변이 연골 과소기질 단백질이 Swarm Rat 연골육종세포주의 세포외 기질 생성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

김현우 · 박문수 · 송우석 · 공선영 · 신규호 · 한수봉 · 박희완

= Abstract =

Effects of Mutant Cartilage Oligomeric Matrix Protein on the Synthesis of Extracellular Matrix in the Swarm Rat Chondrosarcoma Cell Line

Hyun Woo Kim, M.D., Mun Soon Park, M.D., Woo Suk Song, M.D., Sun Young Kong, M.S., Kyoo Ho Shin, M.D., Soo Bong Hahn, M.D., Hui Wan Park, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the effects of mutated cartilage oligomeric matrix protein (COMP) on the synthesis of cartilage-specific major matrix proteins of Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes.

Materials and Methods: The Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes transfected with chimeric construct consisting of a mutant gene of human COMP and an amino acid FLAG tag sequence were cultured in agarose gel. Formation of extracellular proteoglycan and type-II collagen of the cells were evaluated by immunohistochemical staining and measuring ^{35}S-sulfate incorporation.

Results: No difference was observed in type-II collagen detection among the cell line expressing mutant COMP and control cell lines. Histochemical staining of sulfated proteoglycans with safranin-O showed lower amounts of proteoglycans were incorporated into the extracellular matrix of chondrocytes transfected with mutant gene. ^{35}S-sulfate incorporation into the cell/matrix fractions demonstrates marked lower radiolabel incorporation compared to control cells.

Conclusion: Mutation of COMP impacts the processing of proteoglycans rather than type-II collagen in three-dimensional culture of Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes.

Key Words: Mutant COMP, Extracellular matrix

※ **통신저자: 박 희 완**

서울특별시 강남구 도곡동 146-92

연세대학교 의과대학 영동세브란스병원 정형외과

TEL: 02) 3497-3410, FAX: 02) 573-5393

E-mail: hwpark@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 교수연구비에 의해 수행되었음.

서 론

골의 길이성장(longitudinal bone growth)은 팽창된 연골주형(expanded cartilage template)을 골소주(bone trabeculae)로 전환시키는 연골내골화 과정(endochondral ossification)을 통해 일어나는데 이는 골성장판(growth plate)내 연골세포의 증식과 분화, 세포외 연골기질(extracellular matrix)의 형성 등 조화된 과정을 거친다. 많은 다양한 골격계 이형성증(skeletal dysplasia)에서 보이는 가장 뚜렷한 임상상은 이와 같은 골의 길이성장의 저하이며, 세포외 연골기질 단백질의 유전자 변이(mutation)는 이러한 과정들의 조화를 파괴하여 골격성장을 방해할 수 있다[9,20,24]. 이중 연골 과소기질 단백질(cartilage oligomeric matrix protein, COMP)의 변이는 가성 연골무형성증(pseudoachondroplasia, PSACH)과 다발성 골단 이형성증(multiple epiphyseal dysplasia) 등을 유발하는 것으로 알려져 있으며[2,13] 가성 연골무형성증 환자에서 나타나는 사지 길이 성장의 뚜렷한 감소는 골화 이전 연골세포외 기질의 형성 변화에 기인하는 것으로 추측된다[2,6,24].

가성 연골무형성증 환아 들을 대상으로 한 성장판 조직검사 상 연골세포는 매우 특이적인 변화를 보이는데, 연골세포의 과립형질 내세망(rough endoplasmic reticulum)의 현저한 팽창과 연골 과소기질 단백질의 축적을 전자 현미경으로 관찰할 수 있다[7,11,18]. 연골 과소기질 단백질은 원래 연골에서 발견되는 일종의 소수 세포외 기질 단백(minor extracellular matrix protein)으로 알려져 왔으나[10,22] 최근 이들이 인대나 건에서도 발견됨이 밝혀졌다[8,11]. 가성 연골무형성증환자에서 나타나는 연골 과소기질 단백질의 축적은 연골세포에서만 발견되는 특징적 소견이지만, 이들 연골세포를 단층 배양(monolayer culture)할 경우 연골 과소기질 단백질의 세포내 축적 현상은 사라지며 섬유아세포(fibroblast-like cells)와 비슷한 표현형(phenotype)으로의 세포 탈분화(dedifferentiation) 현상이 일어난다[12]. 또한 변이된 인간 연골 과소기질 단백질을 가성 연골무형성증 환자의 연골세포에서 발견되는 원형과 구별하는 것이 불가능하고, 연골세포이외의 다른 종류의 세포에서 가성 연골무형성증의 표현형을 유발시키는 변이 연골 과소기질 단백질의 발현이 불가능하다는 점 등은 변이된 연골 과소기질 단백질의 처리과정(processing)을 추적하거나 다른 기질 분자들의 형성에 미치는 영향을 관찰하는데 제약을 가져왔다. 본 연구에서는 변이된 인체 연골 과소기질 단백질이 단백 다당(proteoglycan)이나 제 2형 교원질과 같은 연골 특이 단백질의 합성에 미치는 영향을 알아보고자 하였으며 이를 위해 쥐의 내적인 연골 과소기질 단백질(rat endogenous COMP)의 처리과정과 구분하여 추적할 수 있도록 일종의 "FLAG" tag 아미노산 배열을 포함하는 변이된 인체 연골 과소기질 단백질 유전자를 연골세포에 주입(transfection)시키고 삼차원 배양을 시도하였다.

연구재료 및 방법

1. 3차원 세포 배양

본 연구에서는 세 가지 종류의 안정적으로 변형된(stable transformed) 장기간 배양 세포주(long-term culture cell lines, 미국 Iowa 대학 Dr. J. W. Stevens로부터 얻음)를 이용하였는데[5,7,12,19,26]; 원래의 DNA 벡터 구조물(vector construct)은 lipofectin(Life Technologies, Grand Island, NY)과 SuperFect(Qiagen Inc, Valencia, CA)를 통하여 Swarm rat 연골육종세포[19]로 주입되었다(Fig. 1)[26]. 클론 "C415"는 가성 연골무형성증과 연관된(aspartic acid 469의 소실) 변이 연골 과소기질 단백질을 발현시키는 DNA와 8개의 아미노산 "FLAG" tag-sequence로 구성되었고, 이전의 연구에서 변이된 인간 연골 과소기질 단백질 FLAG은 western blotting을 통하여 면역학적으로 검출된 바 있다. 또한 변이 연골 과소기질 단백질의 antisense sequence를 함유하는 클론 "C422"는 유전자 주입의 음의 대조군(transfectant negative control cell line)으로, Swarm rat 연골육종세포주(이하 LTC라 함) 자체는 대조 세포군

(control cell line)으로 사용되었다. 세 개의 세포주는 각각 4 mm 직경의 투석 튜브(dialysis tube)에 5×10^6 cells/ml의 세포 농도로 1% low melt agarose-complete growth medium cell culture suspension이 되도록 배양되었다. 배양액으로 사용된 완전 성장 배지(complete growth medium)[19]는 Dulbecco's Modified Eagles Medium, 4.5 gm glucose per liter; 12% heat inactivated fetal bovine serum; 25 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid; ascorbic acid, 50 μg/ml; gentamycin, 50 μg/ml으로 구성되었으며, 세포배양 기간 동안 매일 교체되었다.

2. 면역조직화학적 분석

절편을 무작위로 분석하기 위하여 첫 번째 절편으로부터 매 10 번째 얻어진 절편을 취하였으며 각각의 분석은 3중으로 반복 시행되었다. 절편을 10% 중성 포르말린으로 고정 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하였다. 5 microns 크기의 절편을 gelatin이 깔려있는 슬라이드에 놓고 xylene으로 파라핀을 제거한 후 단계적 농도의 에탄올과 증류수의 혼합용액으로 수화(hydration)시켰다. 절편을 20 mM sodium phosphate(pH 7.4)와 150 mM sodium chrolide로 두 차례 세척한 후 Target Unmasking Fluid(Signet Laboratories, Dedham, MA, USA)로 70℃에서 20분 간 처리하였다. 절편을 20 mM sodium phosphate(pH 7.4)와 0.15 M sodium chloride로 다시 두 차례 세척한 후 0.25 units/ml 농도의 chondroitin ABC lyase(Seikagaku America, Rockville, MD)와 0.625 units/ml in 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M sodium acetate(pH 7.2)농도의 Streptomyces hyaluronidase(Calbiochem, La Jolla, CA)로 90분간 37℃에서 처리하였다. 절편을 20 mM sodium phosphate(pH 7.4), 150 mM sodium chrolide로 5분간 세 척한 후 0.3% hydrogen peroxide in methanol용액으로 30분간 실온에서 처리하고 다시 세 차례 세척하였다. 이후 각각 FLAG 염기서열을 가지는 단백질의 확인을 위한 M2 항체(1 μg/ml, Eastman Kodak Company, Scientific Imaging System, New Haven, CT)에 대한 10% horse serum, 항 rCOMP 항체를 위한 10% goat serum, 1% bovine serum albumin 및 0.1% Tween-20 in 20 mM sodium phosphate(pH 7.4), 150 mM sodium chrolide로 실온에서 30분간 처리하였다. 쥐와 사람세포 기원의 모든 연골 과소기질 단백질은 rabbit polygonal antibody로 처리하였는데 이는 인간 연골 과소기질 단백질의 carboxyl terminus 염기서열과 62.5% 동일성(homology)을 갖는 쥐의 연골 과소기질 단백질의 carboxyl terminus 8개의 아미노산을 대상으로 합성되었다[21]. 이후 각 절편들은 II-II63B(제 2 형 교원질)와 M2 항체를 위한 murine 단일크론 항체로 처리되었고 biotin-conjugated anti-murine IgG 이차 항체와 horseradish-conjugated streptovavidin을 추가한 후 DAB 기질(substrate)을 이용하여

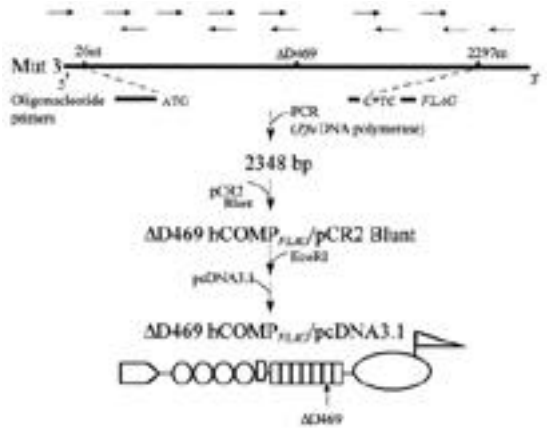

Fig. 1. Construction of a mutant hCOMP^{FLAG} chimeric protein. A primer set consisting of an oligonucleotide sequence encompassing the transcription start site and an oligonucleotide containing the 3 end of COMP with a mutation of the stop codon, plus a sequence that encodes for the 8 amino acid FLAG epitope was used to generate a 2348 nucleotide PCR product from clone Mut3 that encodes for a PSACH-linked D469 hCOMP. The DNA fragment was inserted into pcDNA 3.1 expression vector following ligation into pCR2 vector blunt to obtain Eco RI DNA restriction enzyme sites.

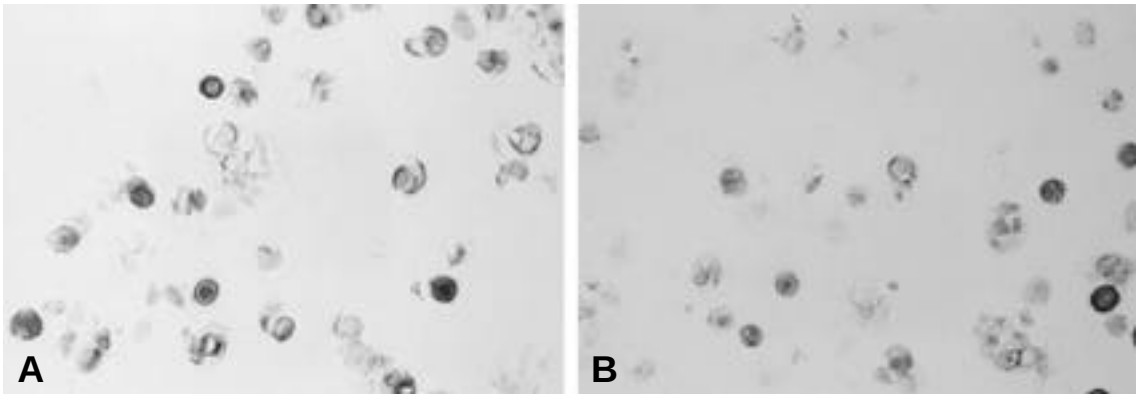

Fig. 2. Immunohistochemical staining of type II collagen at day 14. No differences were observed for type II collagen detection between the expressed mutant COMP cell line (**A**) and antisense transfectant control cell line (**B**). Magnification = 200X

발현시켰다. 또한 연골 조직에 특이한 sulfated 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycan)의 검출을 위하여 각 절편들에 대해 safranin-O 염색이 추가적으로 시행되었다.

3. 대사적 분석

0.5 cm 내지 1 cm 길이의 각각 세 개의 절편을 각 세포주에서 채취한 후 ^{35}S-H_2SO_4(50 μCi/ml)가 들어있는 배양액에서 24시간 배양한 후 1, 4, 7, 14 및 28일째 표본을 재 채취하였다. 세척하고 표지가 안된 방사성 물질을 제거한 후 표본을 Tissue Freezing Medium(Triangle Biomedical Science, Durham, NC, USA)에서 냉동시켰다. 각 세포주별 및 각 날짜별로 cryomicrotome으로 잘린 30개의 10 μm 두께 절편을 각각 1-5절편, 11-15절편, 21-25절편 별로 microfuge tube에 보관하였고, 나중에 다시 72 ℃에서 0.1 mg/ml in 0.1 M sodium acetate, pH 6.5, 5 mM mannitol 농도의 papain 용액 500 μl(~17 units/mg protein from papaya latex, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)로 처리하였다. 이후 sodium azide (0.025%, w/v)를 첨가하고 60℃에서 24 시간 동안 처리하였다. 추출물을 Sepharose G-50 column(0.7×14 cm 크기)에 담아 papain digestion buffer에서 용해시켰고 방사성 표지의 양은 4 ml Bio-Safe II counting cocktail (Research Products International Corp., Mount Prospect, IL, USA)을 첨가한 후 liquid scintillation counter(Model LS3801, Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 정량화 하였다. 통계학적 분석은 ANOVA 방법을 사용하였다.

결 과

변이된 연골 과소기질 단백질을 함유한 세포주(C415)와 대조군인 C422 및 LTC 세포주를 배양한 후 시행된 면역조직화학적 검사상, 제 2 형 교원질은 첫째 날부터 모든 세포군에서 검출되었으며 7일째까지 염색 강도가 지속적으로 증가하였고 14일 째나 28일째 더 이상 염색 강도의 증가는 관찰되지 않았다. 또한 C415 세포주와 대조 세포주 사이에 제 2 형 교원질의 발현 정도에 차이가 없었다(Fig. 2). C415 세포주에서의 연골 과소기질 단백질$_{FLAG\ epitope}$의 발현은 첫째 날 세포내에서 관찰되었으며 4일 째에는 발현 강도의 경미한 증가가 관찰되었고(Fig. 3), 경미하게나마 세포주변부(pericellular)에서도 검출되었는데 이는 일부 변이된 연골 과소기질 단백질이 분비된 결과로 해석되었다.

^{35}S-sulfate의 표지는 모든 세포주에서 4일 째 및 7일 째 가장 많은 양이 관찰되었으며(Fig. 4), C415 세포주의 경우 $8.9\times10^3\pm2.3\times10^3$에서 $16.5\times10^3\pm1.6\times10^3$ dpm per slices, LTC

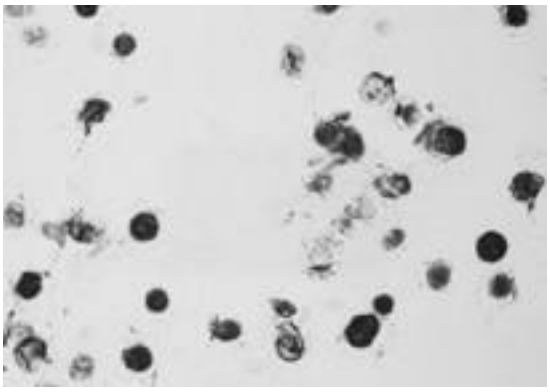

Fig. 3. Immunohistochemical identification of human PSACH-linked mutant COMP tagged with a selective immunoreactive sequence distinct from rat COMP in Swarm rat chondrosarcoma cells cultured for 14 days. Brown staining identifies retention of expressed mutant COMP within the cells. Magnification = 1,500X

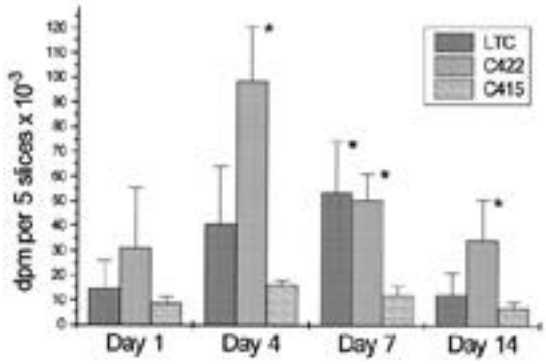

Fig. 4. ^{35}S-sulfate incorporation into the cell/matrix fractions of cell lines cultured in 1% agarose for varying times (Days 1,4,7 and 14). C415, expressing the mutant hCOMP^{FLAG}, demonstrates a marked lower radiolabel incorporation compared to C422 mutant hCOMP^{FLAG} antisense control and LTC cells. Asterisk indicates statistically significant difference at $p<0.05$ to C415.

세포주는 $12.2\times10^3\pm9.2\times10^3$에서 $53.4\times10^3\pm0.1\times10^3$으로, C422 세포주는 $31.1\times10^3\pm24.3\times10^3$에서 $98.6\times10^3\pm22.4\times10^3$ dpm으로 각각 증가하였다. 그러나 C415 세포주는 대조군에 비해 방사성 표지의 정도가 전 배양 기간을 통해 저하되어 있었으며 배양 4, 7, 14일째 C422 세포주에 비해 17% 내지 24%, 배양 7일 째 LTC 세포주에 비해 22% 덜 표지 되었다($p<0.05$). 28일째 방사성 표지는 전 세포주에서 매우 미량 검출되었는데 이는 세포와 세포외 기질사이의 항상성 평형상태(homeostatic equilibrium)에 의한 것으로 해석되었다. safranin-O 염색방법으로 관찰한 결과 C415 세포주의 경우 대조군에 비해 상대적으로 적은 양의 새로이 합성된 단백 다당이 염색되었다(Fig. 5).

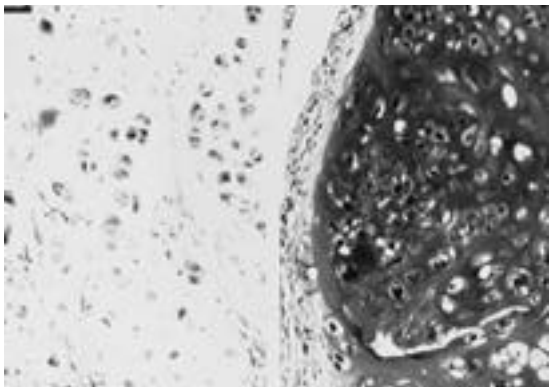

Fig. 5. Histochemical staining of sulfated proteoglycans with safranin-O. Lesser amounts of proteoglycans are incorporated into the matrix in the cell line of C415(left panel) compared to that of C422(right panel), suggesting expression of the mutant COMP is altering deposition of proteoglycan in the ECM as similarly seen in PSACH patients. Magnification = 200X

고 찰

연골 과소기질 단백질은 524 kDa의 homopentamer로서 Csy49와 Cys52에서 disulfide bridge로 연결되는 737개의 아미노산 단량체(monomer)로 구성되어 있다. 단일 유전자 복사(single gene copy)는 19개의 exons으로부터 부호화(encoded) 되는데, 특히 exons 4-19에서 4개의 다른 thrombospondin 유전자(exons 11-22)와 강한 염기서열 동질성(sequence homology)을 가진다[5]. 가성 연골무형성증에서 나타나는 변이의 대부분은 exons(13C-18A)에 의해 부호화 되는 제 3 형 반복 칼슘 부착 도메인(type-3 repeat calcium binding domain)에서 일어나는 것으로 알려져

있으며 최근 연구에 의하면 이와 같은 변이를 갖는 연골 과소기질 단백질은 원형(wild type) 연골 과소기질 단백질에 비해 절반의 수의 Ca^{2+}과 결합하며[5,17], 변이형과 원형 단백질은 칼슘 존재하에서 서로 다른 형태(conformation)를 보인다고 하였다[5]. 이는 결국 연골 과소기질 단백질 유전자의 변이가 과립형질 내세망으로부터의 정상적인 분비(secretion)에 필요한 단백질 folding을 방해하므로써 이들 단백질의 정상적인 처리과정(processing)에 영향을 미침을 의미한다고 할 수 있다. 최근 가성 연골무형성증과 연관된 변이 연골 과소기질 단백질 유전자를 연골세포에 삽입하고 이에 의해 발현된 단백질이 과립형질 내세망내에 축적됨이 확인된 형질전환 세포 배양 시스템이 개발되었다[5,7,12,19,26]. 이와 같은 가성 연골무형성증과 연관된 세포 배양법은 사람의 조직이나 독립된 세포들을 이용하여서는 불가능한 여러 가지 조작 가능한(manipulative) 실험을 가능하게 하였고, 연골육종세포를 3차원 배양하므로 써 연골세포를 장기간 단층 배양하는 동안 일어나는 탈분화(dedifferentiation) 혹은 형성된 연골의 섬유화를 방지할 수 있는 장점이 있다[14]. Chen 등은 Swarm Rat 연골육종세포에서 발현시켰을 때 변이된 사람의 연골 과소기질 단백질이 쥐의 내적인 연골 과소기질 단백질(rat endogenous COMP)과 구분되어 세포내 침착됨을 면역학적 방법을 통해 관찰한 바 있고 변이된 연골 과소기질 단백질은 변량체(heteromer)로 밝혀진 바, 이는 결국 연골 과소기질 단백질의 저 중합 작용(oligomerization)이 이루어져 변이된 단백질이 적절히 분비되지 못함을 시사한다.

한편, 성장판 연골세포의 과립형질 내세망 내부에 침착되는 함유물(inclusion body)의 존재는 가성 연골무형성증에 특이적인 세포 화학적 지표(cytochemical hallmark)로서 이는 가성 연골무형성증이 일종의 과립형질 내세망내 축적 질환(endoplasmic reticulum storage disorders)이라는 것을 시사한다. 개를 이용한 가성 연골무형성증 모델을 통한 연구 결과, 연골세포의 수직성장(vertical growth)의 감소는 변화된 세포외 기질이 수평 성장(horizontal growth)을 제한시키고 연골내 성장과 연골환 주위 성장(perichondrial growth)의 부조화를 유발시켜 골간단의 편평화(metaphyseal flaring)를 일으키므로써 유발되는 것으로 밝혀졌다. 연골 과소기질 단백질은 정상적으로 연골, 인대, 건 및 관절막의 세포에서 발견되지만, 가성 연골무형성증환자의 경우 오직 연골 조직에서만 과립형질 내세망내 침착이 관찰될 뿐 기타 인대와 건 조직에서는 뚜렷한 변화를 볼 수 없다. 또한 연골 과소기질 단백질을 합성하지 못하는 gene knockout mice에서 비교적 정상적인 성장과 발달이 일어난다는 사실은 가성 연골무형성증의 표현형이 발현되기 위해서는 연골 과소기질 단백질의 존재 혹은 합성 여부가 아닌 변이(mutation) 자체가 중요함을 의미한다. 그러나 성장판 연골의 소수 단백(minor protein)에 불과한 연골 과소기질 단백질의 변이가 어떻게 전반적인 연골내 골 형성 전체를 교란시키는가에 대한 기전은 아직 설명되지 못하고 있는 실정이다. 최근 변이된 연골 과소기질 단백질 유전자에 의한 변형된 형태(confirmation)가 과립형질 내세망으로부터의 부적절한 분비 과정에 기인할 것이라는 가정이 제시되어 왔고 실제로 가성 연골무형성증에서 연골 과소기질 단백질이 세포내 축적되지만 변이된 단백질 자체가 세포내 축적을 유발한다는 직접적인 증거는 제시되지 못하였다. 또한 원형 단백질(wild type protein)과 변이된 단백질간의 미묘한 아미노산 차이는 실질적으로 각각의 종(species)에서의 표현형의 발현을 추적하는데 많은 어려움을 가져왔다.

미래 골소주의 주형(template)으로 쓰이게 되는 성장판 연골의 세포외 기질은 세포 체액(tissue fluids)과 제 2 교원질, 단백 다당(proteoglycan), 비 교원질성 단백질(non-collagenous protein)과 같은 소위 구조적 고분자(structural macromolecules)들의 체제로 구성되는데, 본 연구를 통하여 가성 연골무형성증과 연관된 변이 연골 과소기질 단백질의 발현은 일종의 세포외 기질 형성 장애를 유발함을 관찰하였다. 또한 장기간의 세포배양 전 기간 동안, 변이된 연골 과소기질 단백질을 함유한 연골세포군은 두 개의 대조군에 비해 적은 양의 단백 다당을 합성하였으며 이는 변이된 연골 과소기질 단백질이 발현될 때 연골 과소기질 단백질과 단백 다당이 같은 분비과정 혹은

통로를 공유하는 것을 의미한다. 따라서 연골 과소기질 단백질의 변이는 단백 다당의 세포내 축적을 유발시키고 결과적으로 이의 분비의 감소로 나타난다고 할 수 있을 것이다. 이는 변이된 연골 과소기질 단백질이 단백 다당의 유전자해석 후 과정(post-translational processing)과 골지체(Golgi apparatus)내에서 글리코스아미노글리칸(glycosaminoglycan chain)의 추가 과정에 영향을 주는 것으로 해석될 수 있다. 한편, 이들 세포외 기질 합성에 대한 영향은 연골 세포외 기질에 대한 전반적이고도 일반적인 결손은 아닌 것으로 사료되었는 바, 본 연구에서 연골 특이(cartilage-specific) 제 2 교원질의 분비는 다른 두 대조군과 비교해서 변화 없음이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 질환의 원인인 연골 과소기질 단백질의 변이가 선택적으로 단백 다당 분자의 세포외 기질로의 결합만을 변화시킴을 의미한다. 일반적으로 분비성 단백질(secretory protein)은 유전자 해석과정 이후 "chaperone" 단백질의 도움을 받아 수조(cisterne)내에서 folding되며 과립형질 내세망 소낭을 통하여 골지체로 분비되는데 예를 들어 저 중합 작용을 겪게되는 단백질인 thyroglobulin 과 thrombospondin은 BiP, grp94, Erp72, grp17 등으로 구성되는 "다발성 분자 chaperones 복합체"와 연관된다고 하였다[1,15].

결론적으로 연골 과소기질 단백질의 변이는 제 2 교원질보다는 단백 다당의 세포외 기질로의 분비 혹은 합성을 저해하며 결국 이러한 장애가 가성 연골무형성증과 다발성 골단 이형성증 등과 같은 질환에서의 사지 길이의 감소를 초래할 수 있는 원인이 됨을 관찰하였다. 향후 변이된 연골 과소기질 단백질의 운명과 실질적으로 단백 다당이 세포외로 적절히 분비되지 못해 일어나는지 여부를 알기위한 일종의 "pulse-chase" 실험을 시행하여 단백 다당이 세포외 기질로 분비되는 과정에 대한 보다 정확한 기전을 연구하는 것이 후행되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) **Bornstein P**: Thrombospondins: structure and regulation of expression. *Faseb J*, 6:3290-3299, 1992.
2) **Briggs MD, Hoffman SMG, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, et al**: Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nature Genet*, 10:330-336, 1995.
3) **Briggs MD, Mortier GR, Cole WG, King LM, Golik SS, Bonaventure J, et al**: Diverse mutations in the gene for cartilage oligomeric matrix protein in the pseudoachondroplasia-multiple epiphyseal dysplasia disease spectrum. *Am J Hum Genet*, 62:311-319, 1998.
4) **Bruer GJ, Farnum CE, Padgett GA, Wilsman NJ**: Cellular basis of decreased rate of longitudinal growth of bone in pseudoachondroplatic dogs. *J Bone Joint Surg*, 74-A:516-528, 1992.
5) **Chen H, Deere M, Hecht JT, Lawler J**: Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium-binding protein, and a mutation in its Type 3 repeats causes conformational changes. *J Biol Chem*, 275:26538-25644, 2000.
6) **Cooper RR, Ponseti IV, Maynard JA**: Pseudoachondroplastic dwarfism. A rough-surfaced endoplasmic reticulum storage disorder. *J Bone Joint Surg*, 55-A:475-484, 1973.
7) **Delot E, Brodie SG, King LM, Wilcox WR, Cohn DH**: Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture. *J Biol Chem*, 273:26692-26697, 1998.
8) **Di Cesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulson M**:. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. FEBS Lett, 354:237-240, 1994.
9) **Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R**: Towards a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 80:371-378, 1995.
10) **Fellini S, Kimura J, Hascall V**: Polydispersity of proteoglycans synthesized by chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem*, 256:7883-7889, 1981.

11) **Hecht JT, Deere M, Putnam E, Cole W, Vertel B, Chen H, et al**: Characterization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in human normal and pseudoachondroplasia musculoskeletal tissues. *Matrix Biol*, 17:269-278, 1998.
12) **Hecht JT, Montufar-Solis D, Decker G, Lawler J, Daniels K, Duke PJ**: Retention of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and cell death in redifferentiate pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol*, 17:625-633, 1998.
13) **Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FFB, Harrison WR et al**: Mutaions in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nature Genet*, 10:325-329, 1995.
14) **Kim HW, Han CD**: An overview of cartilage tissue engineering. *Yonsei Med J*, 41;766-773, 2000.
15) **Kuznetsov G, Chen LB, Nigam SK**: Multiple molecular chaparones complex with misfolded larger oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 272:3057-3063, 1997.
16) **Maddox BK, Keene DR, Sakai LY, Charbonneau NL, Morris NP, Ridgway CC et al**: The fate of cartilage oligomeric matrix protein is determined by the cell type in the case of a novel mutation in pseudoachondroplasia. *J Biol Chem*, 272:30993-30997, 1997.
17) **Maddox BK, Mokashi A, Keene DR, Bchinger HP**: A cartilage oligomeric matrix protein mutation associated with pseudoachondroplasia changes the structure and functional properties of the type 3 domain. *J Biol Chem*, 275:11412-11417, 2000.
18) **Maynard JA, Cooper RR, Ponseti IV**: A unique rough surface endoplasmic reticulum inclusion in pseudoachondroplasia. *Lab Invest*, 26:40-44, 1972.
19) **Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M**: Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-arm structure. *J Biol Chem*, 267:6137-6141, 1992.
20) **Mundlos S, Olsen BR**: Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J*, 11:125-132, 1997.
21) **Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA et al**: Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*, 24:435-439, 1994.
22) **Oldberg , Antonsson P, Lindbloom K, Heinegrd D**: COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*, 267:22346-22350, 1992.
23) **Stanescu V, Maroteaux P, Stanescu R**: The biochemical defect of pseudoachondroplasia. *Europ J Pediat*, 138:221-225, 1982.
24) **Stanescu V, Stanescu R, Marteaux P**: Pathogenic mechanisms in osteochondro-dysplasias. *J Bone Joint Surg*, 66-A: 817-836, 1984.
25) **Stevens JW**: Pseudoachondroplastic dysplasia: An Iowa review from human to mouse. *Iowa Orthop J*, 19:53-65, 2000.
26) **Stevens JW, Rapp TB, Martin JA, Maynard JA, Vertel BA, Hecht JT**.: Stable transfection of chondrocytes with mutant COMP. *Trans Orthop Res Soc*, 23;103, 1998.