aanvaar kan word (De Wet *et al*, 1983a; Steinmann *et al*, 1984). Hierdie tipe resultaat word verkry deur weefselkulture vir toenemende tydsintervalle oor 'n 24 uur periode radioaktief te merk en die sellaaagprotefene deur middel van SDS-PAGE te analiseer. Uitgaande van hierdie voorbeelde is fibroblaste van sowel pasiënt 2139 - 1 as 'n kontrole in die teenwoordigheid van [³H]-prolien vir 2, 4, 8, 16 of 24 uur gefinkubeer. Hierna is die sellae en media-protefene gepepsineer en aan SDS-PAGE in die afwesigheid van βME onderwerp.

Die resultaat van hierdie ondersoek word in figuur 6.3 vervat. Uit 'n visuele ondersoek van die fluorogramme is dit duidelik dat tipe I prokollageen wat gemuteerde α1-kettings bevat, wel gesekreteer word (figuur 6.3B). Dit kan gesien word in die voorkoms van 'n relatief groot hoeveelheid disulfiedgebonde α1(I)-dimere in die media. Op die oog af kan daar verder geen aanduiding van 'n opeenhoping van tipe I prokollageen in die sellae van pasiënt 2139 - 1 waargeneem word nie (figuur 6.3A). Tewens, ongeveer dieselfde hoeveelheid tipe I prokollageen kom in die sellae van kontrole fibroblaste voor.



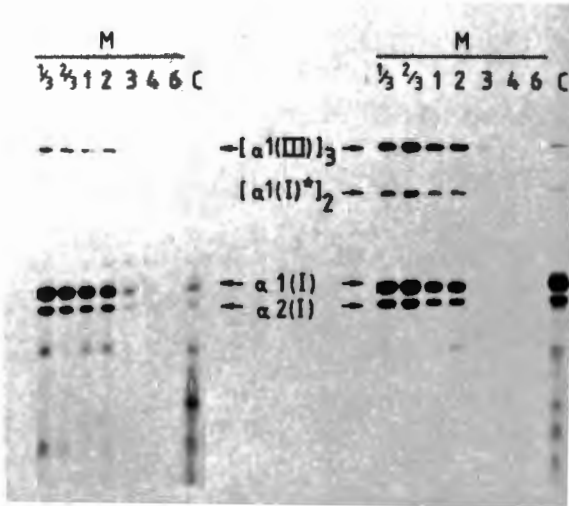
FIGUUR 6.3 Verspreiding van radio-aktiefgemerkte proteïenmateriaal tussen die sellae (A) en media (B) na inkubasie van fibroblaste met [^3H]-proliëne vir toenemende tye. Fibroblastweefselkulture is onder standaardkondisies vir 2 uur, 4 uur, 8 uur en 16 uur met $35 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ L-[4,5- ^3H]-proliëne gemerk. Die ammoniumsulfaat-gepresipiteerde media is voorberei vir pepsienvertering (kyk afdeling 3.4.1), waarna die monster van elke tydsinterval in twee gelyke volumes verdeel is. Een helfte is aan pepsienvertering onderwerp, terwyl die ander helfte vir verdere analise bewaar is (sien figuur 6.6). Die sellae is in selhomoniseringsmedium geskraap, gehomogeniseer en gepepsineer (kyk afdeling 3.4.1). Elektroforesis in die afwesigheid van βME en fluoroografie op Kodak XAR 5 X-straal film is uitgevoer soos in figuur 4.7.

C kontrole 01481, P pasiënt 2139 - 1

Soos reeds genoem, is bogenoemde resultaat slegs 'n ruwe aanduiding van die mate van sekresie van tipe I prokollageen deur die pasiënt se fibroblaste. Meer subtiele verskille mag bestaan in die sekresietempo van tipe I prokollageen in fibroblaste van pasiënt 2139 - 1 in vergelyking met dié van kontrole fibroblaste. 'n Meer kwantitatiewe prosedure sou wees om die t_{1/2} van sekresie te bepaal. Fibroblaste van pasiënt 2139 - 1 en 'n geskikte kontrole is vir 3 uur met [³H]-prolien, in die teenwoordigheid of afwesigheid van α, α' -dipiridiel, gemerk. Die vervanging van die media is opeenvolgend na 20 minute, 20 minute, 20 minute, 60 minute, 60 minute, 60 minute en 120 minute herhaal. Hierna is die sellae aan pepsinerings onderwerp en gepresipiteer. Die media deelvolume is gepresipiteer en aan pepsinerings onderwerp. Al die monsters wat op dié manier verkry is, is voorberei vir en onderwerp aan SDS-PAGE onder nie-reduserende kondisies. 'n Gedetailleerde bespreking van die eksperimentele protokol word in hoofstuk 3 weergegee.

Verteenwoordigende elektroforetogramme wat op dié manier verkry is, word in figuur 6.4 getoon. Die bande wat die $\alpha 1(I)$ -dimeer, $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$ en $\alpha 1(III)$ -kettings verteenwoordig is hierna densitometries afgetas. Uit hierdie data is die kumulatiewe sekresie van prokollageen in vergelyking met die totale hoeveelheid prokollageen van die sellae en media in terme van sekresiekrommes uitgedruk (figuur 6.5). Eksponensiële verskilkrommes is gekonstrueer en volgens die voorskrifte van Kao *et al.*, (1977) verwerk om die snelheidskonstantes van sekresie te bepaal (tabel 6.1).

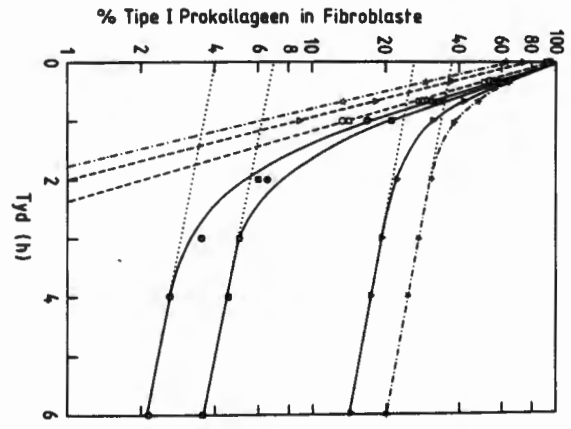
Sekresie van kollageen vind in twee fases, 'n vinnige- en 'n stadige fase, plaas. Kontrole fibroblaste sekreteer 96% tipe I prokollageen tydens die vinnige fase. Dieselfde hoeveelheid tipe III prokollageen, naamlik 96%, word in dieselfde fase gesekreteer. Dié twee fases word deur twee eerste



FIGUUR 6.4 Sekresie van [^3H]-proliengemerkte proteïenmateriaal deur kontrole en OI fibroblaste na pulsmerking. Fibroblastweefselkulture is in 25 cm² flessies, na 'n pre-inkubasie periode van 30 minute, vir 3 uur in die teenwoordigheid of afwesigheid van α, α' -dipiridiel met 100 $\mu\text{Ci}\cdot\text{m}\ell^{-1}$ L-[4,5 - ^3H]-prolien gemerk. Na pulsmerking is die media onttrek, die sellae is met PBS gewas en 1,5 m ℓ hoeveelhede van voorafverhitte nie-radio-aktiewe media (met 10 mM koue prolien) is by elke flessie gevoeg. Die laasgenoemde media is na 20 minute, 20 minute, 20 minute, 60 minute, 60 minute, 60 minute en 120 minute onttrek en vervang. Die media is afgeswaai, gehersuspendeer in selhomogeniseringsmedium (afdeling 3.3.2) en gepepsineer (afdeling 3.4.1). Die sellae is na die laaste mediaruilingstap in 250 $\mu\ell$ selhomogeniseringsmedium geskraap, gehomogeniseer en gepepsineer. Hierna is die selhomogenate met 30% ammoniumsulfaat gepresipiteer en in 100 $\mu\ell$ selhomogeniseringsmedium gehersuspendeer. Die monsters is in die afwesigheid van βME voorberei vir elektroforese (sien figuur 4.7), en na dialise is die volumes van die verskillende monsters gelyk gestel. 'n Gelyke volume van elke monster is deur middel van 4 - 8% SDS-PAGE vir 16 uur by 50V geskei.

Links: kontrole 0181 - 5

Regs: pasiënt 2139 - 1.



FIGUUR 6.5 Kinetika van sekresie van prokollageen.

Die data van die krommes is verkry deur densitometrie van elektroforetoگرامme soos dié in figuur 6.4. Verwerking van die data is uitgevoer soos in afdeling 3.7 beskryf is.

- (●-●) normale tipe I prokollageen
- (■-■) tipe I prokollageen wat disulfied= gebonde $\alpha_1(I)$ -dimere bevat.
- (▲-▲) tipe I prokollageen van pasiënt 2139 - 1
- (★-★) tipe I prokollageen wat een normale en een gemuteerde pro $\alpha_1(I)$ -ketting bevat

Die snelheidskonstantes vir sekresie is bereken deur gebruik te maak van waardes verkry vanaf eksponensiële verskilkrommes (vergeelyk afdeling 3.7, hoofstuk 3) vir:

- (○-○) normale tipe I prokollageen
- (□-□) tipe I prokollageen wat disulfiedgebonden $\alpha_1(I)$ -dimere bevat.
- (△-△) tipe I prokollageen van pasiënt 2139 - 1
- (★-★) tipe I prokollageen wat een normale en een gemuteerde pro $\alpha_1(I)$ -ketting bevat.

TABEL 6.1 Die kinetika van die sekresie van normale en gemuteerde tipe I prokollageen deur kontrole en OI-fibroblaste

Tipe I prokollageen	I	I + I ^C	I ^{CC}	I ^C
k ₁ (X 10 ⁻² min ⁻¹)	3,2	3,5	3,1	3,7
k ₂ (X 10 ⁻³ min ⁻¹)	1,8	1,8	1,9	1,8
t ₁ vir die vinnige fase (min)	22	20	22	19
t ₁ vir die stadige fase (min)	387	392	367	389
fraksie in die vinnige fase gesekreter (%)	96	74	93	63
fraksie in die stadige fase gesekreter (%)	4	26	7	37

orde snelheidskonstantes (k_1 en k_2) beskryf. Uit die eksponensiële verskilkrommes is bepaal dat die waardes vir die snelheidskonstantes vir kontrole tipe I prokollageen $3.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ is. Die $t_{\frac{1}{2}}$ van sekresie vir die vinnige- en stadige fase is 22 minute vir tipe I prokollageen. Merking in die teenwoordigheid van α, α' -dipiridiel lei daartoe dat die ongehidroksileerde, nie-tripelheliese prokollageen teen 'n tiende van die normale tempo gesekreter word, sodanig dat die kinetika daarvan deur die tweede snelheidskonstante beskryf word.

Tipe I prokollageen van pasiënt 2139 - 1 wat twee gemuteerde $\alpha 1(I)$ -kettings bevat (tipe I^{CC}), en waar 'n disulfiedbrug gevolglik in die tripelheliese domein voorkom, het snelheidskonstantes van $3.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Die $t_{\frac{1}{2}}$ van sekresie is 22 minute en 367 minute vir die vinnige- en stadige fase onderskeidelik, terwyl 93% tipe I^{CC} prokollageen tydens die vinnige fase gesekreter word. In teenstelling hiermee is gevind dat slegs 74% van die mengsel van normale tipe I prokollageen en tipe I prokollageen waarin een gemuteerde $\alpha 1(I)$ -ketting gefinkorporeer word (tipe I^C) en dus nie 'n disulfiedbrug in die tripelheliese gebied bevat nie, in die vinnige fase gesekreter word. Die snelheidskonstantes in die geval is $3.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ sodat die $t_{\frac{1}{2}}$ van sekresie in die vinnige- en stadige fase 20 minute en 392 minute onderskeidelik is. Wanneer die waarde van die fraksie tipe I^C prokollageen wat tydens die vinnige fase gesekreter word, gesimuleer word, word 'n waarde van 63% verkry. Die waarde is selfs nog laer as die waarde wat vir die mengsel van tipe I^C en tipe I prokollageen verkry is.

Uit hierdie resultate kan twee gevolgtrekkings gemaak word. In die eerste plek is die sekresie van tipe I prokollageen wat twee mutante $\alpha 1(I)$ -kettings bevat, byna normaal. 'n Fraksie wat laer is as die normaal word daarenteen vir die tipe I prokollageen wat een gemuteerde $\alpha 1(I)$ -ketting bevat, verkry.

6.4 PROSESSERING VAN TIPE I PROKOLLAGEEN DEUR N-PROTEÏENASE

Ekstrasellulêre prosessering deur N-proteïenase lei tot die omvorming van prokollageen tot pC-kollageen, terwyl prokollageen deur C-proteïenase tot pN-kollageen geprosesseer word (Taubman en Goldberg, 1976; Uitto en Lichtenstein, 1976; Goldberg, 1977; Uitto, 1977). Die gekombineerde werking van beide ensieme lei tot die verwydering van die N- en C-propeptiede met kollageen as produk. Al vier vorme, naamlik prokollageen, pN- en pC-kollageen, sowel as kollageen kan geredelik met behulp van SDS-PAGE onderskei word. 'n Duidelike skeiding van pro $\alpha 1(I)$, pCa $1(I)$, pro $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(I)$, pNa $2(I)$ en $\alpha 2(I)$ word verkry, met 'n komigrering van pCa $2(I)$ en pNa $1(I)$. Dat hierdie verskillende vorme in media van pasiënt 2139 - 1 voorkom, word gefimpliseer deur die resultaat in figuur 4.7A, baan 1 (hoofstuk 4). 'n Verdere bevestiging hiervoor is verkry deur mediaproteïenase na merking vir 2, 4, 8, 16 en 24 uur, sonder pepsinerings en in die teenwoordigheid van β ME, te elektroforeer (figuur 6.6). Uit hierdie resultaat is dit duidelik dat dieselfde toenemende omvorming van prokollageen tot die pN- en pC-vorme, vir sowel die kontrole as vir pasiënt 2139 - 1, met toenemende inkubasietyd voorkom.

Alhoewel die pasiënt se ekstrasellulêre prokollageen wel prosesseerbaar blyk te wees, is die mutasie in $\alpha 1(I)CB8$

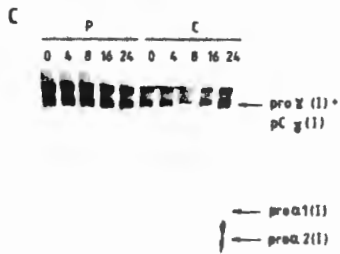
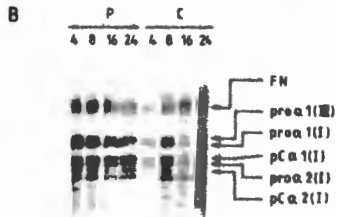
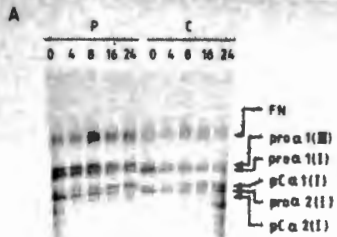


FIGUUR 6.6 Tydsafhanklike akkumulering van radio-aktief-gemerke mediaproteïene na inkubasie van fibroblaste in die teenwoordigheid van [^3H]-prolien. Selmerking en die voorbereiding van mediaproteïene vir SDS-PAGE in die teenwoordigheid van βME is uitgevoer soos in figuur 6.3

C kontrole 01481, P pasiënt 2139 - 1

naby die N-teloceptied. 'n Natuurlike konformasie van die N-terminale propeptied is 'n spesifieke voorvereiste vir die normale aktiwiteit van N-protefenase (Tuderman *et al*, 1978; Tanzawa *et al*, 1985). Steinmann *et al* (1980) en veral Sippola *et al* (1984) en Sippola-Thiele (1985) het onlangs gevind dat mutasies in die N-teloceptiedgebied en selfs in die tripelheliese gebied kan lei tot 'n opheffing van die N-protefenase uitkenningspunt. Slegs pN-kollageen word gevolglik gevorm. In die geval van sommige mutasies is 'n stadiger as normale omvorming van prokollageen tot pC-kollageen waargeneem.

Om die prosesbaarheid van die gemuteerde prokollageen op 'n meer kwantifiseerbare wyse na te gaan, is die volgende eenvoudige benadering na aanleiding van figuur 6.6 gevolg. Die kondisies is dan ook sodanig gekies dat 'n verhoging in die ekstrasellulêre prosessering van prokollageen resulteer. Fibroblaste van pasiënt 2139 - 1 en 'n kontrole is vir twee dae in die teenwoordigheid van askorbaat geïnkubeer waarna die media afgetrek, gekombineer en by 0°C bewaar is. Prolieën is hierna tot 'n finale konsentrasie van 10 mM by die kontrole media gevoeg. (Verder word hiër na verwys as koue media). Die sellae van beide die pasiënt en kontrole is aan 'n 3 uur pulsmerking met [³H]-prolieën onderwerp, waarna die media afgetrek, gekombineer en by 0°C bewaar is. Kontrole media is vervolgens by die sellae gevoeg en die inkubasie is vir 4, 8, 16 en 24 uur voortgesit. Die media is hierna voorberei vir 'n onderwerp aan SDS-PAGE onder nie-reduserende en reduserende kondisies (figuur 6.7B en C). Gelyktydig hiermee is die prosessering van prokollageen in 'n selvrye sisteem nagegaan. Gelyke volumes van die koue media is met die media na pulsmerking van die kontrole en pasiënt onderskeidelik, vermeng. Hierdie mediamengsels is vir 0, 4, 8, 16 en 24 uur by 37°C geïnkubeer en aan SDS-PAGE onder reduserende



FIGUUR 6.7 Fluorogramme van kollageen na vertering met endogene N-proteïenase. Fibroblaste van 'n kontrole en pasiënt 2139 - 1 is vir 3 uur met [³H]-prolien gemerk. Hierna is die media onttrek en koue media, soos beskryf in afdeling 3.2 (hoofstuk 3), is by die fibroblaste gevoëg waarna inkubasie by 37°C vir 4, 8, 16 en 24 uur gedoen is. Die radioaktiewe media is vermeng met koue media en ook by 37°C vir 0, 4, 8, 16 en 24 uur geïnkubeer. A: Gemerkte mediaproteïene wat met koue medium geïnkubeer is en onder reduserende kondisies geskei is. B: Mediaproteïene wat deur die selle gesekreter is na toevoëging van koue medium en daarna onder reduserende kondisies geskei is. C: Gemerkte mediaproteïene wat met koue medium geïnkubeer is en daarna onder nie-reduserende kondisies geskei is.

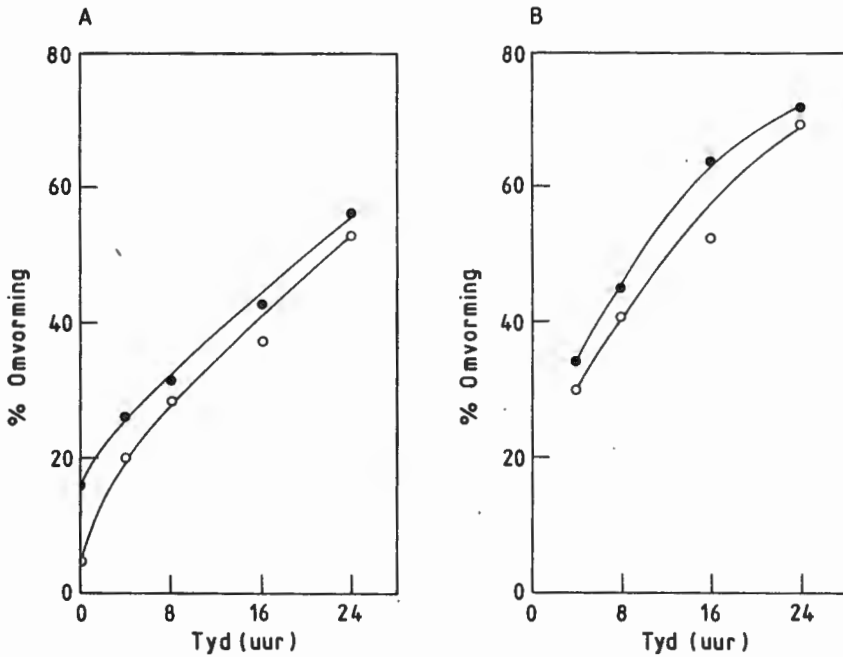
P pasiënt 2139 - 1 C kontrole 01481

kondisies onderwerp (figuur 6.7A). 'n Gedetailleerde bespreking van die eksperimentele protokol word in hoofstuk 3 weergegee.

In die afwesigheid van β ME is slegs 'n hoofband wat met die γ -vorm van prokollageen of pC-kollageen mag ooreenstem, waarneembaar (figuur 6.7C). Hierdie resultaat was nie informatief nie. In teenstelling hiermee kan 'n toenemende omvorming van pro α 1(I) tot pC α 1(I) vir beide die kontrole en pasiënt 2139 - 1 in die teenwoordigheid van β ME waargeneem word (figuur 6.7B). Geen N- en C-proteïenase is tot die sisteem toegevoeg nie en die resultaat weerspieël gevolglik die prosesbaarheid van prokollageen deur die proteïenase wat oorspronklik deur kontrole fibroblaste, en in 'n mindere mate deur die pasiënt en kontrole fibroblaste met verloop van tyd, gesekreter is. Die N- en C-proteïenase in die koue media was teweens steeds tot so 'n mate funksioneel aktief dat 'n omvorming van pro α 1(I) tot pC α 1(I) ook duidelik in figuur 6.7A waarneembaar is.

Vir 'n kwantifisering van die fluorogramme in figuur 6.7A en 6.7B is die pro α 1(I)- en pC α 1(I)-bande densitometries afgetas. Die verhouding van pC α 1(I) tot die som van pC α 1(I) en pro α 1(I) is gebruik as 'n aanduiding van die omvang van prosesering. Hierdie verhouding is tot 'n persentasie van omvorming in die grafieke in figuur 6.8 verwerk. Slegs na hierdie kwantifisering van die omvormings-tempo, is dit duidelik dat die mutante prokollageen tot dieselfde mate as kontrole prokollageen deur ekstrasellulêre N-proteïenase tot pC-kollageen omvorm is.

Uit hierdie resultaat kan afgelei word dat die mutasie in α 1(I)CB8 nie die prosesering van prokollageen statisties beduidend beïnvloed nie.



FIGUUR 6.8 Tydsafhanklike omvorming van tipe I prokollageen tot pC-kollageen deur endogene N-proteïenase. Die waardes in A en B is verkry na densitometrie van die fluorogramme wat onderskeidelik in figuur 6.7A en 6.7B getoon is. Die persentasie omvorming is bereken uit die vergelyking:
$$\frac{pCa1(I)}{pCa1(I) + proa1(I)} \times \frac{100}{1}$$

(●-●) kontrole 01481

(○-○) pasiënt 2139 - 1

6.5 SAMEVATTING

In hierdie hoofstuk is vasgestel dat die mutasie die termiese stabiliteit en sekresie van tipe I prokollageen beïnvloed. Die T_m -waarde van trimere wat twee gemuteerde $\alpha 1(I)$ -kettings bevat, is vanaf 40.3°C tot 39°C verlaag. Tipe I prokollageen wat nie disulfiedgebonde is in die tripelheliese domein nie en waarin een of geen gemuteerde $\alpha 1(I)$ -kettings geïnkorporeer is, het 'n T_m -waarde van ongeveer 38°C vir twee-derdes van die materiaal en 'n T_m -waarde van 40.5°C vir die resant. 'n Verlaagde sekresie is verder vir hierdie materiaal gevind, sodanig dat 74% in die vinnige fase van sekresie gesekreter word. Die sekresie van tipe I prokollageen wat disulfiedgebonde is in die tripelheliese domein kom ooreen met die sekresie van normale tipe I prokollageen, sodanig dat 93% in die vinnige fase van sekresie gesekreter word. In teenstelling hiermee word die prosesering van tipe I prokollageen deur ekstrasellulêre N-protiefenase nie deur die teenwoordigheid van 'n Cys-residu in $\alpha 1(I)CB8$ beïnvloed nie.

HOOFSTUK 7

BESPREKING

7.1 INLEIDING

Met die siftingsprogram, waarby daar oorspronklik vyf families betrek is (vergelyk hoofstuk 4), is 'n pasiënt geïdentifiseer waarvan die fibroblaste gemuteerde pro α 1(I)-kettings sintetiseer. Teenwoordigheid van 'n Cys-residu in die α 1(I)CB8-fragment van mutante α 1(I)-kettings is voorts aangetoon (hoofstuk 5). Verder kon voorgestel word dat inkorporasie van sisteïenbevattende mutante α 1(I)-kettings in tipe I heterotrimere lei tot 'n verlaagde termiese stabiliteit en sekresie van tipe I prokollageen (hoofstuk 6). Prosessering deur N-proteïenase word egter nie beïnvloed nie. Die betekenis van en moontlike verklarings vir hierdie bevindinge sal in hierdie hoofstuk verder toegelig word.

7.2 POSISIE EN AARD VAN DIE MUTASIE

Met behulp van peptiedkartering is vasgestel dat die gemuteerde kettings disulfiedgebonde is tussen hul α 1(I)CB8-fragmente, wat strek vanaf aminosuur 124 - 402 (vergelyk hoofstuk 5, figuur 5.7). Voorkoms van disulfiedbrûe in die tripelheliese domein het die identifisering van die abnormale pro α 1(I) in hierdie ondersoek moontlik gemaak. Na behandeling van die pasiënt se tipe I prokollageen met pepsien en SDS is die disulfiedgebonde gemuteerde pro α 1(I)-kettings as α 1(I)-dimere vrygestel. Hierdie α 1(I)-dimere kon geredelik met behulp van SDS-PAGE onder nie-reducerende kondisies geïdentifiseer word (hoofstuk 4, figuur 4.12).

Die tripelheliese domein van tipe I prokollageen bevat nor-

TABEL 7.1 Die invloed van 'n enkele base verandering in die Gly-kodon op die uiteindelijke aminosuurvolgorde

Gly kodons	Mutasie in die 1e posisie		Mutasie in die 2e posisie		Mutasie in die 3e posisie	
	Kodon	Aminosuur	Kodon	Aminosuur	Kodon	Aminosuur
GGU	UGU	Cys	GUU	Val	GGC	Gly
	CGU	Arg	GCU	Ala	GGA	Gly
	AGU	Ser	GAU	Asp	GGG	Gly
GGC	UGC	Cys	GUC	Val	GGU	Gly
	CGC	Arg	GCC	Ala	GGA	Gly
	AGC	Ser	GAC	Asp	GGG	Gly
GGA	UGA	Term	GUA	Val	GGU	Gly
	CGA	Arg	GCA	Ala	GGC	Gly
	AGA	Arg	GAA	Glu	GGG	Gly
GGG	UGG	Trp	GUG	Val	GGU	Gly
	CGG	Arg	GCG	Ala	GGC	Gly
	AGG	Arg	GAG	Glu	GGA	Gly

maalweg nie Cys-residue nie. Disulfiedbrûe word dus nie in dié gebied gevorm nie. Cys-residue kom wel in die propeptiede van tipe I prokollageen voor, sodat inter- sowel as intra-ketting disulfiedbrûe in daardie domeine gevorm word. Behandeling van tipe I prokollageen met pepsien, soos dit in hierdie ondersoek gedoen is (hoofstuk 4, afdeling 4.2.2), lei tot die selektiewe verwydering van die N- en C-propeptiede, sodat gepepsineerde prokollageen nie disulfiedbrûe of Cys-residue bevat nie.

Substitusie van een van die aminosure in $\alpha 1(I)CB8$ met 'n Cys-residu kan tot die vorming van disulfiedbrûe lei. Uit die genetiese kode blyk dit dat die substitusie van 'n Gly-residu met 'n Cys-residu moontlik is. Dit kon veral gesien word uit die invloed van 'n enkel base-verandering in die eerste of tweede posisie van die Gly kodons op die aminosuur wat uiteindelik in die tripelheliks ingebou word (tabel 7.1). Hieruit is dit duidelik dat daar 'n kans van 14% bestaan vir die omvorming van 'n Gly-residu na 'n Cys-residu. Puntmutasies in die Gly-kodon kan ook lei tot die substitusie van Gly-residue met ander aminosure naamlik: Arg (20%), Ala (17%), Asp (14%), Cys (14%), Ser (14%), Val (14%), Glu (3,3%) en Trp (0,3%). Die substitusie van Gly-residue met Arg-, Asp- of Glu-residue sal tot 'n ladingsverandering in die kollageen lei.

Cohn *et al*¹⁾ het inderdaad onlangs aangetoon dat 'n enkel base-verandering, naamlik die omvorming van 'n guanielresidu tot 'n uridielresidu (G → U) daartoe gelei het dat Gly 988 in die $\alpha 1(I)$ -ketting ($\alpha 1(I)CB6$) met 'n Cys-residu vervang is. Hierdie ondersoek het gevolg nadat Steinmann *et al* (1984) aangetoon het dat abnormale disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -kettings

1. Cohn, D.H., Byers, P., Steinmann, B. en Gelinas, R. "Lethal Osteogenesis Imperfecta resulting from a single nucleotide change in one $\alpha 1(I)$ collagen allele", voorgeleë vir publikasie.

deur fibroblaste van 'n pasiënt met tipe II OI gesintetiseer word.

'n Enkel base-verandering in die kodons van 'n aantal ander aminosure kan moontlik ook lei tot die inbouing van Cys-residue in $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente van gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -kettings (tabel 7.2). Die aminosuurvolgorde van die $\alpha 1(I)CB8$ fragment van die mens $\alpha 1(I)$ -ketting is nog nie bekend nie en daarom word die verdere bespreking na analogie van die kalf en rot $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente gedoen (Balian *et al.*, 1971; Balian *et al.*, 1972; Glanville *et al.*, 1983). Die $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente in beide kalf en rot $\alpha 1(I)$ -kettings bevat 93 Gly-residue wat een-derde van die totale aantal aminosure in die fragment is. Hierteenoor verteenwoordig die ander aminosure wat moontlik substitueerbaar met Cys-residue is, naamlik Arg, Ser, Phe, Tyr en Trp 'n klein persentasie van die totale aantal aminosure in die $\alpha 1(I)CB8$ -fragment, ongeveer 10,8% (tabel 7.2). 'n Ander kodon wat moontlik met 'n enkele base-verandering aanleiding kan gee tot die voorkoms van 'n Cys-residu in die fragment, is die terminasiekodon UGA. Aangesien vollengte kettings egter gesintetiseer word, is dit duidelik dat hierdie kodon nie in die $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente van die rot en kalf se $\alpha 1(I)$ -kettings voorkom nie. Verder kom twee van die aminosure (Trp en Tyr) wat moontlik met Cys-residue substitueerbaar is, nie in die $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente van die rot en kalf voor nie. Met inagneming van die weglating van die UGA-kodon en die afwesigheid van Tyr en Trp in die $\alpha 1(I)CB8$ -fragmente van die rot en kalf $\alpha 1(I)$ -kettings, is dit duidelik dat die kans vir die moontlike substitusie van 'n Gly-residu met 'n Cys-residu groter is as vir die substitusie van een van die ander aminosure met 'n Cys-residu, veral gesien in die lig van die hoë voorkoms van Gly in die bepaalde fragment.

TABEL 7.2 Enkel base veranderinge in kodons van ander aminosure wat kan lei tot die die kodering van Cys.

Aminosuur	Kodon	Mutasie in 1e posisie wat lei tot Cys		Mutasie in 2e posisie wat lei tot Cys		Mutasie in 3e posisie wat lei tot Cys	
		Base verandering	Kodon	Base verandering	Kodon	Base verandering	Kodon
Arg	CGU	C → U	UGU				
Ser	AGU	A → U	UGU				
Arg	CGC	C → U	UGC				
Ser	AGC	A → U	UGC				
Phe	UUU			U → G	UGU		
Ser	UCU			C → G	UGU		
* Tyr	UAU			A → G	UGU		
Phe	UUC			U → G	UGC		
Ser	UCC			C → G	UGC		
* Tyr	UAC			A → G	UGC		
* Term	UGA					A → U	UGU
* Trp	UGG					G → U	UGU
* Term	UGA					A → C	UGC
* Trp	UGG					G → C	UGC

* Nie teenwoordig in rot a1(I)CB8 nie (Balian *et al*, 1971; Balian *et al*, 1972).

** Nie teenwoordig in kalf a1(I)CB8 nie (Glanville *et al*, 1983).

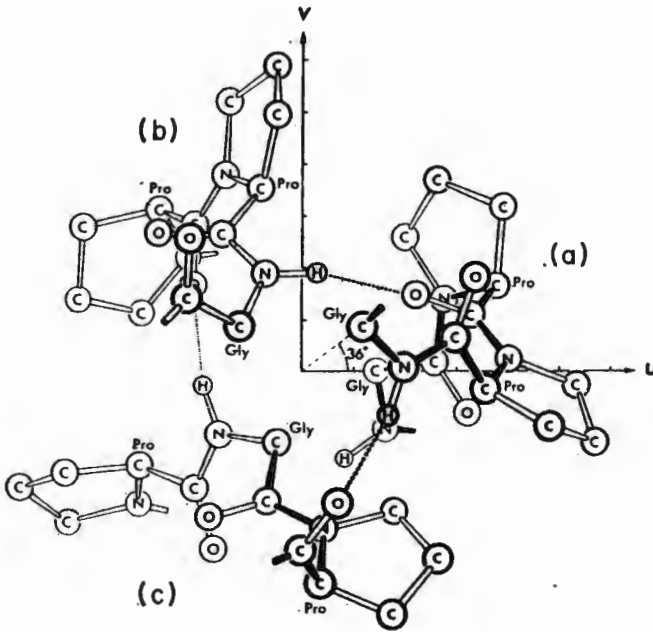
7.3 DIE EFFEK VAN DIE MUTASIE OP DIE KARAKTERIS- TIEKE VAN TIPE I PROKOLLAGEEN

7.3.1 Inleiding

'n Groot deel van die primêre struktuur van tipe I prokolla-
geen is uit die herhalingsseenheid Gly-X-Y saamgestel. Hier-
die herhalingskarakter, en die hoë voorkoms van Pro en Hyp
in posisies X en/of Y, dwing die Gly-X-Y-bevattende gebiede
in 'n tipe II trans-heliks, waarin die pirrolidoonringsisteme
van die prolielresidue na buite om die heliks gerig is.
Die herhalingsvolgordes assosieer om tripelstringige super-
helikse te vorm. Hierdie superheliese strukture reflekteer
die sekondêre struktuur van poli-L-prolien behalwe dat die
klein aminosuur Gly telkens aan die binnekant van die
trippelheliks geleë is (figuur 7.1) en die aminosure X en Y
na buite gerig is. Phe en Leu kom slegs in die X-posisie
voor en Glu, Arg en Thr slegs in die Y-posisie (Bornstein
en Traub, 1979). Dit dra by tot die stabilisering van
die tripelheliks. Die ander aminosure kom in die X- of die
Y-posisie voor.

Die heliks met ongeveer drie residue per heliksdraai, word
gestabiliseer deur interstring waterstofbrugbindings, waar-
toe die hidroksigroepe van Hyp kan bydra. Herhalingsvolg-
ordes met 'n hoë inhoud aan Pro en veral Hyp vorm daarom 'n
digter, meer stabiele tripelheliks. Die effek van veral
Hyp kan gesien word daarin dat poli- (Pro-Pro-Gly) 'n Tm-
waarde van 24°C gehad het, terwyl poli-(Pro-Hyp-Gly) 'n
Tm-waarde van 58°C gehad het.

'n Verandering in die konformasie van die tripelheliese gebied
wat lei tot 'n verbreking of versteuring van die waterstof-
brugbindings kan moontlik tot 'n verlaging in termiese stabi-
liteit lei.



FIGUUR 7.1 Glisien, as die kleinste aminosuur, kom voor in die kern van die tripelheliks. 'n Projeksie af in die heliks-as toon duidelik die posisie van drie glisien-residue ten opsigte van mekaar in die kern van die heliks, gevorm uit $(\text{Gly-Pro-Pro})_n$. Die struktuur word hier gesien vanaf die karkoksielkant. Waterstofbrugbindings tussen α -amino- en α -karkoksielgroepe word deur stippelelyne aangetoon. Tripeptiedeenhede van die verskillende kettings word verteenwoordig deur (a), (b) en (c) (Bornstein en Traub, 1979).

7.3.2 Termiese stabiliteit

Dat die moontlike teenwoordigheid van 'n Cys-residu in $\alpha 1(I)CB8$ 'n dramatiese effek op die tripelheliese gebied van tipe I prokollageen het, word weerspieël deur die resultate wat ten opsigte van die termiese stabiliteit verkry is (hoofstuk 6, figuur 6.2). Normale tipe I prokollageen het 'n T_m -waarde van ongeveer $40,5^\circ C$ gehad. Hierteenoor het tipe I prokollageen wat disulfiedgebonde in $\alpha 1(I)CB8$ is, 'n T_m -waarde van ongeveer $39^\circ C$ vertoon. Dit verteenwoordig 'n verskil van $1,5^\circ C$. 'n Bifasiese denatureringskromme is vir tipe I prokollageen wat nie disulfiedgebonde in $\alpha 1(I)CB8$ was nie, waargeneem. Eenderde van die materiaal het met 'n normale T_m -waarde van $40,5^\circ C$ gedatureer, terwyl die resant van die materiaal 'n T_m -waarde van $38^\circ C$ gehad het. Dit beteken dat die T_m -waarde van hierdie materiaal $2,5^\circ C$ laer was as dié van normale tipe I prokollageen.

Die resultate wat verkry is, dui daarop dat die pro $\alpha 1(I)$ -kettings wat deur die pasiënt se fibroblaste gesintetiseer is, in drie verskillende trimere geïnkorporeer is:

1. 'n tipe I trimeer (tipe I) wat twee normale pro $\alpha 1(I)$ -kettings en 'n normale pro $\alpha 2(I)$ -ketting bevat,
2. 'n tipe I trimeer (tipe I^C) wat een normale en een gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -ketting sowel as 'n normale pro $\alpha 2(I)$ -ketting bevat, en
3. 'n tipe I trimeer (tipe I^{CC}) wat twee gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -kettings en 'n normale pro $\alpha 2(I)$ -ketting bevat.

Hierdie verskillende trimere kom in 'n verhouding van 1:2:1 voor. Die verkreë T_m -waardes kan vervolgens aan die verskille

spesies toegeken word. Tipe I^{CC} het 'n T_m-waarde van 39°C en tipe I^C die verrassende T_m-waarde van 38°C.

Soos reeds genoem dien die bepaling van die termiese stabiliteit as 'n sensitiewe maatstaf van die effek van 'n mutasie op die kwaternêre struktuur van die tripelheliese domein van prokollageen. 'n Verlaging in T_m-waarde van tipe I prokollageen dui daarop dat die inkorporasie van die gemuteerde prokollageenkettings in heterotrimere 'n destabilisering van die kwaternêre struktuur van die proteïen tot gevolg het. Dat die T_m-waarde van tipe I^C laer was as dié van tipe I^{CC} impliseer 'n groter destabilisering van die struktuur met inkorporasie van een gemuteerde proα1(I)-ketting in heterotrimere as met inkorporasie van twee gemuteerde prokollageenkettings.

Volgens Steinmann *et al* (1984) het die substitusie van Gly 988 met 'n Cys-residu (Cohn *et al*¹) gelei tot 'n T_m-waarde vir disulfiedgebonde tipe I prokollageen wat 3°C laer was as dié van normale tipe I prokollageen. Na aanleiding hiervan het Traub en Steinmann (1986) die reikwydte van die invloed van só 'n lokale versteuring met behulp van modelstrukture ondersoek. Hiervolgens word twee waterstofbindings aangrensend aan die disulfiedbrug gebreek en ander moontlik versteur. Die invloed van die teenwoordigheid van 'n enkele, ongebonde Cys-residu op die waterstofbrugbindings van 'n tipe I trimeer, wat 'n enkele gemuteerde ketting bevat, is nie bepaal nie. In die ondersoek wat hiër uitgevoer is, is die effek van 'n enkele gemuteerde ketting op die heliksstruktuur wel bepaal.

Moontlike verklarings vir die verskil in die T_m-waardes van tipe I^C en tipe I^{CC} prokollageen sal in afdeling 7.4 bespreek word.

7.3.3 Kinetika van sekresie van tipe I prokollageen

Kao *et al* (1977 en 1979) het getoon dat 'n normale sekresie-tempo van tipe I prokollageen uit fibroblaste afhanklik is van die tripelheliese konformasie van die molekules. Sekresie van prokollageen vind in twee fases, 'n vinnige- en 'n stadige fase, plaas. Prokollageen wat tydens dié twee fases gesekreter word kom ooreen in die verhouding van die pro α 1(I)- tot pro α 2(I)-kettings; die grootte van die pro α -kettings; die mate van interkettingdisulfiedbinding en prolielhidroksilering, sowel as die graad van tripelheliksvorming (Kao *et al*, 1977).

Die waardes vir die snelheidskonstantes wat die sekresie van kontrole tipe I prokollageen in die vinnige- en stadige fase beskryf, was $3.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ vir k_1 en k_2 onderskeidelik. Die waardes vir tipe I^C is $3.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ vir k_1 en k_2 onderskeidelik, terwyl die waardes vir tipe I^{CC} $3.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ onderskeidelik, is. Daar bestaan geen beduidende verskil tussen die waardes vir kontrole tipe I prokollageen, tipe I^C en tipe I^{CC} nie. Ook die t_{1/2} waardes van die verskillende spesies tipe I prokollageen vir die twee fases het grootliks ooreengestem (tabel 6.1). Uit bogenoemde kan afgelei word dat daar nie 'n algemene sekresiedefek bestaan nie en dat die meganisme van sekresie vir die verskillende prokollageen spesies nie verskil nie.

Die waardes wat hiér vir k_1 en k_2 verkry is, verskil van waardes wat deur De Wet *et al* (1983a) vir kontrole fibroblaste verkry is ($1.9 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ en $2.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ vir k_1 en k_2 onderskeidelik). Laasgenoemde waardes weerspieël egter die sekresie van alle kollageenagtige peptiede, terwyl die waardes van hierdie studie spesifiek die sekresie van tipe I prokollageen weerspieël.

'n Fraksie van 96% tipe I prokollageen is tydens die vinnige fase gesekreter, terwyl 93% tipe I^{CC} tydens dié fase gesekreter is. Hierteenoor is 'n fraksie van 74% nie-disulfiedgebonde tipe I prokollageen (tipe I^C en tipe I) tydens die vinnige fase deur die pasiënte se fibroblaste gesekreter. Indien sekresie van slegs tipe I^C gesimuleer is, is 'n fraksie van 63% verkry wat tydens die vinnige fase gesekreter word. Die fraksie tipe I^C wat tydens die vinnige fase gesekreter is, is duidelik laer as die fraksie tipe I prokollageen wat deur die kontrole fibroblaste gesekreter is. Verder is dit ook laer as die fraksie tipe I^{CC} wat gesekreter is. Die moontlike verklaring vir en betekenis van die verlaagde sekresie van tipe I^C prokollageen word in afdeling 7.4 bespreek.

7.3.4 Proseering van tipe I prokollageen deur N-proteïenase

Uit die waardes verkry vir termiese stabiliteit kon afgelei word dat 'n konformasieversteuring in die tripelheliese domein van tipe I^C en tipe I^{CC} prokollageen voorkom. Daar kon egter nie bepaal word of die konformasieversteuring beperk is tot die punt van die mutasie en of die konformasie oor 'n groter gebied versteur is nie.

Die substraatspesifisiteit van N-proteïenase vereis 'n normale drie-dimensionele struktuur van die N-terminale telopeptied, sowel as die korrekte snitpunt (Horlein *et al.*, 1978; Tuderman *et al.*, 1978; Tate *et al.*, 1983; Berger *et al.*, 1985; Tanzawa *et al.*, 1985). 'n Verlaagde prosesseeerbaarheid van tipe I en tipe III prokollageen as gevolg van mutasies wat lei tot konformasieveranderinge in die N-terminale telopeptied is reeds deur Sippola *et al.* (1984), Sippola-Thiele (1985) en Cole *et al.* (1986) beskryf. (Vergelyk ook afdeling 2.3).

Gesuiwerde N-protefenase wat by tipe I prokollageen gevoeg is, is deur ander navorsers gebruik om die prosesseeerbaarheid van tipe I prokollageen deur dié ensiem na te gaan (vergelyk Steinmann *et al*, 1980; Sippola *et al*, 1984 en Cole *et al*, 1986). In hierdie ondersoek is daar van 'n eenvoudige benaderingswyse, onder kondisies wat die prosesseeing van ekstrasellulêre prokollageen verhoog, gebruik gemaak (afdeling 3.8, hoofstuk 3 en afdeling 6.4, hoofstuk 6). Met hierdie benadering was dit moontlik om die prosesseeing van nuutgesintetiseerde prokollageen deur N-protefenase, gesintetiseer deur kontrole fibroblaste, na te gaan.

In figuur 6.8 (hoofstuk 6) is die prosesseeerbaarheid van tipe I prokollageen deur N-protefenase met verloop van tyd uitgedruk as 'n persentasie-verhouding van pCa1(I) oor die som van pCa1(I) en proa1(I). Die krommes wat vir die normale en die gemuteerde tipe I prokollageen verkry is, toon 'n ooreenstemmende verloop. Hieruit kan afgelei word dat prosesseeing van tipe I prokollageen wat gemuteerde proa1(I)-kettings bevat, normaal is. 'n Konformasieversteuring kom dus nie aan die N-terminale kant van die mutasie voor nie.

7.4 'N SAMEVATTENDE MODEL

'n Puntmutasie in een van die proa1(I) allele het gelei tot die sintese van gelyke hoeveelhede normale en gemuteerde proa1(I)-kettings. Hierdie kettings is in drie soorte tipe I trimere geïnkorporeer:

- i. tipe I met 'n T_m -waarde van $40,5^{\circ}\text{C}$ en waarvan 96% in die vinnige fase gesekreter is;
- ii. tipe I^C waarvan 63% in die vinnige fase gesekreter is en 'n T_m -waarde van 38°C gehad het, en

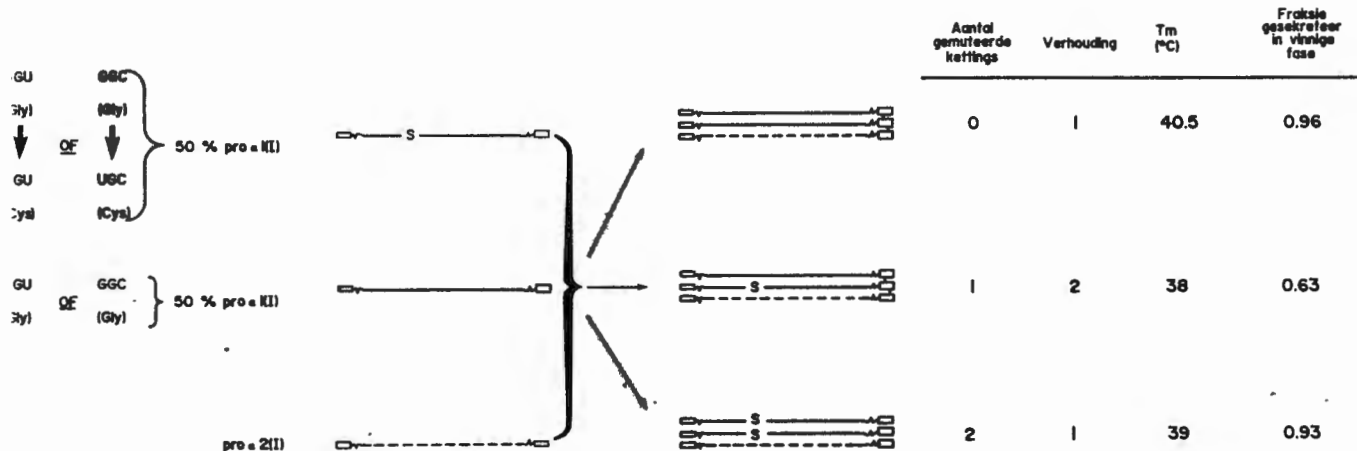
- iii. tipe I^{CC} met 'n T_m-waarde van 39°C en 'n sekresie van 93% in die vinnige fase (figuur 7.2).

Dit is interessant om daarop te let dat daar 'n korrelasie bestaan tussen die verlaging in termiese stabiliteit en die mate waartoe die sekresie van die verskillende spesies beïnvloed is.

Die mutante tipe I prokollageen wat hier ondersoek is, verteenwoordig 'n nuwe voorbeeld van protefeneliminasië (Eng. : proteïn suicide), 'n term wat die eerste keer deur Prockop (1984) gebruik is. Fibroblaste van pasiënt 2139 - 1 het tipe I trimere gesintetiseer waarvan 25% 'n normale stabiliteit het. 'n Verdere 25% van die trimere het 'n effense verlaging in stabiliteit, maar 'n normale sekresie geopenbaar (tipe I^{CC}). Die oorblywende 50% word verteenwoordig deur tipe I^C trimere waarvoor 'n verlaagde stabiliteit en sekresie verkry is. Dit impliseer dat die homosigotiese vorm van gemuteerde tipe I prokollageen (tipe I^{CC}) tot 'n mindere mate geaffekteer is as die heterosigotiese vorm (tipe I^C).

Williams en Prockop (1983) het gevind dat die inkorporasie van een of twee verkorte pro α 1(I)-kettings lei tot 'n verlaging in termiese stabiliteit van tipe I prokollageen. Hierdie tipe I prokollageen verteenwoordig 75% van die totaal. Volgens die outeurs blyk dit dat trimere wat twee verkorte pro α 1(I)-kettings bevat, selfs 'n laer termiese stabiliteit het as dié wat een verkorte pro α 1(I)-ketting bevat.

Substitusie van 'n klein Gly-residu met 'n groter Cys-residu in α 1(I)CB8 van gemuteerde pro α 1(I)-kettings sal lei tot 'n versteuring in die steriese organisasie van die aminosure in die kern van trimere wat gemuteerde pro α 1(I)-kettings bevat. Die disulfiedbrug in tipe I^{CC} blyk 'n stabiliserende



FIGUUR 7.2: Schematische voorstelling van die samevattende model se hooftrekke

kompensatoriese effek op die versteurde kwaternêre struktuur te hê, daarin dat dit die negatiewe effek van die verbreekte waterstofbrugbindings (vergelyk afdeling 7.3.2) ophef.

Hierteenoor beskik tipe I^C oor 'n vrye sulfidriëlgroep, afkomstig van die Cys-residu in die tripelheliese gebied, wat beskikbaar is vir interaksie met ander proteïene se vrye sulfidriëlgroepe. Die kwaternêre struktuur sal gevolglik tot 'n groot mate versteur word. Ontvouing van die tripelheliks met 'n "ritssluiters-effek" kan vanuit die punt geïnisiëer word. Die disulfiedgebonde Cys-residue van tipe I^{CC} is daarenteen nie beskikbaar vir dié tipe interaksies nie.

Die moontlikheid om so 'n disulfiedgebonde proteïen aan te toon word belemmer deur die noodsaaklikheid van pepsienvertering gevolg deur SDS-PAGE vir die vrystelling van die $\alpha 1(I)$ -dimeer. Pepsien verteer alle nie-tripelheliese strukture en die proteïen sal sodoende vernietig word.

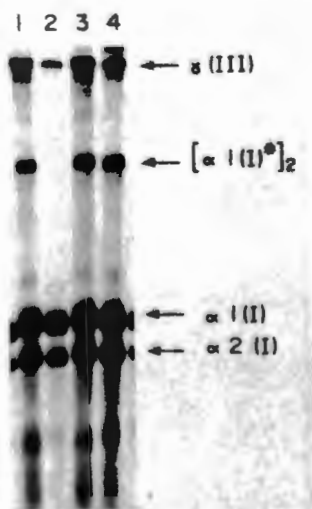
Ten slotte is dit belangrik om daarop te wys dat die resultate wat in hierdie ondersoek verkry is nie direk met dié wat Steinmann *et al* (1984) vir 'n tipe II OI-pasiënt verkry het (vergelyk ook afdeling 2.3.6), vergelyk moet word nie. Hierdie tipe II OI moet gesien word teen die agtergrond van 'n geskiedenis van MS. Die molekulêre basis van MS is nog onbekend en so ook die aanleidende hidrae hiervan, in assosiasie met die Cys-residu in $\alpha 1(I)CB_6$, tot die waargenome fenotipe.

7.5 KLINIESE MANIFESTASIE VAN DIE MUTASIE IN DIE FAMILIE

Pasiënt 2139 - 1 is 'n lid van 'n groot familie. Fibroblaste van ander aangetaste lede van die familie is op dieselfde wyse (vergelyk afdeling 3.4.1 hoofstuk 3 en afdeling 4.2.2.4 hoofstuk 4) as fibroblaste van pasiënt 2139 - 1 vir die teenwoordigheid van die disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -kettings geanaliseer. In figuur 7.3 is dit duidelik dat die dimeer in fibroblaste van al die aangetaste lede van die familie voorkom.

Vervolgens is 'n gedetailleerde fenotipiese beeld van nege van die lede van twee takke van die familie in samewerking met Dr. G.S. Gericke, Dr. H. Hamersma en Dr. P.R. Farnell saamgestel. ('n Samevatting van die beeld wat vir elke pasiënt uit kliniese-, oudiometriese- en radiologiese ondersoeke verkry is; word in bylaag I gegee). Hieruit was dit duidelik dat 'n groot fenotipiese variasie - wat wissel vanaf 'n matig aangetaste fenotipe met blou sklera, gehoorsverlies en geen frakture tot 'n fenotipe met blou sklera, veelvuldige beenbreuke, misvorming en sonder gehoorsverlies-tussen lede van die familie voorkom (tabel 7.3).

Gesien in die lig van die groot fenotipiese variasie is die waargenome teenwoordigheid van die disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -kettings in fibroblaste van lede van die familie wat tot 'n meerdere of 'n mindere mate aangetas is, verrassend. Variasie in die kliniese manifestasie is 'n karakteristieke eienskap van 'n groot aantal outosomaal dominante defekte, maar is nog nie voorheen binne 'n familie met osteogenesis imperfecta aangetoon nie. Die gemak waarmee die $\alpha 1(I)$ -dimeer met behulp van die benaderingswyses in afdeling 3.4.1 (hoofstuk 3) en afdeling 4.2.2.4 (hoofstuk 4) geïdentifiseer kan word, maak dit 'n belangrike hulpmiddel vir die identifisering van aangetaste lede van



FIGUUR 7.3 Voorkoms van die $\alpha 1(I)$ -dimeer in ander lede van die familie. Fibroblaste van ander lede van die familie is met [^3H]-prolien gemerk. Hierna is dit met pepsien verteer (afdeling 3.4.1) en skeiding op 'n 4 - 8% SDS-poliakriela-miedgel uitgevoer.



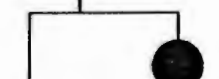
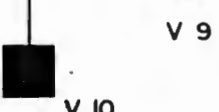
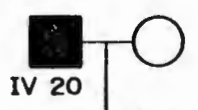


Baan 1 V.7

Baan 3 IV.27

Baan 2 IV.21

Baan 4 V.10

TABEL 7.3 Fenotipiese variasie tussen lede van familie 2139¹

Verkorte stamboom	Ouderdom	Aantal frakture	Skelet= afwykings	Postuur	Kleur van sklera	Presinlele doofheid	Worm- bene
	59	6	UITGESPROKE	KLEIN	BLOU	matig	afwesig
	35	geen	geen	normaal	BLOU	ERG	TEENWOORDIG
	16	14	UITGESPROKE	KLEIN	wit	geen	TEENWOORDIG
	14	12	MATIG	normaal	BLOU	geen	afwesig
	44	geen	MATIG	normaal	wit	matig	afwesig
	20	32	UITGESPROKE	KLEIN	BLOU	geen	TEENWOORDIG
	15	geen	geen	normaal	wit	geen	afwesig

1. Nommers van die lede van die familie stem ooreen met die in-
figuur I.1 (bylaag I).

die familie reeds op 'n vroeë ouderdom.

7.6 SLOTSOM

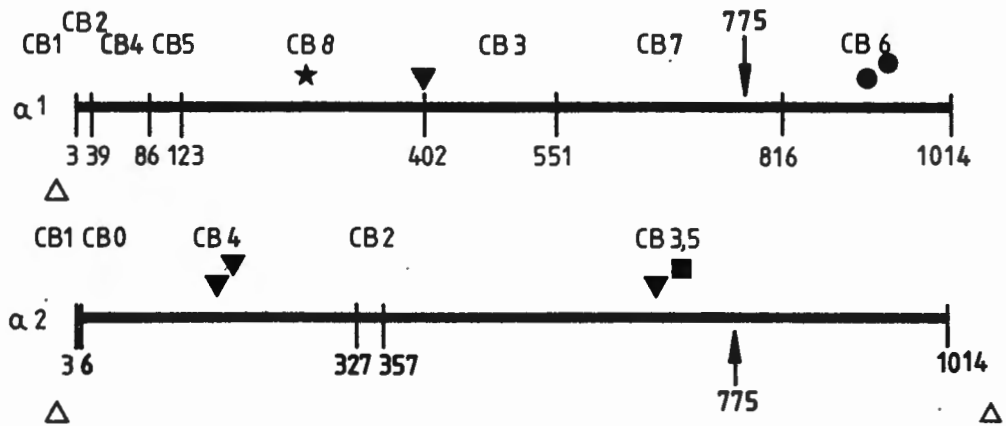
In hierdie bespreking is veral klem gelê op die resultate wat verkry is, naamlik:

- i. die voorkoms van 'n Cys-residu in $\alpha 1(I)CB8$,
- ii. die normale prosesseebaarheid van die pasiënt se gemuteerde tipe I prokollageen deur N-proteïenase, en
- iii. die verlaging in termiese stabiliteit en sekresie van die gemuteerde tipe I prokollageen, veral tipe I^C.

Hierdie bevindinge kon die kernvrae wat rondom die mutant gevra is (vergeelyk afdeling 2.4, paragraaf 6, p. 60), beantwoord. Die betekenis van en verklarings vir die bevindinge van hierdie ondersoek kon dan ook vervat word in 'n samevattende model (afdeling 7.5).

Die werklike betekenis van hierdie ondersoek kom egter eers na vore wanneer dit in konteks gesien word met studies wat reeds gedoen is. Na aanleiding van figuur 7.4, kan die bekende OI-mutasies soos volg opgesom word:

- i. Vier gevalle van deleisies in $\text{pro}\alpha 1(I)$ - of $\text{pro}\alpha 2(I)$ -kettings (Byers *et al*, 1983; De Wet *et al*, 1983a; Williams en Prockop, 1983; Sippola *et al*, 1984).
- ii. Een geval van 'n invoeging in die $\text{pro}\alpha 2(I)$ -ketting (Byers *et al*, 1981c).



FIGUUR 7.4 Die posisie van verskillende mutasies in die $\alpha 1(I)$ -en $\alpha 2(I)$ -kettings ten opsigte van die mutasie wat hier ondersoek is. Die delesies op die grens van $\alpha 1(I)CB8$ en $\alpha 1(I)CB3$ is deur Williams en Prockop (1983) aangetoon. Cole *et al* (1986) het die delesie van ongeveer 24 aminosure in die N-terminale propeptied van die pro $\alpha 1(I)$ -ketting aangetoon. Puntmutasies wat die substitusie van 'n aminosuur met 'n Cys-residu in $\alpha 1(I)CB6$ veroorsaak is deur Steinmann *et al* (1984) en Nicholls *et al* (1984) aangetoon. 'n Delesie in die N-terminale propeptied van $\alpha 2(I)$ -kettings is vir 'n EDS VII pasiënt aangetoon (De Wet, ongepubliseerde data); Sippola *et al* (1984) kon 'n delesie van ongeveer 30 aminosure in $\alpha 2(I)CB4$ aantoon, terwyl Byers *et al* (1983) 'n delesie in dieselfde fragment kon aantoon. 'n Delesie van 18 aminosure is deur De Wet *et al* (1983) in $\alpha 2(I)CB3,5$ beskryf. Byers *et al* (1981c) het 'n moontlike invoeging in $\alpha 2(I)CB3,5$ beskryf, terwyl Deak *et al* (1983) 'n leesraamverskuiwing in die C-propeptied van pro $\alpha 2(I)$ -kettings beskryf het.

▼ Delesies in die gebiede wat deur CNBr-fragmente gedek word.

▽ Delesies buite die CNBr-fragment gebied.

■ Invoegings

● Puntmutasies

★ Die puntmutasie in pro $\alpha 1(I)$ -kettings in pasiënt 2139 - 1.

iii. Puntmutasies in die pro α 1(I)-kettings (Nicholls *et al*, 1984; Steinmann *et al*, 1984).

Twee gevalle.

(Vergelyk ook afdeling 2.3, hoofstuk 2). Hieruit is dit duidelik dat delesies die grootste persentasie van die bekende mutasies omvat het. Die aantoning van die Cys-residu in α 1(I)CB8 verhoog die relatiewe bydrae van die puntmutasies tot die totale aantal bekende mutasies. Hieruit is dit duidelik dat puntmutasies 'n groter rol in OI mag speel as wat aanvanklik verwag is. Dat die puntmutasies wat sover aangetoon is almal die substitusie van 'n aminosuur met 'n Cys-residu was, weerspieël nie net die relatiewe voorkoms van die mutasie nie, maar ook die gemak waarmee die teenwoordigheid van α 1(I)-dimere aangetoon kan word. Ander aminosuursubstitusies sou meer subtiele veranderinge van tipe I kollageen tot gevolg hê wat meer verfynde tegniese vir die opsporing daarvan sou vereis, byvoorbeeld iso-elektriese fokusering waar ladingsveranderinge op die kollageen voorkom.

In die ondersoek is verder aangetoon dat tipe I prokollageen wat twee gemuteerde pro α 1(I)-kettings bevat, meer stabiel is as tipe I prokollageen wat een gemuteerde pro α 1(I)-ketting bevat. Dit impliseer dat die heterosigotiese vorm van die proteïen minder stabiel is as die homosigotiese vorm.

Ten slotte kon aangedui word dat die sintese van disulfiedgebonde pro α 1(I)-kettings deur fibroblaste van aangetaste lede van die familie as belangrike hulpmiddel kan dien vir die identifisering van aangetaste persone met gebruikmaking van die benaderingswyse wat reeds beskryf is.

Die presiese aard van die mutasie is nie in hierdie ondersoek bepaal nie aangesien die aminosuurvolgordes vir die mens

$\alpha 1(I)CB8$ fragment nog nie bekend is nie. S_1 -nuklease-analises om die mutasie op DNA-vlak te karakteriseer is nie gedoen nie aangesien cDNA's wat oor die gebied van die mutasie strek, nog nie beskikbaar is nie (Bernard *et al*, 1983a). 'n Polimorfisme in die $pro\alpha 1(I)$ -allele sou as 'n belangrike hulpmiddel kon dien vir die opsporing van aangetaste persone in die groot familie. Tot op datum is daar egter nog nie 'n polimorfisme in die $pro\alpha 1(I)$ -geen geïdentifiseer nie.

OPSOMMING

Osteogenesis imperfecta (OI) is 'n heterogene groep bindweefsel-siektetoestande wat gekenmerk word deur brosheid van bene en word dikwels geassosieer met ander kliniese simptome soos skeletale misvorming, blou sklera, gehoorverlies en dentinogenesis imperfecta. OI kan in ten minste vier verskillende subtypes verdeel word: tipe I, tipe II, tipe III en tipe IV. 'n Aantal ondersoekes, wat gedoen is met fibroblastweefselkulture, het getoon dat sommige van die bindweefsel-siektetoestande geassosieer kan word met 'n verandering in die metabolisme van tipe I prokollageen.

Sintese van tipe I prokollageen deur fibroblaste van 'n pasiënt met tipe I OI is ondersoek. Pepsienbehandeling van prokollageen, gevolg deur SDS-PAGE, het getoon dat tipe I kollageen waarvan twee $\alpha 1(I)$ -kettings disulfiedgebonde was, deur die fibroblaste gesintetiseer is. Fragmentering van die disulfiedgebonde $\alpha 1(I)$ -dimere met vertebraatkollagenase en sianogeenbromied het getoon dat 'n sisteïen-residu in $\alpha 1(I)$ CB8 voorkom. Hierdie fragment bevat aminosuurresidue 124 - 402 van die $\alpha 1(I)$ -ketting.

Inkorporering van een gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -ketting in tipe I trimere het die termiese stabiliteit met 2,5°C verlaag. Hierteenoor het die inkorporering van twee gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -kettings die termiese stabiliteit met 1°C verlaag. Drie tipes trimere is gevorm, naamlik: 'n normale tipe met normale pro $\alpha 1(I)$ -kettings; 'n tipe I trimeer met een normale en een gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -ketting en 'n trimeer met twee gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -kettings. Tipe I trimere wat slegs een gemuteerde pro $\alpha 1(I)$ -ketting bevat, is stadiger

gesekreter as normale tipe I trimere. 'n Fraksie van 63% is in die vinnige fase van sekresie gesekreter teenoor die normale fraksie van 96%. Die inkorporasie van gemuteerde pro α 1(I)-kettings in tipe I trimere het geen effek op die prosessering deur N-proteïenase gehad nie. Die mees waarskynlike verklaring vir die verlaging in termiese stabiliteit en sekresie van die gemuteerde prokollageen is dat 'n glisien-residu gesubstitueer is met 'n sistefen-residu in die helfte van die pro α 1(I)-kettings wat deur die pasiënt se fibroblaste gesintetiseer word.

Radiologiese ondersoeke van die indeksgeval en sewe ander lede van die familie, wat drie generasies verteenwoordig, het 'n groot variasie in fenotipe getoon. Analise van kollageen gesintetiseer deur fibroblaste van lede wat tot 'n mindere of 'n meerdere mate aangetas is, is gedoen. Die gemuteerde kollageen is deur al hierdie fibroblaste gesintetiseer.

Die resultate van hierdie ondersoek sal in die volgende tydskrifte gepubliseer word:

1. De Vries, W.N. en De Wet, W.J.

"The molecular defect in an autosomal dominant form of osteogenesis imperfecta : Synthesis of type I procollagen containing cysteine in the triple-helical domain of pro α 1(I) chains" (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9056.

2. De Vries, W.N. en De Wet, W.J.

"Cysteine in α 1(I) chains of human type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta" (1986). In: Development and diseases of cartilage and bone matrix: UCLA symposia on molecular and cellular biology, New series, Vol. 46, in druk.

Resultate van hierdie studie is ook by een internasionale en verskeie nasionale kongresse aangebied:

1. De Vries, W.N. en De Wet, W.J.

"Cysteine in α (I) chains of human type I collagen produces a clinically heterogeneous form of osteogenesis imperfecta" UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology : Development and Diseases of Cartilage and Bone Matrix, Lake Tahoe, Kalifornië; (1986). Uittreksel no. H - 20.

2. De Vries, W.N. en De Wet, W.J.

"Synthesis of altered type I procollagen in a family with osteogenesis imperfecta". 25ste Jaarlikse Patologieskongres van die Suid-Afrikaanse Vereniging van Patoloë, Johannesburg (1985). Uittreksel no. C - 17.

3. De Vries, W.N. en De Wet, W.J.

"The molecular defect in an autosomal dominant form of osteogenesis imperfecta." Die Eerste Gekombineerde Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemievereniging, Suid-Afrikaanse Genetiese Vereniging en Die Suid-Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie, Johannesburg (1986).

4. De Vries, W.N., Gericke, G.S., Hamersma, H., Du Toit, J. en De Wet, W.J.

"Clinical heterogeneity in a family with osteogenesis imperfecta." Die Eerste Gekombineerde Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemievereniging, Suid-Afrikaanse Genetiese Vereniging en die Suid-Afrikaanse Vereniging vir Mikrobiologie, Johannesburg (1986).

BYLAAG I

'N FENOTIPIESE BEELD VAN FAMILIE 2139*

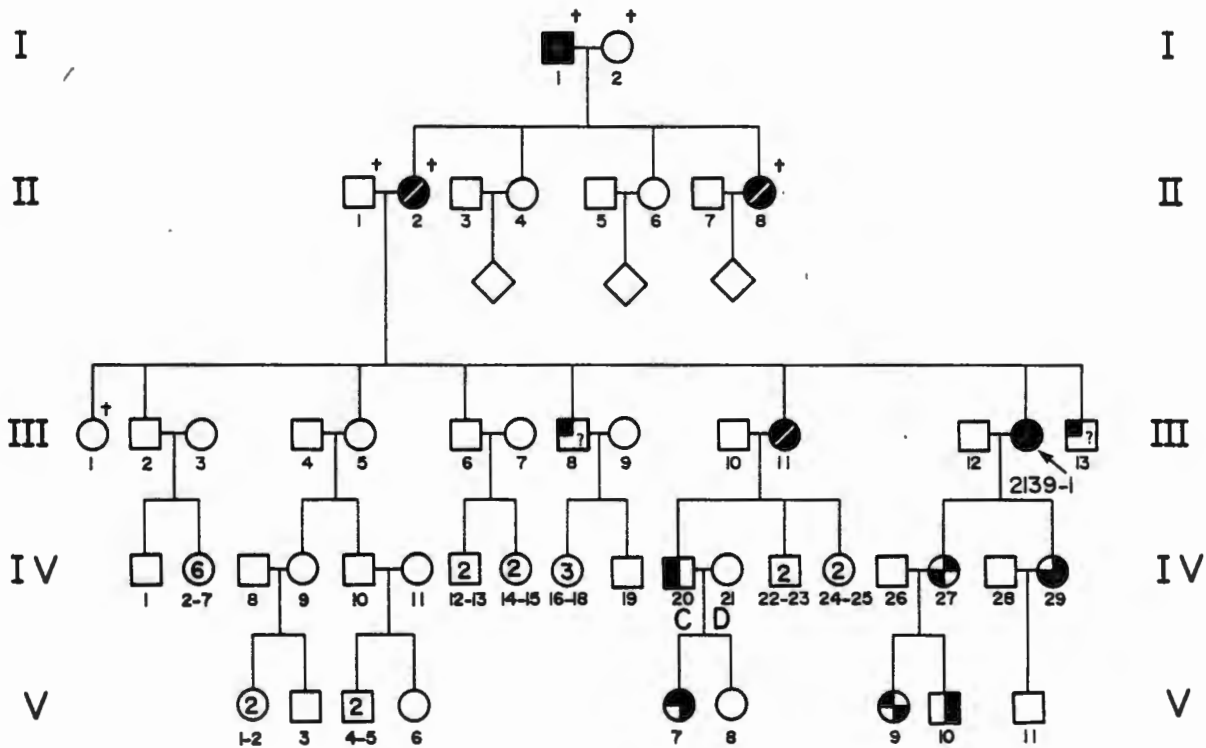
Die familiegeskiedenis van hierdie Kaukasiese familie kon oor vyf generasies nagegaan word (figuur I.1).

'n Deel van hierdie bespreking is gebaseer op inligting wat uit gesprekke met lede van die familie, sowel as van foto's, bekom is. Meer gedetailleerde inligting is verder vir twee takke van die familie verkry na kliniese, radiologiese en tandheelkundige ondersoekte.

Alhoewel daar 'n wye fenotipiese verskeidenheid onder lede van die familie waargeneem is, kan die familie as tipe IA geklassifiseer word. Dentinogenesis imperfecta was afwesig by al die lede van die familie wat onderwerp is aan tandheelkundige ondersoekte.

Die eerste lid van die familie waarvoor inligting bekom kon word, is die grootvader van die indeksgeval (pasiënt 2139 - 1), naamlik pasiënt I.1. Hy het 'n klein postuur gehad (duidelik sigbaar op 'n foto), maar verder is geen inligting oor hierdie pasiënt beskikbaar nie. Hierdie pasiënt het vier dogters gehad, waarvan twee (II.2 en II.3) klein van postuur was en twee (II.6 en II.4) fenotipies normaal voorgekom het.

Die indeksgeval is die tweede jongste van agt kinders waarvan vyf (III.1, III.2, III.5, III.6 en III.11) fenotipies normaal voorgekom het, terwyl drie (III.8, III.13 en 2139 - 1) fenotipiese kenmerke van OI vertoon het. Een van die kinders wat fenotipies normaal was, is reeds op 16jarige leeftyd aan onbekende oorsake oorlede. Die belangrikste kenmerkende kliniese simptoom by pasiënte III.8 en III.13 wat op foto's



FIGUUR I.1: Uitgebreide, aangepaste stamboom van familie 2139.

- Vroulik
- Manlik
- Fenotipiese kenmerke van OI
(mondellinge mededelings)
- ◻ Misvorming (foto's); verdere
kliniese simptome onbekend
- ◻ Blou sklera
- ◻ Misvorming
- ◻ Frakture
- ◻ Gehoorverlies
- Indeksgeval

waargeneem kon word, was pectus carinatum.

Vir die indeksgeval (pasiënt 2139 - 1), sowel as 'n aantal ander lede van die familie, kon daar 'n breedvoerige kliniese beskrywing bekom word.

Pasiënt 2139 - 1

Die pasiënt is 'n 59-jarige vrou met 'n goeie gesondheid. 'n Algemene kliniese ondersoek het getoon dat die pasiënt blou sklera, 'n klein postuur (138,5 cm), lang armspan (169 cm) en fisiese misvorming, waaronder duidelik waarneembare pectus carinatum en kifoskolirose, het. Verder het die pasiënt 'n geskiedenis van 6 frakture.

Radiologiese toetse het algemene osteopenie getoon. Geen Worm-bene is in die skedel waargeneem nie, maar wel 'n verdunning van die kalvaria sowel as intra-serebrale kalsifisering.

Die belangrikste kenmerk van die borskas was 'n bikonkawe skoliose van die dorsale werwelkolom. 'n Verdunning van die korteks van die werwels is by die servikale-, torakale- en lumbale wyke waargeneem. Die inlynstelling van die servikale werwels was normaal, terwyl daar 'n merkbare kifose van die torakale werwelkolom voorgekom het. 'n Toename in die normale lordose met 'n skoliose konveks na links in dié gebied is ook waargeneem. Verder kon 'n bikonkawe vervorming van die torakale- en lumbale werwels aangetoon word.

'n Ondersoek van X-strale van die pelvis het duidelike acetabuli protrusio aangetoon. By die langbene kon 'n Shepard-agtige vervorming van die regter femur sowel as 'n ou fraktuur met kallus- en periosteale reaksie aangetoon word. Verder het 'n merkbare buiging van die tibia, fibula

en proksimale punt van die ulna voorgekom.

Oudiometriese analise het 'n 43% geleidingsverlies, wat kenmerkend is van OI, vir die linkeroor getoon. Die regteroor het daarenteen 'n gehoorskerpte by die onderste grens van normaal gehad. Beengeleiding was normaal vir die berekening van die gehoor, behalwe die heel hoë tone wat aangetas was.

Die opsommende gevolgtrekking is dat kenmerkende veranderinge wat gepaard gaan met OI radiologies by die langbene van die ledemate, pelvis en werwelkolom aangetoon is. Oudiometriese afwykings, kenmerkend van OI, is ook aangetoon.

Pasiënt IV.27

Hierdie pasiënt is 'n 35 jarige vrou waar blou sklera en gehoorverlies as die enigste duidelike kliniese simptome van OI voorgekom het. Gehoorprobleme het reeds op 23-jarige ouderdom gemanifesteer en gelei tot 'n spadektomie van die regteroor. 'n Uitermatige luggeleidingsverlies (80%) wat gepaard gaan met 'n aangetaste beengeleiding is vir hierdie oor aangetoon. Die linkeroor was in 'n mindere mate aangetas met 'n luggeleidingsverlies van 44%. Beengeleiding was normaal by lae frekwensies, terwyl middel en hoë frekwensies al tot 'n mate aangetas is.

'n Kliniese ondersoek het getoon dat die pasiënt normale liggaamsproporsies het (151 cm) met 'n armspan van 163 cm. Matige gewrigsmobiliteit is verder in die ondersoek gevind.

Geringe osteopenie is radiologies gediagnoseer. 'n Röntgenogram het getoon dat die sigbaarheid van die pituitêre fossa, swak is as gevolg van osteopenie en dat Worm-bene

in die oksipitale gebied aanwesig is.

Röntgenogramme van die werwelkolom het die volgende geringe tot matige veranderinge aangedui:

- i. skoliose van die dorsale wyk,
- ii. skoliose met gepaardgaande toename in die normale lordose van die lumbale wyk, en
- iii. 'n bikonkawe vervorming van die werwels van die lumbale wyk.

Pasiënt V.9

Die pasiënt, 'n 16-jarige dogter, vertoon tot 'n groot mate dieselfde fenotipiese kenmerke as die indeksgeval. 'n Kliniese ondersoek het getoon dat sy wit sklera, 'n verkorte postuur (135,5 cm) en 'n abnormale lang armspan het. Verder is daar met die ondersoek vasgestel dat 'n uiterste hipermobiliteit van die gewrigte by die pasiënt voorkom. Die gehoor van die pasiënt is normaal.

Radiologiese ondersoeke het getoon dat skeletafwykings kenmerkend van OI, naamlik vervorming van die langbene en werwelkolom teenwoordig is. Verder is 'n algemene osteopenie in die skelet waargeneem.

Hierdie pasiënt het 'n geskiedenis van 14 frakture wat oor 'n tydperk van 8 jaar wat vanaf 'n ouderdom van 5 jaar voorgekom het. Van die 18 frakture het slegs een van die elmboog voorgekom, terwyl die res verdeel was tussen beide femurs. Hierdie frakture het uiteindelik daartoe gelei dat staalpenne aan albei femurs aangebring is. 'n Verdunning van die femurskagte was radiologies sigbaar. 'n Effense buiging van die distale ent van die tibia en fibulas kon ook waargeneem word.

Acetabuli protrusio van die bekken, veral aan die linkerkant, was aanwesig. Worm-bene is in die oksipitale gebied van die skedel waargeneem, terwyl die pituifêre fossa normaal vertoon het.

Klinies waarneembare abnormaliteite van die werwels was die volgende:

- i. 'n verlies van die normale buiging in die servikale wyk,
- ii. bikonvekse skoliose van die dorsale wyk, en
- iii. 'n duidelike kifose van die dorsale wyk.

Pasiënt V.10

Die pasiënt is 'n 14-jarige seun. Blou sklera, normale gehoor, 'n byna normale postuur (162,5 cm) en 'n uitermatige lang armspan is tydens die ondersoek waargeneem. Oor 'n tydperk van 12 jaar het hierdie pasiënt 12 frakture opgedoen. Die eerste hiervan het tydens geboorte voorgekom en beskikbare inligting dui aan dat die frakture beperk was tot die tibia, radius, ulna en beide femurs.

Die herhaaldelike voorkoms van frakture van die femurs het daartoe gelei dat staalpenne aan albei femurs aangebring is. 'n Verwyding van die distale ent van die regter femur wat gepaard gaan met sistiese veranderinge is verder op röntgenogramme waargeneem. Hierdie sistiese veranderinge is moontlik 'n sekondêre effek van 'n vorige fraktuur. 'n Minimale buiging van die tibia en fibulas het voorgekom.

Verder is osteopenie van die pituifêre fossa, maar ook die res van die skelet radiologies aangetoon. Geen Worm-bene was in die skedel waarneembaar nie.

Die buiging van die werwelkolom was in drie wyke abnormaal. Eerstens was 'n verlies van die normale buiging van die servikale wyk waarneembaar. Tweedens is 'n matige skoliose en kifose van die torakale werwels waargeneem, terwyl 'n toename in die normale lordose van die lumbale wyk voorgekom het. Acetabuli protrusio van die pelvis was afwesig.

Pasiënt IV.29

Die pasiënt is die 32-jarige dogter van die indeksgeval met tipiese blou sklera, veelvuldige frakture (6) en aangetaste gehoor. Oudiometriese toetse het gedui op 'n luggeleidingsverlies van 57% by die regteroor, terwyl die luggeleidingsverlies slegs 13% by die linkeroor was. Beengeleiding in die regteroor was goed in die lae tone, maar nie in die middel- en hoë tone nie. 'n Operatiewe verwydering van die gefikseerde stapes is reeds op die oor uitgevoer.

Radiologiese ondersoeke van die skelet is nie op hierdie pasiënt uitgevoer nie, aangesien sy ten tyde van die ondersoek 31 weke swanger was.

Pasiënt IV.20

'n Kliniese ondersoek het gedui op 'n effense verkorting van die toraks, wit sklera en geringe gehoorverlies by hierdie 44 jarige manlike susterskind van die indeksgeval. Die effense gehoorverlies kon moontlik aan blootstelling aan geraas, eerder as OI, toegeskryf word. 'n Lengte van 161 cm en 'n armspan van 178 cm is by die pasiënt gemeet.

'n Onderzoek van die skelet het aangetoon dat hierdie man 'n mate van osteopenie het. Behalwe vir osteopenie kon geen ander abnormaliteite vir die langbene van die ledemate waargeneem word nie. By die werwelkolom is die volgende waargeneem, naamlik:

- i. 'n normale servikale wyk,
- ii. kifose van die dorsale wyk,
- iii. 'n toename in die normale lordose van die lumbale wyk,
en
- iv. bikonkawe vervorming van die werwels in die lumbale-
en dorsale wyke.

Pasiënt V.7

Hierdie pasiënt is 'n 20-jarige vrou met blou sklera, normale gehoor, 'n klein postuur (126 cm) en 'n besondere lang armspan (163 cm). Voorts is uitermatige hipermobiliteit van die gewrigte aangetoon. Veelvuldige frakture (32) het oor 'n tydperk van 18 jaar, wat strek van 3 maande tot 18 jaar, voorgekom.

Osteopenie kon algemeen op röntgenogramme waargeneem word. Worm-bene het verder in die oksipitale gebied van die skedel voorgekom. 'n Merkbare skoliose, konveks na regs, is vir die dorsale werwels aangetoon, terwyl skoliose, konveks na links, by die lumbale verwelkolom voorgekom het. Die mid-sakrale gebied het verder 'n akute buiging en 'n toename in die normale lordose gehad.

Behalwe vir 'n effense buiging van die radius, was die digtheid van die beenwand vir die humerus, radius en ulna normaal. Op die röntgenogramme het die regter femur, die tibia en fibulas baie dun vertoon. Verder is tekens van 'n fraktuur en 'n verbreding van die distale metafise van die regter femur waargeneem. Verbreding van die distale- en proksimale metafises van die tibia en fibulas het ook voorgekom.

Pasiënt V.8

Hierdie 15-jarige dogter het wit sklèra, normale gehoor en 'n effense gewrigshpermobiliteit gehad. Die radiologiese analise het slegs geringe skoliose van die dorsale werwelkolom en kifose van die lumbale werwelkolom getoon.

Pasiënt IV.21

Hierdie 38-jarige vrou is die enigste kontrole persoon in die familiegroep wat aan kliniese- en radiologiese toetse onderwerp is. Röntgenogramme het getoon dat osteopenie van die skelet sowel as matige vervorming van die werwelkolom voorkom. Hierdie veranderinge sluit in:

- i. skoliose van die boonste dorsale wyk
- ii. kifose van die mid-dorsale gebied, en
- iii. 'n toename in die normale lordose van die lumbale wyk.

'n Vervorming van die koppe van die eerste, tweede, derde en vierde middelhandbene, moontlik as gevolg van vorige chirurgie, kon waargeneem word. Verder kon geen abnormaliteite van die skelet waargeneem word nie.

* Hierdie kliniese-, oudiometriese- en radiologiese ondersoeke is gedoen in samewerking met:

1. Dr. G.S. Gericke, M.B. Ch. B. (Paed) FCP (SA) M.D. (UCT).
2. Dr. H. Hamersma, M.B. Ch.B. (Pret) M.D. (Amsterdam).
3. Dr. P.R. Farndell, radioloog.

BYLAAG II : AFKORTINGS

A	adenosien
Ala	alanien
Arg	arginien
Asp	asparagien
BFB	bromofenolblou
β ME	2-merkpto-etanol
bp	base pare
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase
CNBr	sianogeenbromied
Cys	sistefen
DI	dentinogenesis imperfecta
DNA	deoksiribonukleifensuur
DMEM	Eagle se medium soos aangepas deur Dulbecco
DMSO	dimetielsulfoksied
EDS	Ehlers-Danlos-sindroom
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
G	guanosien
Glu	glutamien
Gly	glisien
His	histidien
Hyl	hidroksilisien
Hyp	hidroksiprolien
Ile	isoleusien
kb	kilobase
Kd	kilodalton
Leu	leusien
Lys	lisien
Met	meteonien
mRNA	boodskapper ribonukleifensuur
MS	Marfan-sindroom
NEM	N-etielmalefimid

NP 40	Nonidet P-40
OI	osteogenesis imperfecta
o.p.m.	omwentelingē per minuut
pAB	para-aminobensamidiē
PAGE	poliakriēlamiedgelektroforese
PBS	fosfaatgebufferde fisiologiese sout-oplossing
Phe	fēniēlalanien
PMSF	fēniēlmetiēlsulfoniēlfluoried
PPO	2,5-difēniēloksasool
Pro	proliēn
SD	standaardafwyking
Ser	seriēn
SDS	natriumdodesiēlsulfaat
SDS-PAGE	PAGE in die teenwoordigheid van SDS
T	timidiēn
TCA	trichloorasynsuur
Term	terminasiēkodon
Thr	treonien
Tris	tris-(hidroksimetiēl)-amino-metaan
Tyr	tirosien
U	uridiēn
Val	valiēn

LITERATUURLYS

ALBRIGHT, J.A. & MILLAR, E.A. (1981). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 159, 2.

ANTONARAKIS, S.E., BOEHM, C.D., GIARDINA, P.J.V. & KAZAZIAN, H.H. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 137.

BABEL, W. & GLANVILLE, R.W. (1984). *Eur. J. Biochem.* 143, 545.

BALIAN, G., CLICK, E.M. & BORNSTEIN, P. (1971). *Biochemistry* 10, 4470.

BALIAN, G., CLICK, E.M., HERMONDSON, M.A. & BORNSTEIN, P. (1972). *Biochemistry* 11, 3798.

BARON, R., GERTNER, J.M., LANG, R. & VIGNERY, A. (1983). *Pediat. Res.* 17, 204.

BARSH, G.S. & BYERS, P.H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 3838.

BARSH, G.S., PETERSON, K.E. & BYERS, P.H. (1981). *Collagen Rel. Res.* 1, 543.

BATEMAN, J.F., MASCARA, T., CHAN, D. & COLE, W.G. (1984). *Biochem. J.* 217, 103.

BEIGHTON, P. (1981). *J. Med. Genet.* 18, 124.

BEIGHTON, P. & VERVELD, G.A. (1985) *Clin. Genet.* 27, 298.

BEIGHTON, P., WINSHIP, I. & BEHARI, D. (1985) *Clin. Genet.* 28, 69.

- BERGER, J., TANZAWA, K. & PROCKOP, D.J. (1985). *Biochemistry* 24, 600.
- BERGER, J., TANZAWA, K. & PROCKOP, D.J. (1985). *Biochemistry*. 24, 600.
- BERNARD, M.P., MYERS, J.C., CHU., M-L., RAMIREZ, F., EIKENBERRY, E.F. & PROCKOP, D.J. (1983a). *Biochemistry*. 22, 1139.
- BERNARD, M.P., CHU, M-L., MYERS, J.C., RAMIREZ, F., EIKENBERRY, E.F. & PROCKOP, D.J. (1983b). *Biochemistry*. 22, 5213.
- BLOBEL, G. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 17, 1496.
- BOEHM, C.D., ANTONARAKIS, S.E., PHILLIPS, J.A., STETTEN, G. & KAZAZIAN, H.H. (1983). *N. Eng. J. Med.* 308, 1054.
- BONADIO, J. & BYERS, P.H. (1985). *Nature* 316, 363.
- BONADIO, J., HOLBROOK, K.A., GELINAS, R.E., JACOB, J. & BYERS, P.H. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 1734.
- BORIGHT, A.P., LANCASTER, G.A. & SCRIVER, C.A. (1984). *Hum. Genet.* 67, 29.
- BORNSTEIN, P. (1970). *Biochemistry*. 9, 2408.
- BORNSTEIN, P. & TRAUB, W. (1979). in "The Proteins" (Neurath, H. en Hill, R.L. red.) Derde uitgawe Vol. 4 p 411 Academic Press, New York.
- BORNSTEIN, P. & SAGE, H. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* 49, 957.
- BREBNER, D.K., GROBLER - RABIE, A.F., BESTER, A.J., MATHEW, C.G. & BOYD, C.D. (1985). *Hum. Genet.* 70, 25.

- BREINDL, M., HABERS, K. & JAENISCH, R. (1984). *Cell* 38, 9.
- BROWN, D.M. (1981). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 159, 75.
- BRÜCKNER, P. & PROCKOP, D.J. (1981). *Anal. Bioch.* 110, 360.
- BRÜCKNER, P., EIKENBERRY, E.F. & PROCKOP, D.J. (1981). *Eur. J. Biochem.* 118, 607.
- BURGESON, R.E., EL ALDI, F.A., KAITILA, I.I. & HOLLISTER D.W. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 2579.
- BURGESON, R.E. (1982). *J. Inves. Der.* 79, 255.
- BURGESON, R.E., MORRIS, N.P., SAKAI, L.Y. & MURRAY, L.W. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 460, 47.
- BUTLER, W.T. & CUNNINGHAM, L.W. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 3882.
- BYERS, P.H., BARSH, G.S. & HOLBROOK, K.A. (1981a). *Collagen Rel. Res.* 5, 475.
- BYERS, P.H., BARSH, G.S. & HOLBROOK, K.A. (1981b). *Birth Defects: Original Article Series* Vol. XVII no. 2 p. 147 March of Dimes Birth Defects Foundation.
- BYERS, P.H., SIEGEL, R.C., PETERSON, K.E., ROWE, D.W., HOLBROOK, K.A., SMITH, L.T., CHANG, Y-H. & FU, J.C.C. (1981c). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7745.
- BYERS, P.H., SHAPIRO, J.R., ROWE, D.W., DAVID, K.E. & HOLBROOK, K.A. (1983). *J. Clin. Inv.* 71, 689,
- CETTA, G., LENZI, L., RIZZOTTI, M., RUGGERI, A., VALLI, M. & BONI, M. (1977). *Connect. Tis.* 5, 51.

- CHEAH, K.S.E. (1985). *Biochem. J.* 229, 287.
- CHU, M-L., WILLIAMS, C.J., POPE, G., HIRSCH, J., PROCKOP, D.J. & RAMIREZ, F. (1983). *Nature* 304, 78.
- CHU, M-L., ROWE, D., NICHOLIS, A.C., POPE, F.M. & PROCKOP, D.J. (1984a) *Collagen Rel. Res.* 4, 389.
- CHU, M-L., DE WET, W., BERNARD, M., DING, J.F., MORABITO, M., MYERS, J., WILLIAMS, C. & RAMIREZ, F. (1984b) *Nature* 310, 337.
- CHU, M-L., DE WET, W., BERNARD, M. & RAMIREZ, F. (1985a) *J. Biol. Chem.* 260, 2315.
- CHU, M-L., WEIL, D., DE WET, W., BERNARD, M., SIPPOLA, M. & RAMIREZ, F. (1985b) *J. Biol. Chem.* 260, 4357.
- CHU, M-L., GARGIULO, V., WILLIAMS, C.J. & RAMIREZ, F. (1985c) *J. Biol. Chem.* 260, 691.
- CHUNG, E. & MILLER, E.J. (1974) *Science* 183, 1200.
- COLE, W.G., CHAN, D., CHAMBERS, G.W., WALKER, I.D., & BATEMAN, J.F. (1986) *J. Biol. Chem.*, in druk.
- CROPP, G.J.A. & MYERS, D.N. (1972) *Pediatrics* 49, 375.
- DEAK, S.B., NICHOLLS, A., POPE, M.F. & PROCKOP, D.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15192.
- DE WET, W.J., PIHLAJANIEMI, T., MYERS, J., KELLY, T.E. & PROCKOP, D.J. (1983a) *J. Biol. Chem.* 258, 7721.
- DE WET, W.J., CHU, M-L & PROCKOP, D.J. (1983b) *J. Biol. Chem.* 258, 14385.

- DE WET, W., SIPPOLA, M., BERNARD, M., PROCKOP, D. CHU, M-L
& RAMIREZ, F. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* 460,
415.
- DE WET, W., SIPPOLA, M., TROMP, G., PROCKOP, D., CHU, M-L.,
& RAMIREZ, F. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 3857.
- DICKSON, L.A., PIHLAJANIEMI, T., DEAK, S., POPE, M.F.,
NICHOLLS, A., PROCKOP, D.J. & MYERS, J.C. (1984). *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA. 81, 4524.
- ELEJALDE, B.R. & DE ELEJALDE, M.M. (1983). *Am. J. Med. G.*
14, 353.
- ENGFELDT, B. & HJERPE, A. (1976). *Act Pat MA* 84, 488.
- EYRE, D.R. (1981). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 159, 97.
- FALK, C.T., SCHWARTZ, R.C., RAMIREZ, F. & TSIPOURAS, P.
(1985). *Am. J. Hu. Gen.*, in druk.
- FIETZEK, P.P. & KÜHN, K. (1975). *Mo. C. Bioch.* 8, 141.
- FIETZEK, P.P. & KÜHN, K. (1976) *Int. Rev. Connect.*
Tissue Res. 7, 1.
- FIETZEK, P.P. & KÜHN, K. (1977). *Clin Orthop. Relat.*
Res. 124, 271.
- FRANCIS, M.J.O., WILLIAMS, K.J., SYKES, B.C. EN SMITH, R.
(1981). *Clin. Sci.* 60, 617.
- FUJII, K. & TANZER, M.L. (1977). *Clin. Orthop. Relat.*
Res. 124, 271.

GILLEROT, Y., DRUART, J.M. & KOULISHER, L. (1983). *Eur. J. Ped.* 141, 119.

GLANVILLE, R.W. (1982). *Arzneim Forsch Drug Res.* 32, 1353.

CLANVILLE, R.W., BREITKREUTZ, D., MEITINGER, M. & FIETZEK, P. (1983). *Biochem. J.*, 183.

GOLDBERG, B. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 3322.

GROBLER-RABIE, A.F., BREBNER, D.K., VANDENPLAS, S., WALLIS, G., DALGLEISCH, R., KAUEMAN, R.E., BESTER, A.J., MATHEW, C.G.P. & BOYD, C.D. (1984) *Am. J. Hu. Gen.*, in druk.

HABERS, K., KUEHN, M., DELIUS, H. & JAENISCH, R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1504.

HOLBROOK, K.A. & BYERS, P.H. (1982) *J. Inves. Der.* 79, 7s.

HOLLISTER, D.W., (1981) *Coll. Res.* 1, 227.

HOLLISTER, D.W., BYERS, P.H. & HOLBROOK, K.A. (1982) *Adv. Hum Gen.* 12, 1.

HORLEIN, D., FIETZEK, P.P. & KUHN, K. (1978) *FEBS Lett.* 89, 279.

HURYCH, J. & CHAVAPIL, M. (1965). *Biochem. Biophys. Acta.* 97, 361.

JEFFREYS, A. (1979) *Cell* 18, 1.

- KAN, Y.W. & DOZY, A. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 5631.
- KAO, W. W-Y., BERG, R.A. & PROCKOP, D.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8391.
- KAO, W. W-Y., PROCKOP, D.J. & BERG, R.A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2234.
- KIRSCH, E., KRIEG, T., REMBERGER, K., FENDEL, H., BRUCKNER, P. & MÜLLER, P.K. (1981) *Eur. J. Cl. In.* 11, 39.
- KIRSCH, E., IHME, A., MÜLLER, P. & KRIEG, Th. (1982) *Enzyme* 27, 239.
- KIVIRIKKO, K. & PROCKOP, D.J. (1969) *Biochem. J.* 102, 432.
- KRIEG, T., KIRSCH, E., MATZEN, K. & MÜLLER, P.K. (1981) *Klin. Wochenschr.* 59, 91.
- LAENMLI, U.K. (1970) *Nature* 227, 680.
- LASKEY, R.A. & MILLS, A.D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 56, 335.
- LIDSKY, A.S., LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G., KWOK, S.C.M., DAIGER, S.P., ROBSON, K.J.H. & WOO, S.L.C. (1985) *Am. J. Hu. Gen.* 37, 619.
- LÖHLER, J., TIMPL, R. & JAENISCH, R. (1984) *Cell.* 38, 597.
- MARTIN, G.R., TIMPL, R., MÜLLER, P.K. & KÜHN, K. (1985) *TIBS*, 285.

- MAYNE, R. & VON DER MARK, K. (1983) in: "*Cartilage*", Vol. 1, (Hall, B.K. *red.*) p. 181 Academic Press, New York.
- MAYNE, R., VAN DER REST, M., NINOMIYA, Y. & OLSEN, B.R. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 460, 38
- MILLER, E.J. (1976) *Mol. C. Bioch.* 13, 165 - 192.
- MINOR, R.R. (1980) *Am. J. Path.* 98, 226 - 279.
- MIYAHARA, M., BRUCKNER, P., HELLE, O. & PROCKOP, D.J. (1983) *Collagen Rel. Res.* 3, 279.
- MIYAHARA, M., HAYASCHI, K., BERGER, J., TANZAWA, K., NJIEHA, F.K., TRELSTAD, R.L. & PROCKOP, D.J. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9891.
- MÜLLER, P.K., LEMMEN, C., GAY, S. & MEIGEL, W.N. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 97.
- MÜLLER, P.K., RAISCH, K., MATZEN, K. & GAY, S. (1977) *Eur. J. Ped.* 125, 29.
- MURPHY, L. & ROSENBLOOM, J. (1973) *Biochem. J.* 135, 249.
- MYERS, J.C., DICKSON, L.A., DE WET, W.J., BERNARD, M.P., CHU, M-L., Di LIBERTO, M., SANGIORGI, F.O. & RAMIREZ, F. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 10128.
- NICHOLLS, A.C., POPE, F.M. & SCHLOON, H. (1979) *Lancet* 1, 1193.
- NICHOLLS, A.C., POPE, F.M. & GRAIG, D. (1984) *Br. Med. J.* 288, 112.

- PATEL, Z.M., SHAH, H.L., MADON, P.F. & AMBANI, L.M. (1983) *Prenat. Diag.* 3, 261.
- PATERSON, C.R., McALLION, S. & MILLER, R. (1983) *J. Bone Br-V* 65, 35.
- PEDERSON, U., SØGAARD, H. & ELBRØND, O. (1984) *Arch Otorhinolaryngol* 240, 1.
- PELTIER, L.F. (1981) *Clin. Orthop. Relat. Res.* 159, 3.
- PELTONEN, L., PALOTIE, A. & PROCKOP, D.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6179.
- PENTTINEN, R.P., LICHTENSTEIN, J.R., MARTIN, G.R. & MCKUSICK, V.A. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 586.
- PIHLAJANIEMI, T., DICKSON, L.A., POPE, F., KORHONEN, V.K., NICHOLLS, A., PROCKOP, D.J. & MYERS, J.C. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 12941.
- POPE, F.M., NICHOLLS, A.C., EGGLETON, C., NAREISSI, P., HEY, E.N. & PARKIN, J.M. (1980) *J. Clin. Path.* 33, 534.
- POPE, F.M. & NICHOLLS, A.C. (1981) in : *"The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues"* VEIS, A. red.) p. 223 Elsevier, North-Holland, New York.
- PROCKOP, D.J. (1984) *Am. J. Hu. Gen.* 36, 499.
- PROCKOP, D.J. & KIVIRIKKO, K.I. (1984) *New Eng. J. Med.* 311, 376.
- PROCKOP, D.J., BERG, R.A., KIVIRIKKO, K.I. & UITTO, J. (1976) in : *"Biochemistry of Collagen"*. (Ramachandran, G.N. & Reddi, A.H. red.) Plenum.

- RAMIREZ, F., CHU, M-L. & DE WET, W. (1985a) in :
"The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues"
 Butler, W.T. red.) p. 391 EBSCO Media, Birmingham.
- RAMIREZ, F., BERNARD, M., CHU, M-L., DICKSON, L.,
 SANGIORI, F., WEIL, D., DE WET, W., JUNIEN, C. & SOBEL,
 M. (1985b) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 460, 117.
- RAMIREZ, F., SANGIORGI, F. & TSIPOURAS, P. (1985c) in :
"Human Genes and Diseases" (Blasi, F. ed.) John Wiley
 and sons, in druk.
- RAWSON, M.E., WEBSTER, J.G. & ALMARIO, V.P. (1983)
Military Medicine 148, 157.
- ROSENBLOOM, J., HARSCH, M. & JIMENEZ, S. (1973) *Arch*
Bioch 158, 478.
- SAUK, J.J., GAY, R., MILLER, E.J. & GAY, S. (1980)
J. Oral. Path. 9, 210.
- SEYER, J.M. & KANG, A.H. (1981). *Biochemistry.* 210, 2621.
- SHAPIRO, J.E., PHILLIPS, J.A., BYERS, P.H., SANDERS, R.,
 HOLBROOK, K.A., LEVIN, L.S., DORST, J., BARSH, G.S.,
 PETERSON, K.E. & GOLDSTEIN, P. (1982) *J. Ped.* 100, 127.
- SILLENCE, D.O., SENN, A. & DANKS, D.J. (1979) *J. Med.*
Genet. 16, 101.
- SILLENCE, D. (1981). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 159, 11.
- SILLENCE, D.O., BARLOW, K.K., GARBER, A.P., HALL, J.G.
 & RINOIN, D.L. (1984) *Am. J. Med. G.* 17, 407.
- SIPPOLA, M., KAFFE, S. & PROCKOP, D.J. (1984) *J. Biol.*
Chem. 259, 14094.

SIPPOLA-THIELE, M. (1985) "Defects in the structure of type I procollagen and decreased processing of pro-collagen to collagen" Proefschrift, Universiteit van Turku, Finland.

SPENCER, A.T. (1962) *J. Pathol. Bacteriol.* 83, 423.

STEINMANN, B.U., MARTIN, G.R., BAUM, B.I. & CRYSTAL, R.G. (1979) *FEBS Lett.* 101, 269.

STEINMANN, B., RAO, V.H., VOGEL, A., BRÜCKNER, P., GITZELMANN, R. & BYERS, P.H. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 11129.

STEPHENS, J.D., FILLY, R.A., CALLEN, P.W. & GOLBUS, M.S. (1983). *Hum. Genet.* 64, 191.

STOLLE, C.A., PYERITZ, R.E., MYERS, J.C. & PROCKOP, D.J. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 1937.

SYKES, B., PUDDLE, B., FRANCIS, M. & SMITH, R. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 1472.

SYKES, B., FRANCIS, M.J.O. & SMITH, R. (1977). *N. Eng. J. Med.* 296, 1200.

TAKAGI, Y., KOSHIBA, H., KIMURA, O., KUBOKI, Y. & SASAKI, S. (1980) *J. Oral Path.* 9, 201.

TANZAWA, K., BERGER, J. & PROCKOP, D.J. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 1120.

TATE, V.E., FINER, M.H., BOEDTKER, H. & DOTY, P. (1983). *Nucl. Acid. R.* 11, 91.

TAUBMAN, M.B. & GOLDBERG, B. (1976). *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 490.

- TIMPL, R. & MARTIN, G.R. (1982). in "*Immunochemistry of the Extracellular Matrix*" (Furthmayr, H. red.) p. 119, CRC Press, Boca Baton.
- TRAUB, W. & STEINMANN, B. (1986). *FEBS Lett.* 198, 213
- TRELSTAD, R.L., RUBIN, D. & GROSS, J. (1977) *Lab. Inv.* 36, 501.
- TSIPOURAS, P., MYERS, J.C., RAMIREZ, F. & PROCKOP, D.J. (1983) *J. Clin. Inv.* 72, 1262.
- TSIPOURAS, P., BORRESEN, A-L., DICKSON, L.A., BERG, K., PROCKOP, D.J. & RAMIREZ, F. (1984) *Am. J. Hu. Gen.* 36, 1172.
- TUDERMAN, L., KIVIRIKKO, K.I. & PROCKOP, D.J. (1978) *Biochemistry* 17, 2948.
- UITTO, J. (1977) *Biochemistry* 16, 3421.
- UITTO, J. & LICHTENSTEIN, J.R. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 60.
- UITTO, J., PEREJDA, A.J., ABERGEL, R.P., TORRANCE, C.A., CHU, M-L. & RAMIREZ, F. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 460, 514.
- VAN DER REST, M., MAYNE, R., NINOMIYA, Y., SEIDAH, N.G., CRETIEN, M. & OLSEN, B.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 220.
- WEBER, S., ENGEL, J., WIEDEMANN, H., GLANVILLE, R.W. & TIMPL, R. (1984) *Eur. J. Biochem.* 139, 401.
- WEIL, U.H. (1981) *Clin. Orthop.* 159, 6.

WILLIAMS, C.J. & PROCKOP, D.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 5915.

WOO, J.S.K., GHOSH, A., LIANG, S-T. & WONG, V.C.W. (1983) *J. Clin Ultr.* 11, 42.

WOO, S.L.C., LIDSKY, A.S., GÜTTLER, F., CHANDRA, T. & ROBSON, K.J.H. (1983b) *Nature* 306, 151.

YAMADA, Y., MUDRYI, M. & DE CROMBRUGGHE, B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14914.

YAMADA, Y., LIAN, G., MUDRYI, M., OBICI, S. & DE CROMBRUGGHE, B. (1984) *Nature* 310, 333.

BEDANKINGS

Graag wil ek die volgende persone en instansies bedank:

- * Prof. dr. W.J. de Wet onder wie se leiding hierdie studie gedoen is. Baie dankie vir u vriendelike hulp, belangstelling en aanmoediging gedurende die duur van die studie.*
- * Vriende en kollegas van die Departement Biochemie vir hulle hulp en belangstelling.*
- * Mev. H.E. Müller vir die geduld en netjiese tik van die verhandeling.*
- * Prof. dr. N.T. Malan vir die taalkundige versorging van die verhandeling.*
- * Henriëtte Swart vir die natrek van die figure.*
- * Die OI-families wat bereid was om deel te vorm van hierdie studie. Dankie veral aan die familie waaroor hierdie studie uiteindelik gehandel het vir hulle blymoedige samewerking en belangstelling.*
- * Die MNR vir finansiële steun.*
- * Alle vriende, veral Nicolette en Leonie, en familie vir hulle belangstelling.*
- * My ouers en broers vir hulle nimmereindigende liefde, aanmoediging, belangstelling, finansiële steun en geloof dat ek hierdie doelwit sal bereik.*