

Regulation der humanen Xylosyltransferasen durch Promotorvariationen und fibrotische Mediatoren

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Isabel Faust
aus Bremen

Bielefeld/Bad Oeynhausen

April 2014

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von **Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe**
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
in Bad Oeynhausen
in der Zeit von April 2011 bis April 2014.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sewald

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sowie seine Unterstützung und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sewald danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Doris Hendig für die Betreuung dieser Arbeit, die konstruktiven Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen Projekte eigenständig umzusetzen.

Meinem Kooperationspartner Herrn Dr. med. Philipp Traut danke ich herzlich für sein unermüdliches Engagement und Vorantreiben der Arthrofibrose-Studie. Frau Dr. Elena Neumann und Frau Dr. Elke Kunisch möchte ich für die Zurverfügungstellung synovialer Fibroblasten danken.

Ein besonderer Dank gilt Patricia Kuzaj und Christoph Lichtenberg für die vielen wertvollen Fachgespräche und die alltägliche Zusammenarbeit ohne den Spaß bei und an der Arbeit zu vergessen.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Mareike Dabisch-Ruthe, Birgitt Drawe, Dr. Jens Dreier, Jessika Dumke, Marlen Ewald, Imke Grimm, Bärbel Kammel, Dr. Joachim Kuhn, Dr. Christina Roch, Anne-Kathrin Vollmer, Dr. Tanja Vollmer, Dr. Jan Weile und Melanie Weinstock für die ständige Hilfsbereitschaft und die sowohl produktive als auch sehr angenehme Atmosphäre am Institut.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gilt auch meinen ehemaligen Masterstudenten Kai Oliver Böker und Christina Eirich sowie meiner ehemaligen Bachelorstudentin Dagmar Akkermann für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonders möchte ich mich daher bei meinen Eltern und meiner Schwester dafür bedanken, dass sie immer an mich geglaubt und mich auf jegliche Art unterstützt haben. Ein weiterer, ganz besonders herzlicher Dank gilt Dennis für sein Verständnis, seine Geduld und seine Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Extrazelluläre Matrix	3
2.2 Proteoglykane und Glykosaminoglykane	3
2.3 Glykosyltransferasen	7
2.4 Xylosyltransferasen	8
2.4.1 Pathophysiologie der XT	10
2.5 Fibrose	10
2.5.1 Arthrofibrose	13
2.6 Transkription eukaryotischer Gene	14
2.7 microRNAs	15
2.8 Zielsetzung der Arbeit	17
3. Ergebnisse	19
3.1 Analyse der XT-Regulation durch Promotorvariationen	19
3.1.1 Entschlüsselung der vollständigen <i>XYLT1</i> -Promotorsequenz	19
3.1.1.1 Klonierung von <i>XYLT1</i> -Promotorkonstrukten	25
3.1.1.2 Induktion des <i>XYLT1</i> -Promotors durch TGF- β 1	26
3.1.2 Identifizierung von Einzelnukleotid-Variationen im <i>XYLT1</i> -Promotor	27
3.1.2.1 Effekte der <i>XYLT1</i> - Einzelnukleotid-Variationen auf die Promotoraktivität	28
3.1.2.2 Auswirkungen der <i>XYLT1</i> -Einzelnukleotid-Variationen auf die XT-Aktivität.....	29
3.1.2.3 Haplotypen-Analyse	30
3.1.2.4 Auswirkungen der <i>XYLT1</i> -Einzelnukleotid-Variationen auf Transkriptions- Bindestellen im <i>XYLT1</i> -Promotor	31
3.1.3 Identifizierung eines Mikrosatelliten im <i>XYLT1</i> -Promotor	31
3.1.3.1 Einfluss der Mikrosatellit-Variationen auf die Promotoraktivität	33
3.1.3.2 Auswirkungen der Mikrosatellit-Variationen auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen im <i>XYLT1</i> -Promotor	34
3.1.4 Identifizierung von Einzelnukleotid-Variationen im <i>XYLT2</i> -Promotor	34
3.1.4.1 Effekte der <i>XYLT2</i> -Einzelnukleotid-Variationen auf die Promotoraktivität	35
3.1.4.2 Auswirkungen der <i>XYLT2</i> -Einzelnukleotid-Variationen auf die XT-Aktivität.....	36
3.1.4.3 Haplotypen-Analyse	38
3.1.4.4 Auswirkungen der <i>XYLT2</i> -Einzelnukleotid-Variationen auf Transkriptions-faktor- Bindestellen im <i>XYLT2</i> -Promotor	39
3.2 Analyse der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren	40
3.2.1 Evaluierung der XT als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung	40

3.2.1.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils	41
3.2.1.2 Analyse der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression und XT-Aktivität	43
3.2.2 Wirkung profibrotischer Wachstumsfaktoren und Hormone auf die <i>XYLT</i> mRNA Expression und XT-Aktivität dermalen Fibroblasten.....	45
3.2.2.1 Analyse der <i>XYLT</i> und <i>ACTA2</i> mRNA Expression.....	45
3.2.2.2 Analyse der XT-Aktivität.....	47
3.2.3 Regulation der XT durch microRNAs.....	47
3.2.3.1 Identifizierung XT-regulierender miRNAs mittels <i>in silico</i> Analyse	48
3.2.3.2 Reduktion der <i>XYLT</i> mRNA Expression durch miRNAs.....	49
3.2.3.3 miRNA-Array basierte Genexpressionsprofilanalyse nach TGF- β 1-Induktion	50
3.2.3.4 Gezielte miRNA-Inhibition.....	52
3.3 Evaluierung der XT als Arthrofibrose-Biomarker	54
3.3.1 Analyse der Wirkung von TGF- β 1 auf synoviale Fibroblasten	54
3.3.1.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils	55
3.3.1.2 Analyse der XT-Aktivität und der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression	57
3.3.2 Induktion synovialer Fibroblasten mit mechanischem Stress	58
3.3.2.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils	59
3.3.2.2 Analyse der XT-Aktivität.....	61
3.3.3 Bestimmung der Serum-XT-Aktivität bei Arthrofibrose-Patienten.....	61
3.3.4 Messung der Galectin-3- und GDF-15-Serumkonzentration bei Arthrofibrose-Patienten .	64
4. Diskussion	65
4.1 Regulation der XT durch Promotorvariationen.....	65
4.1.1 Entschlüsselung der vollständigen <i>XYLT1</i> -Promotorsequenz	66
4.1.2 Charakterisierung von Einzelnukleotid-Variationen im <i>XYLT1</i> -Promotor	69
4.1.3 Detektion eines Mikrosatelliten im <i>XYLT1</i> -Promotor.....	70
4.1.4 Charakterisierung von Einzelnukleotid-Variationen im <i>XYLT2</i> -Promotor	71
4.2 Analyse der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren.....	74
4.2.1 Etablierung eines Zellkulturmodells zur Myofibroblasten-Kultivierung.....	74
4.2.2 XT als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung.....	75
4.2.3 XT-Regulation durch Wachstumsfaktoren und Hormone.....	77
4.2.4 Regulation der XT durch miRNAs.....	80
4.3. Evaluierung der XT als Arthrofibrose-Biomarker	84
4.3.1 Untersuchungen an synovialen Fibroblasten.....	84
4.3.2 Analyse der Serum-XT-Aktivität	86
4.4 Ausblick.....	89
5. Methoden	90

5.1 Molekularbiologische Methoden.....	90
5.1.1 Isolation von Gesamt-RNA.....	90
5.1.1.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Zelllysaten mit dem <i>NucleoSpin RNA Kit</i>	90
5.1.1.2 Isolation der Gesamt-RNA aus Zelllysaten mit dem <i>miRNeasy Micro Kit</i>	90
5.1.2 Isolation von Gesamt-DNA aus Zelllysaten und EDTA-Vollblut.....	91
5.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	91
5.1.4 Photometrische Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration.....	92
5.1.5 Reverse Transkription.....	92
5.1.5.1 cDNA-Synthese mit dem <i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	92
5.1.5.2 cDNA-Synthese mit dem <i>miScript II RT Kit</i>	92
5.1.6 Polymerase-Kettenreaktion.....	93
5.1.6.1 Amplifikation von <i>XYLT</i> -Promotorfragmenten.....	93
5.1.6.2 <i>Slowdown-PCR</i>	95
5.1.6.3 Kolonie-PCR.....	96
5.1.7 Quantitative <i>real-time-PCR</i>	97
5.1.8 miRNA-Genexpressionsprofil dermalen Fibroblasten.....	99
5.1.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	100
5.1.10 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	100
5.1.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	100
5.1.12 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse zur Genotypisierung von <i>XYLT2</i> - Sequenzvariationen.....	102
5.1.13 Ortsgerichtete Mutagenese.....	103
5.1.13.1 Klonierung von <i>XYLT1</i> -Promotorkonstrukten.....	104
5.1.13.2 Definierter Basenaustausch in <i>XYLT</i> -Promotorkonstrukten.....	105
5.2 Zellbiologische Methoden.....	106
5.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	106
5.2.1.1 Anlage von Primärkulturen synovialer Fibroblasten.....	106
5.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung.....	106
5.2.1.3 Passagieren und Aussäen.....	107
5.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl.....	107
5.2.1.5 Behandlung mit profibrotischen Faktoren.....	107
5.2.1.6 Behandlung mit mechanischem Stress.....	108
5.2.1.7 Liposomen-vermittelte miRNA-Transfektion.....	108
5.2.1.8 Liposomen-vermittelte Plasmid-DNA-Transfektion.....	108
5.2.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	109
5.2.2.1 Anzucht und Kryokonservierung.....	109
5.2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> XL 10 Gold Zellen.....	109

5.3 Proteinbiochemische Methoden	110
5.3.1 Radiochemischer XT-Aktivitätsassay	110
5.3.2 Massenspektrometrischer XT-Aktivitätsassay	111
5.3.3 Immunfluoreszenzanalysen	112
5.3.3.1 Expressionsnachweis von CD90 in synovialen Fibroblasten	112
5.3.3.2 Expressionsnachweis von α -Glattmuskelaktin in Fibroblasten	112
5.3.4 Bestimmung der Galectin-3-Konzentration im Serum	112
5.3.5 Bestimmung der GDF-15-Konzentration im Serum	113
5.3.6 Quantifizierung der <i>XYLT</i> -Promotoraktivität	113
6. Material	115
6.1 Chemikalien und Reagenzien	115
6.2 Puffer und Lösungen	116
6.2.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	116
6.2.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	116
6.2.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	117
6.3 Zelllinien	117
6.4 Zellkulturmedien und -zusätze	118
6.5 Bakterienstämme	118
6.6 Nährmedien für <i>E. coli</i>	119
6.7 Rekombinante Proteine	119
6.8 Enzyme	119
6.9 Antikörper und Inhibitoren	120
6.10 Oligonukleotide	120
6.10.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von <i>XYLT</i> -Promotorfragmenten	120
6.10.2 Oligonukleotide für die quantitative <i>real-time</i> PCR	121
6.10.3 Oligonukleotide für die RFLP-Analyse	121
6.10.4 Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese	122
6.10.5 miRNA-mimics, -Inhibitoren und siRNAs	122
6.11 Plasmide	123
6.12 Kommerzielle Reaktionssysteme	123
6.13 Verbrauchsmaterial	123
6.14 Software und Datenbanken	124
6.15 Geräte	124
7. Abkürzungen	126
8. Literatur	128
9. Publikationen, Präsentationen und Förderungen	139

10. Anhang	141
10.1 Sequenz des <i>XYLT1</i>-Promotors.....	141
10.2 Sequenz des <i>XYLT2</i>-Promotors.....	143
10.3 <i>In silico</i> Analyse: miRNA Scores.....	146
10.4 miRNA-Array: Rohdaten.....	147
11. Erklärung.....	150

1. Zusammenfassung

Die humanen Xylosyltransferasen-I und -II (XT-I/-II) katalysieren den initialen Schritt der posttranslationalen Proteoglykan-Glykosylierung im Golgi-Apparat und werden mit dem xylosylierten Akzeptor in den extrazellulären Raum sekretiert. Eine gesteigerte XT-Aktivität resultiert in einer Proteoglykan-Akkumulation und Gewebe-Remodellierung, die maßgeblich an der Manifestation fibrotischer Erkrankungen beteiligt ist. Die Quantifizierung der Serum-XT-Aktivität kann bei Erkrankungen, die mit einem dysregulierten Metabolismus der extrazellulären Matrix einhergehen, einen wertvollen diagnostischen Beitrag leisten. Trotz umfangreicher, biochemischer Charakterisierungen ist bisher jedoch unklar, welchen physiologischen und pathologischen Regulationen die XT unterliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Untersuchung der humanen *XYLT*-Promotorregionen auf Sequenzvariationen durchgeführt, um zu analysieren, ob diese Einfluss auf die natürliche Variabilität der Serum-XT-Aktivität nehmen. Hierbei wurde erstmalig ein evolutionär hochkonservierter Sequenzabschnitt von 238 bp in der *XYLT1*-Promotorregion nachgewiesen, der kein Bestandteil bisher veröffentlichter humaner Referenzsequenzen ist. Eine *in silico* Analyse sowie Promotoraktivitätsstudien zeigten, dass dieser Bereich Transkriptionsfaktor-Bindestellen enthält, die für die basale *XYLT1* Genexpression sowie deren Induzierbarkeit durch den *transforming growth factor*- β 1 (TGF- β 1) obligat sind. Über die Genotypisierung 100 gesunder Blutspender konnten ein Mikrosatellit und zwei Einzelnukleotid-Variationen (*single nucleotide variant*, SNV) im *XYLT1*-Promotor sowie fünf SNV im *XYLT2*-Promotor identifiziert werden. Wenngleich der Einfluss der Variationen auf die Serum-XT-Aktivität nur marginal war, konnte die SNV c.-1088C>A mit einer signifikanten Verringerung der Promotoraktivität assoziiert werden. Somit ergeben sich erste Hinweise auf eine transkriptionale Regulation der XT durch *XYLT*-Promotor-Sequenzvariationen.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Identifizierung XT-regulierender, profibrotischer Mediatoren. In einem eigens zu diesem Zweck etablierten Zellkulturmodell zur Kultivierung dermalen Myofibroblasten konnte erstmals eine Beteiligung der XT-I an der Myofibroblasten-Differenzierung aufgezeigt werden. Neben TGF- β 1 konnte auch Activin A als potenter fibrotischer Mediator der XT herausgestellt werden. CTGF (*connective tissue growth factor*), PDGF-AB (*platelet derived growth factor*-AB), Angiotensin-II und Endothelin-1 wiesen hingegen eine modulative Wirkung auf die anderen profibrotischen Faktoren auf. Darüber hinaus konnte *in vitro* erstmalig eine XT-Regulation durch die miRNAs miR-34a und miR-18a detektiert werden. Da mittels miRNA-Array jedoch keine TGF- β 1-abhängige, signifikante Genexpressionsänderung einer dieser beiden miRNAs in dermalen Myofibroblasten aufgezeigt werden konnte, muss der Stellenwert der miRNA-vermittelten XT-Regulation in der Fibrogenese weiterführend evaluiert werden.

Im dritten Teilprojekt dieser Arbeit konnte die XT-I als Schlüsselmediator arthrofibrischer Gewebe-Remodellierungen in synovialen Fibroblasten herausgestellt werden. Während die profibrotische Behandlung mit TGF- β 1 oder mechanischem Stress zu einer zellulären Induktion der *XYLT1* mRNA Expression und XT-Aktivität führte, konnte hingegen kein signifikanter Unterschied in der Serum-XT-Aktivität von Arthrose-Patienten und gesunden Kontrollen verzeichnet werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Arthrose als ein über die Synovialmembran abgegrenzter, lokaler Prozess definiert werden kann, der durch klinisch systemische Parameter wie eine erhöhte Serum-XT-Aktivität nicht abzubilden ist.

Zusammenfassend leisten die erzielten Erkenntnisse dieser Dissertation einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der XT-Regulation und untermauern das Potenzial einer XT-Inhibition als therapeutische Option bei fibrotischen Erkrankungen.

Abstract

Human xylosyltransferase-I and -II (XT-I/-II) are golgi-resident isoenzymes which catalyze the rate-limiting step in posttranslational glycosylation of proteoglycans. It could be demonstrated that an increase in XT activity results in proteoglycan accumulation. Therefore, XT are associated with diseases being characterized by an abnormal extracellular matrix remodeling as, for instance, fibrosis. Since XT are secreted in the extracellular matrix with the xylosylated acceptor, quantification of serum XT activity displays a powerful technique for diagnostic monitoring of dysregulated tissue remodeling processes. Although XT have been comprehensively studied, physiological as well as pathological mechanisms of XT regulation remain elusive until today.

In this study, a complete analysis of the *XYLT* promoter regions was carried out to analyze whether the naturally occurring variability in serum XT activity is affected by sequence variations. Surprisingly, an evolutionary highly conserved fragment of 238 bp, which has not been described in human *XYLT1* reference sequences before, could be identified in the *XYLT1* promoter region. By performing an *in silico* analysis and promoter activity studies, this fragment could be shown to harbor transcription factor binding sites being responsible for basal *XYLT1* expression, as well as inducibility by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). In addition, a microsatellite and two single nucleotide variants (SNV) were detected in the *XYLT1* promoter region, whereas five SNV were located in the *XYLT2* promoter by genotyping 100 healthy blood donors. Even though investigated sequence variations exerted only marginal effects on serum XT activity, the SNV c.-1088C>A lead to a significantly reduced promoter activity referring to transcriptional XT regulation by *XYLT* promoter sequence variations.

To analyze the regulation of XT in fibrogenesis, a fibroblast cell culture model favoring myofibroblast differentiation was established. By treating dermal fibroblasts with TGF- β 1, the key mediator of XT as well as fibrotic remodeling, XT-I could be shown to function not only as marker of persistent fibrosis, but also as a biomarker of myofibroblast differentiation. In addition to TGF- β 1, Activin A turned out to be another potent profibrotic regulator of *XYLT1* mRNA expression and XT activity, while connective tissue growth factor (CTGF), platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB), angiotensin-II and endothelin-1 entailed only modulatory effects. Furthermore, transfection of dermal fibroblasts with XT-specific miRNAs miR-34a and miR-18a demonstrated an *in vitro* regulation of XT by miRNAs for the first time. Nevertheless, miRNA array based gene expression profiling did not reveal any significant changes in expression of these miRNAs by TGF- β 1 treatment, so that XT-regulation in fibrogenesis by miRNAs has to be further elucidated.

Moreover, XT-I was defined as a key mediator of arthrofibrotic tissue remodeling in synovial fibroblasts. Thus, *XYLT1* mRNA expression, as well as XT activity, were induced in response to profibrotic treatment with TGF- β 1 or mechanical strain. Contrarily, serum XT activity did not differ significantly between arthrofibrosis patients and controls. This implies that arthrofibrosis is a rare form of fibrosis which is localized and not describable by systemic laboratory parameters.

In summary, the results of this work provide new insights into XT regulation and emphasize the capability of XT inhibition as a therapeutical intervention to treat fibroproliferative disorders.

2. Einleitung

2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) setzt sich aus sekretierten Kollagenen, elastischen Fasern, nicht kollagenösen Glykoproteinen sowie Proteoglykanen zusammen und füllt den Interzellularraum aus. Die Komposition des komplexen Netzwerks, dessen Synthese und Degradierung einem streng regulierten Gleichgewicht unterliegt, definiert die gewebespezifische Histoarchitektur (Aumailley und Gayraud 1998). Ein pathologischer Verlust der strukturellen Integrität der ECM ist mit diversen Erkrankungen wie beispielsweise Fibrosen oder dem Ehlers-Danlos-Syndrom (EDS) assoziiert (Hubmacher und Apte 2013). Dieses umfasst ein genetisch und klinisch heterogenes Spektrum an Erkrankungen, die sich in einer Überbeweglichkeit der Gelenke, einer Überdehnbarkeit der Haut sowie pathologischen Gewebe-Remodellierungen der inneren Organe äußern (De Paepe und Malfait 2012). Ursprünglich wurden sechs EDS-Varianten beschrieben, die vornehmlich mit einer genetisch bedingten Beeinträchtigung der Biosynthese und Struktur der Kollagene I α 1, III α 1 und V α 1 einhergehen (Beighton *et al.* 1998). In Ergänzung wurden weitere EDS-Typen identifiziert, die mit Defekten anderer ECM-Komponenten assoziiert sind. Kürzlich wurde gezeigt, dass zwei seltene EDS-Subvarianten durch eine abnorme Proteoglykansynthese charakterisiert sind und durch Mutationen in Galaktosyltransferase- oder Sulfotransferase-kodierenden Genen hervorgerufen werden (Okajima *et al.* 1999a; Miyake *et al.* 2010; Nakajima *et al.* 2013).

Die essentiellen Funktionen der ECM bestehen darin, Organen und Geweben mechanische Elastizität und Zugfestigkeit zu verleihen sowie biochemische Signaltransduktionskaskaden und zelluläre Funktionen zu modulieren. Eine Regulation der Zelladhäsion, -differenzierung und -proliferation erfolgt sowohl über die Interaktion der ECM-Komponenten mit Transmembranproteinen als auch mit Wachstumsfaktoren, die gebunden, sequestriert und gezielt sekretiert werden können. Darüber hinaus ist die ECM durch die Einlagerung von Wassermolekülen maßgeblich an der Hydratisierung von Geweben beteiligt (Hynes 2009).

2.2 Proteoglykane und Glykosaminoglykane

Proteoglykane (PG) bilden eine heterogene Gruppe von Makromolekülen, die jeweils aus einem *core*-Protein bestehen, an das kovalent unverzweigte Glykosaminoglykanketten (GAG-Ketten) angeknüpft sind (Kjellen und Lindahl 1991). Während das Molekulargewicht eines

PG *core*-Proteins von 10 bis 500 kDa variieren kann, wird die strukturelle und funktionale Diversität von PG zusätzlich auch durch den Glykosylierungsgrad, der von einer bis zu 100 GAG-Ketten reichen kann, moduliert (Prydz und Dalen 2000).

Die posttranslationale Anheftung der GAG-Ketten erfolgt über die Anbindung eines Tetrasaccharid-Linkers (GlcA- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Xyl- β -O-Serin) an einen definierten Serinrest im PG *core*-Protein (s. Abb. 2.1), der innerhalb der Konsensussequenz a-a-a-G-S-G-a-G/a-a (a = saure Aminosäure) lokalisiert ist (Ruoslahti 1988). Während die initiale O-glykosidische Übertragung eines Xylosemoleküls (Xyl) auf das Protein durch die Xylosyltransferasen-I und -II (XT-I/-II) katalysiert wird, erfolgt die nachfolgende sequenzielle Addition zweier Galaktose- (Gal) und eines Glukuronsäurerestes (GlcA) über die β -1,4-Galaktosyltransferase-I (GalT-I) bzw. die β -1,3-Galaktosyltransferase-II (GalT-II) und die β -1,3-Glukuronyltransferase-I (GlcAT-I) (Esko *et al.* 1985; Esko *et al.* 1987; Almeida *et al.* 1999; Bai *et al.* 1999; Bai *et al.* 2001).

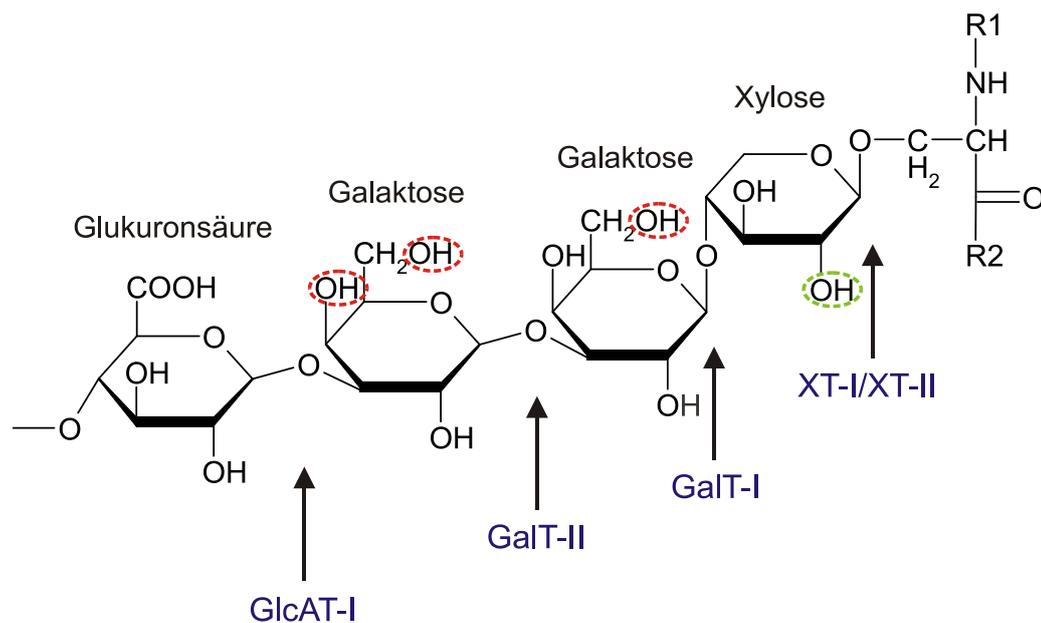


Abbildung 2.1: Aufbau des uniformen Tetrasaccharid-Linkers, welcher GAG-Ketten kovalent mit dem PG *core*-Protein verbindet. Blau markiert sind die Glykosyltransferasen Xylosyltransferase-I/-II (XT-I/-II), β -1,4-Galaktosyltransferase-I (GalT-I), β -1,3-Galaktosyltransferase-II (GalT-II) und β -1,3-Glukuronyltransferase-I (GlcAT-I), die jeweils die Übertragung eines Monosaccharids katalysieren. Rot markiert sind potentielle Sulfatierungspositionen und grün markiert ist eine potentielle Phosphorylierungsposition in der *Linker*-Struktur.

Die Addition des fünften Saccharids, N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) oder N-Acetylglucosamin (GlcNAc), an den Tetrasaccharid-Linker entscheidet, ob nachfolgend ein GAG der Chondroitinsulfat (CS)/Dermatansulfat (DS)- oder der Heparin/Heparansulfat (HS)-

Familie synthetisiert wird (Fritz *et al.* 1997; Sugumaran *et al.* 1998). Inwiefern ein möglicherweise in der Proteinsequenz kodiertes Signal die Entstehung einer GAG-Familie begünstigen kann, ist bis heute unklar. Da jedoch bereits PG beschrieben wurden, die sowohl GAG der CS/DS- als auch der Heparin/HS-Familie tragen, scheint die alleinige Klassifizierung des PG *core*-Proteins hierfür nicht ausschlaggebend zu sein (Prydz und Dalen 2000).

Es sind bereits einige posttranslationale Modifikationen des Tetrasaccharid-*Linkers* bekannt, wenngleich noch nicht vollständig geklärt werden konnte, welche Funktion diese ausüben. Nach der Anknüpfung eines Xylosemoleküls an das PG *core*-Protein erfolgt eine Phosphorylierung der Hydroxylgruppe am C2-Atom. Die Addition des finalen *Linker*-Bausteins Glukuronsäure wird jedoch erst nach der Dephosphorylierung initiiert, sodass die Phosphorylierung als Signalgeber für eine Kettenelongation fungieren könnte (Moses *et al.* 1997; Moses *et al.* 1999). Eine Sulfatierung des *Linkers* wird nur bei der weiterführenden Entstehung von CS/DS, jedoch nicht bei der Synthese von Heparin/HS verzeichnet (Sugahara *et al.* 1988). Demnach scheinen *Linker*-Sulfatierungen an der Regulation der GAG-Komposition beteiligt zu sein.

Alle GAG sind aus repetitiven Disaccharideinheiten aus jeweils einem Hexosamin, Glukosamin (GlcN) oder Galaktosamin (GalN), und einer Hexuronsäure, Glukuronsäure (GlcA) oder Iduronsäure (IdoA), bzw. Galaktoseresten (Gal) aufgebaut (Kjellen und Lindahl 1991). Eine detaillierte Auflistung der entsprechenden GAG-Kompositionen ist in Tab. 2.1 dargestellt.

Einzig das Ausmaß der Epimerisierung von GlcA zu IdoA und das Sulfatierungsmuster der GAG-Kette differenziert DS von CS bzw. Heparin von HS. Eine Sonderstellung in der Synthese der GAG nehmen Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure (HA) ein. Während KS nicht nur O- sondern auch N-glykosidisch an das PG *core*-Protein geknüpft werden kann, ist HA das einzige GAG, das weder sulfatiert noch an ein Protein gebunden vorliegt (Prydz und Dalen 2000). Die von Hyaluronsäuresynthasen katalysierte Biosynthese erfolgt daher direkt an der Plasmamembran, während die CS/DS- bzw. Heparin/HS-PG im Anschluss an die Synthese im Golgi direkt zu ihrem Wirkungsort, der ECM, intrazellulären Vesikeln oder der Zelloberfläche, transportiert werden (Kjellen und Lindahl 1991; Bodevin-Authelet *et al.* 2005).

Tabelle 2.1: Aufbau der alternierenden Disaccharideinheiten, aus den GAG synthetisiert werden. GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; GlcNAc = N-Acetylglukosamin; GlcA = Glukuronsäure; IdoA = Iduronsäure; Gal = Galaktose.

GAG	Hexosamin	Hexuronsäure
Chondroitinsulfat (CS)	GalNAc	GlcA
Dermatansulfat (DS)	GalNAc	GlcA; IdoA
Hyaluronsäure (HA)	GlcNAc	GlcA
Heparin/Heparansulfat (HS)	GlcNAc	GlcA; IdoA
Keratansulfat (KS)	GlcNAc	Gal

Die funktionalen Eigenschaften von PG werden von den physikalischen Charakteristika der GAG-Ketten dominiert. Diese sind aufgrund der Sulfatierungen sowie der zahlreichen Carboxylgruppen durch eine hohe negative Ladungsdichte gekennzeichnet und wirken stark hygroskopisch (Peplow 2005). Die Einlagerung der bis zu 1000fachen Menge ihres Volumens an Wasser nimmt vor allem im Knorpel einen wichtigen Stellenwert ein. Das PG Aggrecan bildet dort durch die Einlagerung von Wassermolekülen ein großes hydrodynamisches Volumen aus, das maßgeblich zu der Deformationsresistenz des Knorpels gegenüber Kompressionskräften in den Gelenken beiträgt (Watanabe *et al.* 1998). Des Weiteren zeichnen sich GAG auch durch die häufig ionische Interaktion mit diversen Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Matrixkomponenten und Enzymen aus, die über die Regulation der entsprechenden Signalkaskaden Einfluss auf die Zelladhäsion, -motilität, -proliferation und -differenzierung nehmen (Ruoslahti 1988).

PG *core*-Proteine dienen nicht nur als Glykosylierungsträger, sondern besitzen funktionale Domänen, die für die Verankerung in der Zellmembran oder die Interaktion mit Matrixkomponenten essentiell sein können (Iozzo und Murdoch 1996). Ausgehend von den funktionalen Eigenschaften der *core*-Proteine werden PG in modulare PG, membrangebundene PG und kleine Leucin-reiche PG (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRP) eingeteilt (Iozzo und Murdoch 1996). Die SLRP Decorin und Biglykan sind insbesondere in die Kollagenfibrillogenese involviert. Während Biglykan Kollagene sowohl über die Saccharid- als auch die Proteinkomponente binden kann, erfolgt die Interaktion des Decorins ausschließlich über das *core*-Protein (Reed und Iozzo 2002; Ruhland *et al.* 2007). Weiterhin tragen PG zur Assemblierung der ECM bei, indem sie Matrix-Komponenten wie Kollagene und Fibronectin miteinander quervernetzen (Kjellen und Lindahl 1991).

2.3 Glykosyltransferasen

Eukaryotische Glykosyltransferasen sind integrale Membranproteine des Golgi-Apparates oder des endoplasmatischen Retikulums und katalysieren die Ausbildung einer glykosidischen Bindung durch die Übertragung eines Zuckermoleküls von einem aktivierten Donor auf ein Akzeptorsubstrat. Als häufigste Donoren fungieren Nukleotid-Zucker, wengleich auch Lipid-Phosphat-Zucker und Phosphat-Zucker rekrutiert werden können (Paulson und Colley 1989; Hu und Walker 2002). Die Bandbreite der Akzeptoren ist sehr weit gefächert und spiegelt die Komplexität der natürlich vorkommenden Oligosaccharide sowie deren facettenreiche Funktionalität im Rahmen der Zell-Zell-Interaktion, Entwicklung, Immunologie und Signalgebung wider (Breton *et al.* 2012).

In Anbetracht der Diversität der synthetisierten Verbindungen sowie der geringen Sequenzhomologie werden Glykosyltransferasen als eine der heterogensten Enzymfamilien eingeordnet. Basierend auf Homologien der Aminosäuresequenzen werden aktuell 95 Glykosyltransferase-Familien klassifiziert (Breton *et al.* 2012). Diese zeigen eine hohe Similarität in ihrem modularen Aufbau. Sie sind durch eine kurze cytoplasmatische Domäne, eine 16 bis 20 Aminosäuren umfassende Signal-Ankerdomäne, eine Stammregion und eine katalytische Domäne gekennzeichnet. Die Signal-Ankerdomäne dient einerseits als orientierungsgebende Transmembrandomäne und andererseits als Signalpeptid, um eine enzymatische Spaltung zu verhindern (Paulson und Colley 1989).

Trotz der geringen Sequenzhomologie wurden für Nukleotid-Zucker-übertragende Glykosyltransferasen mittels Kristallstrukturanalyse nur zwei hochkonservierte dreidimensionale Strukturen, GT-A und GT-B, identifiziert (Lairson *et al.* 2008). Auch die Diversität der Reaktionsmechanismen der Glykosyltransferasen ist überschaubar. Invertierende Glykosyltransferasen katalysieren die Übertragung des Zuckermoleküls unter Inversion der Stereochemie des anomeren Kohlenstoffatoms des Donorsubstrates. Die Reaktion erfolgt über die Bildung eines Oxocarbeniumion-Übergangszustandes. Die Metallionenkatalyse folgt einem S_N2 -Mechanismus. Glykosyltransferasen, die kein Metallion in ihrem aktiven Zentrum aufweisen, katalysieren die Zuckerübertragung unter Beibehaltung der Konfiguration am anomeren Kohlenstoffatom des Donors. Mechanistisch ist bis heute unklar, ob über einen zweifachen Umlagerungsmechanismus nach Koshland ein kovalentes Glykosyl-Enzym-Mediat gebildet wird, oder ob die Reaktion alternativ einem S_Ni -Mechanismus folgt (Lairson *et al.* 2008; Breton *et al.* 2012). Die Aktivität der Isoenzyme XT-

I und -II ist abhängig von der Präsenz eines divalenten Kations, weshalb sie als invertierende Glykosyltransferasen zu klassifizieren sind (Voglmeir *et al.* 2007).

2.4 Xylosyltransferasen

Die XT-I und -II (EC 2.4.2.26) katalysieren die posttranslationale Xylosylierung von PG *core*-Proteinen im Golgi-Apparat. Die O-glykosidische Übertragung eines Xylosemoleküls auf definierte Serinreste erfolgt durch Umsatz des Substrates UDP-Xylose und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PG-Biosynthese dar (Schwartz 1977; Kearns *et al.* 1991; Pönighaus *et al.* 2007). Für keine der weiteren Glykosyltransferasen, die an der Synthese des Tetrasaccharid-*Linkers* beteiligt sind, wurde ein Isoenzym beschrieben (Kitagawa *et al.* 1998; Lind *et al.* 1998; Okajima *et al.* 1999b). Da sowohl die XT-I als auch die XT-II die Akzeptor-Sequenz a-a-a-a-G-S-G-a-G/a-a (a = saure Aminosäure) xylosylieren und eine starke Homologie hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften aufzeigen, bleibt die funktionelle Divergenz der Isoenzyme bis heute weitestgehend ungeklärt (Brinkmann *et al.* 1997; Casanova *et al.* 2008).

Eine umfassende Analyse des Akzeptorspektrums zeigte marginale Unterschiede in der Spezifität und Stringenz der Isoenzyme auf (Roch *et al.* 2009). Des Weiteren ergaben sich Divergenzen in Bezug auf die gewebespezifische Expression der XT-Isoformen (Pönighaus *et al.* 2007). Eine weiterführende Expressionsanalyse in 33 humanen Zelllinien ergab zudem Hinweise auf eine ubiquitäre Expression der XT-II und eine selektive Expression der XT-I (Roch *et al.* 2009). In Ergänzung gaben Condac *et al.* 2009 Hinweise darauf, dass die XT-II auch aus Thrombozyten sekretiert wird und unter physiologischen Bedingungen das prädominante Enzym im Serum ist (Condac *et al.* 2009).

Im Genom aller höheren Organismen, die bisher untersucht wurden, existieren zwei *XYLT*-Gene, während die genetischen Modellorganismen *Drosophila melanogaster* (Taufliege) und *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) nur jeweils ein *XYLT*-Gen kodieren (Wilson 2002; Hwang *et al.* 2003). Die humanen Gene *XYLT1* und *XYLT2* sind auf den Chromosomen 16p13.1 bzw. 17q21.3-22 lokalisiert und umfassen 300 kb respektive 15 kb, die für zwölf bzw. elf Exons kodieren (Götting *et al.* 2000b). Die Identifizierung und Charakterisierung der *XYLT*-Promotorregionen zeigte, dass diese einen hohen GC-Gehalt von bis zu 78 % aufweisen und weder eine TATA- noch eine CAAT-Box beinhalten. Eine Isoenzym-

spezifische, transkriptionale Regulation erfolgt über die divergente Beteiligung von AP- und SP-Transkriptionsfaktoren (Müller *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013).

Die Primärstruktur des Proteins XT-I umfasst 959 Aminosäuren und ist durch ein theoretisch kalkuliertes Molekulargewicht von 108 kDa charakterisiert. Das Isoenzym XT-II wird hingegen durch eine Aminosäuresequenz von 865 Aminosäuren beschrieben, die in einem berechneten Molekulargewicht von 97 kDa resultiert (Götting *et al.* 2000b). Aufgrund von Glykosylierungen wird das Molekulargewicht der nativen Isoenzyme posttranslational erhöht (Kuhn *et al.* 2001). Beide humanen XT-Isoformen sind in die Klasse der Typ II-Membranproteine einzuordnen, und zeigen eine Sequenzhomologie der Gesamtproteine von 55 %, die einen strukturell komplementären Aufbau begründet (s. Abb. 2.2). Auf eine cytoplasmatische Domäne folgen eine Transmembrandomäne, eine Stammregion sowie eine hochkonservierte katalytische Domäne (Götting *et al.* 2000b).

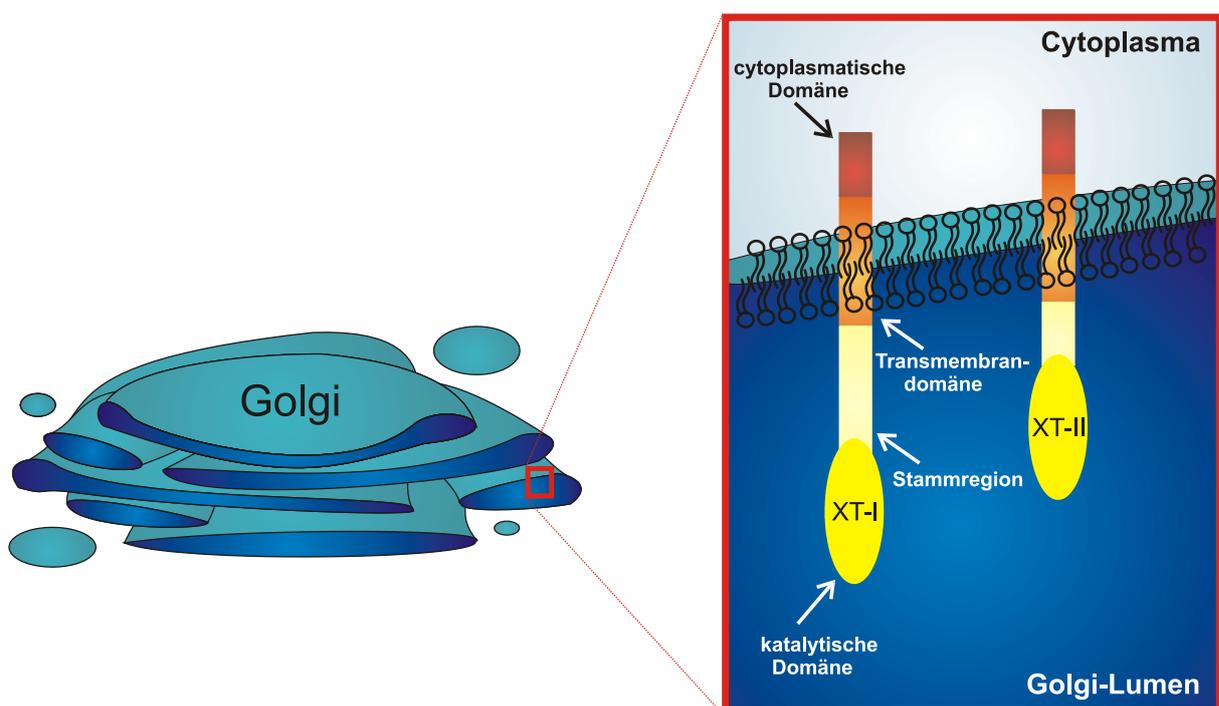


Abbildung 2.2: Struktureller Aufbau der Isoenzyme XT-I und XT-II. Die in der Membran des Golgi-Apparates lokalisierten Enzyme bestehen aus einer cytoplasmatischen Domäne (rot), einer Transmembrandomäne (orange), einer Stammregion (beige) sowie einer katalytischen Domäne (gelb). Exemplarisch gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt der Doppellipidmembran des Golgi-Apparates.

Obwohl die XT funktionell im Golgi-Apparat aktiv sind, werden sie mit dem xylosylierten Proteoglykan in den extrazellulären Raum sekretiert (Götting *et al.* 1999). Der

korrespondierende Sekretionsmechanismus ist Isoenzym-abhängig und wird hinsichtlich der XT-I durch eine Cystein-Protease vermittelt. In die Sekretion der XT-II scheint hingegen eine γ -Sekretase involviert zu sein (Pönighaus *et al.* 2010). Bis heute bleibt unklar, welchem physiologischen Prozess die Sekretion zu Grunde liegt. Es wird vermutet, dass das gezielte *Shedding* der Absenkung der intrazellulären XT-Aktivität dient und somit regulatorischen Einfluss auf die GAG-Biosynthese nimmt.

2.4.1 Pathophysiologie der XT

Die Möglichkeit der Quantifizierung der XT-Aktivität in humanen Körperflüssigkeiten stellt eine wertvolle nicht-invasive Methode dar, um die PG-Biosyntheserate in physiologischen oder pathologischen Matrix-Remodellierungen abzubilden. Eine Erhöhung der XT-Aktivität im Serum konnte bereits mit Leberfibrosen und systemischer Sklerodermie, die im Rahmen der Fibrosierung mit einer gesteigerten PG-Biosyntheserate einhergehen, assoziiert werden (Götting *et al.* 1999; Kuhn *et al.* 2009).

Des Weiteren konnte herausgestellt werden, dass nur die XT-I, jedoch nicht die XT-II, als ein Schlüsselmediator der fibrotischen Matrix-Umstrukturierung dilatativer Kardiomyopathien fungiert (Prante *et al.* 2007). Die Induktion der XT-I erfolgt unter anderem durch den *transforming growth factor*- β 1 (TGF- β 1), welcher zuvor bereits als XT-Mediator in der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen identifiziert wurde (Prante *et al.* 2006). Auch in frühen Phasen der Osteoarthritis findet eine chondrozytäre Induktion der *XYLT1* mRNA Expression statt, die durch TGF- β 1 verursacht wird. Im späten Stadium der Osteoarthritis erfolgt hingegen eine progressive Matrixdegradation, die über Interleukin-1 β und eine verstärkte XT-Sekretion vermittelt wird (Schön *et al.* 2006a; Venkatesan *et al.* 2009). Die maßgebliche Beteiligung der XT-I an der Pathogenese von Erkrankungen des Bindegewebes unterstreicht die Dringlichkeit der umfassenden Charakterisierung der zu Grunde liegenden regulativen Mechanismen einer abnormen XT-Expression und -Aktivität.

2.5 Fibrose

Eine Fibrose ist durch die exzessive, abnorme Akkumulation von ECM-Molekülen charakterisiert, die den progressiven Funktionsverlust des betroffenen Organs begründet (Ghosh *et al.* 2013). Bis zu 45 % aller krankheitsbedingten Todesfälle werden mit der

Beteiligung einer fibrotischen Gewebe-Remodellierungen assoziiert (Bittermann und Henke 1991).

Unabhängig von der klinischen Ätiologie resultieren alle fibrotischen Erkrankungen aus einem persistenten, nicht-physiologischen Wundheilungsprozess, der durch eine physische, chemische, immunologische oder pathologische Gewebeverletzung ausgelöst wird (Wynn 2008; Jinnin 2010). Die sofortige Initiierung des Wundverschlusses geht mit einer Thrombozytenaktivierung sowie der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aus den Thrombozyten, dem geschädigten Gewebe und rekrutierten, infiltrierenden Zellen des Immunsystems einher (Sarrazy *et al.* 2011). Durch die Sezernierung diverser profibrotischer Faktoren wird die Proliferation und Differenzierung der residenten Fibroblasten zu Myofibroblasten gefördert (s. Abb. 2.3).

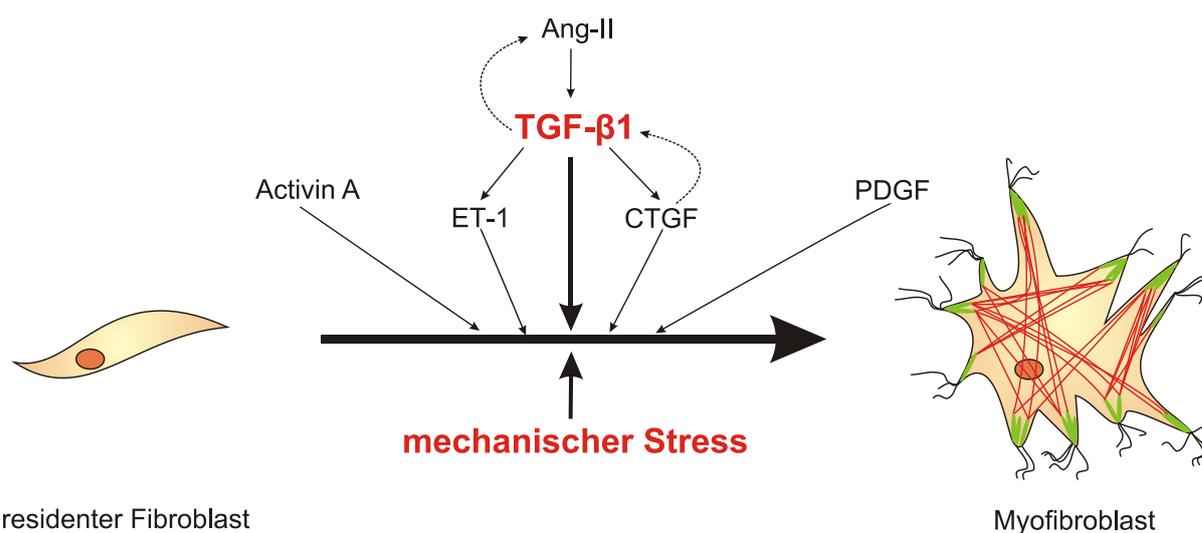


Abbildung 2.3: Schema der Myofibroblasten-Differenzierung. Die Differenzierung eines residenten Fibroblasten zum Myofibroblasten wird vornehmlich durch TGF-β1 und mechanischen Stress induziert. Weitere profibrotische Faktoren nehmen Einfluss auf den Prozess. Gestrichelte Pfeile stellen einen *feed-forward* Mechanismus dar. Fokale Adhäsionen sind grün dargestellt, Stressfasern aus α -Glattmuskelaktin sind rot gezeichnet. Ang-II (Angiotensin-II); ET-1 (Endothelin-1); CTGF (*connective tissue growth factor*); PDGF (*platelet derived growth factor*); TGF-β1 (*transforming growth factor-β1*).

Myofibroblasten zeichnen sich durch eine hohe Kontraktilität und Syntheserate von ECM-Komponenten aus und sind somit die wichtigsten zellulären Mediatoren der Wundheilung und Narbenbildung. Kommt es zu keiner geregelten Apoptose der Myofibroblasten, geht der Wundheilungsprozess in ein chronisches, fibroproliferatives Stadium über, das durch eine

Dysbalance der Matrix-Synthese und -Degradation sowie einen progressiven Organfunktionsverlust charakterisiert ist (Hinz und Gabbiani 2010).

Als bedeutendster, molekular Marker der Myofibroblasten-Differenzierung konnte die *de novo* Expression von α -Glattmuskelaktin (ACTA2) ausgemacht werden. Dieses assembliert intrazellulär zu Stressfasern, die den Zellen Kontraktilität verleihen (Hinz *et al.* 2001). Die Induktion der Expression des α -Glattmuskelaktins erfolgt durch das Einwirken von TGF- β 1 (Desmoulière *et al.* 1993). TGF- β 1 wird im Rahmen des Wundheilungsprozesses sekretiert und gilt als das potenteste profibrotische Cytokin, das einerseits die Expression diverser ECM-Komponenten wie PG und Kollagenen induziert, während andererseits die Expression Matrix-degradierender Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) supprimiert wird (Kuroda und Shinkai 1997). Auch die Induktion der XT-I erfolgt über TGF- β 1 (Prante *et al.* 2007). Ein gesteigerter Wirkeffekt von TGF- β 1 wird in systemischer Sklerodermie unter anderem durch eine erhöhte TGF- β -Rezeptordichte in Fibroblasten und einen gesteigerten TGF- β 1-Serumspiegel vermittelt (Kawakami *et al.* 1998). Eine negative Regulation von TGF- β 1 erfolgt über das PG Decorin (Yamaguchi *et al.* 1990). Neben TGF- β 1 wird auch einer Spleißvariante des Glykoproteins Fibronectin, dem ED-A Fibronectin, ein entscheidender Beitrag in der Regulation der Myofibroblasten-Differenzierung zugesprochen (Serini *et al.* 1998).

Über die Stressfaserausbildung in den Myofibroblasten wird dem fibrosierenden Gewebe eine hohe Deformationsresistenz verliehen. Diese wirkt sich über mechanisch induktive Signaltransduktionskaskaden einerseits positiv auf die Kontraktion der Wunde aus, wobei andererseits eine überschießende, fibrotische Reaktion zu einer *feed-forward* Regulation der ACTA2 Expression selbst beiträgt. Zudem konnte gezeigt werden, dass mechanischer Stress eine Aktivierung von latentem TGF- β 1 in Fibroblasten bewirkt (Wipff *et al.* 2007). Auch epitheliale und endotheliale Zellen sowie hepatische Sternzellen, zirkulierende Fibrocyten oder mesenchymale Vorläuferzellen können unter dem Einfluss von profibrotischen Aktivatoren, einer chronischen Entzündung, mechanischem Stress oder einer Hypoxie zu Myofibroblasten differenzieren (Hinz *et al.* 2007).

Obwohl in den vergangenen Jahren eine umfassende Charakterisierung des komplexen, fibrotischen Regelwerks erfolgte, gibt es bis heute keine anerkannte Therapie. Aktuell diskutierte therapeutische Ansätze fokussieren sich auf die Initiation der Apoptose von Myofibroblasten sowie die Inhibition von profibrotischen Mediatoren oder die Ausbildung der kontraktilen Stressfasern im Myofibroblasten (Hinz und Gabbiani 2010).

Als potenzielle antifibrotische Ziele gelten neben TGF- β 1, das aufgrund seiner facettenreichen Funktionalität im Organismus ungeeignet zu sein scheint, insbesondere die Proteine Activin A, CTGF (*connective tissue growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*), Angiotensin-II und Endothelin-1 (Leask 2010). Das Activin A, welches der TGF- β Superfamilie zugeordnet werden kann, moduliert über eine SMAD-abhängige Signalkaskade nicht nur die Hypophysenfunktion, sondern wird insbesondere in Wundheilungsprozessen und Fibrosen verstärkt exprimiert (Werner und Alzheimer 2006). CTGF ist ein Mitglied der CCN-Familie matrizellulärer Proteine und moduliert zahlreiche biochemische Prozesse einschließlich der Adhäsion, Migration, Mitogenese, Angiogenese oder Apoptose (Bradham *et al.* 1991). Weiterhin agiert CTGF als *downstream*-Mediator von TGF- β 1 und fördert dessen Rezeptoraffinität durch direkte Bindung (Igarashi *et al.* 1993).

PDGF ist wie CTGF den profibrotischen Wachstumsfaktoren zuzuordnen. Es wird von Thrombozyten sekretiert und wirkt als profibrotisches Mitogen auf Neutrophile, Makrophagen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Heldin und Westermark 1999). Angiotensin-II fungiert als vasoaktives Peptidhormon, welches die vaskuläre Kontraktion induziert und als zentraler Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Hämodynamik wirkt. Über den Angiotensin-Rezeptor-I erfolgt zudem eine Induktion von TGF- β 1, das über eine autokrine Schleife wiederum die Ang-II Expression steigert (Campbell und Katwa 1997). Auch Endothelin-1 wirkt als vasokonstriktorisches Peptidhormon und ist zusätzlich als fibrotischer Mediator aktiv. Im Gegensatz zu Ang-II agiert es jedoch *downstream* von TGF- β 1 und wird über eine c-Jun N-terminale Kinase induziert (Leask 2008).

2.5.1 Arthrofibrose

Als primäre Arthrofibrose wird die exzessive, intraartikuläre Akkumulation von ECM-Molekülen in Folge von chirurgischen Eingriffen und Traumata definiert. Mit einer Inzidenzrate von 10 % aller Knie-totalendoprothetischen Eingriffe ist diese Form der Fibrosierung eine schwerwiegende, aber bisher unzureichend erforschte Komplikation (Gollwitzer *et al.* 2006). Hauptsymptom ist die persistierende, teils schmerzhafteste Bewegungseinschränkung des Gelenks. Während die Ätiologie primärer Arthrofibrosen ungeklärt ist, beruhen sekundäre Arthrofibrosen auf postoperativen, mechanischen Problematiken wie einer inakkuraten Transplantatpositionierung. Histopathologisch wird die primäre Arthrofibrose durch eine Synovialitis charakterisiert, die mit einer chronisch

inflammatorischen Hyperplasie der Synovialmembran und einer verstärkten Myofibroblasten-Differenzierung einhergeht (Zeichen *et al.* 2000; Bosch 2002; Krenn *et al.* 2013).

Die Diagnose einer arthrofibrotischen Gewebe-Remodellierung wird interdisziplinär über die Abklärung klinischer, bildgebender, histologischer, mikrobiologischer und labormedizinischer Parameter sowie den Ausschluss anderweitiger Ursachen einer schmerzhaften Bewegungseinschränkung eines Gelenkes, wie beispielsweise eine Infektion oder rheumatoide Arthritis, vorgenommen. Aufgrund des Mangels an einer Kausaltherapie erfolgt therapeutisch eine symptomatische Behandlung über Physiotherapie, analgetische Medikation, eine unter Narkose erfolgende Gelenkmobilisation oder die Entfernung von Narbengewebe im Rahmen einer arthroskopischen Arthrolyse (Gollwitzer *et al.* 2006).

2.6 Transkription eukaryotischer Gene

Die Transkription eukaryotischer Gene erfolgt über die RNA-Polymerase-II (RNA-Pol II), die DNA entwindet, RNA synthetisiert und die DNA wieder verdrillt. Für die Erkennung einer Promotorregion sowie die Transkriptionsinitiation ist die Wechselwirkung der RNA-Pol II mit Transkriptionsfaktoren (TF) obligat (Kornberg 2007). Eine Promotorregion ist als DNA-Strukturelement definiert, das eine Bindung der RNA-Pol II ermöglicht und die Information kodiert, mit welcher Effizienz zu welchem Zeitpunkt ein Gen transkribiert wird. Der Präinitiationskomplex der eukaryotischen Transkription setzt sich aus der RNA-Pol II, den generellen TF TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIJ und TFIIH sowie Mediator-Proteinen, die aktivierend oder supprimierend wirken können, zusammen und bindet an die sogenannte Kern-Promotorregion. Eine Regulation dieser Bindung findet über cis-regulatorische Elemente statt, die in drei Gruppen klassifiziert werden. In der Kern-Promotorregion können ein TFIIB-Bindeelement, eine TATA-Box, ein Initiatorelement sowie *downstream*-Promotorelemente lokalisiert sein, die an der Initiation beteiligt sind. Dennoch ist ihre Anwesenheit nicht zwingend erforderlich. Weitere cis-regulatorische Elemente sind proximale und distale Promotorbereiche, die sich außerhalb der Promotor-Kernregion befinden und als Bindestellen für modulierende Proteine fungieren (Orphanides *et al.* 1996).

Die Transkriptionsinitiation von Promotoren wie den *XYLT*-Promotoren, die keine TATA-Box oder eine Initiatorregion aufweisen, wird häufig über GC-Boxen reguliert. Diese weisen die Konsensussequenz GGGCGG auf und befinden sich ca. 70 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (Blake *et al.* 1990). Die Initiation der Transkription erfolgt über SP1-TF,

die durch eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne charakterisiert sind, die wiederum aus drei C₂H₂-Zinkfingerdomänen aufgebaut ist (Hapgood *et al.* 2001). Im Gegensatz zu einer Aktivierung der Transkription können sich GC-Boxen über die Bindung repressiver TF wie SP3 oder SP4 auch negativ regulierend auf die Transkription auswirken. Weiterhin stellen GC-Boxen ein essentielles Element der Regulation der eukaryotischen Transkription dar. Während die konstitutive Transkription gewebespezifisch exprimierter Gene mittels Methylierung reprimiert wird, befinden sich insbesondere in den Promotorregionen von Haushaltsgenen unmethylierte CpG-Inseln, die die Transkription ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass SP1-TF-Bindestellen maßgeblich zu einem Erhalt des demethylierten Zustands beitragen (Brandeis *et al.* 1994; Siegfried *et al.* 1999).

Das Auftreten regulatorischer Polymorphismen in Promotoren wurde vielfach aufgezeigt und kann auch mit fibrosierenden Prozessen in Verbindung gebracht werden. So wurde 2007 eine signifikante Assoziation der Sequenzvariation c.-945C>G im Promotor des CTGF mit systemischer Sklerodermie beschrieben. Diese beruht auf der Variation einer transkriptional repressiv wirksamen SP3-Transkriptionsfaktor-Bindestelle (Fonseca *et al.* 2007).

2.7 microRNAs

microRNAs (miRNAs) sind eine Familie endogener, nicht-kodierender RNAs, die wichtige Regulatoren der posttranskriptionalen Genexpression darstellen. Die einzelsträngigen ca. 22 Nukleotide umfassenden miRNAs binden an die 3'untranslatierte Region (3'UTR) eukaryotischer mRNAs und induzieren deren Degradierung oder translationale Repression. Schätzungsweise 50 % aller Protein-kodierenden, humanen Gene werden durch miRNAs reguliert, wobei eine miRNA an über 100 verschiedene mRNAs binden kann. Folglich sind miRNAs an nahezu jedem zellulären Prozess beteiligt, weshalb eine Dysregulation der miRNA-Komposition mit unterschiedlichsten pathologischen Phänomenen assoziiert wird (Krol *et al.* 2010). Eine Regulation der XT über miRNAs wurde bisher nicht beschrieben.

miRNAs können sowohl mono- als auch polycistronisch in nicht-kodierenden oder kodierenden DNA-Regionen kodiert sein und werden *in vivo* durch die RNA-Pol II oder III transkribiert. Die synthetisierte pri-miRNA besteht aus einem doppelsträngigen ca. 33 Nukleotide umfassenden *hairpin*-Element, das zwei einzelsträngige Enden und eine terminale *loop*-Struktur aufweist. Die Abspaltung der einzelsträngigen Enden erfolgt im Zellkern durch einen Mikro-Prozessorkomplex, der aus der RNase III Droscha und dem DGCR8-Protein

aufgebaut ist. Die gebildete pre-miRNA wird aus dem Nukleus in das Cytoplasma exportiert und dort weiter prozessiert (s. Abb. 2.4). Hierzu formt die RNase *Dicer* einen Komplex mit dem Protein TRBP, das an doppelsträngige DNA bindet, und spaltet die *loop*-Struktur der pre-miRNA ab, sodass eine *hairpin*-Struktur entsteht (Winter *et al.* 2009). Um nachfolgend eine Bindung der miRNA an die mRNA herzustellen, muss zunächst die Spaltung des miRNA-Doppelstrangs durch eine Helikase erfolgen. Hierbei wird der miRNA*-Strang degradiert. Der verbleibende miRNA-Strang, der sich durch eine geringere Thermostabilität des Basenpaars am 5'-Ende des miRNA/miRNA*-Doppelstrangs auszeichnet, wird in den Ribonukleinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) inkludiert und vermittelt die posttranskriptionale Expressionsrepression (Khvorova *et al.* 2003).

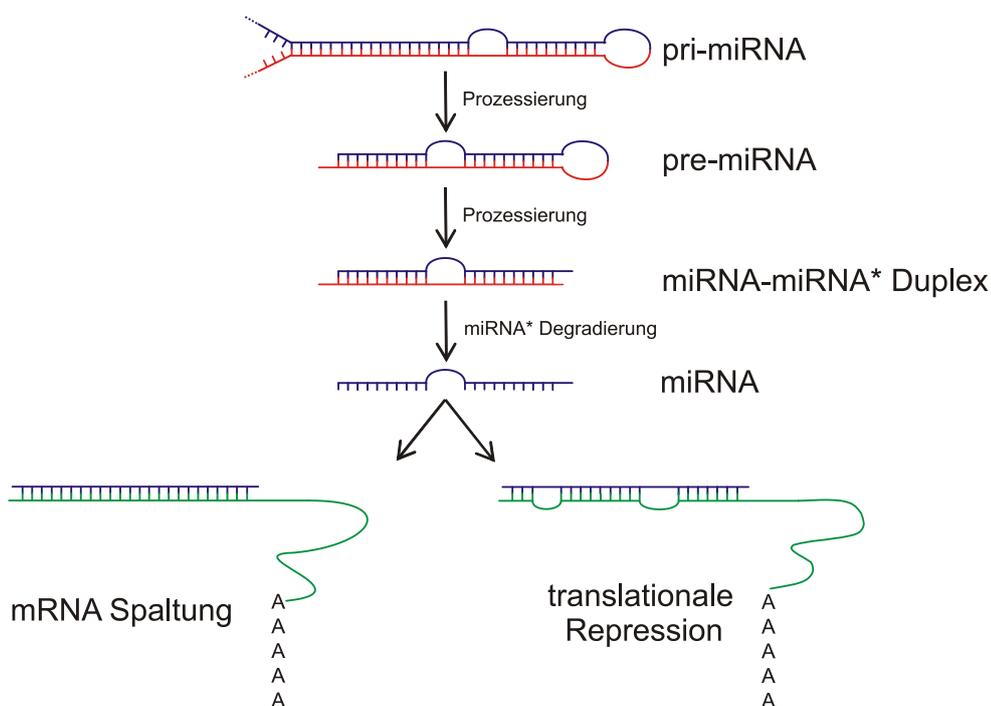


Abbildung 2.4: Darstellung der miRNA-Prozessierung ausgehend von der doppelsträngigen pri-miRNA bis zu der reifen miRNA (blau). Diese bindet an eine komplementäre mRNA (grün) und leitet deren Spaltung oder translationale Repression ein.

Die Wirkung der miRNA wird über eine Watson-Crick-Basenpaarung erzielt, die zwischen zwei bis acht Basen der miRNA (*seed*-Region) und komplementären Basen in der 3'UTR der Ziel-mRNA hergestellt wird. Der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA definiert den regulatorischen Mechanismus. Bei perfekter Basenpaarung kommt es zur Deadenylierung und Spaltung der mRNA, während eine unvollständige

Basenübereinstimmung zu einer Repression der Translation führt. Diese kann die Ribosomenrekrutierung oder auch das frühzeitige Ablösen der Ribosomen von der mRNA bewirken (Kuhn *et al.* 2008; Carthew und Sontheimer 2009; Fabian *et al.* 2010).

Aufgrund des weiten Spektrums der durch miRNAs regulierten zellulären Prozesse unterliegt die miRNA-Biogenese zwangsläufig einer strengen Regulation. Diese erfolgt über die Transkriptionsregulation der miRNAs durch TF, RNA-*Editing*, RNA-bindende Proteine oder die kontrollierte miRNA-Degradation (Fabian *et al.* 2010).

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Die homologen Isoenzyme XT-I und -II katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PG-Biosynthese und wurden in den letzten Jahren umfassend biochemisch charakterisiert. Da die Kenntnisse über die Regulationsmechanismen der XT jedoch noch lückenhaft sind, wurde im Rahmen dieser Dissertation eine weiterführende Analyse der physiologischen und pathologischen XT-Regulation fokussiert.

Aufbauend auf der in Vorarbeiten durchgeführten Identifizierung und Charakterisierung der *XYLT*-Promotorregionen, sollten diese erstmals auf das Vorkommen von Sequenzvariationen in der Normalbevölkerung analysiert werden. Neben dem Konservierungsgrad sollte zudem untersucht werden, ob die natürliche Variabilität der Serum-XT-Aktivität durch Sequenzvariationen in den *XYLT*-Promotoren begründet werden kann.

Eine erhöhte Serum-XT-Aktivität wurde in den letzten Jahren mit einer, durch TGF- β 1 induzierten, fibrotischen Matrix-Remodellierung assoziiert. In Anlehnung an die diagnostische Relevanz der XT-Aktivität, bestand das Ziel des zweiten Teilprojekts dieser Arbeit darin, zu entschlüsseln, durch welche weiteren Mediatoren die XT in der Fibrosierung induziert werden. Da bisher keine therapeutische Option zur Behandlung von Fibrosen existiert, sollte weiterführend hinterfragt werden, inwiefern es sich bei den XT um putative therapeutisch relevante *Targets* sowie diagnostische Marker handeln könnte.

Hierzu sollte zunächst ein geeignetes Zellkulturmodell für die Kultivierung dermalen Myofibroblasten etabliert werden, das nachfolgend Aufschluss darüber geben sollte, ob die XT nicht nur Marker persistenter Fibrosen sind, sondern darüber hinaus auch direkt an der Myofibroblasten-Differenzierung beteiligt sind. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Identifizierung fibrotischer Mediatoren, die *in vitro* eine Induktion der *XYLT* mRNA

Expression und XT-Aktivität ausüben. Neben der Charakterisierung einer definierten Auswahl an profibrotischen Wachstumsfaktoren und Hormonen sollte diesbezüglich herausgestellt werden, ob *in vitro* auch eine XT-Modulation über miRNAs erfolgen könnte.

In einem dritten Teilprojekt dieser Arbeit sollte eruiert werden, ob sich die XT als Marker für arthrofibrotische Gewebe-Remodellierungen eignen. Dazu wurde angestrebt, die Rolle der XT als fibrotischer Mediator in Primärkulturen synovialen Fibroblasten zu charakterisieren. In Ergänzung sollte in einer Arthrofibrose-Patientenkohorte eine Evaluation der Serum-XT-Aktivität als nicht-invasiver, diagnostischer Marker der Arthrofibrose erfolgen.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der XT-Regulation durch Promotorvariationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die humanen *XYLT*-Promotorbereiche erstmalig auf Sequenzvariationen und ihren Konservierungsgrad untersucht sowie geprüft, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Sequenzvariationen in den *XYLT*-Promotorbereichen und der natürlich vorliegenden Variabilität der XT-Aktivität im humanen Serum besteht. Dazu wurden beide *XYLT*-Promotorregionen aus der genomischen DNA von zehn gesunden Blutspendern amplifiziert, sequenziert und auf Sequenzvariationen analysiert. Die Allelfrequenzen der identifizierten Sequenzvariationen wurden in einer Kohorte von 100 Blutspendern bestimmt und der regulatorische Einfluss der Sequenzvariationen auf die Promotoraktivität sowie die Serum-XT-Aktivität weiterführend überprüft.

3.1.1 Entschlüsselung der vollständigen *XYLT1*-Promotorsequenz

Um eine Amplifikation der *XYLT1*-Promotorregion vorzunehmen, wurde diese unter Berücksichtigung der Referenzsequenz (*GenBank accession no.* NG_015843.1) in überlappende Fragmente von etwa 500 bp unterteilt und über spezifische *Primer*-Systeme mittels PCR aus der genomischen DNA von zehn Blutspendern amplifiziert und sequenziert. Die Amplifikation des sich unmittelbar stromaufwärts des Startcodons (ATG) befindenden A-Fragments (c.-372 bis c.+122) gelang, aufgrund des hohen GC-Gehalts von 75 %, ausschließlich unter Anwendung eines speziellen Protokolls für eine *Slowdown-PCR*. Die über eine Gelelektrophorese ermittelte Amplifikatgröße des A-Fragments betrug ca. 700 bp (s. Abb. 3.1) und entsprach demnach nicht der erwarteten, über die Referenzsequenz berechneten, Fragmentlänge von 494 bp.

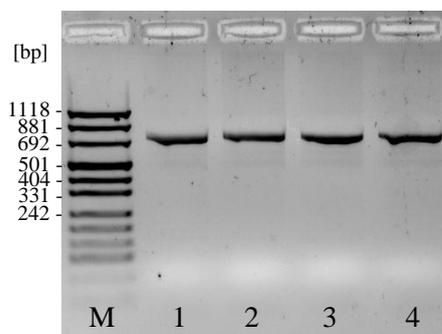


Abbildung 3.1: Nachweis der PCR-Amplifikate des *XYLT1*-Promotorfragments A (c.-372 bis c.+122) im analytischen Agarosegel. M: pUC-Mix Marker 8, Spur 1 bis 4: Aus genomischer DNA der Blutspender 1 bis 4 amplifiziertes A-Fragment (ca. 700 bp).

Durch eine Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass das amplifizierte Fragment sowohl den Sequenzabschnitt von 494 bp analog zu dem 5' untranslatierten Bereich des *XYLTI*-Gens aus der Referenzsequenz enthält, als auch einen zusätzlichen, in der Referenzsequenz fehlenden und nachfolgend als *XYLTI*_{238*} bezeichneten, Sequenzabschnitt von 238 bp beinhaltet. Dieser kodiert unter anderem für eine Mikrosatellitenregion und weist einen GC-Gehalt von 84,9 % auf.

Um auszuschließen, dass die Abweichung von der Referenzsequenz durch Amplifikationsfehler oder eine Mutation in der genomischen DNA der Blutspender verursacht wurde, erfolgte die Amplifikation und Sequenzierung des Fragments aus der genomischen DNA von insgesamt 100 Blutspendern. Weder die Amplifikatgröße noch -sequenz aller amplifizierten Fragmente entsprach der Referenzsequenz. Weiterhin konnten sechs verschiedene Variationen des Mikrosatelliten nachgewiesen werden.

Ein Sequenzabgleich der über eine Konsensussequenz ermittelten Wildtyp-Promotorsequenz *XYLTI*_{complete} mit in Datenbanken gelisteten alternativen Referenz- sowie *Shotgun*-Sequenzen ergab, dass keine der Sequenzen vollständig mit der in dieser Arbeit detektierten Promotorsequenz übereinstimmt. Dennoch konnte eine *Shotgun*-Sequenz (*GenBank accession no.* NW_001838365.2) identifiziert werden, die im Rahmen der Sequenzierung des humanen Genoms durch Craig Venter generiert wurde und eine hohe Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit detektierten *XYLTI*-Promotorsequenz *XYLTI*_{complete} aufweist, jedoch nach 203 bp des bisher in der Referenzsequenz unberücksichtigten Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} an Position c.-162 abbricht (s. Abb. 3.2).

Die Basennummerierung im *XYLTI*-Promotor basiert nachfolgend auf der in dieser Arbeit determinierten Promotorsequenz *XYLTI*_{complete}. Das erste Nukleotid des Translationsstarts (ATG) des *XYLTI*-Gens (*GenBank accession no.* NG_015843.1) wurde als c.+1 definiert und die 5'-kodierende Region rückläufig nummeriert. Die vollständige *XYLTI*-Promotorsequenz ist in Abschnitt 10.1 (Anhang) hinterlegt.

Das dargestellte Sequenz-Alignment (s. Abb. 3.2) des *XYLTI*-Promotor-Sequenzabschnitts c.-610 bis c.+122 (A-Fragment) veranschaulicht die sequenzspezifischen Kongruenzen und Differenzen zwischen der in dieser Arbeit sequenzierten Wildtypsequenz des *XYLTI*-Promotors sowie der aktuell gelisteten Referenzsequenz (*GenBank accession no.* NG_015843.1) und der *Shotgun*-Sequenz (*GenBank accession no.* NW_001838365.2).

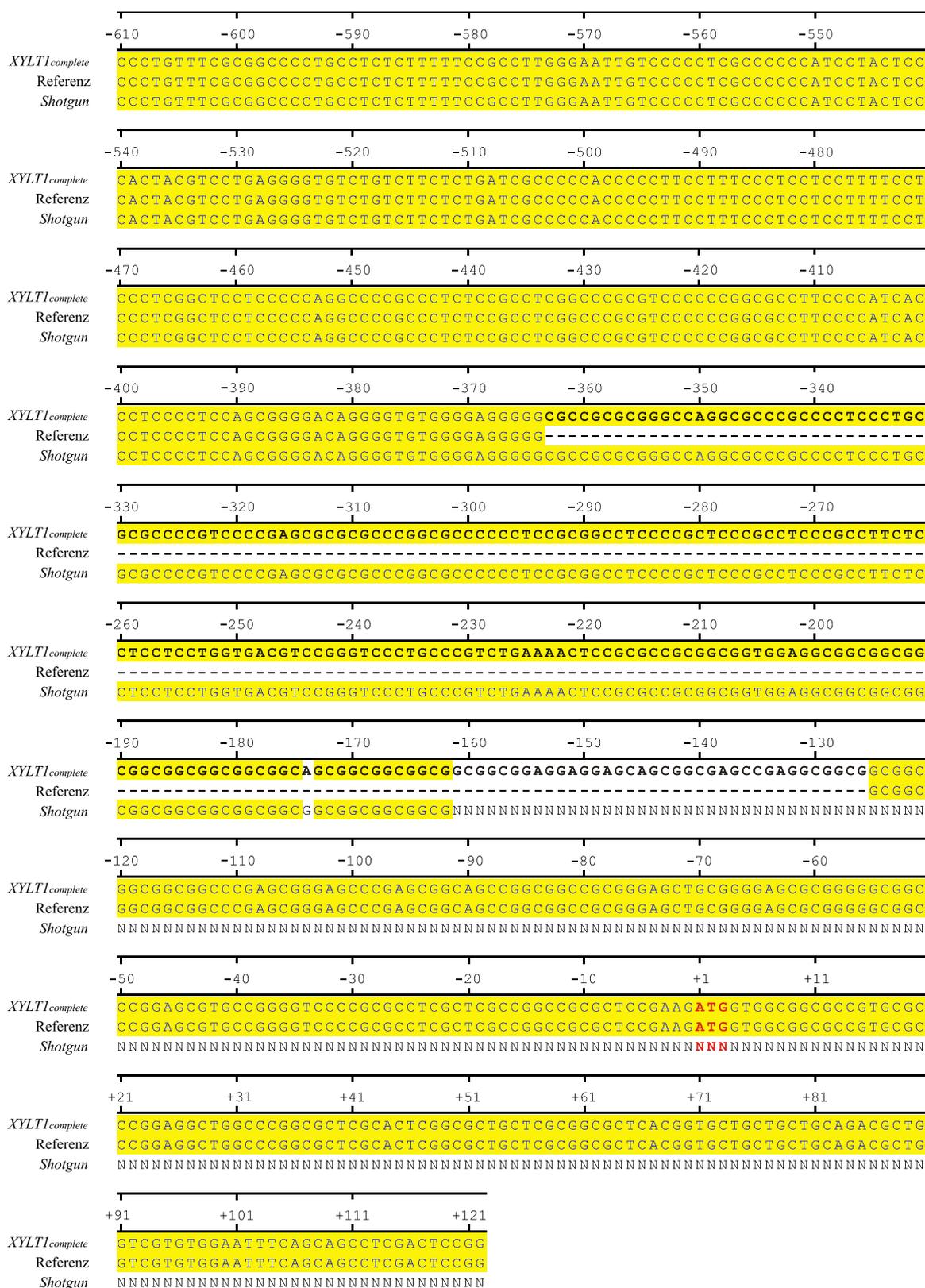


Abbildung 3.2: Sequenz-Alignment des XYLT1-Promotorabschnitts c.-610 bis c.+122. Angeführt sind die in dieser Arbeit identifizierte XYLT1-Promotorsequenz (*XYLT1_{complete}*), sowie die Referenzsequenz (*GenBank accession no. NG_015843.1*) und die Shotgun-Sequenz (*GenBank accession no. NW_001838365.2*). Die Basenposition ist über der Sequenz numerisch dargestellt und erfolgt rückläufig ab dem Translationsstartpunkt c.+1 (ATG, rote Markierung). Übereinstimmende Basenpaare zwischen den Sequenzen sind gelb markiert, voneinander abweichende Basenpaare sind weiß hinterlegt. Der Sequenzabschnitt XYLT1_{238*} ist fett markiert.

Die Sequenz *XYLTI_{complete}* stimmte bis auf den in der Referenzsequenz fehlenden Abschnitt *XYLTI_{238*}* vollständig mit dieser überein. Eine ebenfalls hohe Übereinstimmung zeigten auch die Sequenzen *XYLTI_{complete}* und die *Shotgun*-Sequenz (*GenBank accession no.* NW_001838365.2), wengleich an Position c.-174 eine nicht komplementäre Base detektiert wurde. Aufgrund des frühzeitigen Sequenzabbruchs der *Shotgun*-Sequenz an Position c.-162 konnte das *Alignment* ab dieser Stelle nicht fortgesetzt werden.

Eine weiterführende Verifizierung der beschriebenen Diskrepanz zwischen den *XYLTI*-Promotorsequenzen wurde über ein evolutionäres Sequenz-*Alignment* der humanen Sequenz *XYLTI_{complete}* mit der des Schimpansen (*Pan troglodytes*, *GenBank accession no.* NC_006483.3) und der Maus (*Mus musculus*, *GenBank accession no.* NC_000073.6) durchgeführt. Es konnte sowohl eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen in dem erstmals in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzabschnitt von 238 bp, *XYLTI_{238*}*, als auch in den angrenzenden Promotor-Bereichen aufgezeigt werden (s. Abb. 3.3.).

Eine Auflistung der prozentualen Sequenzübereinstimmungen zwischen den berücksichtigten Spezies ist in Tab. 3.1 aufgeführt. Während sich die Sequenzen der vollständigen *XYLTI*-Promotorregion (*XYLTI_{complete}* c.-1877 bis c.+1) des Menschen und des Schimpansen zu 98 % glichen, betrug die Übereinstimmung zwischen humaner und muriner Sequenz 58 %. Die Sequenz des neu identifizierten Sequenzabschnitts von 238 bp (*XYLTI_{238*}*, c.-363 bis c.-126) zeigte hingegen sowohl bei dem Vergleich der humanen Sequenz mit der des Schimpansen als auch bei dem Abgleich der humanen mit der murinen Sequenz eine hohe Konservierung von 93 bzw. 77 %.

Tabelle 3.1: Prozentualer Sequenzvergleich der vollständigen *XYLTI*-Promotorsequenz *XYLTI_{complete}* und des neu identifizierten Sequenzabschnitts *XYLTI_{238*}* zwischen verschiedenen Spezies. Die angegebenen Positionen der Sequenzabschnitte beziehen sich auf die humane Sequenz des *XYLTI*-Promotors.

Spezies	<i>XYLTI_{complete}</i> [c.-1877 bis c.+1]	<i>XYLTI_{238*}</i> [c.-363 bis c.-126]
<i>Homo sapiens/Pan troglodytes</i>	98 %	93 %
<i>Homo sapiens/Mus musculus</i>	58 %	77 %

In einer *in silico* Analyse wurde mit Hilfe der *Software* Genomatix eine Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen in dem in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} durchgeführt. Der Fokus wurde gezielt auf Transkriptionsfaktor-Familien gelegt, deren Funktion in der XT-Regulation bereits beschrieben wurde oder deren Aktivität in der Signalkaskade von TGF- β 1 eine Rolle spielt (Chen *et al.* 2006; Holian *et al.* 2008; Müller *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013). Die Analyse ergab, dass der Sequenzabschnitt eine Vielzahl an Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der Familien V\$SP1F (GC-Box Faktoren, *specificity protein 1*), V\$EGRF (*early growth response/nerve growth factor induced protein C and related factors*) und V\$KLFS (*Krueppel like transcription factors*) beinhaltet (s. Abb. 3.4).

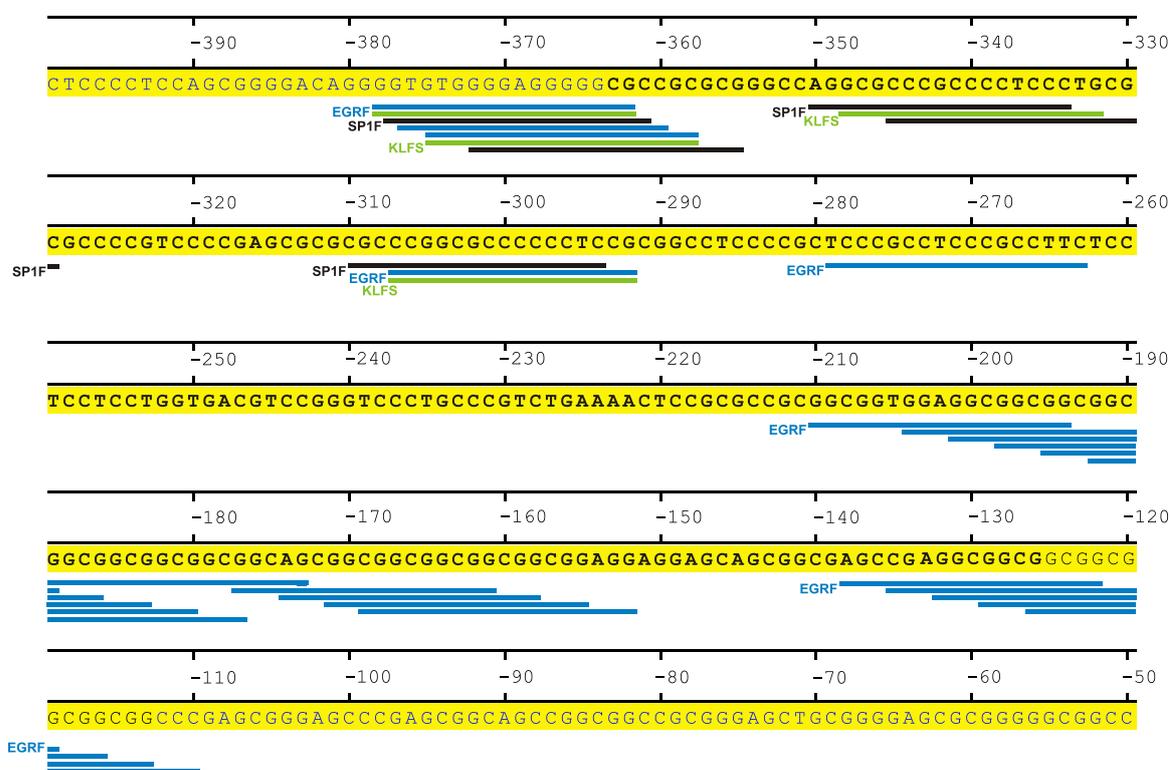


Abbildung 3.4: Darstellung der mittels *in silico* Analyse identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLTI*-Promotorbereich c.-50 bis c.-399. Die Basenposition ist über der Sequenz numerisch dargestellt und erfolgt rückläufig ab dem Translationsstartpunkt c.+1. Der Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} ist fett markiert. Transkriptionsfaktor-Bindestellen der SP1F-Familie sind schwarz, der EGRF-Familie blau und der KLFS-Familie grün markiert.

3.1.1.1 Klonierung von *XYLTI*-Promotorkonstrukten

Der proximale *XYLTI*-Promotorbereich umfasst analog zu der Referenzsequenz (*GenBank accession no.* NG_015843.1) den Sequenzabschnitt c.-1639 bis c.+1. Die Identifizierung dieser Region sowie deren funktionelle Charakterisierung wurde in Vorarbeiten von Müller *et al.* durchgeführt, indem unter anderem die Promotoraktivität verschiedener Promotor-Deletionskonstrukte mit einem Reportergen-Assay quantifiziert wurde (Müller *et al.* 2009). Die Generierung der Konstrukte erfolgte über die Insertion definierter Promotor-Sequenzabschnitte in ein pGL4.10 Vektorsystem. Da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation des A-Fragments des *XYLTI*-Promotorbereichs nicht erfolgreich war, wurden die in den Vektor einzufügenden Fragmente über kombinierte Gensynthese- und PCR-Reaktionen analog der unvollständigen Referenzsequenz synthetisiert (Müller *et al.* 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vervollständigung zweier bestehender pGL4.10 Promotorkonstrukte durchgeführt. Hierzu wurde der Abschnitt *XYLTI*_{238*} (s. 3.1.1) über eine ortsgerichtete Mutagenese sowohl in das die gesamte Promotorregion kodierende Konstrukt c.-1639 bis c.+1_{Δ238*} sowie in das Konstrukt, das laut Müller *et al.* die höchste Aktivität aufweist, c.-1031 bis c.+1_{Δ238*}, eingefügt.

Für die Bestimmung der Promotoraktivität der generierten Vektoren wurde ein Dual-Luciferaseassay durchgeführt. Hierzu wurden definierte Mengen des entsprechenden pGL4.10-Vektors sowie eines pGL4.74-Vektors in die Chondrosarkomazelllinie SW 1353 cotransfiziert. Der Vektor pGL4.10 kodiert ein *Firefly*-Luciferase-Gen, dessen Expression über den inserierten *XYLTI*-Promotorabschnitt reguliert wird. Das Plasmid pGL4.74 kodiert für ein *Renilla*-Luciferase-Gen, dessen Expression einem HSV-TK-Promotor unterliegt. Basierend auf der divergenten Substratspezifität beider Luciferasen kann über die Zugabe von spezifischen Substraten deren Umsatz gezielt induziert werden. Die Bestimmung der *XYLT*-Promotoraktivität erfolgte über die Berechnung der relativen Luciferase-Aktivität, die eine Normalisierung auf die konstante Expression der *Renilla*-Luciferase einbezieht.

Die vergleichende Analyse der Promotor-Aktivitäten zeigte, dass die Einführung des Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} mit einer signifikanten Induktion der relativen Luciferase-Aktivität einherging (s. Abb. 3.5). Die Aktivität des Promotorkonstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} wurde als 100 % definiert. Im direkten Vergleich betrug die Aktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{Δ238} ohne den Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} nur 28,3 % (± 2,2 %). Die Promotor-Aktivität des Konstruktes c.-1639 bis c.+1_{Δ238*} war analog zur initialen Promotorcharakterisierung niedriger als die des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{Δ238*} und betrug

22,6 % ($\pm 0,9$ %). Die Verlängerung der Sequenz c.-1639 bis c.+1 $_{\Delta 238^*}$ um den 238 bp-umfassenden Sequenzabschnitt *XYLTI* $_{238^*}$ war mit einer signifikanten Aktivitätssteigerung auf 81,6 % ($\pm 5,6$ %) verbunden.

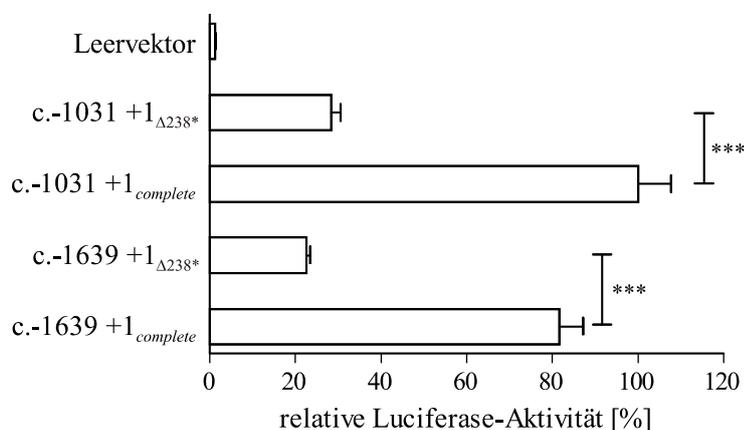


Abbildung 3.5: Relative Luciferase-Aktivität der *XYLTI*-Promotorkonstrukte c.-1031 bis c.+1 $_{\Delta 238^*}$ und c.-1639 bis c.+1 $_{\Delta 238^*}$ bzw. c.-1031 bis c.+1 $_{complete}$ und c.-1639 bis c.+1 $_{complete}$ in SW 1353-Zellen. Die höchste gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1 $_{complete}$ wurde als 100 % definiert. Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (***) = $p < 0,001$).

3.1.1.2 Induktion des *XYLTI*-Promotors durch TGF- β 1

TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) ist der zentrale Schlüsselinduktor der XT-I in der Fibrosierung. Eine Erhöhung der *XYLTI* mRNA Expression nach TGF- β 1 Supplementation wurde erstmals in kardialen Fibroblasten beschrieben (Prante *et al.* 2007). Eine korrespondierende, TGF- β 1-basierte Induktion der Aktivität eines *XYLTI*-Promotorkonstruktes konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde die putative Induzierbarkeit der vervollständigten *XYLTI*-Promotorkonstrukte durch TGF- β 1 (7,5 ng/mL) nach Transfektion in SW 1353-Zellen analysiert.

In Analogie zu der Quantifizierung der basalen Promotoraktivität der in dieser Arbeit generierten Konstrukte (s. 3.1.1.1) wies das Konstrukt c.-1031 bis c.+1 $_{complete}$ die höchste Aktivität auf und wurde als 100 % definiert (s. Abb. 3.6). Die Induktion mit TGF- β 1 führte zu einer nicht signifikanten Aktivitätssteigerung auf 120,2 % ($\pm 16,2$ %), während die Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1 $_{\Delta 238^*}$ durch Zugabe von TGF- β 1 von 28,3 % ($\pm 2,2$ %) auf 16,5 % ($\pm 1,3$ %) reduziert wurde. Die relative Luciferase-Aktivität des

Konstruktes c.-1639 bis c.+1 Δ_{238} * betrug basal 22,6 % (\pm 0,9 %) und wurde durch die TGF- β 1 Behandlung auf 15,2 % (\pm 0,5 %) reduziert. Die Induktion des Volllängen-Konstruktes c.-1639 bis c.+1 $_{complete}$ mit TGF- β 1 führte zu einer erstmalig detektierten, signifikanten Steigerung der Promotoraktivität von 81,6 % (\pm 5,6 %) auf 101,7 % (\pm 3,2 %).

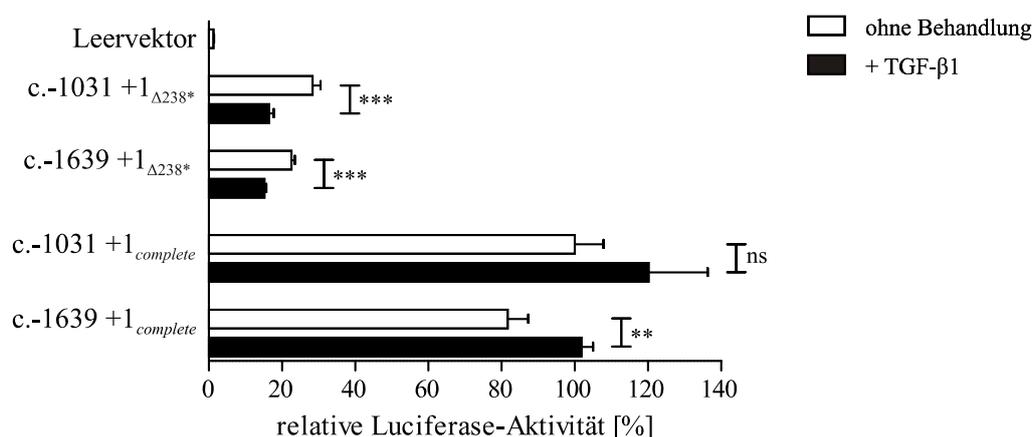


Abbildung 3.6: Relative Luciferase-Aktivität verschiedener *XYLTI*-Promotorkonstrukte in SW 1353-Zellen. Die höchste gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1 $_{complete}$ wurde als 100 % definiert. Weiße Balken demonstrieren die basale, gemessene Promotoraktivität und schwarze Balken zeigen die Promotoraktivität nach Induktion der Zellen mit TGF- β 1 (7,5 ng/mL). Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.1.2 Identifizierung von Einzelnukleotid-Variationen im *XYLTI*-Promotor

Über die Sequenzierung der *XYLTI*-Promotorregion aus der genomischen DNA von zehn Blutspendern konnten die beiden Einzelnukleotid-Variationen (*single nucleotide variant*, SNV) c.-403C>T und c.-1088C>A identifiziert werden. Die ermittelten Allelfrequenzen, die alle dem Hardy-Weinberg-Gesetz entsprechen und in einer Kohorte von 100 Blutspendern determiniert wurden, sind in Tab. 3.2 gezeigt.

Tabelle 3.2: Allelfrequenzen (n = 200) der Einzelnukleotid-Sequenzvariationen (SNV) im *XYLTI*-Promotor. Referenz-SNV Nr. wurden der NCBI Datenbank entnommen (*SNP Variation Viewer*).

SNV	Referenz-SNV Nr. (rs ID)	Allel	Frequenz
c.-403C>T	rs118030014	C	104/200 (0,52)
		T	96/200 (0,48)
c.-1088C>A	rs59423557	C	124/200 (0,62)
		A	76/200 (0,38)

3.1.2.1 Effekte der *XYLTI*- Einzelnukleotid-Variationen auf die Promotoraktivität

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der SNV c.-403C>T und c.-1088C>A auf die *XYLTI*-Promotoraktivität analysiert. Das aktivste Promotorkonstrukt c.-1031 bis c.+1_{complete} (s. 3.1.1.1) wurde hierzu einem definierten Basenaustausch mittels ortsgerichteter Mutagenese unterzogen. Der Basenaustausch sowie die Sequenz des in den Vektor pGL4.10 inserierten Promotorfragments wurden vollständig über eine Sequenzierung verifiziert. Für jede SNV wurden zwei unabhängig voneinander generierte Konstrukte für die Analyse mittels Dual-Luciferaseassay eingesetzt (s. Abb. 3.7).

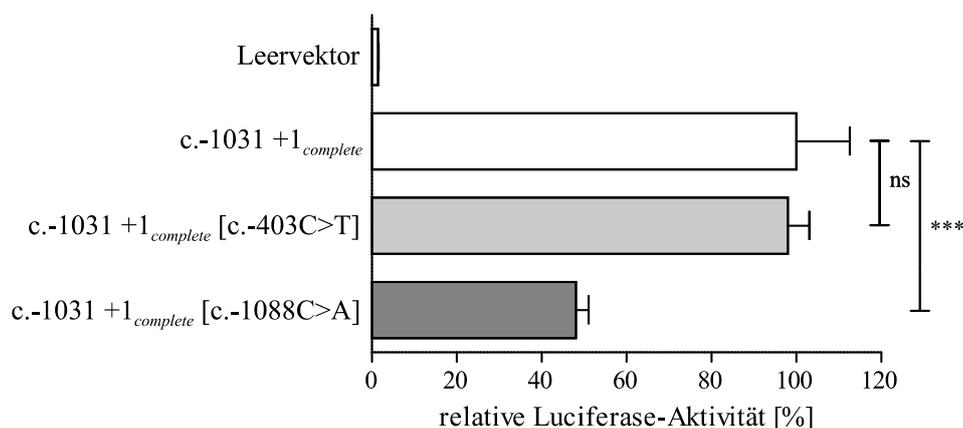


Abbildung 3.7: Änderungen der relativen Luciferase-Aktivität des *XYLTI*-Promotorkonstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} nach ortsgerichteter Mutagenese. Die höchste in SW 1353-Zellen gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} (weißer Balken) wurde als 100 % definiert. Graue Balken demonstrieren die gemessene Promotoraktivität nach Einführung der angegebenen SNV. Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant; *** = p<0,001).

Die Promotoraktivität des unmutierten Konstrukts c.-1031 bis c.+1_{complete} wurde als 100 % definiert. Im Vergleich zeigte sich, dass durch den Basenaustausch C>T an der Position c.-403 keine signifikante Änderung der Aktivität erfolgte. Im Gegensatz dazu führte der Basenaustausch C>A an Position c.-1088 zu einer signifikanten Verminderung der Promotoraktivität auf 48,1 % ($\pm 3,0$ %).

3.1.2.2 Auswirkungen der *XYLTI*-Einzelnukleotid-Variationen auf die XT-Aktivität

Aufgrund der Sekretion der XT-Isoformen in den extrazellulären Raum besteht die Möglichkeit die XT-Aktivität in humanen Körperflüssigkeiten bzw. im Zellkulturüberstand *in vitro* kultivierter Zellen zu quantifizieren. Um beurteilen zu können, ob die detektierten SNV *in vivo* einen regulatorischen Einfluss auf die XT-Aktivität ausüben, wurde diese im Serum der 100 gesunden Blutspendern quantifiziert (s. Abb. 3.8).

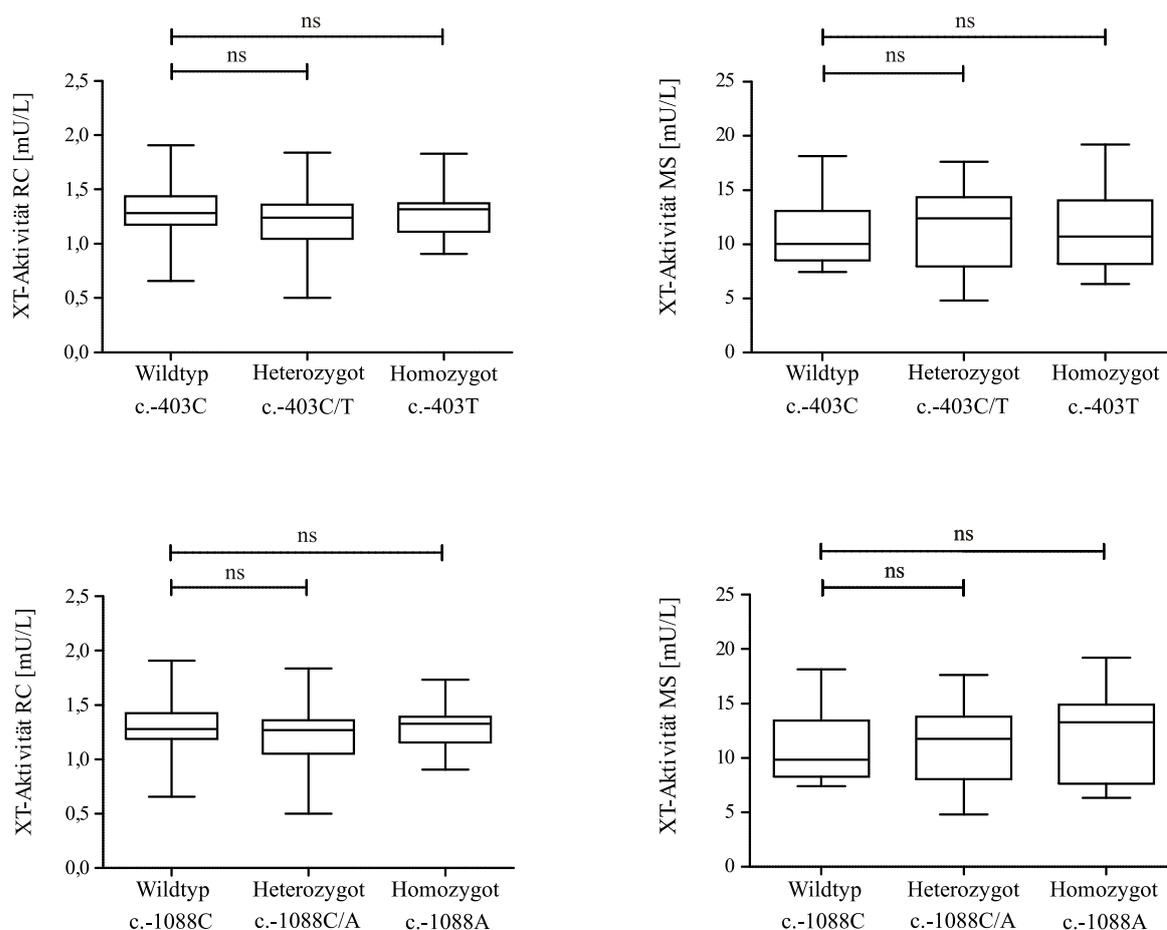


Abbildung 3.8: Assoziation der *XYLTI*-SNV-Genotypen mit der gemittelten Serum-XT-Aktivität einer Kohorte an Blutspendern. Die Serum-XT-Aktivität von 100 Blutspendern wurde sowohl über einen radiochemischen (RC, links) als auch einen massenspektrometrischen (MS, rechts) Test quantifiziert. Gezeigt ist der Median als horizontale Linie im Box-Whisker-Plot (25 bis 75%iges Perzentil; ns = nicht signifikant).

Für jeden SNV-Genotyp wurde der Mittelwert der Serum-XT-Aktivität der korrespondierenden Kohorte an Blutspendern bestimmt. Es wurden jeweils zwei verschiedene Assays zur Bestimmung der XT-Aktivität verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifitäten der XT-Isoformen kann über die Substratwahl der Substratumsatz durch eine Isoform begünstigt werden, sodass trotz Bestimmung der Gesamtaktivität eine tendenzielle Differenzierung vorgenommen werden kann. Der radiochemische Assay (RC) erfasst vorwiegend die XT-I-Aktivität, während der massenspektrometrische Assay vornehmlich die XT-II-Aktivität widerspiegelt (Brinkmann *et al.* 1997; Casanova *et al.* 2008). Für keinen der SNV-Genotypen konnte eine signifikante Assoziation mit der Serum-XT-Aktivität nachgewiesen werden.

3.1.2.3 Haplotypen-Analyse

Unter Verwendung der Haploview-Software wurde die genetische Kopplung (LD: *linkage disequilibrium*) der SNV c.-403C>T und c.-1088C>A untersucht. Die Bildung der Haplotypen-Blöcke wurde gemäß den Kriterien der Einstellung „*solid spine of LD*“ durchgeführt. Diese basiert auf der Voraussetzung, dass der D' -Wert für die äußeren Marker jeden Blockes $> 0,8$ ist. Die Haplotypen-Analyse ergab eine moderate Kopplung beider SNV, die durch Werte von $D' = 0,85$ und $r^2 = 0,49$ gekennzeichnet ist (s. Abb. 3.9). Eine Auflistung der kalkulierten Haplotypen ist in Tab. 3.3 dargestellt.

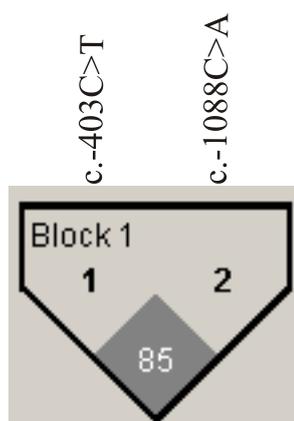


Abbildung 3.9: *Linkage disequilibrium*-Struktur des XYLT1-Promotors. Die Farbabstufung weiß nach schwarz entspricht der zunehmenden Korrelationsstärke zwischen zwei SNV (weiß: $r^2 = 0$; schwarz: $r^2 = 1$).

Tabelle 3.3: Auflistung der *XYLTI*-Promotor-Haplotypen sowie deren Allelfrequenz.

Haplotyp	c.-403	c.-1088	Allelfrequenz (n = 200)
1	C	C	98 (0,492)
2	T	A	70 (0,352)
3	T	C	26 (0,128)
4	C	A	6 (0,028)

3.1.2.4 Auswirkungen der *XYLTI*-Einzelnukleotid-Variationen auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLTI*-Promotor

Um zu analysieren, ob die im *XYLTI*-Promotor identifizierten SNV Einfluss auf das Profil der kodierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen nehmen, wurde eine *in silico* Analyse mit Hilfe der *Software* Genomatix durchgeführt. Der Fokus wurde auf Transkriptionsfaktor-Familien gelegt, deren Funktion in der XT-Regulation bereits beschrieben wurde oder deren Aktivität in der Signalkaskade von TGF- β 1 eine Rolle spielt (Chen *et al.* 2006; Holian *et al.* 2008; Müller *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013).

Im Zusammenhang mit den in Abschnitt 3.1.2 identifizierten SNV im *XYLTI*-Promotorbereich konnte der Nachweis einer zusätzlichen Bindestelle für den Transkriptionsfaktor SMAD-3 der V\$SMAD-Familie mit dem Basenaustausch c.-1088C>A in Verbindung gebracht werden (s. Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Auswirkung der Einzelnukeotid-Variante c.-1088C>A auf das Profil der Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLTI*-Promotorbereich. Das variable Basenpaar wurde rot markiert und die Bindungsposition des Transkriptionsfaktors ist über die Unterstreichung der korrespondierenden Sequenz gekennzeichnet.

SNV	Strang	Wildtyp	Variation	Transkriptionsfaktor (Familie)
c.-1088C>A	-	AAAGGCTGGC	AAAGTCTGGC	SMAD-3 (V\$SMAD)

3.1.3 Identifizierung eines Mikrosatelliten im *XYLTI*-Promotor

Über die Sequenzierung des A-Fragments (c.-610 bis c.+122) konnte erstmalig ein Mikrosatellit in der *XYLTI*-Promotorregion identifiziert werden. Diese hochvariable Region

befindet sich an Position c.-148 bis c.-201 der genomischen DNA innerhalb des in dieser Arbeit erstmals beschriebenen Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} im *XYLTI*-Promotor.

Die Sequenzanalyse in einer Kohorte von 100 Blutspendern ergab, dass sechs verschiedene homozygote Mikrosatellit-Varianten vorlagen. Diese unterscheiden sich durch eine unterschiedliche Anzahl an *tandem repeats* (GGX)_n. Die Position der Base (X) wird zumeist durch Cytosin, teilweise jedoch auch durch Adenin besetzt (s. Abb. 3.10).

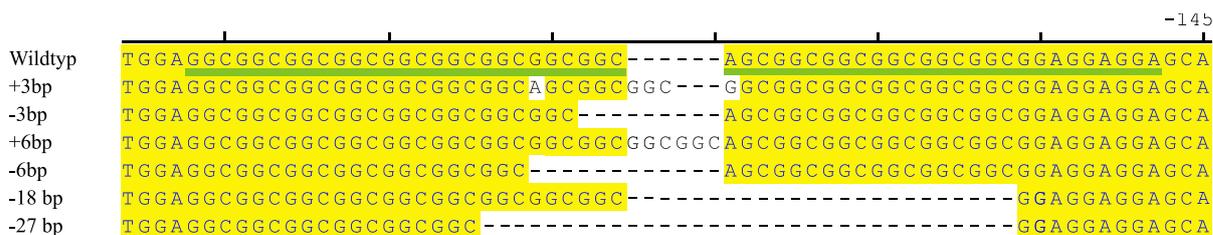


Abbildung 3.10: Darstellung der detektierten Varianten des im *XYLTI*-Promotor kodierten Mikrosatelliten. Die Position des Mikrosatelliten in der Wildtypsequenz (c.-148 bis c.-201) ist grün hervorgehoben. Die Basennummerierung der Wildtyp-Variante beruht auf der Definition des ersten Nukleotids des Startcodons ATG als c.+1. Zwischen den Varianten übereinstimmende Basenpaare sind gelb dargestellt, voneinander abweichende Basenpaare sind weiß hinterlegt.

Bei 45 der 100 Blutspender wurde eine homozygote Sequenz des Mikrosatelliten detektiert. Die Variante mit der höchsten Allelfrequenz wurde als Wildtyp definiert. Die Allelfrequenzen der Varianten sind in Tab. 3.5 gelistet. Die Sequenz der genomischen DNA der verbleibenden 55, für den Mikrosatellit heterozygoten, Blutspender konnte weder über Sanger- noch Pyro-Sequenzierung zuverlässig ausgewertet werden.

Tabelle 3.5: Allelfrequenzen (n = 200) der sequenzierten, homozygoten Mikrosatellit-Variationen im *XYLTI*-Promotor.

Mikrosatellit-Variante	Frequenz
Wildtyp	54/200 (0,27)
+ 3 bp	10/200 (0,05)
- 3 bp	4/200 (0,02)
+ 6 bp	2/200 (0,01)
- 6 bp	18/200 (0,09)
- 18 bp	2/200 (0,01)

3.1.3.1 Einfluss der Mikrosatellit-Variationen auf die Promotoraktivität

In einem weiteren Experiment sollte der potenzielle Einfluss der Mikrosatellit-Variationen auf die *XYLTI*-Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} untersucht werden. Die Generierung der Promotorkonstrukte erfolgte wie zuvor beschrieben über eine ortsgerichtete Mutagenese (s. 3.1.1.1).

Mittels Dual-Luciferaseassay wurde ein Vergleich der Promotoraktivität des den Wildtyp-Mikrosatellit kodierenden Konstruktes und der Aktivität von Konstrukten, die eine Variante des Mikrosatelliten kodierten, gezogen (s. Abb. 3.11). Lediglich das um 3 bp verkürzte Konstrukt wies eine signifikante Erhöhung der Promotoraktivität auf 133,7 % ($\pm 15,3$ %) auf. Die restlichen Konstrukte wiesen keine signifikanten Abweichungen von der Luciferase-Aktivität des Wildtyp-Konstruktes auf.

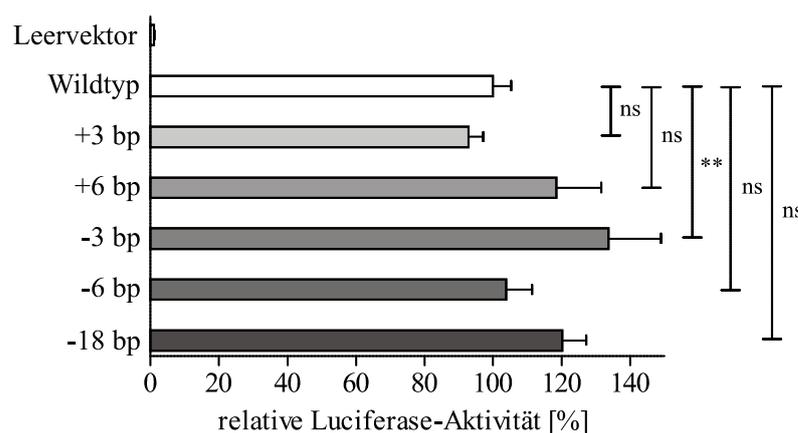


Abbildung 3.11: Änderungen der relativen Luciferase-Aktivität der *XYLTI*-Promotoraktivität durch Mikrosatellit-Variationen. Die höchste im Lysat von SW 1353-Zellen gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} (Wildtyp, weißer Balken) wurde als 100 % definiert. Graue Balken demonstrieren die gemessene Promotoraktivität des Konstruktes nach Einführung der angegebenen Variation. Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$).

Ergänzend zu der Quantifizierung der basalen Promotoraktivität in Abhängigkeit der Mikrosatellit-Variationen, wurde auch der induzierende Effekt von TGF- β 1 (7,5 ng/mL) in SW 1353-Zellen analysiert. Die relative Luciferase-Aktivität aller untersuchten Konstrukte stieg nach Supplementation des Zellkulturmedium mit TGF- β 1 an (s. Abb. 3.12). Die erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch keinen klaren Trend bezüglich der Aktivitätsänderung in Korrelation zur Konstruktlänge.

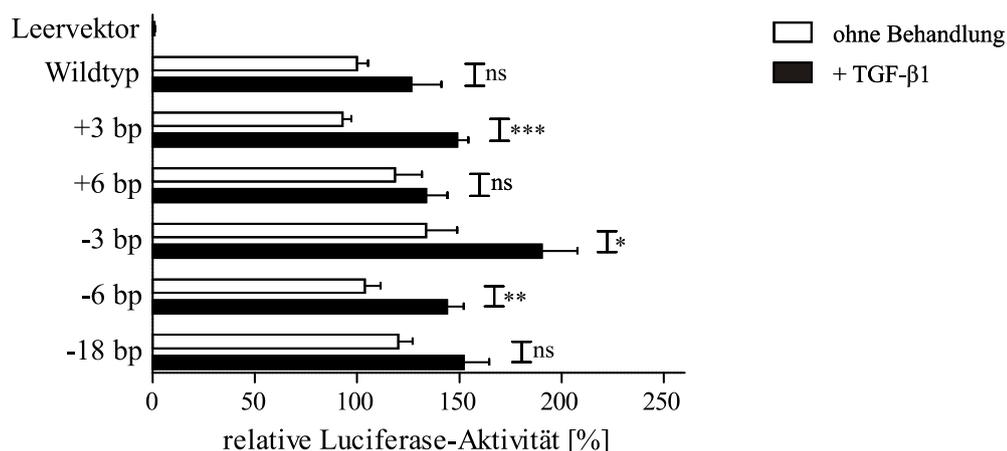


Abbildung 3.12: Änderungen der relativen Luciferase-Aktivität von *XYLT1*-Promotorkonstrukten durch Mikrosatellit-Variationen und die Induktion mit TGF-β1 (7,5 ng/mL). Die höchste gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-1031 bis c.+1_{complete} (Wildtyp, weißer Balken) wurde als 100 % definiert. Schwarze Balken demonstrieren die gemessene Promotoraktivität nach Induktion mit TGF-β1. Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.1.3.2 Auswirkungen der Mikrosatellit-Variationen auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT1*-Promotor

Die *in silico* Analyse zur Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der Mikrosatelliten-Region zeigte, dass eine Zunahme der Anzahl der *tandem repeats* (GGX)_n an die Entstehung weiterer EGR1-Bindestellen geknüpft ist (s. 3.1.1, Abb. 3.4).

3.1.4 Identifizierung von Einzelnukleotid-Variationen im *XYLT2*-Promotor

Um Sequenzvariationen im *XYLT2*-Promotor (vollständige Sequenz s. 10.2) zu identifizieren, wurde dieser in Form von überlappenden Fragmenten von etwa 500 bp aus der genomischen DNA von zehn Blutspendern amplifiziert und sequenziert.

In der 5′untranslatierten Promotorregion der *XYLT2*-Referenzsequenz (*GenBank accession no.* NG_012175.1) wurden fünf SNV identifiziert, deren Allelfrequenz mittels Sequenzierung und RFLP-Analyse in einer Kohorte von 100 Blutspendern bestimmt wurde (s. Tab. 3.6). Alle Allelfrequenzen fallen in das Hardy-Weinberg-Gesetz.

Tabelle 3.6: Auflistung der Allelfrequenzen der detektierten SNV im *XYLT2*-Promotorbereich. Referenz-SNV Nr. wurden der NCBI Datenbank (*SNP Variation Viewer*) entnommen.

Sequenzvariation	Referenz-SNV Nr. (rs ID)	Allel	Frequenz
c.-80delG	-	G	141/200 (0,705)
		-	59/200 (0,295)
c.-84G>C	rs9912067	G	164/200 (0,820)
		C	36/200 (0,180)
c.-188G>A	rs115632911	G	143/200 (0,820)
		A	57/200 (0,285)
c.-664T>G	rs2526542	T	92/200 (0,460)
		G	108/200 (0,540)
c.-1044G>A	rs76924269	G	179/200 (0,895)
		A	21/200 (0,105)

3.1.4.1 Effekte der *XYLT2*-Einzelnukleotid-Variationen auf die Promotoraktivität

Analog zu der Charakterisierung der Sequenzvariationen im *XYLT1*-Promotor wurden auch die Auswirkungen der fünf detektierten SNV im *XYLT2*-Promotorbereich auf die Promotoraktivität untersucht. Für die Transfektion von XT-II exprimierenden Leberhepatoblastom-Zellen (HepG2) wurde ein von Müller *et al.* konstruierter pGL4.10 Vektor modifiziert, dessen kodiertes *Firefly*-Luciferase-Gen unter der Regulation eines bereits inserierten *XYLT2*-Promotorfragments c.-263 bis c.+2 bzw. c.-2568 bis c.+2 steht. Beide Vektoren wurden für die initiale Funktionsanalyse des Promotors generiert. Das Promotorfragment c.-2568 bis c.+2 kodiert den gesamten Promotorbereich, während das kurze Fragment c.-263 bis c.+2 das aktivste Promotorkonstrukt darstellt (Müller *et al.* 2013).

Da das aktivste Promotorkonstrukt nur 263 bp umfasst, konnten lediglich die Änderungen in der Promotor-Aktivität analysiert werden, die durch das Einbringen der SNV c.-80delG, c.-84G>C und c.-188G>A in das Konstrukt verursacht wurden. Für alle drei SNV wurde im Vergleich zu dem unmutierten Konstrukt c.-263 bis c.+2, dessen Aktivität als 100 % definiert wurde, eine nicht-signifikante Absenkung der Promotor-Aktivität im Dual-Luciferaseassay verzeichnet (s. Abb. 3.13). Ergänzend erfolgte jeweils eine selektive Insertion der fünf SNV in das Konstrukt c.-2568 bis c.+2.

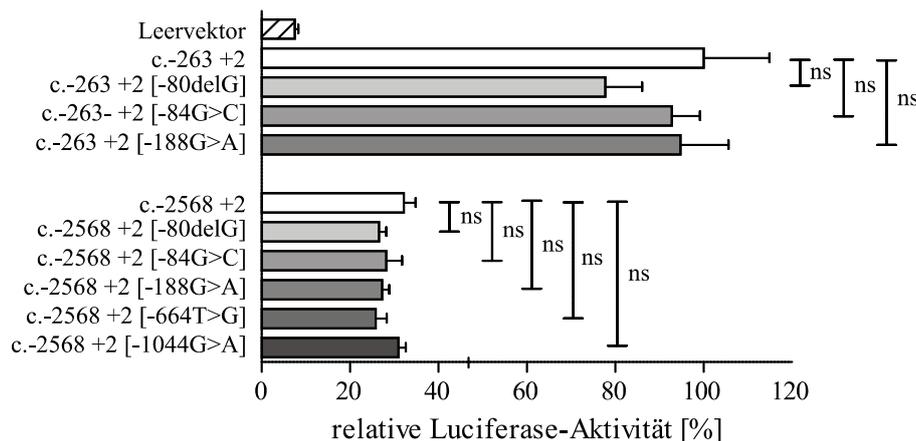


Abbildung 3.13: Änderungen der relativen Luciferase-Aktivität verschiedener *XYLT2*-Promotorkonstrukte nach ortsgerechter Mutagenese. Die höchste in HepG2-Lysaten gemessene, basale Promotoraktivität des Konstruktes c.-263 bis c.+2 (weißer Balken) wurde als 100 % definiert. Ebenfalls weiß dargestellt ist die Aktivität des unmutierten *XYLT2*-Volllängenkonstruktes c.-2568 bis c.+2. Graue Balken demonstrieren die gemessene Promotoraktivität nach Einführung der angegebenen SNV. Als Kontrolle ist die Aktivität des Leervektors pGL4.10 angeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische Replikate aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten (ns = nicht signifikant).

Wie in Vorarbeiten von Müller *et al.* beschrieben, konnte für das unmutierte Volllängenkonstrukt eine signifikante Aktivitätsverminderung auf 32,1 % ($\pm 2,7$ %) verzeichnet werden (Müller *et al.* 2013). Die gezielte Einführung von SNV in dieses Konstrukt ging mit einer leichten, jedoch nicht signifikanten, Verminderung der Promotoraktivität einher.

3.1.4.2 Auswirkungen der *XYLT2*-Einzelnukleotid-Variationen auf die XT-Aktivität

Mögliche Auswirkungen der im *XYLT2*-Promotor kodierten SNV auf die Serum-XT-Aktivität gesunder Blutspender wurden analysiert, indem eine Assoziation des SNV-Genotypen mit der in der entsprechenden Kohorte gemessenen, mittleren XT-Aktivität vorgenommen wurde. Die Bestimmung der Serum-XT-Aktivität wurde sowohl radiochemisch als auch massenspektrometrisch durchgeführt (s. Abb. 3.14). Das Auftreten keiner der fünf SNV war mit einer signifikanten Änderung der Serum-XT-Aktivität assoziiert. Eine statistische Bewertung war bezüglich des homozygoten Austauschs c.-1044G>A aufgrund einer zu geringen Stichprobenzahl nicht möglich.

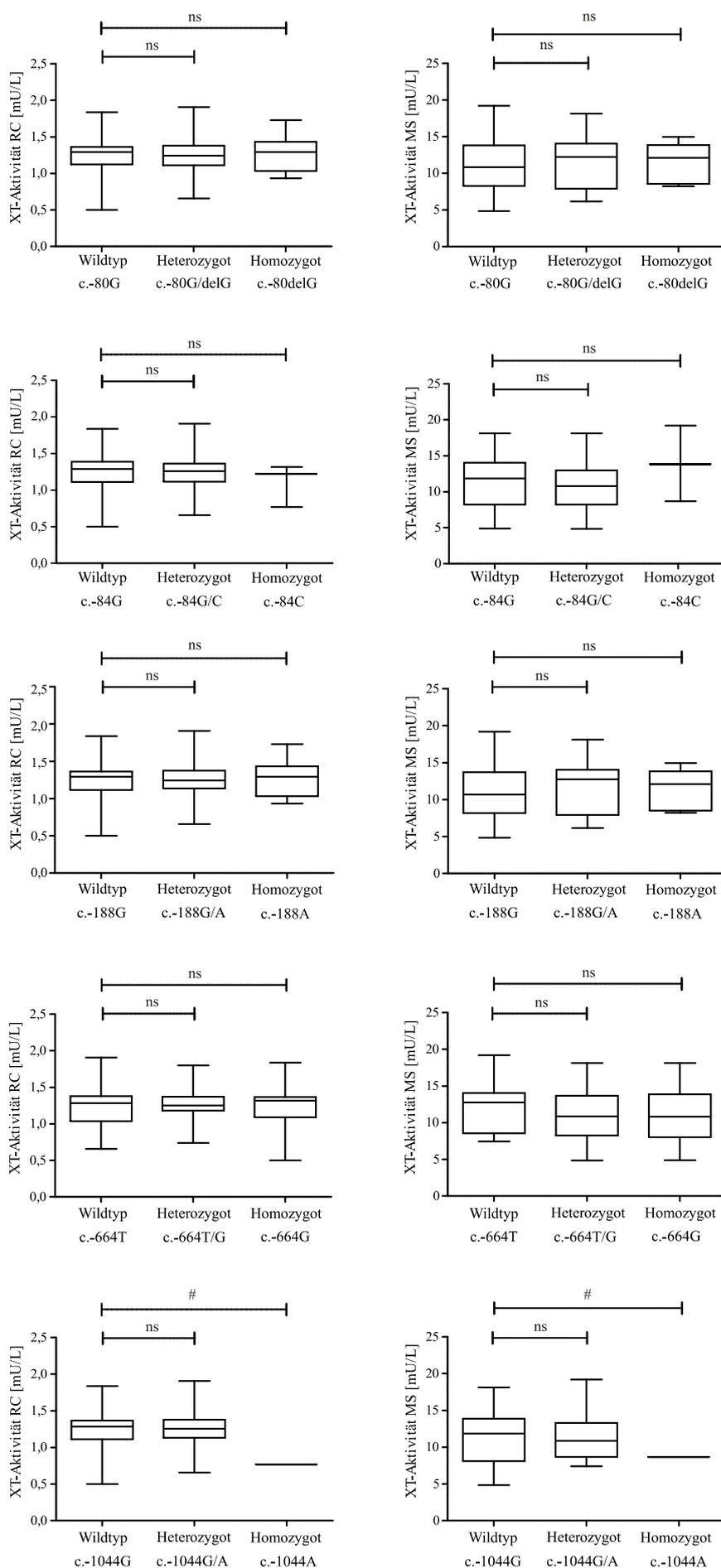


Abbildung 3.14: Assoziation der *XYL2*-SNV-Genotypen mit der gemittelten Serum-XT-Aktivität in einer Blutspender-Kohorte. Die Serum-XT-Aktivität von 100 Blutspendern wurde sowohl über einen radiochemischen (RC, links) als auch einen massenspektrometrischen (MS, rechts) Test quantifiziert. Gezeigt ist der Median als horizontale Linie im Box-Whisker-Plot (25 bis 75%iges Perzentil; ns = nicht signifikant; # = keine Statistik möglich).

3.1.4.3 Haplotypen-Analyse

Die LD-Struktur des *XYLT2*-Gens wurde entsprechend zu der *XYLT1*-Analyse mit Hilfe der Haploview *Software* ermittelt (s. 3.1.2.3). Alle fünf SNV fallen in einen LD-Block (s. Abb. 3.15). Die stärkste genetische Kopplung ($r^2 = 1$) wurde für die SNV c.-80delG und c.-84G>C ermittelt. Ermittelte Haplotypen sind in Tab. 3.7 aufgelistet.

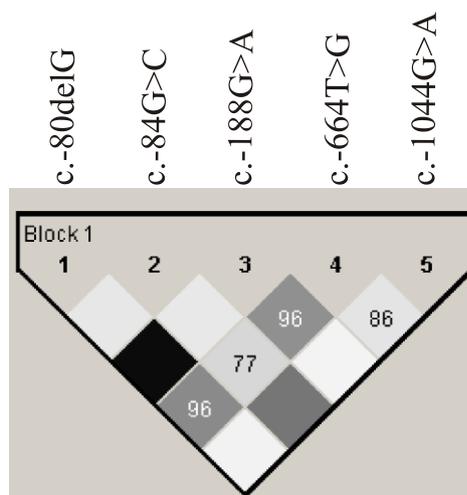


Abbildung 3.15: LD-Struktur des *XYLT2*-Promotors. Die Farbabstufung weiß nach schwarz entspricht der zunehmenden Korrelationsstärke zwischen zwei SNV (weiß: $r^2 = 0$; schwarz: $r^2 = 1$).

Tabelle 3.7: Auflistung der *XYLT2*-Promotor-Haplotypen sowie deren Allelfrequenz.

Haplotyp	c.-80	c.-84	c.-188	c.-664	c.-1044	Allelfrequenz (n = 200)
A	G	G	G	G	G	102 (0,509)
B	A	G	A	T	G	56 (0,279)
C	G	C	G	T	A	18 (0,091)
D	G	C	G	T	G	12 (0,060)
E	G	G	G	T	G	4 (0,021)
F	G	C	G	G	G	3 (0,015)
G	G	C	G	G	A	2 (0,009)
H	A	G	A	G	G	1 (0,006)
I	A	G	G	T	G	1 (0,005)
J	A	C	G	T	A	1 (0,005)

3.1.4.4 Auswirkungen der *XYLT2*-Einzelnukleotid-Variationen auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT2*-Promotor

Die *in silico* Analyse zur Identifizierung von Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT2*-Promotorbereich erfolgte nach den in 3.1.1 beschriebenen Kriterien. Für die beiden SNV c.-80delG und c.-84G>C konnten drei bzw. vier Änderungen des Transkriptionsfaktor-Bindestellen-Profiles ermittelt werden (s. Tab. 3.8).

In Abhängigkeit der Basendeletion c.-80delG entfallen drei Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der EGRF- und der KLFS-Familie. Der Basenaustausch G>C an der Position c.-84 ist hingegen sowohl durch den Wegfall dreier Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der EGRF-, der KLFS und der SP1-Familie, als auch durch die Bildung einer Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor der EGRF-Familie gekennzeichnet.

Tabelle 3.8: Auswirkung der Einzelnukleotid-Variationen c.-80delG und c.-84G>C auf das Profil der Transkriptionsfaktor-Bindestellen im *XYLT2*-Promotorbereich. Das variable Basenpaar wurde rot markiert und die Bindungsposition des Transkriptionsfaktors ist über die Unterstreichung der korrespondierenden Sequenz gekennzeichnet.

SNV	Strang	Wildtyp	Variation	Transkriptionsfaktor (Familie)
c.-80delG	+	AGGGGGG <u>G</u> CG	AGGGGGGCG	<i>Wilms tumor suppressor</i> (V\$EGRF)
	+	AGGGGGG <u>G</u> CG	AGGGGGGCG	<i>Early growth response-1</i> (V\$EGRF)
	+	GGGGGGG <u>G</u> CGG	GGGGGGCGG	<i>Krueppel-like factor-15</i> (V\$KLFS)
c.-84G>C	+	AGG <u>G</u> GGGGCG	AGGG <u>C</u> GGGCG	<i>Wilms tumor suppressor</i> (V\$EGRF)
	+	GAGGG <u>G</u> GGGC	GAGGG <u>C</u> GGGC	<i>Krueppel-like factor-15</i> (V\$KLFS)
	+	GGG <u>G</u> GGGCGG	GGG <u>C</u> GGGCGG	<i>SP4</i> (V\$SP1F)
	+	AGGAGG <u>G</u> GGG	AGGAGG <u>C</u> GGG	<i>Early growth response-1</i> (V\$EGRF)

3.2 Analyse der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren

Fibrotische Erkrankungen resultieren aus einem persistierenden Wundheilungsprozess und sind auf eine Dysbalance der beteiligten Signalkaskaden zurückzuführen. Basierend auf dem bis heute vorliegenden Mangel einer therapeutischen Option für Fibrosen, ist die Aufklärung der zu Grunde liegenden, molekularen Pathomechanismen unabdingbar. Das Cytokin TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) wurde als Schlüsselmediator der Fibrosierung identifiziert, ist jedoch aufgrund der mannigfaltigen, zellulären Funktion der TGF- β 1-Signalkaskade als therapeutischer Angriffspunkt ungeeignet.

Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren. In Vorarbeiten konnte bereits eine Assoziation zwischen einer erhöhten XT-I Expression sowie Aktivität und dem Vorliegen einer hepatischen oder kardialen Fibrose hergestellt werden (Prante *et al.* 2007; Kuhn *et al.* 2009). Das Isoenzym XT-I fungiert folglich nicht nur als funktionaler *downstream*-Mediator von TGF- β 1, sondern stellt auch einen potenziell relevanten therapeutischen Angriffspunkt dar. Um zu evaluieren, welche Rolle die XT in dem komplexen Netzwerk fibrotischer Signalprozesse einnimmt, sollte untersucht werden, durch welche weiteren profibrotischen Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder miRNAs die XT reguliert werden.

3.2.1 Evaluierung der XT als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig analysiert, ob die XT nicht nur mit persistenten Fibrosen assoziiert werden können, sondern auch an der Differenzierung des Myofibroblasten beteiligt sind. Hierzu wurde zunächst ein Zellkulturmodell für die Kultivierung von Myofibroblasten entwickelt. Deren Differenzierung aus Fibroblasten wurde experimentell begünstigt, indem die Kultivierungsparameter entsprechend einer Nachahmung der natürlichen Myofibroblasten-Umgebung angepasst wurden. Die Zellkultivierung erfolgte in einer dem Wundheilungsprozess analogen, niedrigen Zelldichte (40 Zellen/mm²) auf unbeschichteten Zellkulturschalen, die eine fibrotische Gewebeversteifung simulieren.

Unter Anwendung des etablierten Zellkulturmodells erfolgte die Überprüfung der Eignung der XT-I Expression und Aktivität als Marker der humanen, dermalen Myofibroblasten-Differenzierung (Faust *et al.* 2013). Im direkten Vergleich wurden dermale Fibroblasten in einem konfluenten Monolayer sowie subkonfluent nach den Kriterien des etablierten Modells zur optimalen Kultivierung von Myofibroblasten ausgesät. 24 h nach dem Aussäen wurden

die Zellen für einen Tag einem Serumentzug von 10 auf 0,1 % FCS unterzogen. Dieser birgt den Vorteil, dass die Konzentration der im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren reduziert wird. Somit befinden sich die Zellen zu Beginn des Experimentes nicht bereits in einem induzierten Zustand, der die Auswirkungen eines supplementierten profibrotischen Mediators möglicherweise überdecken könnte. Nach der Behandlung der Fibroblasten mit TGF- β 1 (5 ng/mL) wurde sowohl eine Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real-time* PCR als auch die radiochemische Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand und der Nachweis der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression mittels Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt.

3.2.1.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils

Um zu prüfen, ob sich die *XYLT* mRNA Expression als Marker für die Myofibroblasten-Differenzierung eignet, wurde diese im Vergleich mit einem anerkannten Parameter, der Transkriptrate des α -Glattmuskelaktins (*ACTA2*), analysiert (Hinz *et al.* 2001). Hierbei wurde eine höhere *ACTA2* mRNA Basalexpression in den subkonfluenten Fibroblasten detektiert (s. Abb. 3.16). Die Behandlung mit TGF- β 1 führte sowohl bei den in niedriger als auch hoher Zelldichte ausgesäten dermalen Fibroblasten zu einer gesteigerten Myofibroblasten-Differenzierung. Das Ausmaß der Induktion war mit einer 6,5-fachen ($\pm 0,7$) Erhöhung der *ACTA2* mRNA Expression in den subkonfluenten Zellen marginal geringer als der verzeichnete Effekt einer 7,2-fachen ($\pm 1,4$) Induktion in den konfluenten Zellen, wobei in den subkonfluenten Zellen eine höhere relative Gesamt-Transkriptmenge erreicht wurde. Die Verifizierung der Effektvermittlung über TGF- β 1 wurde über eine konzentrationsabhängige Expressionsverminderung der *ACTA2* mRNA Expression durch die Zugabe des ALK5-Antagonisten SB431542 (0,5 bzw. 50 μ M), der die TGF- β 1-Signalkaskade inhibiert, erbracht.

Die Analyse der *XYLT1* Genexpressionsrate zeigte einen zu der *ACTA2* mRNA Expressionsrate korrelierenden Trend einer signifikanten Expressionssteigerung durch TGF- β 1 sowie ein Abmilderung des Effekts durch Zugabe des ALK5-Inhibitors auf. Konträre Ergebnisse traten jedoch hinsichtlich des Grades der Induzierbarkeit sowie bezüglich der Basalexpression auf. Für die subkonfluent kultivierten Zellen konnte eine 7,3-fache ($\pm 1,1$) Zunahme der *XYLT1* mRNA Expression vermerkt werden, während bei den konfluenten Zellen nur eine um das 1,9-Fache ($\pm 0,2$) gesteigerte Genexpression vorlag. Die *XYLT1* Basalexpression war in den subkonfluenten Zellen geringer als im konfluenten Monolayer. Die relative *XYLT2* mRNA Expression wurde weder durch die TGF- β 1 Supplementation noch

durch die Behandlung der Zellen mit dem ALK5-Inhibitor stark reguliert. In beiden Fällen konnte eine leichte Zunahme des Genexpressionslevels verzeichnet werden.

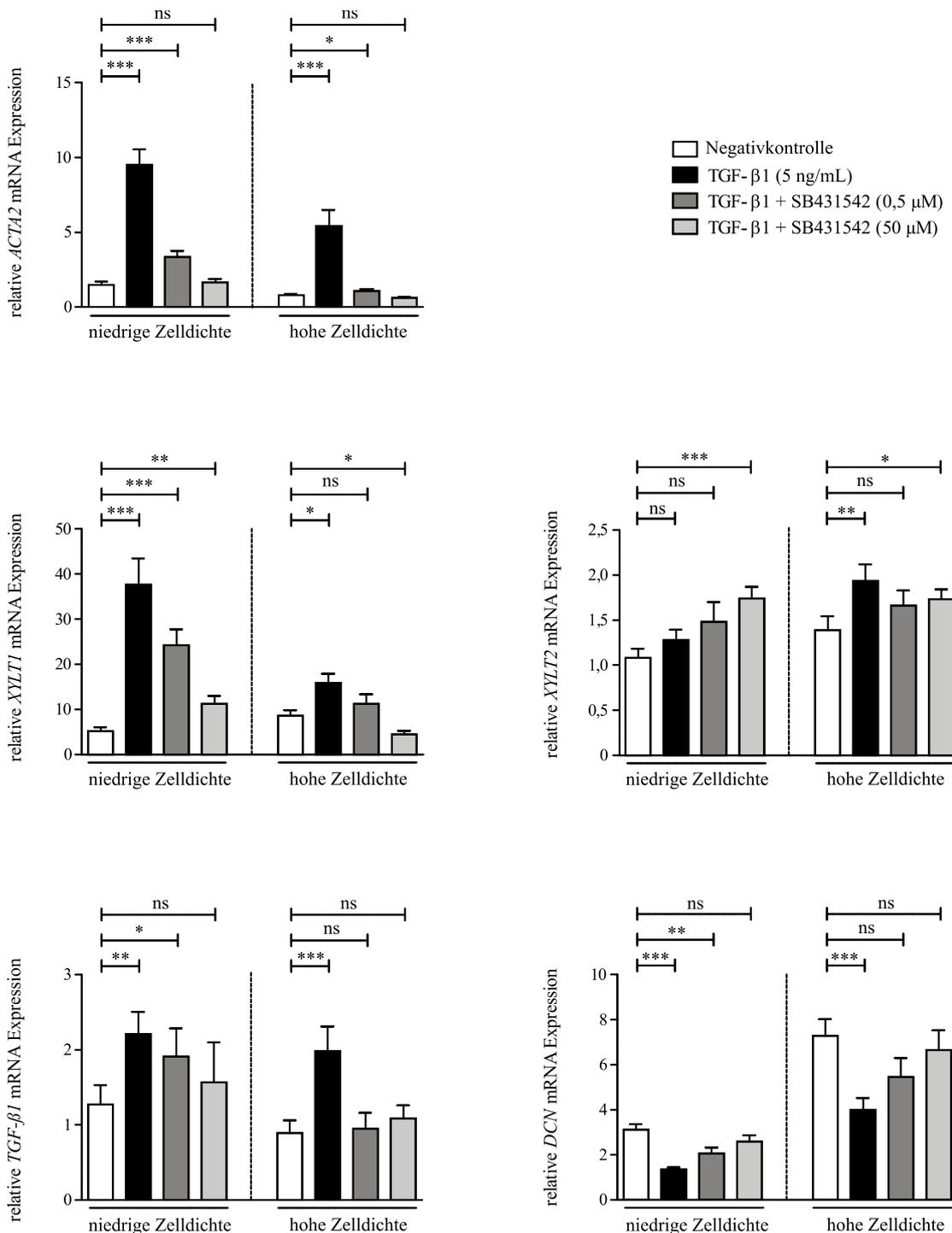


Abbildung 3.16: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil humaner dermaler Fibroblasten nach Behandlung mit TGF-β1 (5 ng/mL) und dem ALK5-Inhibitor SB431542 (0,5 bzw. 50 μM). Die dermalen Fibroblasten (n = 4) wurden in einer Zelldichte von 40 (niedrig) bzw. 500 (hoch) Zellen/mm² ausgesät und am nächsten Tag einem Serumentzug unterzogen. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit einem Vehikel (PBS, weiß), TGF-β1 (schwarz) oder einer Kombination aus TGF-β1 und dem ALK5-Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen (grau). Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

Des Weiteren wurden die Transkriptraten von *TGF-β1* und dem Proteoglykan Decorin (*DCN*), einem TGF-β1-Inhibitor, relativ quantifiziert. Die durch das Einwirken des TGF-β1-Proteins verursachte positive Rückkopplung führte in den subkonfluenten Zellen zu einer Induktion der *TGF-β1* Genexpression (1,7-fach ($\pm 0,7$)). In den konfluenten Zellen wurde eine Expressionsinduktion der gleichen Größenordnung festgestellt (2,2-fach ($\pm 0,4$)). Die relative *TGF-β1* Basalexpression war hingegen in den Zellen niedriger Zelldichte höher als in den Zellen hoher Zelldichte und deutet auf einen stärkeren basalen Differenzierungsgrad der Myofibroblasten hin. In Ergänzung war auch die Basalexpression des Proteoglykans Decorin in subkonfluenten Zellen erniedrigt. Durch Behandlung mit TGF-β1 konnte eine Suppression der *DCN* mRNA Expression verzeichnet werden, die in den subkonfluenten Zellen ein stärkeres Ausmaß (0,4-fach ($\pm 0,1$)) annahm als in den konfluenten Fibroblasten (0,5-fach ($\pm 0,1$)).

3.2.1.2 Analyse der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression und XT-Aktivität

Weiterführend wurde überprüft, ob sich die detektierten Änderungen der *XYLT* und *ACTA2* mRNA Expression auch auf die jeweilige Proteinexpression auswirkten. Bedingt durch die translationale Attenuation wurden die Proteinexpressionsanalysen zu einem späteren Zeitpunkt (120 h) durchgeführt als die Genexpressionsanalyse (s. Abb. 3.17 und 3.18).



Abbildung 3.17: Analyse der Auswirkung einer Behandlung mit TGF-β1 auf die α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression humaner dermalen Fibroblasten. 120 h nach einer Inkubation der Zellen mit TGF-β1 (5 ng/mL) oder einer Kombination aus TGF-β1 und dem ALK5-Inhibitor SB431542 (0,5 bzw. 50 μ M) wurden die Zellen fixiert und das Protein ACTA2 über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Exemplarisch gezeigt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen einer subkonfluent (40 Zellen/mm²) bzw. konfluent (500 Zellen/mm²) ausgesäten Zelllinie. Die Maßstabskala (unten rechts) entspricht 100 μ m.

Die α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression wurde 120 h nach der Inkubation der Fibroblasten mit einem Vehikel (Negativkontrolle), TGF- β 1 oder TGF- β 1 und dem Inhibitor SB431542 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Eine frühere Detektion war aufgrund zu schwacher Signale nicht möglich. Kongruent zu den Änderungen der *ACTA2* Transkriptrate (s. 3.2.1.1) erfolgte eine Induktion der *ACTA2*-Proteinexpression durch TGF- β 1 Behandlung sowie eine Expressionssuppression durch Supplementation des ALK5-Inhibitors. Die beschriebenen Effekte waren in den subkonfluenten Zellen stärker ausgeprägt als in den konfluenten Zellen.

Die Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand war im Gegensatz zur Quantifizierung der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression bereits 48 h nach der Induktion mit TGF- β 1 möglich. Die Aktivitätsänderungen wurden nach 48, 72 und 120 h ermittelt (s. Abb. 3.18).

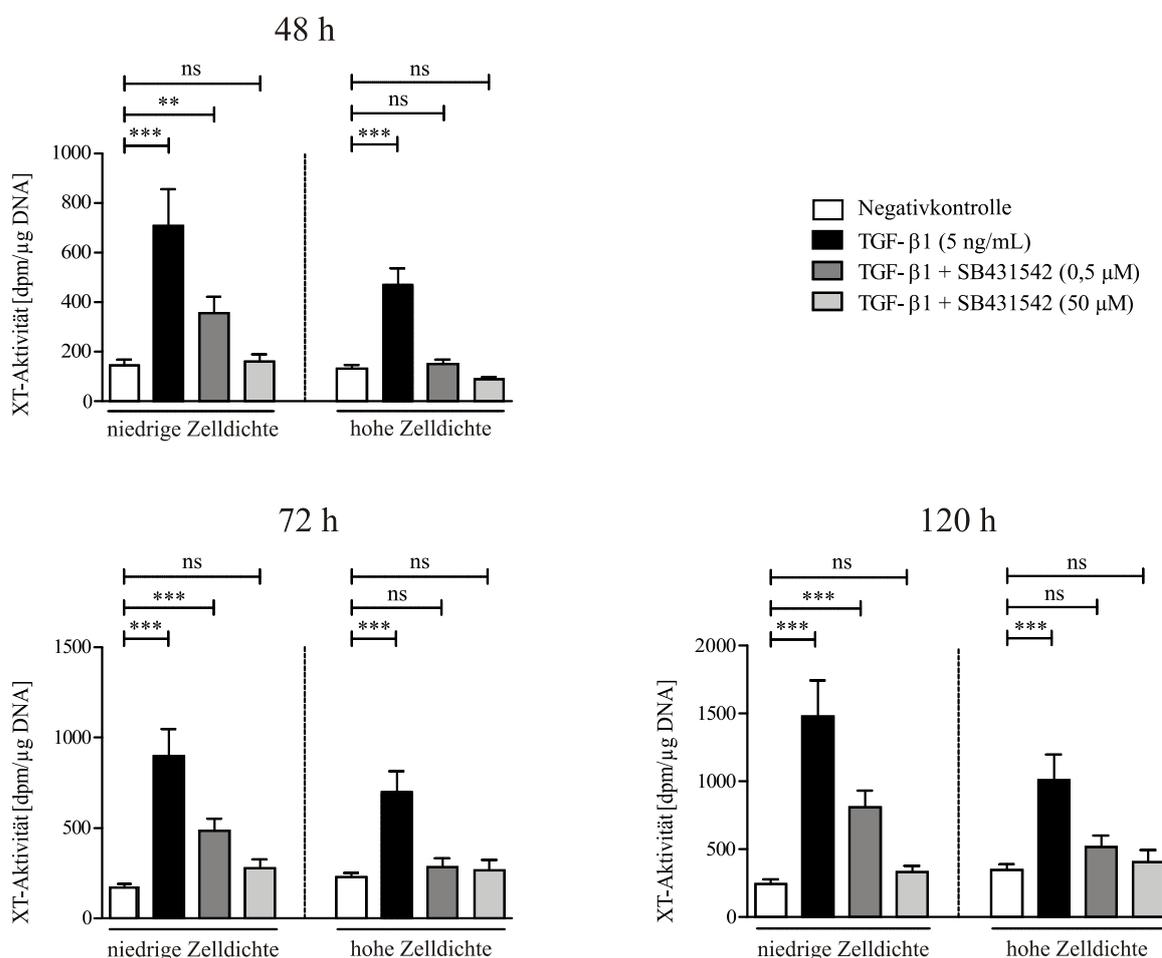


Abbildung 3.18: Analyse der im Zellkulturüberstand quantifizierten XT-Aktivität humaner dermaler Fibroblasten nach TGF- β 1-Behandlung. Die dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 40 (niedrig) bzw. 500 (hoch) Zellen/ mm^2 ausgesät und am nächsten Tag einem Serumentzug unterzogen. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit einem Vehikel (PBS, weiß), TGF- β 1 (5 ng/mL, schwarz) oder einer Kombination aus TGF- β 1 und dem ALK5-Inhibitor SB431542 (0,5 bzw. 50 μ M) in unterschiedlichen Konzentrationen (grau). Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Auch die XT-Aktivität folgte dem beschriebenen Muster einer Induktion durch TGF- β 1 sowie einer Effektabschwächung durch TGF- β 1-Inhibition. Neben einer stärkeren Induzierbarkeit der XT-Aktivität in den subkonfluenten Zellen konnte darüber hinaus eine progrediente Steigerung des induktiven Effekts festgestellt werden. Während nach 48 h eine 4,8-fache ($\pm 1,0$) Induktion der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand der subkonfluenten Zellen gemessen wurde, erhöhte sich der Wert nach 72 bzw. 120 h auf das 5,3-Fache ($\pm 0,9$) bzw. das 6,0-Fache ($\pm 1,1$). Die Induktion der XT-Aktivität der konfluenten Zellen sank in einem Zeitraum von 48 bis 120 h von einer 3,6-fachen ($\pm 0,5$) Erhöhung auf das 2,9-Fache ($\pm 0,5$) ab.

3.2.2 Wirkung profibrotischer Wachstumsfaktoren und Hormone auf die *XYLT* mRNA Expression und XT-Aktivität dermalen Fibroblasten

Um neben TGF- β 1 weitere profibrotisch relevante Moleküle zu identifizieren, die die *XYLT* mRNA Expression und XT-Aktivität während der fibrotischen Matrix-Remodellierung beeinflussen, wurde die Wirkung einer Auswahl an Mediatoren auf das Genexpressionsprofil und die XT-Aktivität dermalen Fibroblasten untersucht. Eine Behandlung der subkonfluent ausgesäten Zellen (s. 3.2.1) erfolgte mit Fibrose-assoziierten Mediatoren aus der Molekülklasse der Wachstumsfaktoren (CTGF (*connective tissue growth factor*), Activin A und PDGF-AB (*platelet derived growth factor-AB*)) sowie aus der Molekülklasse der Hormone (Angiotensin-II und Endothelin-1).

3.2.2.1 Analyse der *XYLT* und *ACTA2* mRNA Expression

Die Analyse der *ACTA2* mRNA Expression ergab, dass die Behandlung der dermalen Fibroblasten sowohl mit TGF- β 1 (5 ng/mL) als auch mit Activin A (50 ng/mL) zu einer 7,3-fachen ($\pm 1,0$) bzw. 2,8-fachen ($\pm 0,3$) signifikanten Expressionssteigerung führte (s. Abb. 3.19). Die durch die Supplementation mit CTGF (50 ng/mL), PDGF-AB (10 ng/mL), Angiotensin-II (10^{-7} M) und Endothelin-1 (10^{-7} M) hervorgerufenen Änderungen des *ACTA2* Expressionslevels waren nicht signifikant. Die Inkubation der Zellen mit einer Kombination aus jeweils einem der Mediatoren und TGF- β 1 führte in allen Fällen zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression, wenngleich diese bei keiner Mediatorkombination stärker war als nach der alleinigen Behandlung mit TGF- β 1.

Die *XYLT1* Transkriptionsrate wurde nicht nur durch das Einwirken von TGF- β 1 im Rahmen einer 7,7-fachen ($\pm 1,0$) Induktion reguliert, sondern zeigte auch eine 3,8-fache ($\pm 0,7$) bzw. 1,8-fache ($\pm 0,2$) Zunahme nach Induktion mit Activin A und PDGF-AB. Die Behandlung der dermalen Fibroblasten mit einer Kombination der einzelnen Mediatoren und TGF- β 1 führte analog zu den Änderungen der *ACTA2* mRNA Expression zu einer signifikanten Zunahme der *XYLT1* Genexpression. Es konnte gezeigt werden, dass der kombinatorische Effekt von TGF- β 1 und CTGF bzw. Angiotensin-II im Vergleich zur alleinigen Induktion mit TGF- β 1 zu einer verstärkten Expressionssteigerung führte. Die *XYLT2* mRNA Expression wurde durch keinen der fibrotischen Mediatoren bzw. deren Kombination mit TGF- β 1 signifikant moduliert.

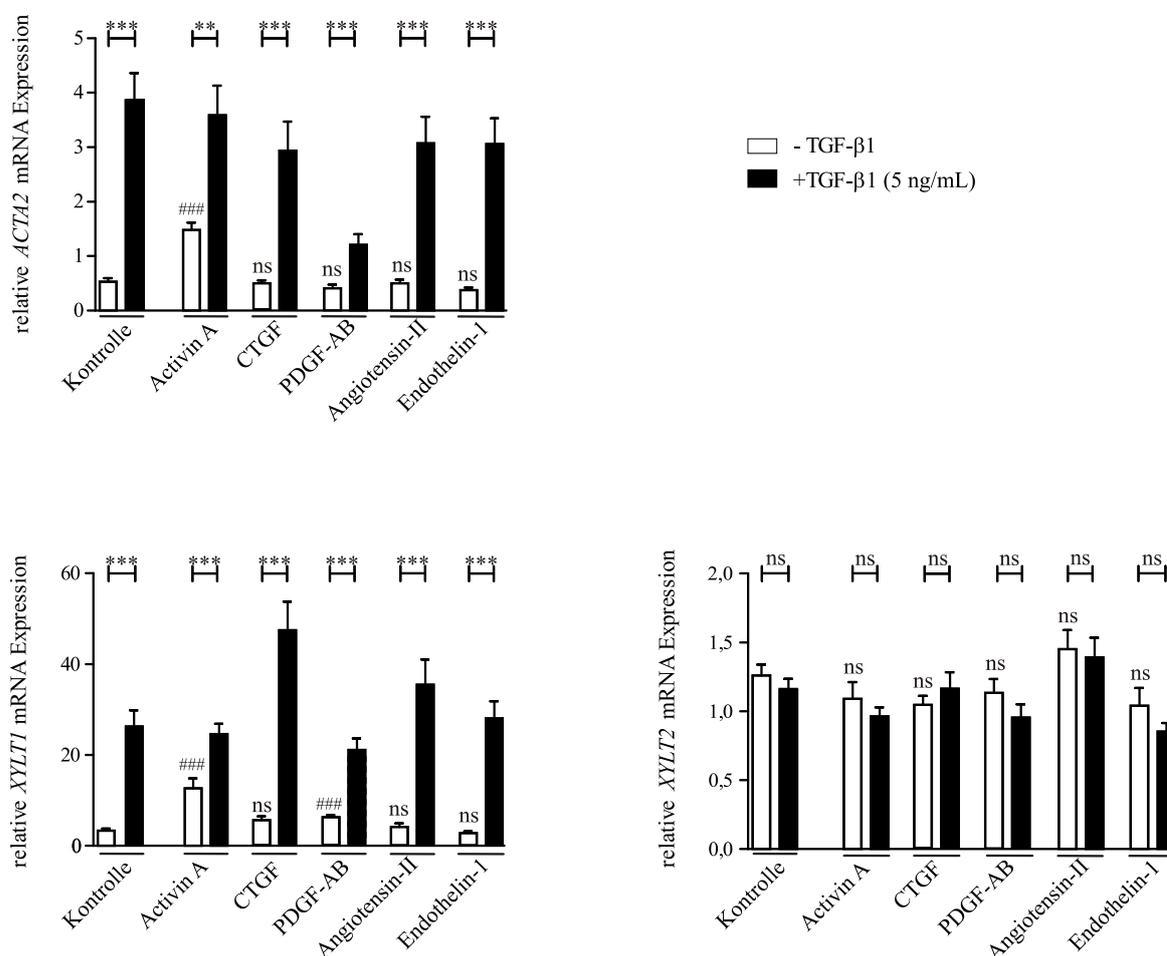


Abbildung 3.19: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil dermalen Fibroblasten nach Behandlung mit profibrotischen Wachstumsfaktoren und Hormonen. Die dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 40 Zellen/ mm^2 ausgesät und am nächsten Tag einem Serumentzug unterzogen. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit einem Mediator (TGF- β 1 5 ng/mL, Activin A 50 ng/mL, CTGF 50 ng/mL, PDGF-AB 10 ng/mL, Angiotensin-II 10^{-7} M, Endothelin-1 10^{-7} M) bzw. dem entsprechenden Vehikel (PBS, weiß) oder einer Kombination des Mediators mit TGF- β 1 (schwarz). Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate. Mit # gekennzeichnete Signifikanzen über den Säulen beziehen sich auf die unbehandelte Negativkontrolle (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,01$; **/# = $p < 0,001$).

3.2.2.2 Analyse der XT-Aktivität

Die im Zellkulturüberstand der dermalen Fibroblasten ermittelte XT-Aktivität wies nach Behandlung mit TGF- β 1, Activin A und Angiotensin-II eine signifikante Zunahme auf (s. Abb. 3.20). Die entsprechende Induktion entsprach einer Steigerung um das 5,9-Fache ($\pm 1,0$), das 3,0-Fache ($\pm 0,6$) bzw. das 2,8-Fache ($\pm 0,7$).

Im Gegensatz zu den relativ quantifizierten *XYLT1* Genexpressionsraten konnte durch Activin A, PDGF-AB, Angiotensin-II und Endothelin-1 ein auf die XT-Aktivität verstärkender Effekt durch eine kombinatorische Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 und dem Mediator im Vergleich zur alleinigen TGF- β 1 Supplementation verzeichnet werden.

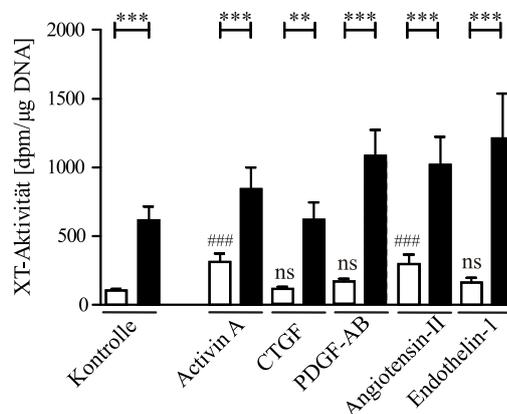


Abbildung 3.20: Analyse der im Zellkulturüberstand quantifizierten XT-Aktivität dermalen Fibroblasten nach einer Behandlung mit profibrotischen Wachstumsfaktoren und Hormonen. Die dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 40 Zellen/ mm^2 ausgesät und am nächsten Tag einem Serumentzug unterzogen. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit einem Mediator (TGF- β 1 5 ng/mL, Activin A 50 ng/mL, CTGF 50 ng/mL, PDGF-AB 10 ng/mL, Angiotensin-II 10^{-7} M, Endothelin-1 10^{-7} M) bzw. dem entsprechenden Vehikel (PBS, weiß) oder einer Kombination des Mediators mit TGF- β 1 (schwarz). Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate. Mit # gekennzeichnete Signifikanzen über den Säulen beziehen sich auf die unbehandelte Negativkontrolle (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; ***/### = $p < 0,001$).

3.2.3 Regulation der XT durch microRNAs

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag darauf, zu eruieren, ob die molekularen Pathomechanismen der Fibrosierung *in vivo* mit einer post-transkriptionalen Regulation der XT durch microRNAs (miRNAs) einhergehen könnten. miRNAs sind nicht-kodierende RNA-Moleküle, deren Omnipräsenz und regulatorische Reichweite erst vor wenigen Jahren erkannt wurde. Eine mögliche Einflussnahme von miRNAs auf die XT wurde bisher nicht experimentell analysiert.

Nachfolgend dargestellt ist die *in silico* basierte Identifizierung der potenziell XT-regulierenden miRNAs miR-18a und miR-34a, deren Wirkpotenzial weiterführend auch experimentell verifiziert wurde.

3.2.3.1 Identifizierung XT-regulierender miRNAs mittels *in silico* Analyse

Die Identifizierung regulatorischer miRNAs kann über sogenannte „*target prediction tools*“ *in silico* durchgeführt werden. Um eine valide Vorhersage XT-regulierender miRNAs zu treffen, wurden die drei Datenbanken *TargetScan Human*, *Pic Tar* und *DIANA mT* herangezogen und deren kalkulierte Ergebnisse vergleichend analysiert. Mit Hilfe einer Datenbank wird für jede miRNA, die entsprechend der Analyse als Regulator des vorgegebenen Zielgens in Frage kommt, ein *Score* ermittelt, der die Wahrscheinlichkeit einer Bindung von Ziel-mRNA und miRNA reflektiert. Für die Datenbank *TargetScan Human* entspricht ein niedriger *Score* einer hohen berechneten Übereinstimmung, während bei den beiden anderen Datenbanken ein hoher *Score* mit einer starken Übereinstimmung korreliert.

Über die *in silico* Analyse wurden zwei XT-regulatorische miRNAs identifiziert, die von mehreren Datenbanken mit einem guten *Score* bewertet wurden. So konnten die miRNAs miR-34a und miR-18a als putativ stärkste Regulatoren der *XYLT1* bzw. *XYLT2* Genexpression herausgestellt werden (s. Tab. 3.9). Für die miR-18a wurde neben *XYLT2* ergänzend auch *XYLT1* als mögliches Zielgen berechnet, wobei die entsprechenden *Scores* eine Bevorzugung der *XYLT2* mRNA ausdrücken. Eine vollständige Übersicht der Bewertungen der XT-regulatorischen miRNAs befindet sich im Anhang (s. 10.3).

Tabelle 3.9: Auflistung der mittels *in silico* Analyse identifizierten *XYLT1*- bzw. *XYLT2*-regulierenden miRNAs.

Gen	miRNA	<i>Score</i>	<i>Score</i>	<i>Score</i>
		<i>TargetScan Human</i>	<i>PicTar</i>	<i>DIANA mT</i>
<i>XYLT1</i>	miR-34a	-0,64	5,92	13,85
	miR-18a	-0,31	-	9,20
<i>XYLT2</i>	miR-18a	-0,43	3,26	22,75

3.2.3.2 Reduktion der *XYLT* mRNA Expression durch miRNAs

Um die mittels *in silico* Analyse berechnete Expressions-supprimierende Eigenschaft der miRNAs miR-18a und miR-34a auf die XT *in vitro* zu verifizieren, wurden dermale Fibroblasten mit den entsprechenden miRNAs (20 nM) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einer unspezifischen miRNA (20 nM) transfiziert wurden. Etwaige unspezifische Seiteneffekte können somit determiniert werden. Für den gezielten *XYLT*-Knockdown wurden dermale Fibroblasten in einer niedrigen Zelldichte von 45 Zellen/mm² ausgesät und transfiziert. Eine Zellyse und anschließende Genexpressionsanalyse wurde nach einer Inkubationszeit von 48 bzw. 72 h durchgeführt (s. Abb. 3.21).

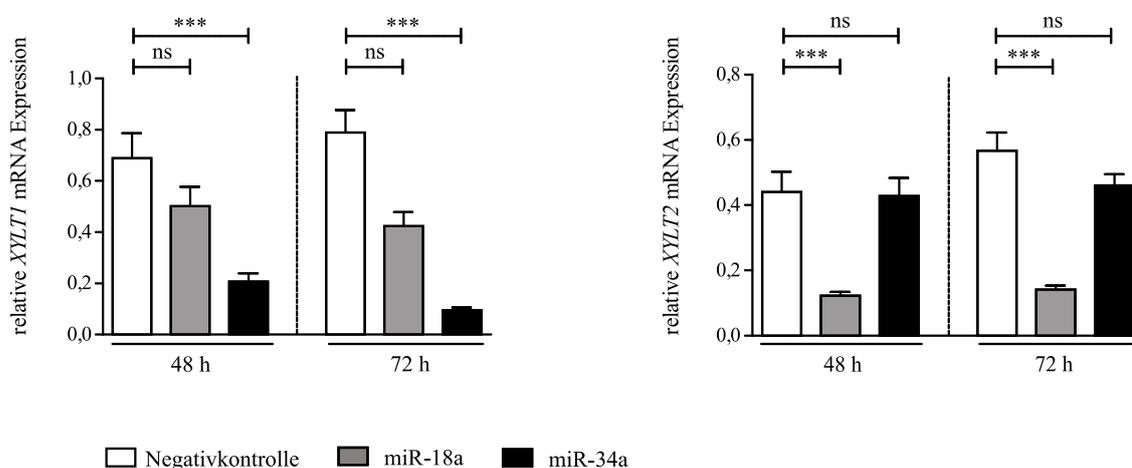


Abbildung 3.21: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil dermaler Fibroblasten nach Transfektion von miRNAs (20 nM). Dermale Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 45 Zellen/mm² ausgesät und mit miR-18a (grau), miR-34a (schwarz) oder einer Negativ-Kontroll-miRNA (weiß) transfiziert. Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$).

Es konnte eine für jede XT-Isoform spezifische Verminderung der mRNA Expression gezeigt werden. Die *XYLT1* mRNA Expression wurde durch Behandlung der Zellen mit miR-34a nach 48 h um das 0,3-Fache ($\pm 0,1$), und nach 72 h um das 0,1-Fache ($\pm 0,01$) reduziert. Auch durch die Transfektion der miR-18a konnte eine verringerte Genexpression verzeichnet werden, wobei diese jedoch nicht statistisch signifikant war.

Die *XYLT2* mRNA Expression wurde nur durch die Transfektion der miR-18a reduziert, nicht jedoch durch die miR-34a. Sowohl nach 48 als auch nach 72 h wurde die *XYLT2* Genexpression auf das 0,3-Fache ($\pm 0,01$) reduziert.

Die Quantifizierung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand der dermalen Fibroblasten wurde nach 48, 72 und 144 h durchgeführt. Die XT-Aktivität wurde nach 48 h marginal aber nicht signifikant supprimiert (s. Abb. 3.22). Nach 72 h fand eine Erniedrigung der XT-Aktivität im Überstand der mit miR-34a transfizierten Zellen um das 0,9-Fache ($\pm 0,03$) statt. Die Änderungen der XT-Aktivität nach Transfektion der miR-18a waren nicht signifikant. Erst nach 144 h konnte auch ein erniedrigender Effekt der miR-18a Transfektion auf die XT-Aktivität beobachtet werden. Ermittelte Werte ergaben eine Aktivitätsverminderung um das 0,8-Fache ($\pm 0,04$). Eine stärkere Reduktion der XT-Aktivität fand nach einer 72stündigen bzw. 144stündigen Inkubationszeit mit miR-34a statt. Die Expressionserniedrigung betrug hier 0,8 ($\pm 0,03$) bzw. 0,7 ($\pm 0,03$).

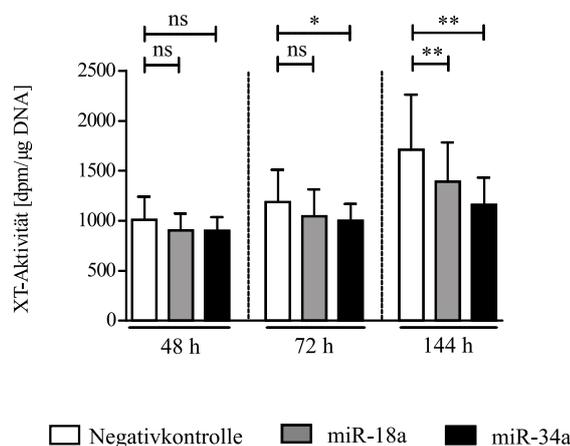


Abbildung 3.22: Analyse der im Zellkulturüberstand quantifizierten XT-Aktivität dermalen Fibroblasten nach miRNA-Transfektion (20 nM). Die dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 45 Zellen/ mm^2 ausgesät und mit miR-18a (grau), miR-34a (schwarz) oder einer Negativ-Kontroll-miRNA (weiß) transfiziert. Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.2.3.3 miRNA-Array basierte Genexpressionsprofilanalyse nach TGF- β 1-Induktion

Fibrotische Gewebe-Remodellierungen sind durch eine Vielzahl an Änderungen der Expression relevanter Gene gekennzeichnet. Diese werden unter anderem dadurch verursacht, dass die Quantität einzelner miRNAs sowie die Komposition der miRNA-Gesamtheit einer pathologischen Regulation unterliegt. Ob die in dieser Arbeit als XT-regulierend charakterisierten miRNAs miR-18a und -34a in dermalen Fibroblasten exprimiert werden und ihrer Funktion der XT-Suppression in einer experimentell induzierten Fibrogenese nachgehen, sollte über einen miRNA PCR-Array analysiert werden.

Humane dermale Fibroblasten wurden nach dem in dieser Arbeit etabliertem Modell (s. 3.2.1) zur Kultivierung von Myofibroblasten ausgesät, einem Serumentzug unterzogen und für 48 h mit TGF- β 1 (5 ng/mL) behandelt. Nach der Zellernte erfolgte eine Anreicherung der miRNAs aus dem Zelllysat sowie deren reverse Transkription in cDNA. Der verwendete *miScript miRNA PCR-Array* im 384-Kavitäten-Format ermöglicht die relative Quantifizierung von 372 verschiedenen miRNAs sowie eine MIQE-Guideline gerechte Normierung auf die Expression mehrerer inkludierter Haushaltsgene mittels *real-time* PCR. Es wurde jeweils ein miRNA-Genexpressionsprofil der mit TGF- β 1 induzierten Fibroblasten sowie unbehandelter Zellen von zwei Zelllinien angefertigt und verglichen.

Zunächst erfolgte die obligate Überprüfung der Modellvalidität über den Nachweis von Expressionsänderungen der fibrotisch-relevanten miRNAs miR-21 und miR-29b. Weiter sollte der Unterschied in den Genexpressionsraten der miRNAs miR-18a und -34a zwischen dem Fibrose-Modell und der Negativkontrolle analysiert werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass insgesamt 19 miRNAs nach der Behandlung mit TGF- β 1 verstärkt exprimiert wurden, und sechs miRNAs eine verminderte Expressionsrate aufwiesen (Gesamtübersicht s. 10.4). Unter anderem konnte herausgestellt werden, dass eine 4,2-fache (\pm 1,4) Induktion der miR-21 sowie eine 0,4-fache (\pm 0,1) Reduktion der miR-29b Expression stattfand (s. Abb. 3.23).

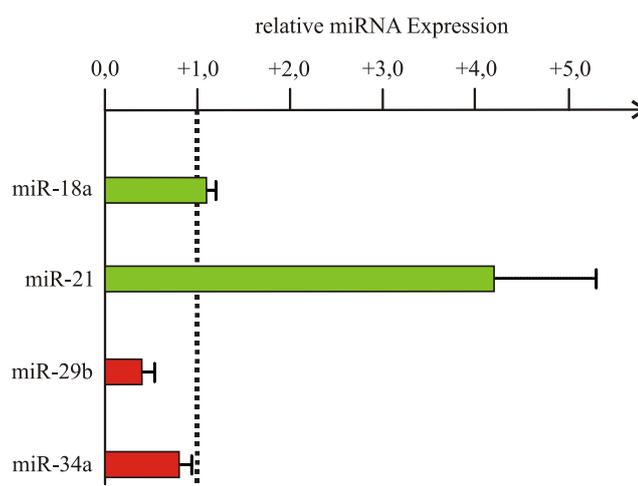


Abbildung 3.23: Relativ quantifiziertes miRNA-Genexpressionsprofil dermaler Fibroblasten nach Inkubation mit TGF- β 1 (5 ng/mL). Dermale Fibroblasten ($n = 2$) wurden in einer Zelldichte von 45 Zellen/mm² ausgesät und für 48 h mit einem Vehikel (PBS) oder TGF- β 1 inkubiert. Ermittelte relative miRNA Expressionslevel wurden auf die Expression der PBS-behandelten Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je ein biologisches und ein technisches Replikat.

Für die XT-regulierenden miRNAs miR-18a und -34a konnte nur marginale Änderungen der Expressionsraten detektiert werden. Während die miR-18a 1,1-fach ($\pm 0,1$) induziert wurde, sank die Genexpression der miR-34a um das 0,8-Fache ($\pm 0,1$).

3.2.3.4 Gezielte miRNA-Inhibition

In Analogie zu der beschriebenen, durch die Transfektion von miRNAs ausgelöst, Suppression der *XYLT* mRNA Expression wurde überprüft, ob eine Expressionsinduktion durch Behandlung der Zellen mit einem synthetischen, korrespondierenden miRNA-Inhibitor erzielt werden kann. miRNA-Inhibitoren binden an die einzelsträngige, nativ funktionale miRNA und lösen nachfolgend deren Degradierung aus.

Die Transfektion der Inhibitoren (20 nM) wurde wie beschrieben vorgenommen (s. 3.2.3.2). Bezüglich der *XYLT1* mRNA Expression konnte 48 h nach der Transfektion des Inhibitors der miR-18a bzw. miR-34a eine leichte, jedoch nicht signifikante, Expressionssteigerung beobachtet werden (s. Abb. 3.24). 72 h nach der Transfektion sank das *XYLT1* Genexpressionslevel nicht signifikant ab.

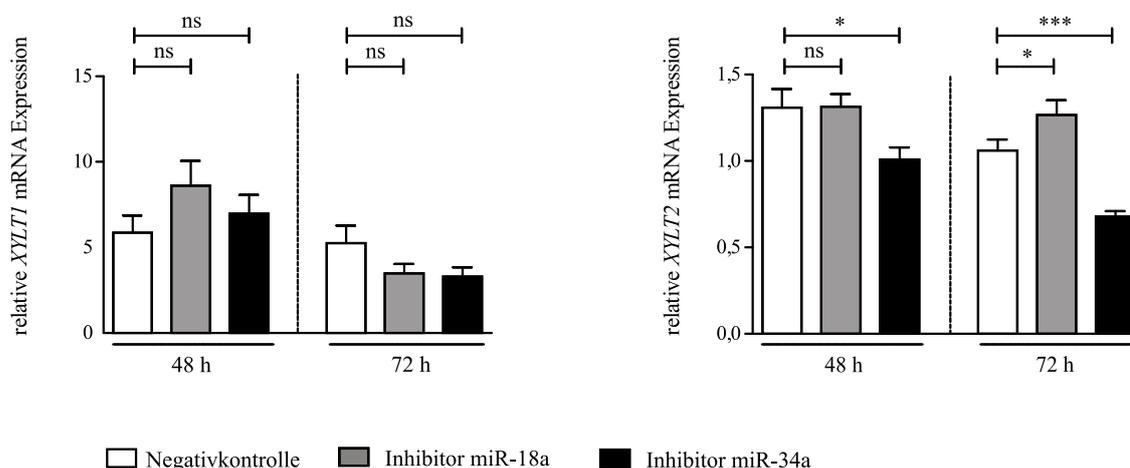


Abbildung 3.24: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil dermalen Fibroblasten nach Transfektion von miRNA-Inhibitoren (20 nM). Dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 45 Zellen/ mm^2 ausgesät und mit dem Inhibitor der miR-18a (grau), miR-34a (schwarz) oder einer Negativ-Kontroll-miRNA (weiß) transfiziert. Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$).

Auch die Änderungen der *XYLT2* mRNA Expression nach Transfektion der miRNA-Inhibitoren waren nur schwach ausgeprägt. Die Transfektion des miR-18a Inhibitors führte nach 48 h zu keinem Effekt, während nach 72 h eine statistisch signifikante Induktion der Expression um das 1,2-Fache ($\pm 0,1$) verzeichnet wurde. Die Transfektion des Inhibitors der miRNA miR-34a löste ein Absinken der *XYLT2* mRNA Expression aus.

144 h nach der Transfektion der dermalen Fibroblasten mit einem gegen die miR-18a bzw. -34a gerichteten Inhibitor konnte eine signifikante Induktion der XT-Aktivität beobachtet werden (s. Abb. 3.25). Im Gegensatz zu den frühen Inkubationszeiten von 48 und 72 h, zu denen keine Zunahme der XT-Aktivität ermittelt wurde, stieg die XT-Aktivität nach 144 h um das 1,1-Fache ($\pm 0,1$) bzw. das 1,2-Fache ($\pm 0,2$) an.

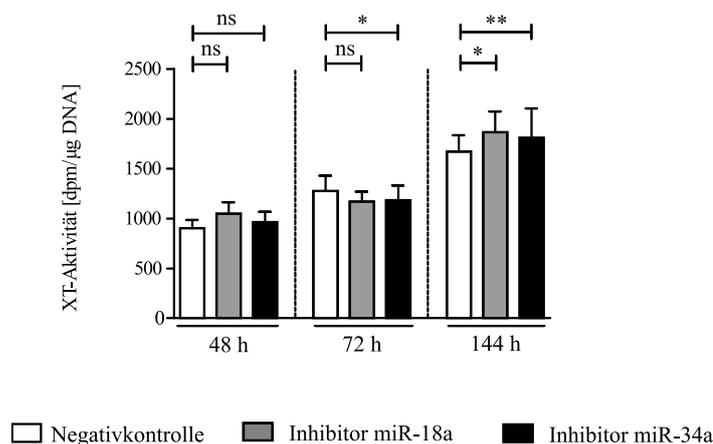


Abbildung 3.25: Analyse der im Zellkulturüberstand quantifizierten XT-Aktivität dermalen Fibroblasten nach einer Transfektion von miRNA-Inhibitoren (20 nM). Die dermalen Fibroblasten ($n = 4$) wurden in einer Zelldichte von 45 Zellen/ mm^2 ausgesät und mit dem Inhibitor der miR-18a (grau), der miR-34a (schwarz) oder einer Negativ-Kontroll-miRNA (weiß) transfiziert. Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.3 Evaluierung der XT als Arthrofibrose-Biomarker

Die pathobiochemischen Hintergründe der Entwicklung einer arthrofibrotischen Matrix-Remodellierung in der Synovialis sind trotz einer Prävalenz von 10 % nach Implantation einer Knie-Totalendoprothese (TEP) bislang nur unzureichend erforscht. Die aus der Fibrose resultierende exzessive Matrixakkumulation führt letztendlich zu einer starken Einschränkung der Knie-Beweglichkeit, für die es bisher noch keine therapeutische Option gibt (Bosch *et al.* 1999; Gollwitzer *et al.* 2006).

Die Fibrosierung der Leber oder des kardialen Gewebes konnte in vergangenen Studien bereits mit einer verstärkten zellulären Expression sowie einer erhöhten Serum-XT-Aktivität in Verbindung gebracht werden (Prante *et al.* 2007; Kuhn *et al.* 2009). Ob die XT auch mit der Entstehung von Arthrofibrosen assoziiert sind und demnach als putative therapeutische und diagnostische *Targets* fungieren könnten, wurde in einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit eruiert. Während ein Fokus der Studie darauf lag, die Rolle der XT im arthrofibrotischen Prozess der zellulären Myofibroblasten-Differenzierung einzuordnen, wurde in einem weiteren Schwerpunkt die Eignung der Serum-XT-Aktivität als diagnostischer Marker für Arthrofibrosen evaluiert.

3.3.1 Analyse der Wirkung von TGF- β 1 auf synoviale Fibroblasten

Um die zellulären Regulationsmechanismen der Pathogenese einer Arthrofibrose zu untersuchen, wurden zunächst synoviale Fibroblasten gewonnen. Diese wurden aus Gewebebiopsien isoliert, die im Rahmen einer Knie-Revisions-OP nach Knie-TEP-Implantation entnommen wurden (s. Abb. 3.26). Nachfolgend aufgeführte Experimente wurden mit drei Primärkulturen synovialer Kontrollfibroblasten (Kontrolle) und sechs Primärkulturen arthrofibrotischer, synovialer Fibroblasten (Afib) durchgeführt.

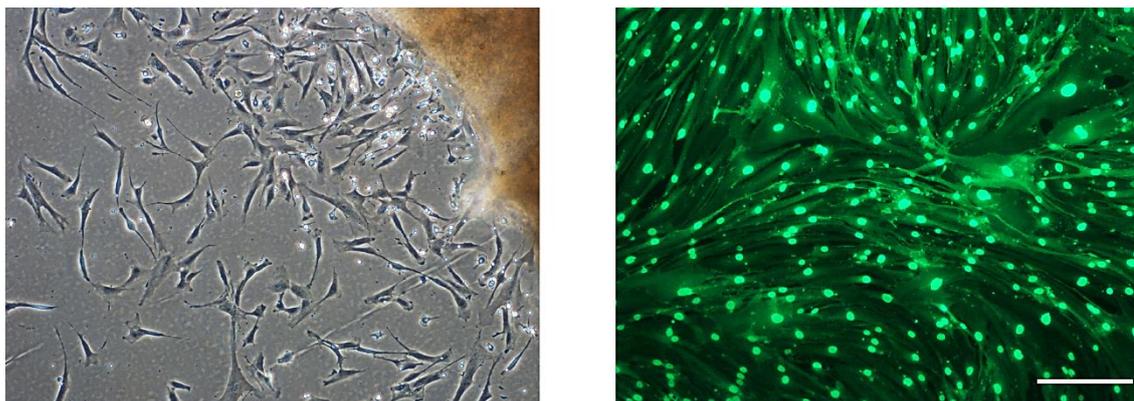


Abbildung 3.26: Anlage einer Primärzellkultur synovialer Fibroblasten. Die Gewinnung primärer, synovialer Fibroblasten erfolgte aus Gewebebiopsien, die zunächst enzymatisch verdaut und anschließend in Zellkulturmedium inkubiert wurden. Aus der Biopsie auswachsende Fibroblasten (links) wurden auf die Expression des Fibroblastenmarkers CD90 überprüft (rechts) und für nachfolgende Experimente gesichert. Die Maßstabskala (unten rechts) entspricht 100 μm .

3.3.1.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils

Entsprechend dem in dieser Arbeit etablierten Kultivierungsmodell für dermale Myofibroblasten (s. 3.2.1) wurden die Zellen in einer Zelldichte von 40 Zellen/ mm^2 ausgesät, einem Serumentzug unterzogen und 48 h mit TGF- β 1 (5 ng/mL) behandelt. Um Differenzen des fibrotischen Remodellierungsprozess und der Myofibroblasten-Differenzierung zwischen den Afib- und Kontrollzellen aufzuzeigen, wurden diese nach 48 h geerntet. Die aus dem Zelllysat gewonnene mRNA wurde revers transkribiert und die erhaltene cDNA für die Analyse der Genexpression ausgewählter Matrixkomponenten mittels quantitativer *real-time* PCR eingesetzt. Die Bestimmung der XT-Aktivität erfolgte im Zellkulturüberstand. Das Ausmaß der Myofibroblasten-Differenzierung sollte zusätzlich auch auf Proteinebene dargestellt werden, indem α -Glattmuskelaktin mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde.

Die Behandlung der synovialen Fibroblasten mit dem profibrotischen Mediator TGF- β 1 führte zu einer signifikanten Induktion der *XYLT1* mRNA Expression in Kontroll- und Afib-Fibroblasten (s. Abb. 3.27). Wenngleich das basale *XYLT1* Expressionslevel in den unbehandelten Afib-Zellen einen geringeren Wert aufwies als in den unbehandelten Kontrollen, konnte in den Afib-Zellen eine 11,4-fache ($\pm 0,9$) Induktion der *XYLT1* mRNA Expression detektiert werden. Für die Transkriptrate in den Kontrollzellen konnte eine Steigerung um das 7,1-Fache ($\pm 0,7$) verzeichnet werden.

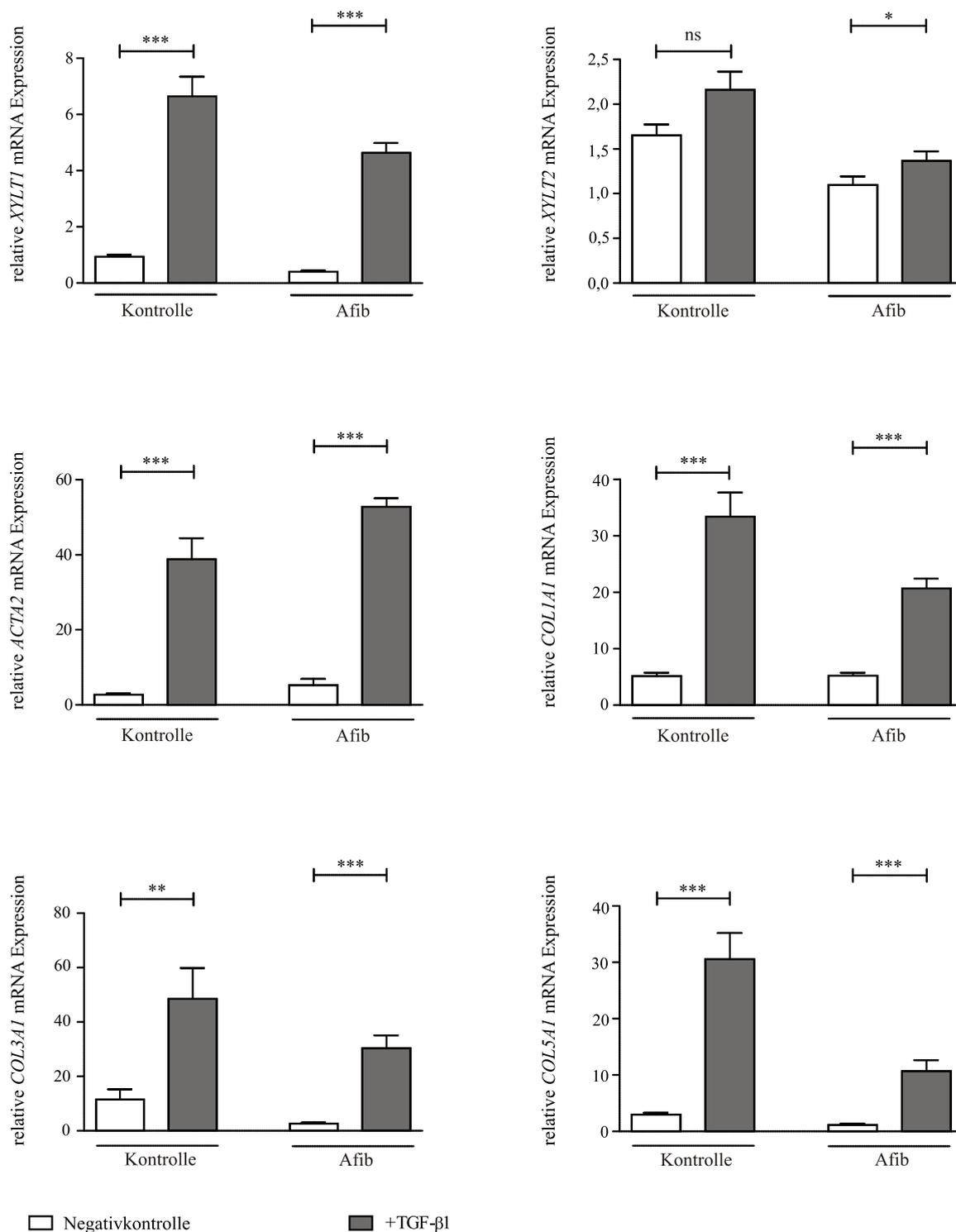


Abbildung 3.27: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil synovialer Fibroblasten nach Behandlung mit TGF-β1 (5 ng/mL). Die synovialen Fibroblasten (Kontrollen n = 3; Afib n = 6) wurden in einer Zelldichte von 40 Zellen/mm² ausgesät und am nächsten Tag einem 24stündigen Serumentzug unterzogen. Anschließend wurden die Fibroblasten für 48 h mit TGF-β1 (dunkelgraue Balken) bzw. einem Vehikel (PBS, weiße Balken) behandelt. Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Kontrollzelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001).

Die Behandlung mit TGF- β 1 führte des Weiteren zu einem 1,3-fachen ($\pm 0,1$) Anstieg der relativen *XYLT2* mRNA Expression in den Afib-Zellen, während in den Kontrollen keine signifikante Änderung des Expressionsniveaus detektiert wurde.

Die Genexpression des Myofibroblastenmarkers α -Glattmuskelaktin (*ACTA2*) wurde durch die Inkubation der synovialen Fibroblasten mit TGF- β 1 in den Kontrollzellen 14,4-fach ($\pm 2,1$) und in den Afib-Zellen 10,1-fach ($\pm 0,4$) gesteigert. In den arthrofibrotischen Fibroblasten wurde jedoch die quantitativ höhere relative Transkript-Gesamtmenge nachgewiesen. Dies ist auf die ebenfalls höhere Basalexpression der *ACTA2* mRNA Expression in den arthrofibrotischen gegenüber den Kontroll-Zellen zurückzuführen.

Die Transkriptionsrate der Kollagene I α 1 (*COL1A1*), III α 1 (*COL3A1*) sowie V α 1 (*COL5A1*) wurde nach Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 sowohl in den Kontrollzellen als auch in den Afib-Zellen induziert. Das Ausmaß dieser Expressionszunahme war bezüglich der *COL1A1* und *COL5A1* mRNA Expression mit einer Zunahme um das 6,5-Fache ($\pm 0,8$) bzw. das 10,4-Fache ($\pm 1,6$) in den Kontrollzellen höher als in den Afib-Fibroblasten, bei denen ein Anstieg der Transkriptionsrate um das 4,0-Fache ($\pm 0,3$) bzw. das 9,6-Fache ($\pm 1,8$) detektiert wurde. Das *COL3A1* Expressionslevel unterlag einer 11,5-fachen ($\pm 1,8$) Erhöhung in den Afib-Zellen, während die Induktion in den Kontrollen nur einer Zunahme um das 4,2-Fache ($\pm 1,0$) entsprach. Insgesamt ließen sich eine geringere Basalexpression sowie eine geringere Gesamttranskriptmenge der Kollagene in den arthrofibrotischen Synovialfibroblasten gegenüber den Kontrollzellen nachweisen.

3.3.1.2 Analyse der XT-Aktivität und der α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression

In Ergänzung zu der Analyse des mRNA Expressionsprofils nach Induktion mit TGF- β 1 (5 ng/mL) wurde auch die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand der synovialen Fibroblasten analysiert. Über die radiochemische Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand konnte gezeigt werden, dass Kontroll- und Afib-Fibroblasten eine gleich starke basale XT-Aktivität aufwiesen (s. Abb. 3.28). Durch die Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 erhöhte sich die XT-Aktivität der Kontrollen um das 2,9-Fache ($\pm 0,1$). Die Induktion der XT-Aktivität in den Afib-Zellen fiel mit einer 4,6-fachen ($\pm 0,3$) Zunahme deutlich stärker aus.

Die Supplementation mit TGF- β 1 führte des Weiteren zu einer gesteigerten α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression der Kontrollzellen sowie der Afib-Fibroblasten (s. Abb. 3.28). Wie mittels Immunfluoreszenzanalyse gezeigt werden konnte, zeichneten sich die Afib-

Zellen hierbei sowohl durch eine höhere Basalexpression als auch eine stärkere Induzierbarkeit der α -Glattmuskelaktinexpression gegenüber den Kontrollzellen aus.

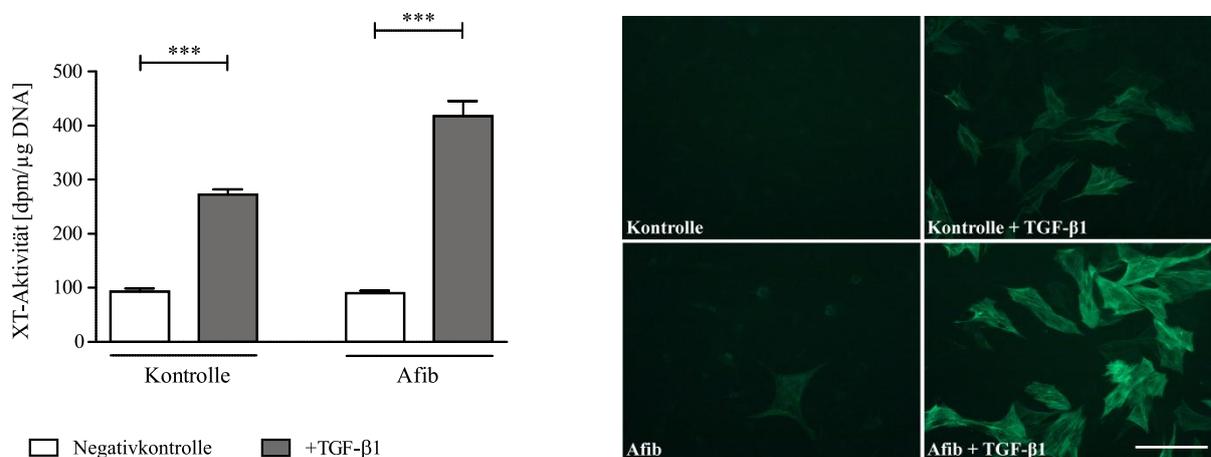


Abbildung 3.28: Analyse der XT-Aktivität (links) und α -Glattmuskelaktin-Proteinexpression (rechts) in synovialen Fibroblasten nach Behandlung mit TGF- β 1 (5 ng/mL). Links: Die synovialen Fibroblasten (Kontrollen n = 3; Afib n = 6) wurden in einer Zelldichte von 40 Zellen/mm² ausgesät und am nächsten Tag einem 24stündigen Serumentzug unterzogen. Anschließend wurden die Fibroblasten für 48 h mit TGF- β 1 (graue Balken) bzw. einem Vehikel (PBS, weiße Balken) behandelt. Die Messung der XT-Aktivität erfolgte im Zellkulturüberstand. Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (***) = p<0,001). Rechts: Immunfluoreszenzfärbung des von synovialen Fibroblasten exprimierten α -Glattmuskelaktins. Nach einer 120stündigen Inkubation der Zellen mit TGF- β 1 wurden die Zellen fixiert und das Protein ACTA2 über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Exemplarisch gezeigt sind die Immunfluoreszenzaufnahmen einer Kontroll- und einer Afib-Zelllinie. Die Maßstabskala (unten rechts) entspricht 100 μ m.

3.3.2 Induktion synovialer Fibroblasten mit mechanischem Stress

Die Differenzierung des residenten Fibroblasten zum Myofibroblasten ist der Schlüsselschritt der Fibrosierung. Neben profibrotischen Molekülen wie TGF- β 1 trägt auch mechanischer Stress entscheidend zu der Veränderung des Zelldifferenzierungsstatus bei (Hinz 2010).

Eine Simulation des, *in vivo* unter anderem über eine progressive Organversteifung vermittelten, mechanischen Stresses erfolgte im Zellkulturmodell über die Kultivierung der synovialen Fibroblasten auf einer dehnbaren Kollagenmatrix. Aufgrund der Limitierung der kommerziell erhältlichen Zellkulturschalengröße mussten die Zellen in einer von dem in dieser Arbeit etablierten Modell zur Kultivierung von Myofibroblasten (s. 3.2.1) abweichenden Zelldichte von 240 Zellen/mm² ausgesät werden. Die Aussaat der Zellen in der angestrebten Zelldichte von 40 Zellen/mm² wäre mit einer für die Analytik zu geringen Konzentration an aus dem Lysat isolierter RNA einhergegangen. Einen Tag nach dem

Aussäen der Zellen in 6-Kavitäten-Platten wurden diese durch ein FlexCell Vakuum-System für 24 h mechanischem Stress (4,5 % Membrandehnung, 1 Hz) ausgesetzt. Ein Serumentzug konnte analog zu der Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 nicht durchgeführt werden, da die Zellvitalität während der Stressexposition bei Serumentzug drastisch reduziert wurde.

Die Zelllysate wurden für die Gewinnung von mRNA verwendet, welche in weiteren experimentellen Schritten in cDNA transkribiert und für die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer *real-time* PCR eingesetzt wurde. Die Bestimmung der XT-Aktivität wurde im Zellkulturüberstand durchgeführt. Die Analyse der relativen Genexpression sowie der XT-Aktivität erfolgte im Vergleich zu Kontrollzellen, die unter den identischen Kulturbedingungen ohne das Einwirken von mechanischem Stress kultiviert wurden.

3.3.2.1 Analyse des mRNA Expressionsprofils

Im Vergleich zu der Behandlung der synovialen Fibroblasten mit TGF- β 1 fielen die Änderungen der Transkriptraten nach mechanischer Stressexposition deutlich schwächer aus (s. Abb. 3.29). Die relative *XYLT1* mRNA Expression der Kontroll- und Afib-Zellen wurde im Vergleich zu den jeweiligen ungestressten Zellen leicht, jedoch nicht signifikant, induziert. Mit einer 1,5-fachen ($\pm 0,3$) Steigerung des *XYLT1* Genexpressionslevels konnte eine tendenziell höhere Induktion in den Afib-Zellen detektiert werden. Die *XYLT2* mRNA Transkriptrate wurde in den Kontrollfibroblasten durch das Einwirken von mechanischem Stress auf das 0,5-fache ($\pm 0,1$) Niveau reduziert, während in den Afib-Zellen keine Änderung der Expression beobachtet werden konnte.

Die durch den mechanischen Stress hervorgerufenen Änderungen des *TGF- β 1* Expressionslevels verhielten sich analog zu den *XYLT1* Expressionsniveaus. Demnach wurde eine 1,8-fache ($\pm 0,4$) Erhöhung der mRNA Expression in den Afib-Zellen und eine 1,6-fache Steigerung ($\pm 0,4$) in den Kontrollzellen gemessen.

Die Analyse der relativen Genexpressionsrate von α -Glattmuskelaktin ergab, dass diese in keinem der beiden Zelltypen einer Regulation durch mechanischem Stress unterlag. Eine Stagnation der relativen mRNA Expression wurde auch für Kollagen I α 1 detektiert.

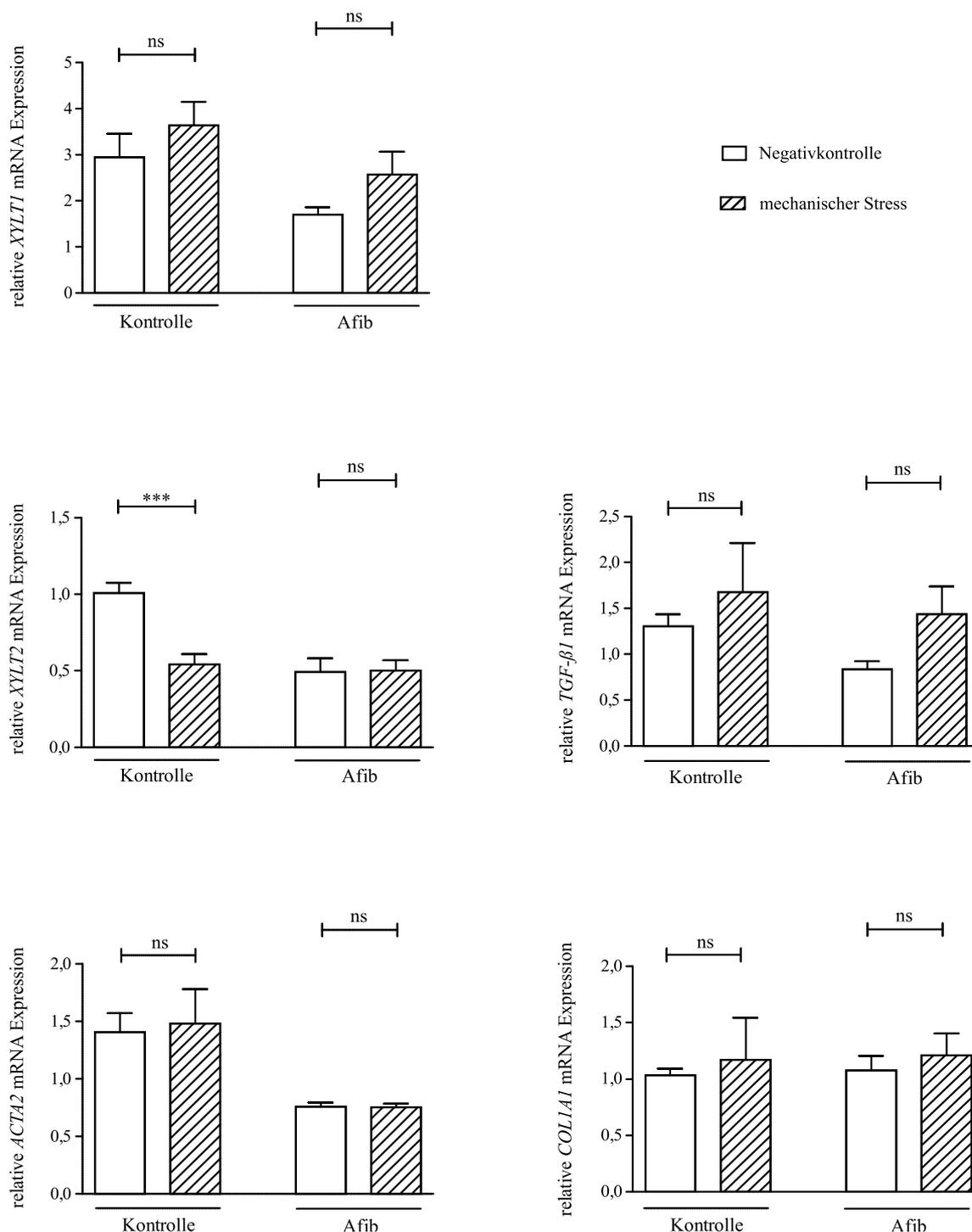


Abbildung 3.29: Relativ quantifiziertes Genexpressionsprofil synovialer Fibroblasten nach Behandlung mit mechanischem Stress. Die synovialen Fibroblasten (Kontrollen n = 3; Afib n = 6) wurden in einer Zelldichte von 240 Zellen/mm² ausgesät und nach einem Tag für 24 h mechanischem Stress (gestreifte Balken) ausgesetzt. Kontrollzellen wurden unter den gleichen Bedingungen ohne mechanischen Stress kultiviert (weiße Balken). Ermittelte relative mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression einer Kontrollzelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; *** = p<0,001).

3.3.2.2 Analyse der XT-Aktivität

In Ergänzung zu der Analyse des mRNA Expressionsprofils zeigte die Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand der mechanisch gestressten Synovialfibroblasten, dass in den Kontrollzellen eine marginale, nicht signifikante Erhöhung der XT-Aktivität erfolgte (s. Abb. 3.30). In den arthrofibrotischen Synovialfibroblasten stieg die Aktivität hingegen signifikant um das 1,2-Fache ($\pm 0,1$) an. Analog zu der Messung der relativen mRNA Expressionslevel nach Induktion mit mechanischem Stress konnte somit bestätigt werden, dass die Exposition von mechanischem Stress einen geringeren Effekt auf die Myofibroblasten-Differenzierung ausübt als die TGF- β 1-Supplementation.

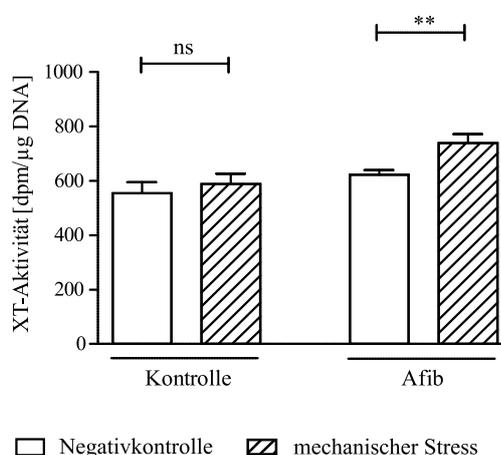


Abbildung 3.30: Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand synovialer Fibroblasten nach Behandlung mit mechanischem Stress. Die synovialen Fibroblasten (Kontrollen n = 3; Afib n = 6) wurden in einer Zelldichte von 240 Zellen/mm² ausgesät und am nächsten Tag für 24 h mechanischem Stress (gestreifte Balken) ausgesetzt. Kontrollzellen wurden unter den gleichen Bedingungen ohne mechanischen Stress kultiviert (weiße Balken). Gezeigt sind auf die Gesamt-DNA-Menge normierte Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (ns = nicht signifikant; ** = p < 0,01).

3.3.3 Bestimmung der Serum-XT-Aktivität bei Arthrofibrose-Patienten

In Ergänzung zur Definition der Rolle der XT im zellulären Kontext der Arthrofibrose wurde die Serum-XT-Aktivität als diagnostischer Biomarker für arthrofibrotische Gewebe-Remodellierungen evaluiert.

Die Untersuchung der Serum-XT-Aktivität wurde bei 95 Arthrofibrose-Patienten und 132 Kontrollpersonen durchgeführt. Die Abnahme des Serums sowie die anamnestische Diagnose erfolgten nach Implantation einer Knie-Totalendoprothese vor Rehabilitation in der Klinik am

Rosengarten (Bad Oeynhausen). Die Diagnose einer Arthrofibrose zu Beginn der Rehabilitation wurde anhand eines reduzierten Bewegungsmaßes (*range of motion*, ROM), synovialer Hyperplasie und anhaltenden Schmerzen im Kniegelenk gestellt und nach den ICD (*international classification of diseases*) Richtlinien klassifiziert. Postoperative Komplikationen wie Infektionen oder tiefe Venenthrombosen wurden anamnestisch ausgeschlossen. Die Kohorte der Arthrofibrose-Patienten wurde in Korrelation zu dem Schweregrad der Erkrankung in drei Gruppen unterteilt: Afib1 (Verdachtsdiagnose Arthrofibrose: Diagnosekriterien (s.o.) nur teilweise erfüllt), Afib2 (Diagnose Arthrofibrose aufgrund klinischem Verlauf und anamnestischer Parameter (s.o.)), Afib3 (Diagnose Arthrofibrose durch externe Institutionen aufgrund klinischem Verlauf und anamnestischer Parameter (s.o.)). Der Zeitraum der Operation bis zur Probenentnahme und Diagnosestellung ($\text{Zeit}_{\text{Diagnose}}$) variiert je nach Afib-Score. Die Quantifizierung der Thrombozytenzahl erfolgte am CellDyn Ruby (Abbott, Illinois, USA). Die klinischen Parameter sind in Tab. 3.10 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3.10: Klinische Parameter der Arthrofibrose (Afib)-Patienten und Kontrollen.

	Kontrollen	Afib1	Afib2	Afib3
n	132	28	36	31
Alter [Jahre]	62,0 ± 9,6	65,0 ± 11,3	61,4 ± 9,7	63,5 ± 9,3
Zeit _{Diagnose} [Monate]	6,7 ± 22,6	2,4 ± 4,6	26,0 ± 48,2	19,2 ± 21,6
ROM [°]	78,4 ± 16,3	59,6 ± 16,8***	59,9 ± 20,8***	60,6 ± 24,7***
THRO [10E9/L]	427,8 ± 116,1	449,7 ± 144,2	322,5 ± 116,4***	299,7 ± 147,6***
XT-Akt. RC [mU/L]	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2
XT-Akt. MS [mU/L]	44,2 ± 16,4	34,6 ± 13,0**	31,5 ± 15,3***	25,7 ± 8,1***
OA	117 (88,6%)	27 (96,4%)	23 (63,9%)	20 (64,6%)

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Afib Arthrofibrose-Score, $\text{Zeitpunkt}_{\text{Diagnose}}$ Zeitfenster zwischen Operation und Blutentnahme/Diagnosestellung; ROM *range of motion*; RC radiochemischer Assay zur Bestimmung der XT-Aktivität; MS massenspektrometrischer Assay zur Bestimmung der XT-Aktivität; OA Osteoarthritis.

Die Serum-XT-Aktivität wurde über einen XT-I-spezifischen, radiochemischen Assay sowie einen XT-II-spezifischen massenspektrometrischen Assay in der Kontroll- und der Arthrofibrose-Kohorte quantifiziert. Der favorisierte Substratumsatz durch eine Isoform beruht auf der Stringenz der Isoenzyme hinsichtlich des verwendeten Substrates (Brinkmann *et al.* 1997; Casanova *et al.* 2008). Bezüglich der radiochemisch determinierten XT-I-Aktivität konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollkohorte und den

Afib-Kohorten verzeichnet werden (s. Abb. 3.31). Im Gegensatz dazu konnte für die XT-II-Aktivität mittels MS-Assay eine sukzessive Verminderung mit steigendem Schweregrad der Arthrofibrose im Vergleich zur Kontrollkohorte detektiert werden. So wurde die XT-II-Serum-Aktivität in den Kohorten Afib1 bis Afib3 um das 0,8-Fache ($\pm 0,1$), das 0,7-Fache ($\pm 0,1$) bzw. das 0,6-Fache ($\pm 0,1$) reduziert. Die beobachtete Reduktion der XT-II-Serum-Aktivität korrelierte mit einer Verminderung der Thrombozytenzahl ($r = 0,478$; $p < 0,001$).

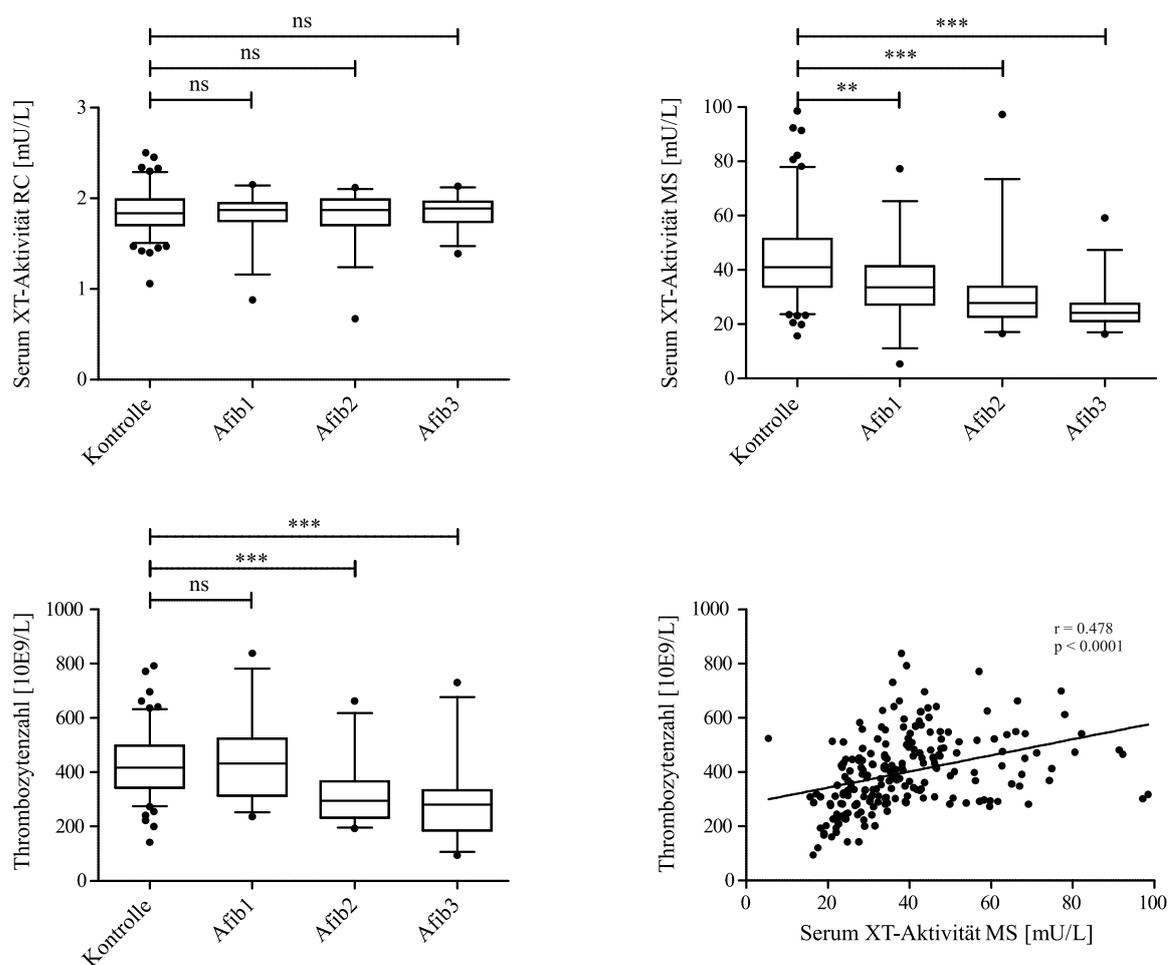


Abbildung 3.31: Vergleichende Analyse der quantifizierten Serum-XT-Aktivität und Thrombozytenzahl zwischen Kontroll- und Afib-Patienten. Die analytischen Parameter wurden in einer Kontrollkohorte ($n = 132$) sowie drei nach Schweregrad eingestufteten Patienten-Kohorten Afib1 bis Afib3 ($n_{\text{gesamt}} = 95$) bestimmt. Die Serum-XT-Aktivität wurde sowohl über einen radiochemischen (RC) als auch einen massenspektrometrischen (MS) Test quantifiziert. Gezeigt ist der Median als horizontale Linie im Box-Whisker-Plot (25 bis 75%iges Perzentil; Whiskers: 5 bis 95%iges Perzentil; ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.3.4 Messung der Galectin-3- und GDF-15-Serumkonzentration bei Arthrofibrose-Patienten

Neben der XT-Aktivität wurde die Konzentration der beiden weiteren Fibrose-assoziierten Parameter Galectin-3 und GDF-15 (*growth differentiation factor-15*) im Serum der Kontroll- und Afib-Kohorten mittels Immunoassay quantifiziert. Die Analyse ergab, dass die Konzentrationsspiegel an Galectin-3 und GDF-15 zwischen gesunden Kontrollen und Afib-Patienten keiner starken Regulation unterlagen und sich nur geringfügig voneinander unterschieden (s. Abb. 3.32).

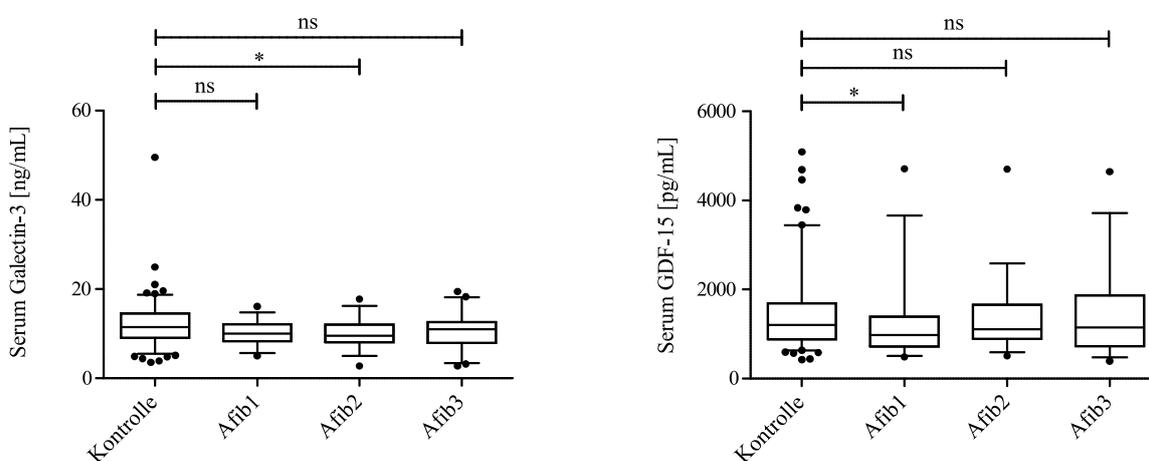


Abbildung 3.32: Vergleichende Analyse der Galectin-3- und GDF-15-Serumkonzentration zwischen Kontrollen und Afib-Patienten. Die analytischen Parameter wurden in einer Kontrollkohorte ($n = 132$) sowie drei nach Schweregrad eingestuften Patienten-Kohorten Afib1 bis Afib3 ($n_{\text{gesamt}} = 95$) mittels Immunoassay bestimmt. Gezeigt ist der Median als horizontale Linie im Box-Whisker-Plot (25 bis 75%iges Perzentil; Whiskers: 5 bis 95%iges Perzentil; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$).

4. Diskussion

Die humanen Isoenzyme Xylosyltransferase-I und -II (XT-I/XT-II) katalysieren den initialen Glykosylierungsschritt von Proteoglykanen, indem sie durch den Umsatz des Substrates UDP-Xylose definierte Serinreste im Proteoglykan-*core*-Protein xylosylieren (Schwartz 1977; Kearns *et al.* 1991). Eine *in vivo* gesteigerte *XYLT* mRNA Expression und XT-Aktivität ist mit einer abnormen Biosyntheserate und Akkumulation von Proteoglykanen assoziiert (Götting *et al.* 2000a; Prante *et al.* 2007; Kuhn *et al.* 2009). Die resultierende, pathologische Umstrukturierung sowie der Funktionsverlust der extrazellulären Matrix trägt maßgeblich zu der Manifestation fibrotischer Erkrankungen bei (Swann *et al.* 1985; Westergren-Thorsson *et al.* 1993; Wynn 2008). Trotz einer umfassenden, biochemischen Charakterisierung der XT-Isoformen in den vergangenen Jahren ist die Rolle der XT in dem komplexen Netzwerk fibrotischer Remodellierungsprozesse jedoch noch weitestgehend ungeklärt (Götting *et al.* 2000b; Schön *et al.* 2006b; Pönighaus *et al.* 2007).

Die in dieser Arbeit fokussierte Aufklärung der transkriptionalen Regulation der XT-Isoformen sowie deren Interaktion mit profibrotischen Mediatoren ist demnach essentiell für ein besseres Verständnis der physiologischen Funktion der XT.

4.1 Regulation der XT durch Promotorvariationen

Die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung der humanen *XYLT*-Promotorregionen erfolgte erst vor wenigen Jahren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der *XYLT1*- als auch der *XYLT2*-Promotorbereich einen hohen Anteil an CpG-Inseln aufweisen sowie durch das Fehlen einer für die klassische, eukaryotische Transkription charakteristischen TATA- oder CAAT-Box gekennzeichnet sind (Müller *et al.* 2009; Müller *et al.* 2013). Die hohe Frequenz von GC-reichen, regulatorischen Elementen (CpG-Inseln) in Promotor- oder *Enhancer*-Regionen wird nicht nur bei einer Vielzahl von Haushaltsgenen, sondern auch bei vielen gewebespezifisch exprimierten Genen mit der Abwesenheit einer TATA-Box oder alternativen Initiatorelementen der Transkription in Verbindung gebracht (Asundi *et al.* 1998; Redell und Tempel 1998). Aufgrund dieser diffusen Verteilung GC-reicher DNA-Elemente in Promotoren, kann diesen neben der Aufrechterhaltung einer Basalexpression jedoch keine eindeutige Beteiligung an einem physiologischen Prozess oder einem regulativen Mechanismus zugesprochen werden (Hapgood *et al.* 2001).

Nach bisherigem Kenntnisstand erfolgt die basale, transkriptionale Aktivierung des *XYLT1*-Promotors vornehmlich über die Transkriptionsfaktoren SP1 und AP1 (Müller *et al.* 2009). Die *XYLT2*-Promotorsequenz hingegen beinhaltet neben SP1-Bindestellen zusätzliche Bindungspositionen für die Transkriptionsfaktoren AP2 und HNF4 α (Müller *et al.* 2013). Beide *XYLT*-Promotoren wurden bisher keiner weitergehenden Sequenzanalyse unterzogen, sodass weder Kenntnisse über deren Konservierungsgrad noch die Frequenz regulatorischer Sequenzvariationen vorhanden sind. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin zu überprüfen, ob Sequenzvariationen in den *XYLT*-Promotorbereichen unmittelbaren Einfluss auf die Promotoraktivität und die natürliche Variabilität der Serum-XT-Aktivität ausüben.

4.1.1 Entschlüsselung der vollständigen *XYLT1*-Promotorsequenz

Um eine Genotypisierung der *XYLT1*-Promotorregion vorzunehmen, wurde diese zunächst vollständig mittels PCR aus der genomischen DNA gesunder Blutspender amplifiziert. Als methodisch extrem schwierig stellte sich hierbei die Amplifikation des Sequenzabschnitts von 400 bp unmittelbar stromaufwärts des Translationsstarts heraus, da dieser einen GC-Gehalt von 75 % aufweist. Bisher konnte für dieses Promotorfragment kein PCR-System etabliert werden, weshalb die initiale Promotorklonierung auf der Verwendung partiell gensynthetisch generierter Fragmente beruhte (Müller *et al.* 2009). Die Amplifikation des Fragmentes gelang erstmals im Rahmen dieser Arbeit über eine *Slowdown*-PCR. Diese wurde explizit für die Amplifikation GC-reicher Promotoren entwickelt (Bachmann *et al.* 2003; Frey *et al.* 2008). Das Prinzip beruht auf der Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer spezifischen *Primer*-Bindung an das *Template*. Diese wird durch das progrediente Durchlaufen eines *Annealing*-Temperatur-Gradienten sowie minimierte Heiz- und Kühlraten erzielt.

Mittels *in silico* Analyse konnte im *XYLT1*-Promotor an Position c.-387 bis c.-364 eine Sequenz identifiziert werden, die den Kriterien einer potenziellen G-Quadruplexstruktur ($G_3\text{-}_5N_{L1}G_3\text{-}_5N_{L2}G_3\text{-}_5N_{L3}G_3\text{-}_5$) entspricht. Die Sequenzabfolge besteht aus vier Guanintri- bis pentameren, die jeweils durch Nukleotidbrücken von einem bis sieben Basenpaaren getrennt werden. G-Quadruplexe wurden bereits vermehrt in eukaryotischen Promotoren identifiziert und bilden über Hogsteen-Basenpaarungen hochkomplexe, sekundäre DNA-Strukturen deren funktionelle Bedeutung in der transkriptionalen Regulation verankert ist (Burge *et al.* 2006; Qin und Hurley 2008). Die Existenz eines G-Quadruplexes im *XYLT1*-Promotor könnte maßgeblich zu der Ausbildung einer komplexen Sekundärstruktur beitragen, weshalb eine Amplifikation via PCR erschwert wird. Die obligate Auflockerung der Sekundärstruktur

erfolgte über die Verwendung eines dGTP-Analogons, 7-deaza-dGTP. Dieses wird während der *Slowdown*-PCR in den DNA-Doppelstrang eingefügt und minimiert die Ausbildung von Hogsteen-Basenpaarungen ohne dass die Watson-Crick-Basenpaarungen beeinträchtigt werden, sodass die DNA in einer für die Polymerase zugänglichen Form vorliegt (Jung *et al.* 2002; Wanrooij *et al.* 2012). Herkömmliche PCR-Additive wie Betain oder DMSO sind für diese Anwendung ungeeignet (Jensen *et al.* 2010).

Mit der etablierten Technik konnte die vollständig *XYLTI*-Promotorregion in Form von Fragmenten aus der genomischen DNA von gesunden Blutspendern amplifiziert werden. Im Jahr 2013 beschrieben Khair *et al.* die vollständige Amplifikation des unfragmentierten *XYLTI*-Promotors unter Verwendung eines auf GC-reiche Fragmente abgestimmten Polymerase-Reaktionsansatzes (Khair *et al.* 2013). Die mit der NCBI-gelisteten Referenzsequenz (*GenBank accession no.* NG_015843.1) übereinstimmende Amplifikatsequenz von Khair *et al.* konnte in dieser Arbeit jedoch in keiner der 100 sequenzierten Proben reproduziert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung der *XYLTI*-Promotorregion ergab, dass diese den 238 bp umfassenden Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} enthält, der nicht in der somit unvollständigen Referenzsequenz des *XYLTI*-Gens enthalten ist (s. Abb. 3.2). Über die hohe Übereinstimmung eines Sequenz-Alignments dieses neu identifizierten Sequenzabschnitts mit evolutionär verwandten Spezies konnte die Unvollständigkeit der Referenzsequenz sowie die damit verbundene Validität der erstmals in dieser Arbeit detektierten Sequenz im humanen Genom verifiziert werden (s. Abb. 3.3).

Durch den Vergleich mit alternativen humanen Referenzsequenzen konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen der Sequenzierung des humanen Genoms durch Craig Venter generierte *Shotgun*-Sequenz NW_001838365.2 einen Teilbereich von 203 bp des Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} beinhaltet. Dass diese Sequenz frühzeitig abbricht, untermauert die Hinweise auf eine hochkomplexe Struktur der DNA, die nicht mit standardisierten Methoden amplifizierbar und sequenzierbar ist. Eine alternative humane Referenzsequenz, die den vollständigen Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} kodiert, ist in keiner Datenbank vorhanden. Demnach wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die vollständige Sequenzierung des humanen *XYLTI*-Promotors durchgeführt.

Die über eine *in silico* Analyse durchgeführte Charakterisierung des bisher unbeschriebenen Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} ergab, dass dieser eine Vielzahl von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der Familie EGRF (*early growth response factors*), SP1 (*specificity protein 1 family*) und KLFS (*Krüppel like family of transcription factors*) aufweist (s. Abb.

3.4). Die experimentelle Inhibition von SP1-Transkriptionsfaktoren wurde bereits mit einer verminderten Expression von Genen in Verbindung gebracht, die Kollagene, PG und weitere Bestandteile der ECM kodieren (Verrecchia *et al.* 2001b). Eine erhöhte SP1-Bindungsaffinität zu dem Kollagen Ia1 (*COL1A1*)-Promotor wurde zudem in Fibroblasten von Sklerodermie-Patienten beobachtet und gibt Hinweise auf die Assoziation dieser Transkriptionsfaktorfamilie mit der Entstehung von Fibrosen (Hitraya *et al.* 1998). Den quantitativ höchsten Anteil an Transkriptionsfaktor-Bindestellen in *XYLTI*_{238*} nahmen EGR1-Bindestellen ein. EGR1 (*early growth response-1*) ist ein *downstream*-Mediator von TGF- β 1 und induziert die *in vivo* und *in vitro* erfolgende SMAD-unabhängige Kollagenexpression bei systemischer Sklerodermie (Bhattacharyya *et al.* 2008). Auch die identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen für Proteine der KLFS-Familie können mit Fibrogenese assoziiert werden. So wird KLF6 eine entscheidende Funktion bei der TGF- β 1 regulierten Epithel-mesenchymalen Transition zugesprochen, die als Induktor renaler Fibrosierung anerkannt ist (Holian *et al.* 2008).

Um zu analysieren, welchen Einfluss der Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} auf die Promotoraktivität ausübt, wurde dieser mittels ortsgerichteter Mutagenese in analog zu der Referenzsequenz aufgebaute, von Müller *et al.* generierte, Promotorkonstrukte inseriert. Anschließend erfolgte die Transfektion der Konstrukte in Chondrosarkomazellen. Diese sind durch eine starke basale *XYLTI* Expression gekennzeichnet, sodass von einer Expression der für die Analyse der Promotoraktivität obligaten Transkriptionsfaktoren ausgegangen werden kann (Roch *et al.* 2009). Die Insertion des Sequenzabschnitts *XYLTI*_{238*} ging mit einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität einher (s. Abb. 3.5). Demnach müssen in diesem Sequenzabschnitt Elemente kodiert sein, die entscheidend an der basalen Expression des *XYLTI*-Gens beteiligt sind. Welchen der Transkriptionsfaktor-Bindestellen eine derartige Funktion zugesprochen werden kann, muss weiterführend durch die Generierung von Deletionskonstrukten überprüft werden.

Des Weiteren konnte für die vollständige Promotorregion erstmals eine Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch TGF- β 1 aufgezeigt werden (s. Abb. 3.6). Das analog zu der unvollständigen Referenzsequenz hergestellte Konstrukt hingegen wies weder in dieser noch in vergangenen Studien eine Sensibilität gegen TGF- β 1 auf (Müller 2009). Die Hypothese einer TGF- β 1 basierten Induktion der Promotoraktivität über cis-regulatorische Elemente außerhalb der *XYLTI*-Promotorregion konnte somit durch die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegt werden. Die Divergenz in der Induzierbarkeit des unvollständigen und des

vollständigen *XYLT1*-Promotorkonstrukte durch TGF- β 1 zeigt erstmals die bedeutsame Rolle des Sequenzabschnitts *XYLT1*_{238*} für die Funktionalität des *XYLT1*-Promotors auf.

4.1.2 Charakterisierung von Einzelnukleotid-Variationen im *XYLT1*-Promotor

Die Anzahl der detektieren, natürlich vorkommenden Variationen im proteinkodierenden Bereich des *XYLT1*-Gens ist sehr gering (Schön *et al.* 2005; Schön *et al.* 2006a; Schön *et al.* 2006d). Bis vor Kurzem war lediglich die Variation c.343G>T mit dem Auftreten diabetischer Nephropathie assoziiert, während die Intron-Variationen c.10C>T und c.30G>T als Risikofaktoren für Typ-1 Diabetes beschrieben wurden (Bahr *et al.* 2006; Schön *et al.* 2006c). Kürzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass die *Missense*-Mutation c.1441C>T (p.R481W) in der katalytischen Domäne der XT-I zu einer Fehllokalisation und einer eingeschränkten Proteoglykan-Biosyntheserate führt, die in der Ausprägung eines Zwergenwuchssyndroms und intellektueller Beeinträchtigung resultiert (Schreml *et al.* 2013). 2014 wurden zudem fünf *XYLT1*-Mutationen bei Patienten mit Desbuquois dysplasia Typ 2, eine Erkrankung die durch eine pathologische Ossifikation charakterisiert ist, identifiziert (Bui *et al.* 2014).

Die *XYLT1*-Promotorregion wurde im Gegensatz zu dem *XYLT1*-Gen erstmals in dieser Arbeit auf den Konservierungsgrad und Sequenzvariationen untersucht. Die einzige bisher beschriebene Einzelnukleotid-Variation (*single nucleotide variation*, SNV) im *XYLT1*-Promotor ist die Variation c.-5C>G, die in vorhergehenden Arbeiten über die Sequenzierung des ersten Exons identifiziert wurde (Schön *et al.* 2005).

In der *XYLT1*-Promotorregion von 100 Blutspendern wurden die SNV c.-403C>T und c. 1088C>A identifiziert. Beide SNV unterlagen keiner signifikanten Kopplung und konnten nicht mit einer Änderung der Serum-XT-Aktivität assoziiert werden. Hingegen zeigte die SNV c.-1088A einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die Promotoraktivität (s. Abb. 3.7). Mittels *in silico* Analyse konnte nachgewiesen werden, dass der Austausch c.-1088C>A mit der Entstehung einer SMAD3-Bindestelle einhergeht. SMAD3 ist ein cytoplasmatischer Mediator von TGF- β 1, der nach der TGF- β -Rezeptoraktivierung zunächst rekrutiert, phosphoryliert und schließlich mit einem Co-SMAD-Faktor komplexiert wird (s. Tab. 3.4). Der aktive Transkriptionsfaktorkomplex wird in den Nukleus transloziert und bindet dort an spezifische Erkennungssequenzen (Derynck und Feng 1997; Verrecchia und Mauviel 2002). Eine Modulation der Genexpression diverser Matrixproteine erfolgt über TGF- β 1 und die

SMAD-Kaskade (Verrecchia *et al.* 2001a). Die Reduktion der Promotoraktivität des *XYLT1*-Promotorkonstruktes, das für eine zusätzliche SMAD3-Bindestelle kodiert, verhält sich invers zu dem durch TGF- β 1 ausgelösten induktiven Effekt auf die XT-I. Aufgrund dessen ist eine weiterführende Überprüfung der Aktivität der Transkriptionsfaktor-Bindestelle sowie eine Verifizierung der DNA-SMAD3 Bindung mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) sinnvoll.

Da sich die beobachtete Reduktion der Promotoraktivität nicht in einer Veränderung der XT-Aktivität im Serum widerspiegelte, lässt dies darauf schließen, dass die XT-I möglicherweise nur einen marginalen Beitrag zu der physiologischen Serum-Gesamtaktivität leistet. Diese Hypothese wird dadurch gefestigt, dass nach neuesten Erkenntnissen die XT-II das prädominante Isoenzym im murinen sowie humanen Serum ist (Condac *et al.* 2009).

4.1.3 Detektion eines Mikrosatelliten im *XYLT1*-Promotor

In Ergänzung zu den beiden erstmalig beschriebenen SNV wurde mittels Sequenzanalyse ein Mikrosatellit an der Position c.-148 bis c.-201 im *XYLT1*-Promotor identifiziert (s. Abb. 3.10). Im humanen Genom sind mehr Mikrosatelliten in den untranslatierten Regionen als in der kodierenden Region lokalisiert. Weiter ist bekannt, dass in der 5'UTR deutlich mehr Triplet-*tandem repeats* kodiert sind als in der 3'UTR. Bei der im *XYLT1*-Promotor detektierten Variation handelt es sich um eine Vervielfachung des Triplets (GGX)_n. Diese Variation ist hochfrequent und wurde bereits in 100 von 136 Mikrosatelliten in einer genomweiten Triplet-Analyse in humanen 5'UTR identifiziert (Wren *et al.* 2000).

Im Vergleich zu der starken Konservierung des *XYLT1*-Promotors außerhalb der detektierten Mikrosatelliten-Region, unterliegt diese einer hohen genotypischen Variabilität. 45 der 100 typisierten Blutspender wiesen eine homozygote Variante des Mikrosatelliten auf. Hierbei wurden neben dem Wildtyp-Genotyp fünf Variationen des Mikrosatelliten nachgewiesen. Bei den anderen 55 Blutspendern zeigten sich Variationen dieses Mikrosatelliten im heterozygoten Status. Der exakte Genotyp dieser heterozygoten Varianten konnte weder mittels Sanger- noch Pyro-Sequenzierung aufgeklärt werden, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass noch weitere Sequenzvariationen in diesem Promotorabschnitt vorkommen. Alternative Herangehensweisen zur Genotypisierung der heterozygot vorliegenden Varianten könnte in weiteren Arbeiten die Analyse mittels hochauflösender

Schmelzkurvenanalytik oder die selektive Klonierung und anschließende Sequenzierung der DNA-Einzelstränge sein.

Shimajiri *et al.* beschreiben eine Abhängigkeit der transkriptionalen Promotoraktivität sowie der korrespondierenden Enzymaktivität der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) von der Anzahl der *tandem repeats* in der Promotorregion (Shimajiri *et al.* 1999). Wenngleich eine Korrelation der *tandem repeat*-Zahl mit der Ausprägung der Basalexpression eines *XYLT1*-Promotorkonstrukts bzw. mit dem durch TGF- β 1 verursachten induktiven Effekt in der vorliegenden Arbeit nicht aufgezeigt werden konnte, zeigte sich eine Konstrukt-bedingte Variabilität der gemessenen Promotoraktivität (s. Abb. 3.11).

Auch die Expression des humanen *COLIA2* Promotors ist abhängig von der Anzahl der Dinukleotid-*repeats*, wenngleich keine lineare Korrelation zu deren Anzahl hergestellt werden konnte (Akai *et al.* 1999). Demnach ist der detektierte *XYLT1*-Mikrosatellit weder in die Kategorie der *tandem repeats* einzuordnen, die eine definierte Anzahl an *repeats* für die Genexpression erfordert, noch scheint eine proportionale Abhängigkeit der Transkriptionsstärke von der *repeat*-Zahl vorzuliegen. Dennoch zeigt die *in silico* Analyse, dass durch die natürlich vorkommenden *XYLT1*-Mikrosatellit-Varianten die Anzahl an EGRF-Transkriptionsfaktor-Bindestellen beeinflusst wird (s. 3.1.3.2). Ob *in vivo* eine Regulation der Genexpression über die Anzahl der *tandem repeats* erfolgt, oder ob möglicherweise die Affinität bindender Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, muss in weiteren Experimenten eruiert werden.

Eine Assoziation der Mikrosatellit-Varianten mit Änderungen der Serum-XT-Aktivität wurde nicht überprüft, da die Kohortengrößen der einzelnen Variationen zu klein waren um statistisch valide Daten zu erzeugen. Eine Ausweitung der Kohorte erscheint somit notwendig.

4.1.4 Charakterisierung von Einzelnukleotid-Variationen im *XYLT2*-Promotor

Analog zu der starken Konservierung des *XYLT1*-Gens konnten auch im *XYLT2*-Gen vergleichsweise wenige Sequenzvariationen identifiziert werden. Einige der Sequenzvariationen konnten als signifikante Risikofaktoren für Pseudoxanthoma elasticum, Hypertonie bei Typ1-Diabetes oder Osteoarthritis aufgezeigt werden (Schön *et al.* 2005;

Schön *et al.* 2006a; Schön *et al.* 2006d). Ein kausaler Zusammenhang zwischen den *XYLT2*-Mutationen und einer Erkrankung existiert bis heute nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Konservierungsgrad des *XYLT2*-Promotors untersucht. Lediglich der an das Exon 1 angrenzende Sequenzabschnitt wurde in vorhergehenden Arbeiten bereits sequenziert und identifizierte die Sequenzvariationen c.-86delG, c.-84G>A, c.-72G>C und c.-35G>C (Schön *et al.* 2006d).

Über die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der vollständigen *XYLT2*-Promotorregion aus der genomischen DNA gesunder Blutspender wurden die fünf SNV c.-80delG, c.-84G>C, c.-188G>A, c.-664T>G und c.-1044G>A detektiert und deren Allelfrequenz in der genomischen DNA von 100 gesunden Blutspendern determiniert. Die SNV c.-80delG stimmt mit der von Schön *et al.* beschriebenen Variante c.-86delG überein (Schön *et al.* 2006a). Die Diskrepanz in der Nomenklatur beruht darauf, dass die Lokalisation des deletierten Guanins aufgrund einer Abfolge von sieben Guaninen in der Wildtypsequenz technisch mittels Sequenzierung nicht determiniert werden kann. Auch die SNV an der Position c.-84 wurde bereits beschrieben, wenngleich in keiner der in dieser Arbeit sequenzierten Proben ein Basenaustausch G>A detektiert wurde.

Für die SNV c.-80delG und c.-84G>C wurde eine genetische Kopplung festgestellt (s. Abb. 3.15). Weiterhin konnte für keine der fünf SNV eine signifikante Assoziation mit einer Veränderung der Serum-XT-Aktivität aufgezeigt werden. Analog wurde auch die Promotoraktivität der untersuchten *XYLT2*-Promotorkonstrukte durch selektive Einführung der SNV nur marginal, jedoch nicht signifikant, reduziert. Beide Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei keiner der detektierten SNV um regulatorische SNV handelt, die Einfluss auf die Genexpression nehmen (De Gobbi *et al.* 2006). Untermauert wird diese Hypothese durch die Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindestellen an den entsprechenden Sequenzpositionen. Für die SNV c.-188G>A, c.-664T>G und c.-1044G>A konnten keine Änderungen im Profil der Bindestellen verzeichnet werden. Die in Tab. 3.8 aufgelisteten Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind, bis auf die Ausnahme der Bildung einer EGR1-Bindestelle durch die Variation c.-84G>C, durch deren Wegfall in Verbindung mit dem Auftreten der SNV c.-80delG und c.-84G>A gekennzeichnet. Eine EMSA-Analyse könnte Aufschluss über SNV-bedingte Änderungen in der Affinität bestimmter Proteine zu den DNA-Sequenzen liefern, wenngleich den *XYLT2*-Promotorvariationen aufgrund der diskutierten Ergebnisse höchstwahrscheinlich keine funktionelle Relevanz zukommt.

Ergänzend könnte auch eine Analyse der Auswirkung der gekoppelten SNV auf die Promotoraktivität vorgenommen werden.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit über die Etablierung eines speziellen PCR-Systems erstmals der in allen Referenzsequenzen fehlende Sequenzabschnitt *XYLTI*_{238*} mit einer Länge von 238 bp in der *XYLTI*-Promotorregion identifiziert werden. Dessen Charakterisierung zeigte, dass in dieser Region eine Vielzahl von Transkriptionsfaktor-Bindestellen kodiert sind, die für die basale Expression und Induktion der XT-I durch TGF- β 1 essentiell sind. Über die Sequenzierung der *XYLT*-Promotoren konnten ein Mikrosatellit und sieben SNV identifiziert werden. Dies gibt Hinweise darauf, dass die *XYLT*-Promotoren analog zu den korrespondierenden, proteinkodierenden *XYLT*-Gensequenzen einen hohen Konservierungsgrad aufweisen. Es konnte keine signifikante Assoziation einer regulatorischen SNV mit der Variabilität der natürlichen Serum-XT-Aktivität ausgemacht werden.

Mit der durchgeführten Sequenzanalyse wurde eine wichtige Grundlage geschaffen, um weiterführend putative Assoziationen der detektierten Promotor-Sequenzvariationen mit fibrotischen Erkrankungen aufzudecken.

4.2 Analyse der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren

Gegenwärtig gibt es weder einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz zur Vermeidung oder Behandlung, noch einen anerkannten nicht-invasiven Biomarker für Diagnostik und Prognose einer Fibrose. Aufbauend auf der Eignung der XT-Aktivität als Biomarker des Proteoglykan-Stoffwechsels könnte eine gezielte Beeinflussung der XT-Regulation grundlegende Erkenntnisse für die Entwicklung einer therapeutischen Option liefern. Um Einblicke in die Regulation der XT in der Fibrogenese zu erhalten und mögliche therapeutische Angriffspunkte aufzuzeigen, wurde im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit der Einfluss profibrotischer Mediatoren auf die XT untersucht.

4.2.1 Etablierung eines Zellkulturmodells zur Myofibroblasten-Kultivierung

Um zu eruieren welche profibrotischen Mediatoren Einfluss auf die XT nehmen, sollten diese als Supplement in den Zellkulturüberstand dermalen Fibroblasten gegeben und die Auswirkungen auf die *XYLT* Genexpression und die XT-Aktivität analysiert werden. Da die aktive Zelle der Fibrosierung nicht der residente Fibroblast, sondern der Myofibroblast ist, wurde zunächst die Etablierung eines Zellkulturmodells vorgenommen, dass die Differenzierung von Myofibroblasten aus Fibroblasten ermöglicht.

Die herkömmliche Kultivierung dermalen Fibroblasten erfolgt unter Supplementation mit 10 % FCS. Dieses beinhaltet jedoch einen hohen nicht standardisierten und quantifizierten Anteil an Wachstumsfaktoren, der zudem einer starken Chargenvariabilität unterliegt (Honn *et al.* 1975; Childs *et al.* 1982). Li *et al.* demonstrierten 2007, dass die Stimulation der Hyaluronsäuresynthese in dermalen Fibroblasten durch 10 % FCS ohne PDGF-BB stärker ausfällt, als wenn eine Supplementation von PDGF-BB (*platelet derived growth factor-BB*) in 0,1 % FCS vorgenommen wird (Li *et al.* 2007). Der Nachweis eines induktiven Effekts durch einen profibrotischen Mediator wird demnach zunehmend erschwert, wenn sich die Zellen bedingt durch die FCS-Supplementation bereits in einem induzierten Zustand befinden. Somit wurde eine Minimierung des Einflusses profibrotischer Faktoren aus dem FCS durch einen Serumentzug auf 0,1 % FCS durchgeführt.

Neben dem Zellkulturmedium sind die Zelldichte und die Kultivierungsmatrix weitere Parameter, die bei der Kultivierung von Myofibroblasten beachtet werden müssen (McFarland *et al.* 2011). Masur *et al.* konnten erstmals aufzeigen, dass eine Erniedrigung der Zelldichte

proportional mit einer verstärkten Myofibroblasten-Differenzierung einhergeht (Masur *et al.* 1996). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer beobachteten, Zelldichte-abhängigen Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die bei konfluenten Zellen in einer verschlechterten Bindung von Wachstumsfaktoren resultiert (Rizzino *et al.* 1988; Petridou *et al.* 2000). Auch *in vivo* erfolgt durch eine Läsion, die den Wundheilungsprozess und damit die Myofibroblasten-Differenzierung initiiert, eine Reduktion der Zelldichte. In Anlehnung an diese Studien wurden die dermalen Fibroblasten in dieser Arbeit in einer Zelldichte von 40 bis 45 Zellen/mm² ausgesät, die es erlaubt eine ausreichende Menge an RNA für die Analytik zu isolieren und trotzdem einen hohen Differenzierungsgrad der Myofibroblasten zu erreichen. Unter herkömmlichen Bedingungen werden Fibroblasten in Zelldichten von ca. 250 Zellen/mm² ausgesät.

Im Vergleich zu einer *Monolayer*-Kultivierung spiegelt eine dreidimensionale Kultivierungsmatrix die natürliche, extrazelluläre Umgebung von Fibroblasten in der fibrotischen Gewebe-Remodellierung wider (Grinnell 2003; Lee *et al.* 2004). Die klassische Kultivierung von Fibroblasten auf unbeschichteten Zellkulturschalen, die auch in dieser Arbeit angewandt wurde, rückt daher immer mehr in den kritischen Fokus. In Bezug auf die Kultivierung von Myofibroblasten muss jedoch berücksichtigt werden, dass die dreidimensionale Kultivierung den entscheidenden Nachteil einer verringerten Matrixsteife birgt. Die in gesundem Lebergewebe vorliegende Resistenz gegen Deformation (Messgröße: E, *Young's elastic modulus*) beträgt ca. 300 Pa, während eine Leberfibrosierung zu einer Versteifung und einer Deformationsresistenz von 20 kPa führt (Georges *et al.* 2007; Yin *et al.* 2007). Die Deformationsresistenz von Zellkulturschalen aus Plastik wird hingegen im Giga-Pa-Bereich eingeordnet. Somit werden in den meisten Arbeiten Zellen in einer mechanisch unphysiologischen Umgebung kultiviert. Mechanischer Stress beeinflusst eine Vielzahl biochemischer Signalkaskaden des Zellwachstum, der Motilität und der Vitalität (Wells 2008). Einzig für die Kultivierung des Myofibroblasten wird eine Kultivierung auf Plastikschalen als bestes *in vitro* Modell postuliert, da es eine optimale Nachahmung der fibrotischen Gewebeversteifung simuliert (Tomasek *et al.* 2002; Hinz 2010).

4.2.2 XT als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung

Eine erhöhte Serum-XT-Aktivität konnte in vergangenen Studien mit fibrotischen Erkrankungen differenziellen Ursprungs assoziiert werden (Götting *et al.* 1999; Götting *et al.* 2000a; Kuhn *et al.* 2009). Obwohl eine Dysregulation der XT somit bereits mit Fibrosen in

Verbindung gebracht werden konnte, wurde erstmals in dieser Arbeit analysiert, welche Rolle die XT in der Entstehung der Fibrose und somit in der Myofibroblasten-Differenzierung einnehmen.

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde zunächst die Expression von α -Glattmuskelaktin als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung im etablierten Zellkulturmodell überprüft, um dessen Validität zu verifizieren. Es konnte demonstriert werden, dass eine Induktion der *ACTA2* mRNA- und Proteinexpression durch TGF- β 1 in Abhängigkeit von einer geringen Zelldichte und dem damit resultierenden hohen Ausmaß der Myofibroblasten-Differenzierung erfolgte (s. Abb. 3.16). Andere Studien, die *ACTA2* als zentral reguliertes Gen der Fibrosierung hervorheben, wurden bereits in Lungenfibroblasten oder einem Ratten-Modell durchgeführt (Desmoulière *et al.* 1993; Hinz *et al.* 2001).

Eine weitere Bestätigung der Funktionalität des Modells lieferte die relative Quantifizierung der *TGF- β 1* und *DCN* mRNA Expression (s. Abb. 3.16). Während die subkonfluent ausgesäten Fibroblasten durch eine hohe *TGF- β 1* Basalexpression und eine niedrige *DCN* mRNA Basalexpression gekennzeichnet waren, konnte in konfluenten Zellen eine gegensätzliche Regulation detektiert werden. Beschriebene Effekte beruhen darauf, dass die Ausbildung von Myofibroblasten mit einer starken, autokrinen Freisetzung von TGF- β 1 und einer geringen Expression des TGF- β 1 inhibierenden Proteoglykans Decorin assoziiert wird (Yamaguchi *et al.* 1990; Dabiri *et al.* 2006).

Dass die beschriebenen Änderungen im Genexpressionsprofil durch TGF- β 1 verursacht wurden, konnte über eine ALK5-Inhibition abgesichert werden. Die Inhibition des TGF- β -Rezeptor 1 (TGF β R1), der auch als ALK5 (*Activin receptor like kinase 5*) bezeichnet wird, revidierte den durch TGF- β 1 vermittelten, induktiven Effekt. Die Inhibition der TGF- β 1 Signalkaskade über ALK5 wurde bisher erfolgreich in einem Ratten-Modell zur Wundheilung eingesetzt (Boys *et al.* 2012). Obwohl TGF- β 1 aufgrund seines diffusen Wirkspektrums kein geeignetes *Target* für eine antifibrotische Therapie zu sein scheint, wird auch der Einsatz von ALK5-Inhibitoren zur Behandlung von Leberfibrosen diskutiert (de Gouville und Huet 2006).

Neben der Regulation der Embryogenese und Zellproliferation nimmt TGF- β 1 als Ligand eine Schlüsselposition in der Induktion zahlreicher ECM-Komponenten wie Kollagenen, Proteoglykanen und TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) ein und partizipiert somit entscheidend an der Wundheilung und Fibrosierung (Derynck und Feng 1997; Verrecchia und Mauviel 2002; Leask und Abraham 2004). Im Gegensatz zur adulten Wundheilung konnte in

embryonalen Wunden ein erniedrigter TGF- β 1-Spiegel detektiert werden, der zu einem narbenfreien Wundverschluss beitragen könnte (Ferguson und O'Kane 2004). In Studien zur chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen ergaben sich auch erste Hinweise auf eine Beteiligung der TGF- β Familie an der XT-Regulation (Prante *et al.* 2006; Müller *et al.* 2008). Die Identifizierung von TGF- β 1 als Schlüsselmediator der XT-I erfolgte in kardialen Fibroblasten (Prante *et al.* 2007).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eignet sich die Induktion der *XYLT1* mRNA Expression und auch der XT-Aktivität ebenso gut wie die *ACTA2* mRNA Expression als Marker der Myofibroblasten-Differenzierung (Faust *et al.* 2013). Weiter konnte herausgestellt werden, dass die Ermittlung des Grades der Myofibroblasten-Differenzierung im Zellkulturmodell über die XT-Aktivität bereits nach 48 h möglich ist (s. Abb. 3.18). Die *ACTA2* Proteinexpression lässt sich hingegen erst nach 120 h mittels Immunfluoreszenz nachweisen (s. Abb. 3.17). Da die Induktion der XT-Aktivität progredient mit zunehmender Inkubationszeit anstieg, scheint insbesondere die Messung der XT-Aktivität ein wertvolles Maß zur Quantifizierung der Myofibroblasten-Differenzierung darzustellen. In Anbetracht dessen, dass die siRNA-vermittelte Reduktion der *XYLT1* mRNA Expression in dermalen Fibroblasten zu einer signifikanten Verringerung der GAG-Synthese führt (Dziedzic *et al.* 2010), scheint die kombinierte Inhibition der *XYLT1* und *ACTA2* mRNA Expression eine vielversprechende therapeutische Option für Fibrosierungen zu sein und sollte in nachfolgenden Studien evaluiert werden.

Im Gegensatz dazu eignet sich die *XYLT2* mRNA Expression nicht als fibrotischer Marker. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der in kardialen Fibroblasten gemessenen, fehlenden Beteiligung der XT-II am fibrotischen Geschehen (Prante *et al.* 2007). In dieser Arbeit konnte jedoch erstmals eine kompensatorische Induktion der XT-II bei Inhibition der XT-I durch einen ALK5-Inhibitor nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht sowohl die regulatorische Divergenz der XT-Isoformen als auch deren mögliche Interaktion.

4.2.3 XT-Regulation durch Wachstumsfaktoren und Hormone

Fibrotische Gewebe-Remodellierungen werden durch die Wirkung und Interaktion diverser profibrotischer Mediatoren initiiert und moduliert. Wenngleich es zahlreiche Studien über die Beteiligung einzelner Faktoren gibt, ist die *in vivo* erfolgende regulatorische Orchestration der einzelnen Komponenten auf die XT *in vitro* schwer zu entschlüsseln.

Die Genexpressionsanalyse nach Behandlung dermalen Fibroblasten mit Activin A ergab, dass dies der einzige profibrotische Mediator neben TGF- β 1 ist, der einzeln wirkend einen induktiven Effekt auf die *ACTA2* und *XYLT1* mRNA Expression ausübte (s. Abb. 3.19). Das fibrotische Potenzial von Activin A wurde weiter durch die Analyse der XT-Aktivität untermauert (s. Abb. 3.20). Diese wurde durch die Kombination von TGF- β 1 und Activin A stärker induziert als durch TGF- β 1 allein. Demnach scheint Activin A eine wichtige Rolle in der Myofibroblasten-Differenzierung und Regulation der XT einzunehmen. Erste Erkenntnisse bezüglich einer Beteiligung von Activin A am Wundheilungsprozess wurden bereits 1996 gewonnen, als Hübner *et al.* in einem Mausmodell einen Anstieg der *Activin A* mRNA Expression mit dem Zufügen dermalen Läsionen korrelierten (Hübner *et al.* 1996). Transgene, Activin A überexprimierende Mäuse sind durch das Auftreten von dermalen Fibrosierungen gekennzeichnet, die durch den Activin A Antagonisten Follistatin revidiert werden können (Munz *et al.* 1999; Wankell *et al.* 2001). Darüber hinaus konnte auch ein experimenteller Bezug von Activin A zu Leber- und Lungenfibrose hergestellt werden (Ohga *et al.* 1996; Sugiyama *et al.* 1998).

Das extrazelluläre Protein CTGF (*connective tissue growth factor*) wies im Vergleich zu Activin A ein deutlich schwächeres fibrotisches Potenzial auf. Es übte weder Einfluss auf die *ACTA2* oder *XYLT1* mRNA Expression noch auf die XT-Aktivität aus. Lediglich in Kombination mit TGF- β 1 führt es zu einer höheren *XYLT1* mRNA Expressionssteigerung als die alleinige Behandlung mit TGF- β 1. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass CTGF ein *downstream*-Mediator von TGF- β 1 ist und transkriptional über ein TGF- β -*responsive element* im CTGF-Promotor stimuliert wird (Grotendorst *et al.* 1996). Die Wirkung von CTGF als fibrotischer Mediator wird jedoch bis heute kontrovers diskutiert. Während einerseits eine erhöhte CTGF-Serumkonzentration bei Sklerodermie-Patienten gemessen wird und die *in vivo* Überexpression von CTGF in der Maus multiorganische Fibrosen auslöst, scheint CTGF nach aktuellem Wissensstand eher eine modifizierende als eine kausale Funktion in der Pathobiochemie der Fibrosierung einzunehmen (Sato *et al.* 2000; Sonnylal *et al.* 2010). Diese Hypothese steht im Einklang mit der bereits 1999 durchgeführten Studie von Mori *et al.*, in der eine subkutane Injektion von TGF- β 1 und CTGF in einer persistenten Fibrose resultierte, wobei der Effekt nicht durch nur einen der beiden Faktoren ausgelöst werden konnte (Mori *et al.* 1999). Demnach kann vermutet werden, dass CTGF ein wichtiger Modulator, jedoch kein Schlüsselmediator der Fibrose und Induktion der XT ist.

Neben CTGF kann auch PDGF (*platelet derived growth factor*) eine modulierende Funktion in der Fibrosierung zugesprochen werden. Wenngleich PDGF-AB keinen Effekt auf die *ACTA2* mRNA Expression ausübte, so konnten dennoch eine moderate, induzierende Beeinflussung der *XYLT1* mRNA Expression und der Induktion der XT-Aktivität in Kombination mit TGF- β 1 verzeichnet werden (s. Abb. 3.19 und 3.20). Insbesondere in der Pathogenese der Sklerodermie scheint PDGF eine essentielle Funktion auszuüben. So konnte gezeigt werden, dass Sklerodermie-Fibroblasten nach TGF- β 1 Behandlung eine verstärkte Expression des PDGF-Rezeptors α aufweisen (Yamakage *et al.* 1992). Interessanterweise scheint PDGF maßgeblich an der initialen Differenzierung von Proto-Myofibroblasten beteiligt zu sein, während weder *in vivo* noch *in vitro* ein induzierender Effekt von PDGF auf die *ACTA2* mRNA Expression differenzierter Myofibroblasten stattfindet (Rubbia-Brandt *et al.* 1991; Desmoulière *et al.* 1992). In PDGF-*Knockout* Mäusen konnten zudem keine kapillaren Perizyten oder alveolaren Proto-Myofibroblasten nachgewiesen werden, was die Hinweise auf eine Beteiligung von PDGF an der initialen Fibrosierung untermauert (Lindahl *et al.* 1997; Bostrom *et al.* 2002).

Die Untersuchung der Hormone Angiotensin-II und Endothelin-1 ergab, dass diese keinen signifikanten Einfluss auf die *ACTA2* oder *XYLT1* mRNA Expression nahmen. Demnach scheinen auch die vielfach mit Fibrosierung in Verbindung gebrachten Hormone nur als Modulatoren im Netzwerk fibrotischer Mediatoren wirksam zu sein. Die kombinierte Supplementation mit TGF- β 1 führte jeweils zu einer stärkeren Induktion der XT-Aktivität, wenngleich dieser Effekt nicht auf der Genexpressionsebene reproduziert werden konnte. Angiotensin-II ist ein *upstream*-Mediator von TGF- β 1. Die gezielte Angiotensin-II Inhibition verhindert die Entstehung renaler und kardialer Fibrosen im Tiermodell (Junaid *et al.* 1997; Taniyama *et al.* 2000). Wie Schultz *et al.* jedoch nachweisen konnten, ist es nur möglich eine kardiale Fibrose in Wildtyp- nicht aber in TGF- β 1 defizienten Mäusen auszulösen (Schultz *et al.* 2002). Folglich ist auch Angiotensin-II kein autonom aktiver fibrotischer Mediator. Vielmehr aktiviert Angiotensin-II TGF- β 1, das weiterführend die AT1-Rezeptor Expression stimuliert, sodass über eine autokrine Schleife eine Signalverstärkung erfolgt (Campbell und Katwa 1997).

Endothelin-1 fungiert als *downstream*-Mediator von TGF- β 1 und wird über einen SMAD-unabhängigen, ALK5/JNK-Signalweg stimuliert. Die Inhibition des Endothelin A/B-Rezeptors resultiert, in mit TGF- β 1 behandelten Lungenfibroblasten, in einer signifikanten Reduktion der α -Glattmuskelaktinexpression (Shi-Wen *et al.* 2007a). Im Gegensatz dazu wird

jedoch auch eine verstärkte Matrixsynthese nach Inkubation von Fibroblasten mit Endothelin-1 beschrieben, sodass keine definitive Einordnung des fibrotischen Potenzials dieses Induktors vorgenommen werden kann (Shi-Wen *et al.* 2007b). Bezüglich der Regulation der XT-I scheint Endothelin-1 einen zu vernachlässigenden Einfluss auszuüben.

Die *XYLT2* mRNA Expression wurde durch keinen der supplementierten Faktoren signifikant beeinflusst. Diese Beobachtung festigt die postulierte, untergeordnete Rolle der XT-II in der Fibrosierung.

4.2.4 Regulation der XT durch miRNAs

In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob die XT *in vitro* einer Regulation durch miRNAs unterliegen. Hierzu erfolgte die Vorhersage möglicher regulatorischer miRNAs über *target prediction tools*. Aufgrund der bis heute weit fortgeschrittenen, jedoch unvollständigen, Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der post-transkriptionalen Regulation durch miRNAs ist die präzise, mathematische Assoziation einer miRNA mit einem Zielgen sehr komplex. Folglich unterliegt jede Datenbank Algorithmen, die fortwährend angepasst und optimiert werden. Kuhn *et al.* empfehlen diesbezüglich eine multidimensionale *in silico* Analyse, um putative Defizite der mathematischen Algorithmen zu minimieren (Kuhn *et al.* 2008).

Die drei verwendeten *Web-Tools TargetScan Human, DIANA mT* und *Pic Tar* definieren in einem ersten Schritt potenzielle miRNA-Bindestellen, die nachfolgend auf ihre Konservierung zu verwandten Spezies geprüft werden (Sethupathy *et al.* 2006). Eine Auflistung der programmspezifischen Kriterien ist in Tab. 4.1 gezeigt. Unterschiede ergeben sich hierbei in der Bestimmung der mRNA/miRNA-Bindestelle, der thermodynamischen Berechnung der Stabilität der Bindung sowie der Konservierung.

Über die meta-*in silico* Analyse wurden die miR-18a und die miR-34a als die miRNAs definiert, deren Bindung an die XT-II bzw. XT-I mRNA der höchstmöglichen Wahrscheinlichkeit entspricht. Beide miRNAs wurden jeweils von allen drei Anwendungen vorgeschlagen und gegenüber diversen weiteren miRNAs bevorzugt, die schlechtere Bindungseigenschaften aufwiesen oder nur von zwei oder einer Anwendung vorgeschlagen wurden. Ein putatives Zielgen der miR-18a war, neben *XYLT2*, auch *XYLT1*. Aufgrund schlechterer *Scores* und einer fehlenden Vorhersage durch das Programm *Pic Tar* war jedoch zu erwarten, dass die *XYLT2* Expression präferiert supprimiert wird.

Tabelle 4.1: Auflistung der Kriterien der angewandten *target prediction tools*. Modifiziert nach Sethupathy *et al.* 2006.

	<i>TargetScan Human</i>	<i>DIANA mT</i>	<i>Pic Tar</i>
Bindung mRNA/miRNA			
Perfekte <i>seed</i> -Paarung	X		
Präferenz: perfekte <i>seed</i> -Paarung			X
Empirische Bindung		X	
Thermodynamik: ΔG-Berechnung			
RNA-Faltung	X	X	
Nukleinsäure-Hybridisierung			X
Konservierung			
Mensch/Maus		X	
Mensch/Schimpanse/Nager/Hund	X		X

Um zu prüfen, ob die *in silico* determinierten miRNAs auch *in vitro* eine Effektivität aufweisen, erfolgte deren Transfektion in dermale Fibroblasten. Aufgrund des experimentellen Ablaufs einer reversen Transfektion, welcher vorsieht, dass die Transfektion der Zellen direkt nach dem Aussäen erfolgt, wurde kein Serumentzug durchgeführt. Eine Anheftung der Zellen an die Kulturschale ist aufgrund des Mangels an Fibronectin und Vitronectin unter Serumentzug nicht möglich (Hayman *et al.* 1985). Des Weiteren wurde die Zelldichte bedingt durch eine putative Reduktion der Zellzahl durch die Transfektion von 40 auf 45 Zellen/mm² leicht erhöht, wobei bei dieser Zelldichte weiterhin eine starke Myofibroblasten-Differenzierung gewährleistet ist.

Die Behandlung der Zellen mit miR-18a bzw. miR-34a zeigte nach 48stündiger und 72stündiger Inkubation eine signifikante Reduktion der *XYLT2* bzw. *XYLT1* mRNA Expression auf (s. Abb. 3.21). miR-18a verursachte ergänzend eine erwartete, nicht-signifikante Reduktion der *XYLT1* mRNA Expression. Demnach konnte eine zu der *in silico* Analyse korrelierende, spezifische Bindung der miRNAs erfolgreich nachgewiesen werden. Analog zu der Reduktion der *XYLT* mRNA Expression erfolgte auch eine Absenkung der XT-Aktivität (s. Abb. 3.22). Diese konnte jedoch erst nach 144stündiger Inkubation beobachtet werden, was auf eine Translations-basierte Verzögerung hinweist. Eine Behandlung der dermalen Fibroblasten mit den miRNA-Inhibitoren der miR-18a bzw. miR-34a resultierte in nur marginalen Änderungen der *XYLT* Genexpression (s. Abb. 3.24). Die im

Zellkulturüberstand quantifizierte XT-Aktivität wurde nach 144 h signifikant induziert (s. Abb. 3.25).

Zusammenfassend kann den miRNAs miR-18a und miR-34a demnach eine *XYLT* Expression-regulierende Eigenschaft zugesprochen werden, wenngleich deren funktionale Auswirkung auf die Proteinexpression relativ gering war. Dieser Effekt lässt sich einerseits darauf zurückführen, dass die relative Quantifizierung der mRNA Expression spezifisch für eine XT-Isoform ist, während eine spezifische Determinierung der XT-Aktivität einer Isoform bisher nicht möglich ist, sodass eine Hintergrundaktivität durch die jeweils nicht supprimierte Isoform verursacht wird. Andererseits demonstrierten Selbach *et al.* 2008, dass die Auswirkungen einer miRNA-Transfektion oder eines endogenen miRNA-*Knockdowns* auf die Proteinexpression typischerweise nur sehr schwach sind (Selbach *et al.* 2008).

Über einen miRNA Genexpressions-*Array* wurde weiterführend evaluiert, ob die miR-18a und miR-34a in der Fibrose einen regulatorischen Einfluss auf die XT nehmen. Der Vergleich des miRNA Genexpressionsprofils unbehandelter und mit TGF- β 1 induzierter dermaler Myofibroblasten ergab, dass eine starke Regulation der Fibrose-assoziierten miRNAs miR-21 und miR-29b und nur eine moderate Regulation der miR-18a und -34a erfolgte (s. Abb. 3.23).

Die verzeichnete Induktion der miR-21 sowie die Repression der miR-29b steht im Einklang mit einer verstärkten bzw. verminderten Expression dieser im fibrotischen Kontext und verifiziert somit das experimentelle Modell. Thum *et al.* zeigten 2008, dass eine Induktion der Expression der miR-21 mit einer ventrikulären Fibrose bei Herzinsuffizienz assoziiert werden kann. In einem Mausmodell kardialer Hypertrophie konnte ergänzend eine Aufhebung interstitieller Fibrosen über einen miR-21 Inhibitor vorgenommen werden (Thum *et al.* 2008). Die miR-21 fördert das TGF- β 1-Signaling in Fibrosen durch Repression von SMAD7, einem inhibitorisch wirksamen Transkriptionsfaktor der TGF- β 1-Signalkette (Patel und Nouredine 2012). Die Zielgene der miR-29b umfassen ECM-Komponenten wie Kollagene, Elastine oder fibrillenbildende Proteine. Eine TGF- β 1 induzierte Expressionsverringering der miR-29b trägt entscheidend zur Fibrosierung bei. Eine Absenkung der fibrotisch präventiv wirkenden miR-29b Expression konnte in Lungenfibroblasten von Patienten mit idiopathisch pulmonarer Fibrose, in dermalen Fibroblasten von Sklerodermie-Patienten sowie in einem Mausmodell renaler Fibrose nachgewiesen werden (Maurer *et al.* 2010; Pandit *et al.* 2011; Qin *et al.* 2011).

Die im Genexpressions-*Array* detektierte, moderate Regulation der miR-18a und -34a lässt keine eindeutigen Schlüsse zu. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die XT in der

Fibrosierung nur marginal durch miRNAs reguliert werden. Diesbezüglich muss nachfolgend evaluiert werden, ob die untersuchten miRNAs einer Regulation in der Myofibroblasten-Differenzierung unterliegen. Ein Taqman-Sonden-basierter Nachweis der spezifischen miRNAs könnte hier Aufschluss geben. Andererseits ist auch denkbar, dass die XT *in vivo* durch die miR-18a und -34a primär in alternativen Stoffwechselvorgängen reguliert werden. Gestützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Publikationen, die belegen, dass die miR-18a und -34a Mediatoren der Tumorgenese sind. Während miR-34a eine verringerte Expression in Tumorgewebe aufzeigt und ein Mediator der Tumor-Suppressorfunktion von p53 ist, besitzt die miR-18a eine onkogene Wirkung und wird in Tumorgewebe verstärkt exprimiert (Olive *et al.* 2010; Bader 2012). Obwohl es auch Hinweise auf eine Regulation von CTGF durch die miR-18a gibt und eine miR-34a Inhibition unter anderem als Fibrose-reduzierend beschrieben wird, scheint eine vorherrschende Regulation der XT in der Fibrogenese durch die miRNA-18a und -34a unwahrscheinlich (van Almen *et al.* 2011; Boon *et al.* 2013).

Weiterführend sollte dennoch überprüft werden, ob Fibrose-assoziierte miRNAs wie miR-21 oder -29b möglicherweise auch Einfluss auf die XT nehmen. Obwohl diese entsprechend einer *in silico* Analyse (Daten nicht gezeigt) keine primären Zielgene der miR-21 und -29b sind, ist eine sekundäre Regulation über einen Mediator durchaus in Betracht zu ziehen.

Zusammengefasst konnte über die Untersuchung der XT-Regulation durch profibrotische Mediatoren erstmalig gezeigt werden, dass die *XYLT1* mRNA Expression sowie die XT-Aktivität geeignete Biomarker für die Myofibroblasten-Differenzierung darstellen und sich als *Target* einer antifibrotischen Therapie eignen könnten. Die postulierte Funktion von TGF- β 1 als Schlüsselmediator der XT-Regulation in der Fibrose konnte bekräftigt werden. Ergänzend ergaben sich Hinweise darauf, dass auch Activin A ein wichtiger Mediator der XT ist. Eine alleinständige Beeinflussung der *XYLT* Expression konnte weder für CTGF noch für PDGF, Angiotensin-II oder Endothelin-1 herausgestellt werden. Hingegen scheinen diese Faktoren die Wirkung von TGF- β 1 in der Fibrosierung durch Interaktionen zu modulieren. Darüber hinaus konnte erstmals eine Regulation der XT durch miRNAs demonstriert werden. Ob die miRNAs miR-18a und -34a in der Fibrosierung oder vornehmlich in anderweitigen physiologischen Prozessen Einfluss auf die XT nehmen, muss weiterführend eruiert werden.

4.3. Evaluierung der XT als Arthrofibrose-Biomarker

In dem dritten Teilprojekt dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die XT in arthrofibrotischen Gewebe-Remodellierungen nach Implantation einer Knie-Totalendoprothese (TEP) einer Regulation unterliegen und ob sich die Serum-XT-Aktivität diesbezüglich als diagnostischer Parameter eignet.

4.3.1 Untersuchungen an synovialen Fibroblasten

In vorangegangenen Studien wurde bereits beschrieben, dass die XT nicht nur an fibrotischen Erkrankungen beteiligt sind, sondern auch eine entscheidende Rolle in der Homöostase des Gelenkknorpels einnehmen. 2006 identifizierten Schön *et al.* die SNV c.1569T im *XYLT2*-Gen als Risikofaktor für einen frühen Krankheitsausbruch der Osteoarthritis (Schön *et al.* 2006a). Die Pathogenese der Osteoarthritis wird unter anderem durch physiologische Prozesse des Alterns, der mechanische Belastung sowie der Endokrinologie begünstigt (Ghosh und Cheras 2001). Wichtigste Merkmale einer Osteoarthritis sind eine hypermetabolische, kompensatorische Matrixsynthese in einem frühen Stadium sowie der progressive Abbau des Gelenkknorpels im späten Stadium. Die Degradation der ECM geht mit einer verminderten Proteoglykanbiosynthese einher (Cs-Szabo *et al.* 1995). Bei Osteoarthritis-Patienten konnte eine signifikant erhöhte XT-Sekretion und -Aktivität nachgewiesen werden, die in einer verminderten zellulären Aktivität resultieren könnte (Schön *et al.* 2006a). Als Mediatoren der frühen Induktion und späten Repression der *XYLT* Expression bei Osteoarthritis wurden TGF- β 1 bzw. IL-1 β identifiziert (Venkatesan *et al.* 2012).

TGF- β 1 fungiert auch als zentraler Vermittler der Arthrofibrose. So kann die intraartikuläre TGF- β 1 Injektion mit einer Hyperplasie der Synovialmembran assoziiert werden (Allen *et al.* 1990). In Anlehnung an die Pathogenese einer Fibrosierung der Haut oder der inneren Organe, erfolgt auch im Rahmen der Arthrofibrose eine Differenzierung von Fibroblasten zu synovialen Myofibroblasten (Unterhauser *et al.* 2004). Die Behandlung von Kontrollzellen sowie arthrofibrotischen, synovialen Fibroblasten in dieser Studie bestätigte, dass in den A-fib-Zellen eine stärkere Basalexpression und eine höhere Gesamtexpression der *ACTA2* mRNA und Proteinexpression nach Inkubation mit TGF- β 1 vorliegt (s. Abb. 3.27 und 3.28). Die verstärkte Myofibroblasten-Differenzierung ging des Weiteren mit einem Anstieg der Kollagenbiosyntheserate einher. Eine analoge Expressionssteigerung beobachteten auch

Zeichen *et al.* in arthrofibrotischen Gewebebiopsien von Patienten mit Arthrofibrose nach Eingriffen an den Kapsel-Bändern (Zeichen *et al.* 1999).

Des Weiteren erfolgte eine durch TGF- β 1 initiierte, stärkere Induktion der *XYLT1* mRNA Expression und XT-Aktivität in den Afib- als in den Kontroll-Zellen. Folglich fungiert die XT-I auch als zellulärer Mediator der Arthrofibrose in synovialen Fibroblasten. Die Quantifizierung der *XYLT2* mRNA Expression spiegelt die in dermalen und kardialen Fibroblasten beobachtete, fehlende Beteiligung der XT-II am fibrotischen Geschehen wider (Prante *et al.* 2007; Faust *et al.* 2013).

Neben der klassischen Induktion der Arthrofibrose durch den profibrotischen Mediator TGF- β 1 ist bekannt, dass auch auf die Synovialmembran einwirkender, mechanischer Stress eine Fibrosierung begünstigt. Insbesondere im Kniegelenk unterliegen die synovialen Fibroblasten einer hohen mechanischen Belastung, die sowohl durch Dehnung, das Körpergewicht als auch die Scherkräfte der Bewegung der Synovialflüssigkeit verursacht wird (Hlavacek und Novak 1995; Schett *et al.* 2001). Die mechanische Belastung von aus Sehnen gewonnenen Fibroblasten führt zu einer vermehrten Cytokinfreisetzung, die insbesondere in einer Aktivierung von latentem TGF- β 1 resultiert (Skutek *et al.* 2001).

Wenngleich mechanischer Stress somit als entscheidender Regulator der Myofibroblasten-Differenzierung beschrieben wird, konnte dem Einwirken von mechanischem Stress in dieser Studie im Vergleich zur Induktion der synovialen Fibroblasten mit TGF- β 1 ein wesentlich geringeres fibrotisches Potenzial zugesprochen werden (s. Abb. 3.29 und 3.30).

Die Trends der relativ quantifizierten Genexpressionsänderungen nach mechanischer Stressexposition waren prinzipiell konform mit den durch die TGF- β 1 Behandlung verursachten Regulationen, erreichten jedoch keine Signifikanz. Lediglich die XT-Aktivität der Afib-Zellen wurde signifikant induziert. Der milde fibrosierende Einfluss des mechanischen Stresses wurde wahrscheinlich durch suboptimale Zellkulturbedingungen hervorgerufen. Wie bereits diskutiert, fördern eine steife Matrix sowie eine geringe Zelldichte die Myofibroblasten-Differenzierung (Masur *et al.* 1996; Tomasek *et al.* 2002). Beide Parameter konnten im experimentellen Aufbau der in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen nicht berücksichtigt werden, da die für die Stresskammer kompatiblen, kommerziell verfügbaren Zellkulturschalen Kollagen-beschichtet sind und nur ein Sechstel der Fläche der Schalen aufweisen, die für die Etablierung des Zellkulturmodells genutzt wurden. Ein weiterer Nachteil des experimentellen Systems war die notwendige

Supplementation von 10 % FCS, ohne die eine zu starke Einschränkung der Vitalität erfolgte. Weiterführend sollte demnach die Etablierung eines alternativen Zellkulturmodells vorgenommen werden, um die Auswirkungen des mechanischen Stresses besser abbilden zu können.

4.3.2 Analyse der Serum-XT-Aktivität

In zweiten Teil dieser Studie erfolgte die Quantifizierung der Serum-XT-Aktivität in einer Kohorte von Afib-Patienten sowie in einer Kontroll-Kohorte nach Implantation einer Knie-TEP. Aufgrund des ähnlichen Substratspektrums der XT-Isoformen besteht bis heute noch nicht die Möglichkeit der Messung des spezifischen Substratumsatzes der XT-Isoformen (Roch *et al.* 2009). Vielmehr kann über die Substratwahl der Umsatz durch ein Isoenzym favorisiert werden (Campbell *et al.* 1984; Brinkmann *et al.* 1997; Weilke *et al.* 1997; Casanova *et al.* 2008). Die Bestimmung der Serum-XT-Aktivität ergab, dass keine Unterschiede in der Serum-XT-I-Aktivität zwischen Afib-Patienten und Kontrollen vorlagen, während mit zunehmendem Fibrosierungsgrad ein Absinken der Serum-XT-II-Aktivität verzeichnet wurde (s. Abb. 3.31). Diese Beobachtungen entsprechen nicht den Erwartungen, da die Serum-XT-Aktivität in vorherigen Studien als valider Marker der Leberfibrose und Sklerodermie beschrieben wurde (Götting *et al.* 2000a; Kuhn *et al.* 2009).

Condac *et al.* zeigten 2009, dass die murine Serum-XT-Aktivität bei *XYLT2-Knockout* im Vergleich zum Wildtyp um 99 % reduziert wird. Demnach ist die XT-II das prädominante Isoenzym im Serum (Condac *et al.* 2009). Da bisher postuliert wurde, dass eine Sekretion der XT-Isoformen ausschließlich aus residenten Zellen erfolgt, ergaben sich somit erste Hinweise auf eine Freisetzung der XT-II aus den Thrombozyten. Während in humanem Plasma nur eine geringfügige XT-Aktivität gemessen werden konnte, war diese in Serum um 200 % erhöht. Über die Bestimmung der XT-Aktivität in gereinigten, unbehandelten und über Thrombin aktivierten, humanen Thrombozyten wurde letztendlich demonstriert, dass eine XT-Sekretion aus den Thrombozyten erfolgt (Condac *et al.* 2009). Analog konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Korrelation der XT-II-Serum-Aktivität mit der Thrombozytenzahl aufgezeigt werden. Eine Thrombozytopenie wurde bereits mit Leberfibrose in Verbindung gebracht, wenngleich die zu Grunde liegenden Mechanismen nicht aufgeklärt werden konnten (Adinolfi *et al.* 2001). Da die XT-II Expression jedoch noch mit keiner Fibrose assoziiert werden konnte, scheint die Thrombozytopenie der Arthrofibrose-Patienten eher auf anderweitige Aspekte der Erkrankung zurückzuführen zu sein.

Da keine Veränderungen der XT-Aktivität im Serum der Arthrofibrose-Patienten beobachtet werden konnten, ergeben sich Hinweise darauf, dass es sich bei der Arthrofibrose um einen lokalen Prozess handelt (s. Abb. 4.1). Der in dieser Arbeit entwickelten Hypothese nach erfolgt die Sekretion der XT durch die synovialen Fibroblasten in den Gelenkinnenraum, der durch die semipermeable Synovialmembran nicht unmittelbar mit der Blutzirkulation verbunden ist (Levick und Knight 1987). Somit könnte es zu einer Akkumulation der sekretierten XT in der Synovialflüssigkeit kommen, während keine Änderung der Serum-XT-Aktivität verzeichnet wird.

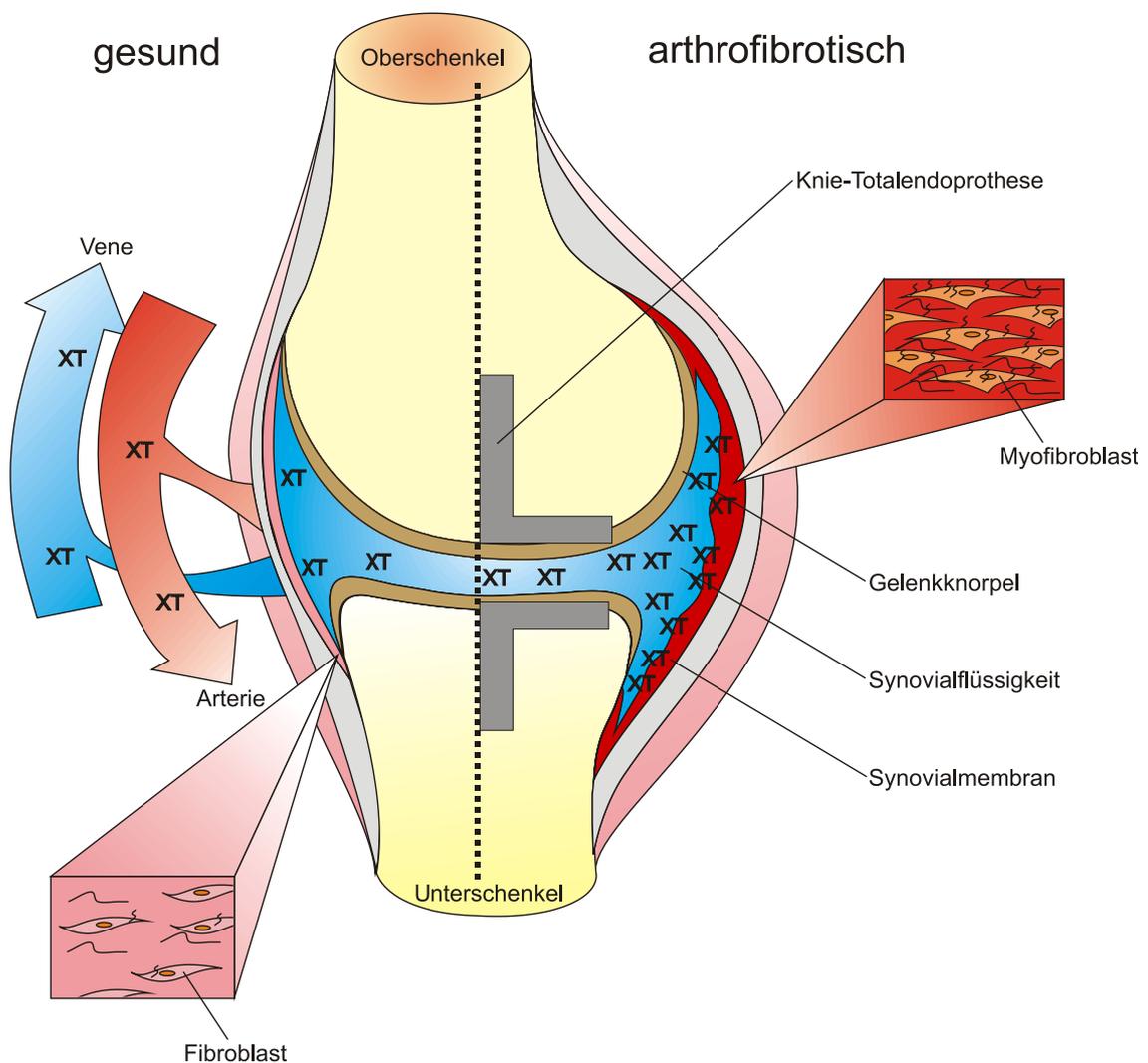


Abbildung 4.1: Hypothetisches Modell der nicht-induzierten Serum-XT-Aktivität bei Arthrofibrose. Vergleichend dargestellt sind die Pathologie der Synovialmembran sowie der Phänotyp der synovialen Fibroblasten in einem gesunden Kniegelenk (links) und einem arthrofibrotischen Gelenk (rechts) nach Implantation einer Knie-Totalendoprothese.

Untermauert wird die Validität des Modells durch eine Studie von Kleesiek *et al.*, in der gezeigt wurde, dass der Anstieg der XT-Aktivität im Serum von Osteoarthrose-Patienten deutlich schwächer ausgeprägt ist als in der Synovialflüssigkeit (Kleesiek *et al.* 1987).

Zudem ergab die Quantifizierung der Fibrose-assoziierten Parameter Galectin-3 und GDF-15 in dieser Studie keine Änderung der Serumkonzentrationen, was ebenfalls auf eine lokale Abgrenzung des Fibrosierungsprozesses hinweist (s. Abb. 3.32). Im Gegensatz dazu sind systemische Fibrosierungen oder fibrotische Erkrankungen gut durchbluteter Organe durch eine erhöhte XT-Aktivität und Galectin-3- bzw. GDF-15-Serumkonzentration charakterisiert (de Boer *et al.* 2010; Taniguchi *et al.* 2012; Yanaba *et al.* 2012).

Zusammenfassend konnte herausgestellt werden, dass die XT-I als zentraler, zellulärer Mediator der Arthrofibrose fungiert und somit ein mögliches Ziel therapeutischer Intervention darstellt. Darüber hinaus erfolgte die Entwicklung eines hypothetischen Modells. Demnach erfolgt bedingt durch die Arthrofibrose eine verstärkte Sekretion der XT durch die synovialen Fibroblasten in den Gelenkinnenraum. Da die Synovialmembran anatomisch eine semipermeable Abgrenzung zwischen der Synovialflüssigkeit und dem Blutkreislauf darstellt, scheint eine systemische Charakterisierung arthrofibrotischer Matrix-Remodellierungen aufgrund der strengen Lokalisierung der physiologischen Prozesse nicht möglich.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals ein bisher nicht beschriebener Sequenzabschnitt im *XYLTI*-Promotor detektiert werden. Darüber hinaus wurden sieben SNV und ein Mikrosatellit in den *XYLT*-Promotorregionen identifiziert. Da keine Korrelation zwischen der SNV-Frequenz und der natürlichen Variabilität der Serum-XT-Aktivität bestand, sollte in weiteren Studien eine Assoziation der SNV mit Erkrankungen überprüft werden, die durch eine abnorme XT-Aktivität charakterisiert sind. Ergänzend erscheint auch die Charakterisierung des Mikrosatelliten über eine Kohortenausweitung sowie eine Genotypisierung der heterozygoten Allele z. B. mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalytik vielversprechend, um Aufschluss über eine eventuelle transkriptionale Regulation durch Mikrosatellit-Varianten zu analysieren.

Im Hinblick auf die XT-Regulation durch profibrotische Faktoren konnte gezeigt werden, dass neben TGF- β 1 auch Activin A eine zentrale Mediatorfunktion zugesprochen werden kann. Die postulierte, modulierend auf die Effektivität von TGF- β 1 wirkende Funktion von CTGF, PDGF, Angiotensin-II und Endothelin-1 sollte fortführend über die Behandlung dermalen Fibroblasten mit mehreren Mediatoren evaluiert werden, um die *in vivo* Orchestration der Mediatoren zu entschlüsseln. Wenngleich erstmals auch eine XT-Regulation durch die miRNAs miR-18a und miR-34a aufgezeigt wurde, muss in weiteren Experimenten aufgeklärt werden, in welchen physiologischen und pathologischen Prozessen eine derartige Interaktion erfolgt. Die Überprüfung der XT-Regulation durch Fibrose-assoziierte miRNAs könnte Rückschlüsse auf die Fibrosierungsmechanismen *in vivo* liefern.

Die Definition der XT als Arthrofibrose-Marker ging mit der Entwicklung eines hypothetischen Modells einher, das die Arthrofibrose als lokal begrenzt definiert. Eine Messung der XT-Aktivität in der Synovialflüssigkeit von Arthrofibrose-Patienten sowie eine Kohortenausweitung auf weitere Gelenke oder andere lokalisierte Fibrosen könnte das Modell stützen und wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung einer therapeutischen Option liefern.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit innovative Aspekte der XT-Regulation aufgezeigt werden. Dennoch bedarf es weiterer Studien, um die Rolle der XT in der Fibrose im Detail verstehen zu können. Die Identifizierung Isoenzym-spezifischer Substrate und Inhibitoren scheint für die Etablierung der XT-Aktivität als diagnostischer Biomarker sowie die therapeutische Intervention unabkömmlich. Darüber hinaus könnte das Potenzial des Wirkeffekts einer therapeutischen XT-Inhibition auf die Matrixintegrität über eine gezielte Induktion oder Suppression der XT-Aktivität im Mausmodell verdeutlicht werden.

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Isolation von Gesamt-RNA

5.1.1.1 Isolation der Gesamt-RNA aus Zelllysaten mit dem *NucleoSpin RNA Kit*

Um eine Quantifizierung der mRNA Expression vorzunehmen, wird die Gesamt-RNA aus in RA1-Puffer lysierten Fibroblasten mit dem *NucleoSpin RNA Kit* (Macherey-Nagel, Düren) isoliert. Die Zellen werden zunächst in RA1-Puffer lysiert, das Lysat auf eine *NucleoSpin*-Filtersäule aufgetragen und 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Ein Aliquot von 50 μL des Durchflusses wird für eine spätere DNA-Quantifizierung separiert, während der restliche Durchfluss mit 350 μL 70%igem Ethanol versetzt wird. Das homogenisierte Lysat wird auf eine *NucleoSpin RNA II* Säule gegeben und für 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Zum Entsalzen der Säule werden 350 μL MDB-Puffer (*Membrane Desalting Buffer*) zugegeben und 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Im nächsten Schritt wird ein DNA-Verdau durchgeführt. Hierzu werden 95 μL einer 1:10 Verdünnung aus rDNase in rDNase-Reaktionspuffer auf die Säule aufgetragen und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 μL Puffer RA2 zugegeben und 1 min bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. Es folgen zwei Waschschrte mit 600 μL bzw. 250 μL RA3-Puffer (Zentrifugation 1 bzw. 2 min, $13.000 \times g$). Um ein vollständiges Trocknen der Membran zu erzielen, wird der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Elution der RNA erfolgt nach 2 min Inkubation in 25 μL RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei $13.000 \times g$. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

5.1.1.2 Isolation der Gesamt-RNA aus Zelllysaten mit dem *miRNeasy Micro Kit*

Die Isolation von miRNAs erfolgt mit dem *miRNeasy Micro Kit* (Qiagen, Hilden). Das in 700 μL *QIAzol Lysis Reagent* homogenisierte Lysat wird zunächst 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 140 μL Chloroform versetzt. Nach Homogenisierung (15 sec) wird die Suspension 3 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (15 min, $12.000 \times g$, 4°C). Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 525 μL 100%igem Ethanol versetzt. 700 μL der Probe werden auf eine *RNeasy MinElute Spin column* überführt und zentrifugiert (30 sec, $13.000 \times g$). Der Durchfluss wird verworfen und mit dem Rest der Probe wird verfahren wie zuvor beschrieben. Die an die Säule gebundene RNA wird in drei

Waschschritten mit 700 μL RWT-Puffer bzw. 500 μL RPE-Puffer und nachfolgend 80%igem Ethanol gewaschen (30 sec, $13.000 \times g$). Anschließend erfolgt die Trocknung der Membran durch Zentrifugation (5 min, $13.000 \times g$). Die RNA wird mit 12 μL RNase-freiem Wasser in ein neues Reaktionsgefäß eluiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.1.2 Isolation von Gesamt-DNA aus Zelllysaten und EDTA-Vollblut

Die Gesamt-DNA aus Zelllysaten und EDTA-Vollblut wird mit dem *Nucleo Spin Blood Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Zu dem bei der RNA-Isolation entnommenen Aliquot an Lysat (s. 5.1.1.1) werden 75 μL Ethanol (99,9%ig) hinzugefügt, um die Bindung der DNA während eines Zentrifugationsschritts (1 min, $13.000 \times g$) an die Silikamembran einer Säule zu ermöglichen. Die Bindung ist reversibel und wird nach zwei Waschschritten gelöst, indem nach dem Trocknen der Membran durch Zentrifugation (1 min, $13.000 \times g$) bei niedriger Ionenstärke in Wasser eluiert wird. Das Wasser wird auf $70\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt, direkt auf die Membran pipettiert und für 2 min inkubiert. Durch Zentrifugation (1 min, $13.000 \times g$) wird das Eluat gewonnen. Für die DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut wird vor der beschriebenen DNA-Aufreinigung eine Zelllyse und Proteindegradation durchgeführt. Hierfür werden 200 μL EDTA-Blut mit 25 μL Proteinase K vermischt und 15 min bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die DNA wird bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 5 mL einer ü. N.-Kultur wird das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach Zentrifugation (5 min, $4.600 \times g$) wird das Zellpellet in 250 μL Resuspensionspuffer resuspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 μL Lysepuffer vermischt. Die Suspension wird sechsmal invertiert, 3 min bei RT inkubiert und mit 350 μL Neutralisationspuffer versetzt. Die beim nachfolgenden Invertieren ausfallenden zellulären Fragmente sowie die genomische DNA werden mittels Zentrifugation (10 min, $13.000 \times g$) abgetrennt. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wird auf eine Säule pipettiert, zentrifugiert (30 sec, $13.000 \times g$) und durch zwei Waschschritte mit 500 μL Puffer PB bzw. 750 μL Puffer PE (30 sec, $13.000 \times g$) gereinigt. Auf einen Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Säule (2 min, $13.000 \times g$) folgt die DNA-Elution in 50 μL Wasser. Die Plasmid-DNA wird bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.1.4 Photometrische Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration isolierter Nukleinsäuren erfolgt mit dem Nanodrop 2000 Spektralphotometer (Thermo Scientific, Schwerte) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm. Für die Messung werden je 2 μL der Probe auf die Auftragsfläche pipettiert und gegen den Puffer gemessen, der als Lösungsmittel dient. Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration der absorbierenden Substanz wird in verdünnten Lösungen durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Für die Berechnung einer Konzentration c [mol/L] einer Nukleinsäurelösung wird demnach die Absorption A durch das Produkt aus dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ [L/mol * cm] und der Schichtdicke d der Küvette [cm] dividiert. Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm beträgt für reine DNA 1,8 und für reine RNA 2,0. Kleinere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen hin.

5.1.5 Reverse Transkription

5.1.5.1 cDNA-Synthese mit dem *Superscript II Reverse Transcriptase Kit*

Die Umschreibung von isolierter, polyadenylierter mRNA in cDNA erfolgt mit dem *Superscript II Reverse Transcriptase Kit* (Life Technologies, San Diego, USA). 1 μg RNA wird mit 2 μL Oligo-dT-Primern (7 pmol) sowie 2 μL dNTPs (25 mM) versetzt. Es werden Oligo-dT-Primer aus 12 bis 18 Thymidinresten verwendet, die an den Poly-A-Schwanz von mRNAs binden, sodass nur polyadenylierte RNA transkribiert wird. Mit RNase-freiem Wasser wird jeder Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 24 μL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird 5 min bei 65 °C inkubiert, danach für 1 min auf Eis gekühlt. Es folgt die Zugabe von 8 μL 5 \times *First-Strand-Buffer* und 4 μL DTT. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C werden 2 μL *SuperScript II RT* hinzugegeben, homogenisiert und der Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Das Enzym denaturiert durch 15minütiges Erhitzen bei 70 °C. Die cDNA wird bei -20 °C gelagert und für die quantitative *real-time-PCR* in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

5.1.5.2 cDNA-Synthese mit dem *miScript II RT Kit*

Die reverse Transkription von miRNAs in cDNA, die für einen *miScript miRNA PCR Array* (Qiagen, Hilden) eingesetzt wird, erfolgt mit dem *miScript II RT Kit* (Qiagen, Hilden). Eine

spezifische Anreicherung von miRNAs ist unnötig, da über die Zusammensetzung des Reaktionspuffers eine reverse Transkription großer RNA-Moleküle wie mRNAs unterdrückt wird. Nach Angaben des Herstellers wird ein Mastermix aus 4 μL 5 \times *miScript HiSpec Buffer*, 2 μL 10 \times *Nucleics Mix*, 2 μL *miScript Reverse Transcriptase Mix* und RNase-freiem Wasser (Gesamtreaktionsvolumen 20 μL) angefertigt und mit 500 ng RNA versetzt. Die Reaktionsbedingungen beinhalten eine 60minütige Inkubation bei 37 °C während der die Polyadenylierung und reverse Transkription erfolgen, sowie einen 5minütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C. Die cDNA wird mit 90 μL RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation definierter Nukleinsäuresequenzen mit DNA-Polymerasen und wird in drei Reaktionsschritte unterteilt. Bei 95 °C findet zunächst die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge statt. Während des *Annealing*-Schritts lagern sich die *Primer* aufgrund ihrer komplementären Struktur an die zu amplifizierende DNA an. Die optimale *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Sequenz des *Primers* und der Zielsequenz. Im dritten Schritt, der Elongation, erfolgt eine Verlängerung der freien 3'-Hydroxylgruppe der *Primer* durch eine DNA-Polymerase bei 72 °C, sodass ein doppelsträngiger DNA-Tochterstrang entsteht. Herkömmliche PCRs umfassen 30 bis 35 Amplifikationszyklen. Eine Überprüfung der im *Thermocycler T Gradient* (Biometra, Göttingen) durchgeführten Amplifikation erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

5.1.6.1 Amplifikation von *XYLT*-Promotorfragmenten

Zur Amplifikation der *XYLT1*- und *XYLT2*-Promotoren werden diese in Fragmente unterteilt (s. Tab. 5.1 und 5.2). Für die Etablierung einer PCR zur Amplifikation der *XYLT1*-Fragmente B bis D sowie *XYLT2*-Fragmente A bis F aus genomischer DNA bzw. aus aufgereinigter Plasmid-DNA (Verdünnung 1:5) nach ortsgerechter Mutagenese, wird zunächst die optimale *Annealing*-Temperatur der *Primer*-Paare (s. Tab. 6.3) mittels Temperatur-Gradienten-PCR (*Annealing*-Temperaturbereich: 50 bis 70 °C) ermittelt. Die *Annealing*-Temperatur, bei der die höchste im Agarosegel detektierbare Amplifikatkonzentration vorliegt, wird als optimal (T_A , s. Tab. 6.3) definiert. Die PCRs erfolgen unter Verwendung einer HotStar *Taq* DNA

Polymerase (Qiagen, Hilden) und dazugehörigem Reagenziensatz. Der entsprechende Reaktionsansatz sowie das Temperaturprofil sind in Tab. 5.3 und 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.1: Auflistung der *XYLT1*-Promotorfragmente, die mittels PCR amplifiziert werden. Dargestellte Sequenzabschnitte befinden sich in der 5′ untranslatierten Region der genomischen DNA-Sequenz des *XYLT1*-Gens (*GenBank accession no.* NG_015843.1). Das erste Nukleotid des Translationsstarts (ATG) des *XYLT1*-Gens wurde als Nukleotid c.+1 definiert und die 5′ des ATG liegende Sequenz rückläufig nummeriert.

Promotorfragment	Sequenzabschnitt	Amplifikat [bp]
A	c.-372 bis c.+122	494
B	c.-891 bis c.-215	676
C	c.-1385 bis c.-813	572
D	c.-1689 bis c.-1273	416

Tabelle 5.2: Auflistung der *XYLT2*-Promotorfragmente, die mittels PCR amplifiziert werden. Dargestellte Sequenzabschnitte befinden sich in der 5′ untranslatierten Region der genomischen DNA-Sequenz des *XYLT2*-Gens (*GenBank accession no.* NG_012175.1). Das erste Nukleotid des Translationsstarts (ATG) des *XYLT2*-Gens wurde als Nukleotid c.+1 definiert und die 5′ des ATG liegende Sequenz rückläufig nummeriert.

Promotorfragment	Sequenzabschnitt	Amplifikat [bp]
A	c.-402 bis c.+107	509
B	c.-825 bis c.-354	471
C	c.-1294 bis c.-689	605
D	c.-1656 bis c.-1247	409
E	c.-2078 bis c.-1506	572
F	c.-2720 bis c.-2050	670

Tabelle 5.3: Reaktionsansatz [25 µL] einer PCR.

Reagenz	1 × Volumen [µL]
10 × PCR-Puffer	2,50
<i>Q-Solution</i>	5,00
dNTPs [25 mM]	0,25
<i>reverse Primer</i> [25 µM]	0,50
<i>forward Primer</i> [25 µM]	0,50
<i>Template-DNA</i> [1:5]	5,00
HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,10
<i>Aqua dest.</i>	11,15

Tabelle 5.4: Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation von *XYLT*-Promotorfragmenten. T_A (s. Tab. 6.3) entspricht der optimalen *Annealing*-Temperatur.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	1 min	95	
<i>Annealing</i>	1 min	T_A	35
Elongation	1 min	72	
Finale Elongation	15 min	72	1

5.1.6.2 Slowdown-PCR

Die Amplifikation des GC-reichen A-Fragments (s. Tab. 5.1) des *XYLT1*-Promotors aus genomischer DNA wurde mittels *Slowdown*-PCR durchgeführt. Die Methodik basiert auf einem herkömmlichen PCR-Protokoll, das durch Änderung der Heizraten und Verwendung des dGTP-Analogons 7-deaza-2'-deoxyguanosin (dc^7GTP ; Roche, Mannheim) angepasst wird (Bachmann *et al.* 2003; Frey *et al.* 2008). Die Amplifikation erfolgt bei einer Heizrate von 2,5 °C/sec sowie einer Kühlrate von 1,5 °C/sec mit spezifischen *Primern* (s. Tab. 6.3). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Temperaturprofil sind in Tab. 5.5 und 5.6 gezeigt.

Tabelle 5.5: Reaktionsansatz [50 µL] einer *Slowdown*-PCR zur Amplifikation des *XYLT1*-A-Fragments.

Reagenz	1 × Volumen [µL]
10 × PCR-Puffer	5,00
<i>Q</i> -Solution	10,0
dATP [10 mM]	1,00
dTTP [10 mM]	1,00
dCTP [10 mM]	1,00
dGTP [1 mM]	2,50
dc^7GTP [1 mM]	7,50
<i>reverse Primer</i> [2,5 µM]	2,00
<i>forward Primer</i> [2,5 µM]	2,00
<i>Template</i> -DNA	2,00
HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,20
<i>Aqua dest.</i>	15,8

Tabelle 5.6: Temperaturprofil der *Slowdown*-PCR zur Amplifikation des *XYLT1*-Promotorfragments A

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen	$\Delta T/3$. Zyklus [°C]
Initiale Denaturierung	15 min	95	1	
Denaturierung	30 sec	95		
<i>Annealing</i>	30 sec	70	48	- 1
Elongation	40 sec	72		
Denaturierung	30 sec	95		
<i>Annealing</i>	30 sec	58	15	
Elongation	40 sec	72		
Finale Elongation	40 sec	72		

5.1.6.3 Kolonie-PCR

Um die Plasmid-DNA-Sequenz transformierter, auf LB-Amp-Platten wachsender, Kolonien von *E. coli* XL 10 Gold Zellen zu überprüfen, wird das Zellmaterial direkt für den PCR-Reaktionsansatz eingesetzt. Nach Übertragung eines Klons auf eine Sicherheitsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze, wird das restliche Zellmaterial in den PCR-Ansatz gegeben. Dessen Zusammensetzung sowie das angewandte Temperaturprofil sind in Tab. 5.7 und 5.8 dargestellt.

Tabelle 5.7: Reaktionsansatz [20 μ L] einer Kolonie-PCR.

Reagenz	1 \times Volumen [μ L]
10 \times PCR-Puffer	2,00
<i>Q-Solution</i>	5,00
dNTPs [25 mM]	0,25
<i>reverse Primer</i> [25 μ M]	0,50
<i>forward Primer</i> [25 μ M]	0,50
HotStar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,20
<i>Aqua dest.</i>	11,55

Tabelle 5.8: Temperaturprofil der Kolonie-PCR. T_A (s. Tab. 6.3) entspricht der optimalen *Annealing*-Temperatur.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	1 min	95	
<i>Annealing</i>	1 min	T_A	35
Elongation	1 min	72	
Finale Elongation	15 min	72	1

5.1.7 Quantitative *real-time*-PCR

Die *real-time*-PCR ist eine Methode, um eine relative Quantifizierung von Genexpressionen in Echtzeit vorzunehmen. Unter der Verwendung von Intron-überspannenden *Primern* (s. Tab. 6.4) interkaliert das Fluorophor *SYBR-Green* (Life Technologies, San Diego, USA) während der Amplifikation in die DNA. Die Extinktion von *SYBR-Green*, das nach jedem Zyklus detektiert wird, liegt bei 480 nm, die Emission bei 520 nm. Es interkaliert nur in doppelsträngige DNA, weshalb sich das gemessene Signal der Fluoreszenzintensität proportional zur Menge an PCR-Produkt verhält. Die Zusammensetzung eines *real-time*-PCR-Ansatzes ist nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 5.9: Reaktionsansatz [10 μ L] einer *real-time*-PCR.

Reagenz	1 \times Volumen [μ L]
<i>Template</i> [cDNA 1:10]	2,50
<i>SYBR-Green</i>	5,00
<i>reverse Primer</i> [25 μ M]	0,25
<i>forward Primer</i> [25 μ M]	0,25
<i>Aqua dest.</i>	2,00

In der *SYBR-Green*-Lösung sind ein Teil der PCR-Reagenzien enthalten. Dazu gehören Mg^{2+} -Ionen, dNTPs, Stabilisatoren und eine Platinum *Taq* DNA-Polymerase. Diese liegt in einem Komplex mit monoklonalen Antikörpern vor, wodurch nichtspezifische Amplifikationen und *Mispriming* bei RT verringert werden. Die Proben werden in eine 96-Kavitäten-Platte pipettiert und diese nachfolgend mit einer optischen *heat-sealing* Folie verschweißt und

30 sec bei $700 \times g$ zentrifugiert. Die PCR wird am *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Eine Darstellung des Temperaturprogramms ist in Tab. 5.10 gezeigt.

Tab. 5.10: Temperaturprofil einer *real-time*-PCR.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
<i>Uracil-N-Glykosidase</i> Verdau	2 min	50	1
Aktivierung der Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	2 min	95	1
Denaturierung	10 sec	95	45
<i>Annealing</i>	15 sec	58	
Elongation	20 sec	72	
Messung	0 sec	72	
Schmelzkurve	15 sec	95	1
	15 min	60 - 95	
Kühlen	10 sec	30	1

Während der ersten Zyklen bleibt die DNA-Konzentration und somit das gemessene Fluoreszenzsignal nahezu konstant. Danach steigt die Konzentration exponentiell an. Zu Beginn dieser exponentiellen Zunahme überschreitet die Signalstärke den Wert des Hintergrundrauschens, den C_T -Wert (*cycle threshold*). Bei welchem Zyklus dieser Punkt überschritten wird, hängt von der Ausgangskonzentration der DNA ab. Am Ende der PCR-Reaktion folgt eine Schmelzkurven-Analytik. Diese dient der Identifizierung der spezifischen Produkte sowie von *Primer*-Dimeren anhand ihrer geringen Schmelztemperatur. Aus den gewonnen Rohdaten werden die C_T -Werte der einzelnen Proben ermittelt. Die Genexpression des Zielgens wird zunächst auf einen Index dreier Haushaltsgene (*HPRT*, *GAPDH*, *B2M*) bezogen. Berechnet wird dieser Normalisierungsfaktor auf Grundlage des geometrischen Mittels der C_T -Werte der drei Haushaltsgene. Nach Kalkulation der normalisierten Expressionslevel des Zielgens unter Einbeziehung der PCR-Effizienz, wird über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode eine relative Quantifizierung vorgenommen. Der Begriff der relativen Quantifizierung umschreibt die Veränderung der Genexpression des Zielgens relativ zu einer Referenzprobe (Livak und Schmittgen 2001).

5.1.8 miRNA-Genexpressionsprofil dermaler Fibroblasten

Für die Erstellung eines miRNA-Genexpressionsprofils unbehandelter und mit TGF- β 1 (5 ng/mL) induzierter, dermaler Fibroblasten wird der *miScript miRNA HC PCR-Array* (Qiagen, Hilden) verwendet. Über die Immobilisierung von miRNA-spezifischen *forward Primern* in einer 384-Kavitäten-Platte kann eine gezielte Quantifizierung von 372 miRNAs aus einer Probe mittels quantitativer *real-time* PCR (s. 5.1.7) vorgenommen werden. Weitere Kavitäten sind Haushaltsgenen (snoRNAs) sowie Positiv- und Negativkontrollen vorbehalten. Die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes unter Verwendung des *miScript SYBR Green Kits* (Qiagen, Hilden) ist in Tab. 5.11 dargestellt.

Tabelle 5.11: Reaktionsansatz [4.100 μ L] zur Durchführung eines *miScript miRNA HC PCR-Arrays*.

Reagenz	1 \times Volumen [μ L]
Template [cDNA]	100
2 \times <i>QuantiTect SYBR-Green PCR Master Mix</i>	2.050
10 \times <i>miScript Universal Primer</i>	410
<i>Aqua dest.</i>	1.540

In jede Kavität der 384-Kavitäten-Platte werden 10 μ L Mastermix pipettiert und die Platte mit einer *heat-sealing* Folie verschlossen. Die Amplifikation der miRNA-cDNA erfolgt über einen universalen reversen *Primer* am *LightCycler 480* (Roche, Mannheim) mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}$ C/sec. Das korrespondierende Temperaturprofil ist in Tab. 5.12 gezeigt.

Tabelle 5.12: Temperaturprofil zur Durchführung eines *miScript miRNA HC PCR-Arrays*.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zyklen
Aktivierung der HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase	15 min	95	1
Denaturierung	15 sec	94	
<i>Annealing</i>	30 sec	55	45
Elongation	30 sec	70	
Messung	0 sec	70	

5.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele dienen zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße werden die Konzentration an Grundsubstanz und damit die Porengröße gewählt. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen durch Entfernen des Agaropektins gewonnen. Die Elektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Thermo Scientific, Schwerte) beruht darauf, dass die negativ geladene, mit Ladepuffer beschwerte, DNA in den Geltaschen bei Anlegen eines elektrischen Feldes im Gel zur Anode migriert. Die Wanderungsdistanz ist proportional zu der Anzahl der Basenpaare. Zur Herstellung eines 1,8%igen Agarosegels werden 1,8 g Agarose durch Erhitzen in TBE-Puffer (100 mL) gelöst und die entstehende Lösung mit 10 µL Ethidiumbromidlösung versetzt. Ethidiumbromid kann aufgrund seiner planaren Struktur in DNA interkalieren und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht, sodass die Fragmentgröße mit Hilfe eines Markers bestimmt werden kann. In dem erstarrten Gel werden sowohl 5 µL Marker als auch 5 µL der Probe, versetzt mit 2 µL DNA-Ladepuffer, in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 140 V und 160 mA für 40 min.

5.1.10 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von (Kolonie-)PCR-Produkten wird mit dem *MSB Spin PCRapace Kit* (Stratec, Birkenfeld) durchgeführt. 20 µL PCR-Produkt werden mit 250 µL Bindepuffer vermengt und auf eine Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation (3 min, $13.000 \times g$) wird der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird in 15 µL Wasser eluiert (1 min, $13.000 \times g$) und nachfolgend zur Sequenzierung eingesetzt.

5.1.11 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Unter Verwendung des *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits* (ABI Foster City, USA) erfolgt eine *Template*-Amplifikation, bei der zufällig Didesoxynukleotide in den DNA-Strang eingebaut werden, sodass ein Kettenabbruch eintritt. Die endständig fluoreszenzmarkierten Fragmente unterscheiden sich in ihrer Länge und werden mittels Kapillar-Gelelektrophorese am *3500 Genetic Analyzer* (ABI, Foster City, USA) in einer

Gelmatrix (POP7-Polymer) aufgetrennt. Eine spezifische Basendetektion der vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide erfolgt mittels Laseranregung. 5 μL des PCR-Produktes werden zunächst mit jeweils 2 μL Exonuklease I sowie *Shrimp alkaline phosphatase* 30 min bei 37 °C inkubiert um überschüssige Primer zu degradieren und dNTPs zu dephosphorylieren. Die Enzyminaktivierung wird für 15 min bei 80 °C durchgeführt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird nachfolgend für die Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Temperaturprofil sind in Tabelle 5.13 und 5.14 dargestellt.

Tabelle 5.13: Reaktionsansatz [20 μL] einer Sequenzierreaktion.

Reagenz	1 \times Volumen [μL]
<i>BigDye v3.1</i> Sequenzierprämix	4,00
5 \times <i>BigDye</i> Sequenzierpuffer	2,00
Primer [25 μM]	1,50
<i>Q-Solution</i>	5,00
Template	2,00
<i>Aqua dest.</i>	5,50

Tabelle 5.14: Temperaturprofil einer Sequenzierreaktion. T_A entspricht der optimalen *Annealing*-Temperatur.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	120 sec	95	1
Denaturierung	10 sec	95	
<i>Annealing</i>	10 sec	T_A	30
Elongation	240 sec	60	
Kühlen	5 min	4	1

Die Aufreinigung von Sequenzieransätzen basiert auf dem Prinzip der Gelfiltration. In einer Matrix aus Sephadex G50 werden kleine Moleküle zurückgehalten, während die Amplifikate eluiert werden. In Abhängigkeit der Probenanzahl werden einzelne *Receiver columns* oder 96-Kavitäten-Platten pro Kavität mit 800 μL einer Sephadex G50-Suspension beladen. Nach Zentrifugation (2 min, 1.000 \times g) wird der Durchfluss verworfen, der Sequenzieransatz mittig auf die Gelmatrix aufgetragen und erneut zentrifugiert (4 min, 1.000 \times g). Das Eluat wird mit 20 μL Wasser versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Injektion der

Probe wird bei 10 kV für 30 sec durchgeführt. Die im Anschluss folgende 90minütige Kapillargelelektrophorese erfolgt bei 50 °C und einer Spannung von 8,5 kV. Die Basenabfolge des Amplifikats wird über ein Elektropherogramm mit der *Sequence Analysis Software* (Perkin Elmer, Foster City, USA) bestimmt.

5.1.12 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse zur Genotypisierung von *XYLT2*-Sequenzvariationen

Die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus- (RFLP-)Analyse beruht auf der Spaltung einer definierten DNA-Erkennungssequenz durch eine Restriktionsendonuklease innerhalb eines amplifizierten *XYLT2*-Promotorabschnitts (s. 5.1.6.1). Liegt innerhalb dieser Schnittstelle eine Sequenzvariation, kann aufgrund des entstehenden Fragmentmusters mittels Agarose-Gelelektrophorese auf den korrespondierenden Genotyp zurückgeschlossen werden. Die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 5.15 gezeigt.

Tabelle 5.15: Restriktionsenzyme und Erkennungssequenzen der durchgeführten RFLP-Analysen.

Restriktionsenzym	SNV	T _{opt} [°C]	Erkennungssequenz	Fragmente
<i>MseI</i>	c.-664T>G	37	5'...T'TAA...3' 3'...AAT'T...5'	161 bp, 23 bp
<i>BsrI</i>	c.-1044G>A	65	5'...ACTGGN'...3' 3'...TGAC'CN...5'	149 bp, 100 bp, 29 bp

Um die Frequenz der Sequenzvariationen c.-664T>G und c.-1044G>A im *XYLT2*-Promotor zu analysieren, erfolgt die gezielte Einführung eines Basenaustausches und die damit verbundene Generierung einer Restriktionsschnittstelle mittels Amplifikation aus genomischer DNA (spezifische *Primer* s. Tab. 6.5). Die PCR-Produkte werden einem Restriktionsverdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym über Nacht unterzogen. Die entstehenden Fragmente werden in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (90 min, 120 V, 140 mA) und das Fragmentmuster anhand mitgeführter Kontrollen einem Genotypen zugeordnet. Die Restriktionsansätze sind in Tabelle 5.16 und 5.17 gezeigt.

Tabelle 5.16: Reaktionsansatz [20 μ L] für die RFLP-Analyse mit *MseI*.

Reagenz	1 \times Volumen [μL]
Puffer NEB4	2,0
BSA [100 μ g/mL]	0,2
<i>MseI</i> [1 U]	0,1
<i>Template</i>	4,0
<i>Aqua dest.</i>	13,7

Tabelle 5.17: Reaktionsansatz [20 μ L] für die RFLP-Analyse mit *BsrI*.

Reagenz	1 \times Volumen [μL]
Puffer NEB3	2,0
<i>BsrI</i> [1 U]	0,2
<i>Template</i>	4,0
<i>Aqua dest.</i>	13,8

5.1.13 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die gezielte Insertion von DNA-Fragmenten oder Einführung eines Basenaustauschs mittels spezifischer *Primer* in Plasmid-DNA wird das *QuikChange XL Site-directed Mutagenesis Kit* (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. In der PCR-basierten Mutagenese wird eine *Pfu*-Polymerase eingesetzt, die sich aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität durch eine geringe Fehlerrate auszeichnet. Die Degradierung der unmutierten, parentalen Plasmide erfolgt anschließend über einen Restriktions-Verdau mit *DpnI*, der nur methylierte DNA-Stränge erfasst. Der durch die Amplifikation entstehende Einzelstrangbruch der mutierten Plasmide wird nach Transformation in *E. coli* XL 10 Gold Zellen durch zelleigene Ligasen geschlossen. Eine Bestimmung der Mutagenese-Effizienz erfolgt über einen separaten Reaktionsansatz. Dieser beinhaltet das Plasmid pWhiteskript, das ein Stopcodon TAA an der Position eines Glutamin-Codons CAA aufweist. Bei erfolgreicher Mutation und Entstehung des Codons CAA kann das Enzym β -Galaktosidase exprimiert werden, sodass auf X-Gal/IPTG-Agar eine Verstoffwechslung erfolgt und blaue Kolonien entstehen.

5.1.13.1 Klonierung von *XYLTI*-Promotorkonstrukten

Um die vorhandenen *XYLTI*-Vektorkonstrukte c.-1639 bis +1_{Δ238*} und c.-1031 bis +1_{Δ238*} (Müller *et al.* 2009) mit dem in dieser Arbeit erstmalig identifizierten Promotor-Sequenzabschnitt von 238 bp zu vervollständigen, wird dieser zunächst aus dem PCR-Produkt der Amplifikation des *XYLTI*-A-Fragments amplifiziert (s. 5.1.6.1). Für die Amplifikation werden *Primer* mit Überhängen von 20 bp (s. Tab. 6.6) eingesetzt, die komplementär zu der Insertionsposition im Ziel-Plasmid sind. Das aufgereinigte PCR-Produkt wird in der Mutagenese direkt als „*Primer*“ eingesetzt (Geiser *et al.* 2001). Reaktionsansatz und Temperaturprofil sind in Tabelle 5.18 und 5.19 gezeigt.

Tabelle 5.18: Reaktionsansatz [51 μL] einer ortsgerichteten Mutagenese zur Plasmid-Konstruktion.

Reagenz	1 × Volumen [μL]
10 × Reaktionspuffer	5,0
<i>Quik-Solution</i>	3,0
dNTP-Mix	1,0
Plasmid-DNA	50 ng
PCR-Produkt	400 ng
<i>Aqua dest.</i>	Add. 50
<i>Pfu</i> Turbo-DNA Polymerase	1

Tabelle 5.19: Temperaturprofil der ortsgerichteten Mutagenese.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	30 sec	95	1
Denaturierung	30 sec	95	
<i>Annealing</i>	30 sec	58,8	18
Elongation	2 min/kb	68	
Finale Elongation	7 min	68	1

Auf die PCR folgt eine 2minütige Inkubation auf Eis und eine dreistündige Inkubation des Reaktionsansatzes mit 1 μL *DpnI* (10 U/μL) bei 37 °C sowie die Transformation in *E. coli* XL 10 Gold Zellen. Die Insertion wird mittels Sequenzierung der aufgereinigten Plasmid-DNA aus einer Kolonie verifiziert.

5.1.13.2 Definierter Basenaustausch in *XYLT*-Promotorkonstrukten

Das Einführen eines definierten Basenaustauschs analog zu einer natürlich vorkommenden SNV im *XYLT1*- oder *XYLT2*-Promotor erfolgt unter Einsatz von 42 bp umfassenden *Primern* (s. Tab. 6.6), die eine zum Plasmid komplementäre Sequenz sowie den Basenaustausch kodieren. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das angewandte Temperaturprofil der Mutagenese-PCR sind in Tabelle 5.20 und 5.21 gezeigt.

Tabelle 5.20: Reaktionsansatz [51 μL] einer ortsgerichteten Mutagenese zur Plasmid-Konstruktion.

Reagenz	1 \times Volumen [μL]
10 \times Reaktionspuffer	5,0
<i>Quik-Solution</i>	3,0
dNTP-Mix	1,0
Plasmid-DNA [25 ng/ μL]	1,0
<i>forward Primer</i> [10 pmol/ μL]	1,0
<i>reverse Primer</i> [10 pmol/ μL]	1,0
<i>Aqua dest.</i>	38,0
<i>Pfu Turbo-DNA Polymerase</i>	1,0

Tabelle 5.21: Temperaturprofil der ortsgerichteten Mutagenese.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
Initiale Denaturierung	1 min	95	1
Denaturierung	50 sec	95	
<i>Annealing</i>	50 sec	60	18
Elongation	1 min/kb	68	
Finale Elongation	7 min	68	1

Nach Inkubation des Reaktionsansatzes auf Eis (2 min) wird die parentale DNA für 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ mit *DpnI* (10 U/ μL) verdaut und der Reaktionsansatz zur Transformation von *E. coli* XL 10 Gold Zellen eingesetzt. Ein erfolgreicher Basenaustausch wird durch Sequenzierung eines Kolonie-PCR-Produktes oder aufgereinigter Plasmid-DNA überprüft.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen werden in Zellkulturschalen (57 cm²) bei 37 °C im CO₂-Inkubator (5 % CO₂) kultiviert. Alle Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen. Dermale und synoviale Fibroblasten sowie Zellen der Zelllinie HepG2 werden in 10 mL DMEM, Zellen der Zelllinie SW 1353 in RPMI 1640 kultiviert. Das jeweilige Medium wird mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) sowie 1 % Antibiotikum/Antimykotikum (AB/AM) supplementiert und alle 3 bis 4 Tage gewechselt.

5.2.1.1 Anlage von Primärkulturen synovialer Fibroblasten

Primärkulturen synovialer Fibroblasten werden aus synovialen Gewebebiopsaten gewonnen. Das Biopsat wird in 70%igem Ethanol dekontaminiert, in PBS gewaschen und zerkleinert. Das Gewebe wird für 1 h mit einer 0,1%igen Trypsinlösung (in PBS) bei 37 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und nachfolgend für 3 h mit einer 0,1%igen Kollagenaselösung (in DMEM mit 10 % FCS ohne AB/AM) bei 37 °C verdaut. Nach zwei Waschschritten mit PBS (3 min, 1.000 × g) werden die Gewebestücke in Zellkulturschalen ausgelegt und mit Medium überschichtet. Sobald Fibroblasten auswachsen, werden die Gewebestücke entfernt und die Zellen nach herkömmlicher Methodik kultiviert.

5.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Um eukaryotische Zellen über einen längeren Zeitraum zu sichern, erfolgt eine Kryokonservierung. Die einzufrierenden Zellen werden kultiviert, bis eine Konfluenz von ca. 80 % vorliegt. Nach Trypsinierung und Zentrifugation (5 min, 1.000 × g) wird das Zellpellet in 1,5 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Jeweils 500 µL der Suspension werden in einem Kryoröhrchen mit 500 µL kaltem Kryomedium (20 % DMSO, 80 % FCS) vermischt. Die Zellen werden über Nacht bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Für die Revitalisierung eukaryotischer Zellen werden die aufzutauenden Zellen sofort auf Eis gelagert. Der Inhalt des für 3 min in der Hand angewärmten Reaktionsgefäßes wird auf zwei Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel, um das im Kryomedium vorhandene DMSO zu entfernen.

5.2.1.3 Passagieren und Aussäen

Die adhären wachsenden Zellen werden bei einer Konfluenz von 90 - 100 % passagiert. Das Medium wird aus der Kulturschale entfernt und die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 mL Trypsinlösung wird für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Inhibition der Proteaseaktivität des Trypsins wird durch Zugabe von 5 mL Medium (10 % FCS, AB/AM) erzielt. Dieses wird zum Ablösen des Zellrasens und zur Aufnahme der Zellen verwendet. Das nach Zentrifugation (5 min, 1.000 × g) entstandene Zellpellet wird in Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird ausgesät oder für die Bestimmung der Zellzahl eingesetzt.

5.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wird mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Das Raster der Zählkammer ist in neun Quadrate unterteilt. Die vier Eckquadrate haben jeweils eine Fläche von 0,1 mm² und sind wiederum in 16 kleine Quadrate unterteilt. Ein Aliquot der Zellsuspension geernteter Zellen wird 1:1 mit Trypanblaulösung verdünnt. 20 µL der Suspension werden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen innerhalb der vier Eckquadrate der Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Vitale Zellen erscheinen leuchtend hell, während tote Zellen aufgrund der porösen Zellmembran blau gefärbt sind. Die Anzahl an Zellen in einem Milliliter Zellsuspension errechnet sich aus dem mit dem Verdünnungsfaktor sowie mit 10⁴ multiplizierten Mittelwert an Zellen in einem Eckquadrat der Zählkammer.

5.2.1.5 Behandlung mit profibrotischen Faktoren

Für die Behandlung von Fibroblasten mit profibrotischen Faktoren werden 230.000 Zellen/Zellkulturschale in 10 mL Medium ausgesät. Nach 24 h erfolgt ein Serumentzug auf 0,1 % FCS. Nach weiteren 24 h wird der Zellkulturüberstand entfernt und durch 6 mL Medium (0,1 % FCS) ersetzt, in dem die gewünschte Konzentration an profibrotischem Faktor bzw. Vehikel (s. 3.2.2.1) eingestellt ist. Die Inkubationsdauer bis zur Zellernte beträgt 48 h. Für die Zellernte wird der Zellkulturüberstand abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und das Zellpellet erneut mit PBS gewaschen (3 min, 1.500 × g) und in 350 µL RA1-Lysepuffer, versetzt mit 3,5 µL β-Mercaptoethanol, aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

5.2.1.6 Behandlung mit mechanischem Stress

230.000 synoviale Fibroblasten werden in beschichtete Bioflex-Kollagen-Typ I Zellkulturplatten (6 Kavitäten) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel und das Anlegen von mechanischem Stress (4,5 % Membrandehnung, 1 Hz) in einem FlexCell System (Dunn, Asbach). Als Kontrolle werden Zellen in den gleichen Schalen ohne mechanischen Stress kultiviert. Nach 24 h werden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert (s. 5.2.1.5).

5.2.1.7 Liposomen-vermittelte miRNA-Transfektion

Für die Transfektion dermalen Fibroblasten mit miRNAs wird das Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* (Life Technologies, San Diego, USA) eingesetzt. In jede Zellkulturschale werden 265.000 Zellen in einem definierten Volumen an DMEM (10 % FCS, ohne AB/AM) ausgesät, sodass das Endvolumen nach der Transfektion 5 mL beträgt. 10 µL *Lipofectamine 2000* werden in 500 µL DMEM (ohne Zusätze) verdünnt und nach 5 min mit einer Lösung aus 500 µL DMEM (ohne Zusätze) und 40 µL miRNA oder miRNA-Inhibitor (Endkonzentration 20 nM) versetzt. Der Ansatz wird 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und auf die Zellen aufgetropft. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgt eine Transfektion mit FAM-markierter siRNA. Am nächsten Tag wird das Zellkulturmedium entfernt und durch vollsupplementiertes Medium (10 % FCS, AB/AM) ersetzt sowie die Transfektionseffizienz mittels Immunfluoreszenzanalyse am Mikroskop bestimmt. 48, 72 oder 144 h nach der Transfektion erfolgt die Zellernte. Der Zellkulturüberstand wird bei -20 °C gelagert, das Zellpellet nach Angabe des Herstellers des *miRNeasy Micro Kits* (Qiagen, Hilden) in 700 µL *QIAzol Lysis Reagent* lysiert und bei -80 °C gelagert.

5.2.1.8 Liposomen-vermittelte Plasmid-DNA-Transfektion

Die Transfektion von Zellen der Zelllinie HepG2 oder SW 1353 mit Plasmid-DNA erfolgt unter Anwendung des *Fugene 6 Transfection Kits* (Promega, Mannheim). In jede Kavität einer 6-Kavitäten-Platte werden jeweils 180.000 Zellen ausgesät und kultiviert. Nach 24 h wird pro Kavität ein Transfektionsansatz aus 188 µL DMEM (ohne Zusätze) und 12 µL *Fugene 6* Reagenz angesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1.000 ng der Plasmid-DNA des jeweiligen pGL4.10-Konstruktes sowie 10 ng des zur Normalisierung der Luciferaseaktivität eingesetzten Plasmids pGL4.74. Der Reaktionsansatz

wird 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Währenddessen wird das Zellkulturmedium der Zellen entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Nach Auftropfen des Transfektionsansatzes beträgt das Gesamtvolumen des Zellkulturüberstandes 2 mL. 24 h nach der Transfektion wird das Medium durch vollsupplementiertes Medium (10 % FCS, AB/AM) und, je nach Angabe, mit TGF- β 1 (7,5 ng/mL) versetzt. Einen Tag später werden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Angaben des Herstellers des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* (Promega, Mannheim) in Lysepuffer lysiert.

5.2.2 Kultivierung von *E. coli*

5.2.2.1 Anzucht und Kryokonservierung

Autoklavierter, noch flüssiger LB-Agar wird auf 57 °C abgekühlt, auf eine Ampicillin-Endkonzentration von 75 μ g/mL eingestellt und auf Kultivierungsplatten verteilt. Transformierte *E. coli* XL 10 Gold Zellen werden auf dem ausgehärteten Agar auf 37 °C vorgewärmter Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für das Anlegen einer ü. N.-Kultur werden 5 mL autoklaviertes, Ampicillin-haltiges LB-Medium (Endkonzentration 75 μ g/mL) mit einer Kolonie transformierter *E. coli* XL 10 Gold Zellen von einer Agarplatte angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 240 U/min inkubiert.

Um Bakterienstämme nach erfolgreicher Transformation über einen längeren Zeitraum zu sichern, werden Kryokulturen angefertigt. 1 mL einer ü. N.-Kultur wird mit 400 μ L Glycerin versetzt, homogenisiert und bei -80 °C gelagert.

5.2.2.2 Transformation von *E. coli* XL 10 Gold Zellen

Das Prinzip der Transformation kompetenter Zellen mit Fremd-DNA beruht auf der Bindung von DNA an die Zellaußenseite chemisch kompetenter Bakterien. Durch einen Hitzeschock werden Poren in der Zellwand ausgebildet und die DNA wird in einem Endocytose-ähnlichen Prozess aufgenommen. Für die chemische Transformation werden chemisch kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* XL 10 Gold auf Eis aufgetaut. Zu je 45 μ L Bakteriensuspension werden 2 μ L β -Mercaptoethanol hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz werden 5 bis 8 μ L Plasmid-DNA (s. 5.1.13) gegeben. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis werden die Zellen einem Hitzeschock von 30 sec

bei 42 °C ausgesetzt. Nach Regeneration der Zellen für 2 min auf Eis werden 500 µL vorgewärmtes SOC-Medium zu den Zellen pipettiert und der Ansatz für 60 min bei 37 °C rotierend inkubiert. 75 µL, 150 µL sowie der restliche Ansatz werden jeweils auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Sicherung werden am nächsten Tag mittels einer sterilen Pipettenspitze Einzelkolonien selektiert und auf eine neue Platte übertragen.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Radiochemischer XT-Aktivitätsassay

Die Quantifizierung der XT-Aktivität in Serum oder Zellkulturüberständen kann über die Xylosylierung eines Akzeptors mit radioaktiv markierter UDP-[¹⁴C]-Xylose erfolgen (Weilke *et al.* 1997). Die Menge der kovalent verknüpften [¹⁴C]-Xylose verhält sich proportional zu der XT-Aktivität. Als Akzeptor für die Xylosylierung dient Seidenfibroin des Seidenspinners *Bombyx mori*, welches zu einem großen Anteil aus sich wiederholenden Einheiten des Peptids (G-S-G-A-G-A-G-A)_n aufgebaut ist. Für die Reaktion wird die Seide zunächst in eine für die Xylosylierung zugängliche Form überführt. Hierzu erfolgt die Solvatisierung der Seide in Lithiumthiocyanatlösung. Im Anschluss wird die Lösung gegen Wasser dialysiert und danach mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 äquilibriert (Campbell *et al.* 1984).

250 µL UDP-[¹⁴C]-Xylose (7,14 GBq/mmol) werden in 950 µL Wasser und 50 µL MES-Puffer verdünnt und nachfolgend als Stammlösung im Reaktionsansatz eingesetzt. In einer Dreifachbestimmung werden jeweils 50 µL Zellkulturüberstand mit 50 µL des Reaktionsansatzes (s. Tab. 5.22) versetzt und 90 min bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 5.22: Reaktionsansatz [50 µL] für den radiochemischen XT-Test.

Reagenz	1 × Volumen [µL]
MES-Puffer	5,00
Mg/Mn-Lösung	5,00
UDP-[¹⁴ C]-Xylose	10,0
Seidenfibroin (1%ig, solvatisiert)	30,0

90 μL des Gemisches werden auf eine Nitrocellulosemembran überführt, zwei Stunden getrocknet und anschließend in einem Szintillationsgefäß mehrfach mit Trichloressigsäure (TCA)-Lösung inkubiert. Im ersten Schritt erfolgt die Fällung des xylosylierten Seidenfibroins mit 10%iger TCA-Lösung für 15 min, es folgen drei Waschschrte mit 5%iger TCA-Lösung (10, 15 und 10 min). Abschließend werden 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit zu der Nitrocellulosemembran gegeben. Die Messung der Aktivität (2 min/Probe) wird am nächsten Tag im Szintillationszähler (Perkin Elmer, Foster City, USA) durchgeführt.

5.3.2 Massenspektrometrischer XT-Aktivitätsassay

Die massenspektrometrische Methode zur Bestimmung der XT-Aktivität beruht auf der Xylosylierung eines Bikunin-K1-Peptids durch die XT im Serum oder Zellkulturüberstand und die anschließende Produktauftrennung und Analyse mittels HPLC-ESI-MS Technik (Kuhn *et al.* 2006). Für die Xylosylierungs-Reaktion werden 50 μL Serum in einer Doppelbestimmung jeweils mit 50 μL des Reaktionsansatzes (s. Tab. 5.23) versetzt.

Tabelle 5.23: Reaktionsansatz [50 μL] für den massenspektrometrischen XT-Test.

Reagenz	1 \times Volumen [μL]
MES-Puffer	5,0
Mg/Mn-Lösung	5,0
UDP-Xylose [80 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	20,0
Bikunin-K1-Peptid [60 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	20,0

Im Anschluss an die 90minütige Reaktion bei 37 °C findet ein Denaturierungsschritt für 10 min bei 99 °C statt. Ausgefallene Proteine werden in einem Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 \times g) abgetrennt. Das xylosylierte Substrat im Überstand wird in einer 1:10 Verdünnung für die Messung eingesetzt.

5.3.3 Immunfluoreszenzanalysen

5.3.3.1 Expressionsnachweis von CD90 in synovialen Fibroblasten

Synoviale Fibroblasten sowie als Positiv- und Negativkontrolle fungierende dermale Fibroblasten bzw. HepG2-Zellen werden in einer Zelldichte von 200 Zellen/mm² in 12-Kavitäten-Platten ausgesät. Nach 24 h werden die Zellen mit PBS gewaschen (500 µL) und in eiskaltem Ethanol fixiert (200 µL, 5 min). Nach drei Waschschrritten erfolgt ein Blockierschritt mit 5 % FCS (20 min, 100 U/min). Nach dem Abwaschen des Blockierreagenz in einem Waschschrritt, wird das FITC-Konjugat anti-CD90 (Verdünnung 1:50 in 1 % BSA) in die Kavitäten pipettiert und für 1 h (100 U/min) im Dunkeln inkubiert. Vor der Beurteilung der Fluoreszenzfärbung werden die Zellen dreimal gewaschen und mit PBS überschichtet.

5.3.3.2 Expressionsnachweis von α -Glattmuskelaktin in Fibroblasten

Zu untersuchende Fibroblasten-Zelllinien werden in einer Zelldichte von 40 oder 500 Zellen/mm² in 12-Kavitäten-Platten ausgesät. 120 h nach Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 (5 ng/mL), erfolgt ein Waschschrritt mit PBS (400 µL/Kavität) und die Fixierung in Aceton/Methanol (1:1; 200 µL/Kavität) für 10 min. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS werden nicht-spezifische Bindestellen mit einer 1%igen Albuminlösung blockiert (1 h, 100 U/min, 300 µL/Kavität). Nach einem weiteren Waschschrritt folgt die Inkubation mit einem monoklonalen Maus-anti-Human Antikörper gegen α -Glattmuskelaktin (1,5 h, 100 U/min, 150 µL/Kavität, Verdünnung 1:50). Überschüssige Antikörper werden in zwei Waschschrritten entfernt, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem FITC-Konjugat Ziege-anti-Maus, stattfindet (1 h, 100 U/min, 150 µL/Kavität, Verdünnung 1:75 in 0,1 % BSA). Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen mit PBS überschichtet und für die Immunfluoreszenzanalyse am Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) eingesetzt.

5.3.4 Bestimmung der Galectin-3-Konzentration im Serum

Für die Quantifizierung der Galectin-3-Konzentration im Serum wird das *Human Galectin-3 Immunoassay Kit* (R&D Systems, Abingdon, UK) eingesetzt. In jede Kavität werden 100 µL *Assay Diluent RDIW* sowie 50 µL Standard, Probe oder Kontrolle pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit werden alle Kavitäten viermal mit je 400 µL Waschpuffer

gewaschen und 200 μ L des Konjugats hinzugefügt. Nach einer weiteren zweistündigen Inkubationszeit werden die Kavitäten erneut viermal gewaschen und anschließend für 30 min mit 200 μ L Substratlösung inkubiert. Mit der Zugabe von je 50 μ L Stopplösung wird der Substratumsatz blockiert. Die Messung der Absorption wird bei 450 nm und 540 nm (Korrektur) am Tecan Infinite (Tecan, Männedorf, CH) durchgeführt.

5.3.5 Bestimmung der GDF-15-Konzentration im Serum

Zur Bestimmung der GDF-15- (*growth differentiation factor-15*) Konzentration im Serum wird das *Human GDF-15 Immunoassay Kit* (R&D Systems, Abingdon, UK) verwendet. Die Proben werden zunächst 1:4 mit *Calibrator Diluent RD5-20* verdünnt. In jede Kavität werden 100 μ L *Assay Diluent RD1-9* vorgelegt und anschließend je 50 μ L Standard, Kontrolle oder Probe in die Kavität pipettiert und der Ansatz 2 h bei 200 U/min inkubiert. Nachdem die Kavitäten viermal mit je 400 μ L Waschpuffer gewaschen wurden, werden je 200 μ L Konjugat in jede Kavität pipettiert. Nach 60minütiger Inkubation bei 200 U/min werden die Kavitäten erneut viermal gewaschen. Unter Lichtausschluss folgt eine 30minütige Inkubation der Kavitäten mit je 200 μ L Substratlösung. Nach Abstoppen der Substratumsetzung mit 50 μ L Stopplösung erfolgt die Messung der Absorption bei 450 nm und 540 nm (Korrektur) am Tecan Infinite (Tecan, Männedorf, CH) innerhalb von 30 min.

5.3.6 Quantifizierung der XYLT-Promotoraktivität

Um die Aktivität von XYLT-Promotorkonstrukten zu quantifizieren, findet das *Dual Luciferase Assay* (Promega, Mannheim) Anwendung. Dieses basiert auf der Co-Expression zweier Luciferasen, die gezielt induziert werden, sodass der spezifische Substratumsatz mittels Lumineszenzmessung in einem Reaktionsansatz quantifiziert wird.

48 h nach der Transfektion der HepG2 oder SW1353 Zellen mit 10 ng pGL4.74 Kontroll-Plasmid und 1.000 ng des jeweiligen pGL4.10 XYLT-Promotorkonstruktes erfolgt die Zellyse in 500 μ L Lysepuffer (2 h, 150 U/min, 4 °C). 20 μ L des Lysats werden in ein Messröhrchen überführt und für die Messung am Luminometer (Berthold Technologies, Gütersloh) eingesetzt. Die Zugabe von 100 μ L *LARII*-Substrat ermöglicht die Messung der *Firefly*-Luciferase-Aktivität. Diese ist stromaufwärts des XYLT-Promotorkonstruktes auf dem pGL4.10-Plasmid kodiert. Mit Zugabe von 100 μ L *Stop&Glo*-Reagenz wird die *Firefly*-

Luciferase inhibiert und die Substratumsetzung der *Renilla*-Luciferase, die stromaufwärts von einem HSV-TK-Promotor auf dem pGL4.74 Plasmid kodiert ist, ermöglicht. Die Messung der *Renilla*-Luciferaseaktivität dient der Normalisierung, sodass Unterschiede bezüglich der Transfektions- und Lyseeffizienz zwischen den Proben minimiert werden. Über die Berechnung des Quotienten aus der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase-Aktivität können Rückschlüsse auf den Einfluss von Sequenzvariationen auf die Promotoraktivität geschlossen werden.

6. Material

Im folgenden Abschnitt sind die verwendeten Materialien aufgelistet. Alle Puffer oder Reaktionsansätze wurden mit destilliertem Wasser (B. Braun, Melsungen) angesetzt. Chemikalien wurden in analytischer Reinheit bezogen.

6.1 Chemikalien und Reagenzien

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bikunin-K1-Peptid	Thermo Scientific, Schwerte
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
dc ⁷ GTP	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard pUC-Mix Marker 8	Thermo Scientific, Schwerte
DNA-Längenstandard pUC19/MspI	MBBL, Bielefeld
dNTPs (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, EST
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr 0,5 mg/mL)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumdichlorid	Serva, Heidelberg
Mangandichlorid	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ <i>Primer</i>	Biomers, Ulm
Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt

Seide	Idee, Bielefeld
Szintillationsflüssigkeit <i>Ready Flow III</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Oxoid, Wilmington, USA
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
UDP-[¹⁴ C]-Xylose (7,14 GBq/mmol)	Perkin Elmer, Foster City, USA
UDP-Xylose	Sigma, Taufkirchen
Wasser (<i>Aqua ad. Injctabilia</i>)	B. Braun, Melsungen
Wasser (Aqua B. Braun)	B. Braun, Melsungen
Wasser (Rotisolv HPLC- <i>Gradient-Grade</i>)	Fisher Scientific, Schwerte
X-Galaktose	Peqlab, Erlangen
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe

6.2 Puffer und Lösungen

6.2.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

10 × TBE-Puffer	1000 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 900 mM Borsäure pH 8,4
10 × TE-Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA pH 7,5
DNA-Ladepuffer	0,05 % Xylencyanol 0,05 % Bromphenolblau 60 % Saccharose

6.2.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Ampicillinlösung	50 mg/mL Ampicillin in 70%igem Ethanol (Arbeitslösung: 75 µg/mL)
Kryomedium	20 % DMSO 80 % FCS

SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glukose 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 7,0
------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6.2.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

MES-Puffer	500 mM MES 100 mM KF pH 6,5
Mg/Mn-Lösung	100 mM MgCl ₂ 100 mM MnCl ₂ 250 mM KCl

6.3 Zelllinien

Synoviale Fibroblasten wurden aus dem Synovialgewebe von gesunden Kontrollen (SynFibK1, EB186, EB228) oder Arthrofibrose-Patienten (Afib01 bis Afib06) gewonnen, das in einem revisionschirurgischen Eingriff nach Knie-TEP-Implantation entnommen wurde.

Tabelle 6.1: Charakteristika der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp/Entnahmeregion	Hersteller
Afib01	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011
Afib02	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011
Afib03	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011
Afib04	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011
Afib05	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011
Afib06	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Faust, 2011

Zelllinie	Zelltyp/Entnahmeregion	Hersteller
SynFibK1	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Neumann <i>et al.</i> , Bad Nauheim
EB186	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Kunisch <i>et al.</i> , Eisenberg
EB228	Humane, synoviale Fibroblasten Synovialmembran	Kunisch <i>et al.</i> , Eisenberg
F42A	Humane, dermale Fibroblasten Abdominale Dermis (CC-25U)	Cambrex, Walkersville, USA
F50UA	Humane, dermale Fibroblasten Dermis des Arms (GM23251)	Coriell, Camden, USA
HepG2	Humane Hepatoblastomazellen Hepatozelluläres Karzinom (ACC-180)	American Type Culture Collection, Wesel
M45D	Humane, dermale Fibroblasten Faziale Dermis (PH10605A)	Genlantis, San Diego, USA
M56D	Humane, dermale Fibroblasten Faziale Dermis (PH10605A)	Genlantis, San Diego, USA
SW 1353	Humane Chondrosarkomazellen Grad II Chondrosarkom (HTB-94)	American Type Culture Collection, Wesel

6.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Antibiotikum/Antimykotikum (100 ×)	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM	Life Technologies, San Diego, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech, Aidenbach
PBS	Life Technologies, San Diego, USA
RPMI 1640	Life Technologies, San Diego, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10 ×)	PAN-Biotech, Aidenbach

6.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL 10 Gold Genotyp: endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB- hsdSMR-mrr)173 tet ^R F'[proAB lac ^q ZΔM15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]	Agilent, Santa Clara, USA
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------

6.6 Nährmedien für *E. coli*

LB-Agar	10 g Pepton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 20 g Agar add. 1 L mit <i>Aqua dest.</i>
LB-Medium	10 g Pepton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt add. 1 L mit <i>Aqua dest.</i>

6.7 Rekombinante Proteine

Lyophilisierte Proteine werden nach Angaben des Herstellers gelöst, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 6.2: Rekombinante Proteine.

Protein	Quelle	Hersteller
Activin A	HEK293-Zellen	HumanZyme, Chicago, USA
Angiotensin-II	synthetisch	Calbiochem, Darmstadt
CTGF	HEK293-Zellen	Biomol, Hamburg
Endothelin-1	synthetisch	Bachem AG, Bubendorf, CH
PDGF-AA	<i>E. coli</i>	Bachem AG, Bubendorf, CH
PDGF-BB	<i>E. coli</i>	Bachem AG, Bubendorf, CH
TGF- β 1	HEK293-Zellen	Miltenyi, Bergisch Gladbach

6.8 Enzyme

<i>BsrI</i> (5 U/ μ L)	New England Biolabs, Frankfurt
Kollagenase (0,1 U/mL)	Roche, Mannheim
<i>DpnI</i> (10 U/ μ L)	Agilent, Santa Clara, USA
Exonuklease I (20 U/ μ L)	New England Biolabs, Frankfurt
Hot Star <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ μ L)	Qiagen, Hilden
<i>MseI</i> (10 U/ μ L)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (1 U/ μ L)	USB, Affymetrix, USA

6.9 Antikörper und Inhibitoren

Maus-anti-Human CD90, FITC-Konjugat, monoklonal	Dianova, Hamburg
Maus-anti-Human α -Glattmuskelaktin, monoklonal	Dako, Hamburg
SB 431542 (ALK5 Inhibitor)	Abcam, Cambridge, UK
Ziege-anti-Maus IgG/IgM, FITC-Konjugat	Dianova, Hamburg

6.10 Oligonukleotide

6.10.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von *XYLT*-Promotorfragmenten

Tabelle 6.3: Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung von *XYLT*-Promotorfragmenten.

Fragment/ Amplifikatgröße	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Annealing- Temp.
<i>XYLT1-A</i> 732 bp	hXYLT1_A21_f hXYLT1_A21_r	CCCTGTTTCGCGGCCCTG CCGGAGTCGAGGCTGCTGAA	<i>Slowdown</i>
<i>XYLT1-B1</i> 285 bp	hXYLT1_B_Gap2_f hXYLT1_B_Gap2_r	CAGTCAGGATGGGAAAGAAC GGTGCCAACGATGTACTAAG	58,8 °C
<i>XYLT1-B2</i> 677 bp	hXYLT1_B2_f hXYLT1_B2_r	ATGGATGGGAAAAGGACAC TGGGGGAGGAGCCGAGGGAG	58,8 °C
<i>XYLT1-C</i> 573 bp	hXYLT1_C1_f hXYLT1_C1_r	AACAATCTCTTCCCACTCCC GGAGTTACTCAACCTTCGCA	61,2 °C
<i>XYLT1-D</i> 417 bp	hXYLT1_D2_f hXYLT1_D2_r	CATGCCCGGCTAATTTTTGT CTTCGCATCTTGTCTGCTGT	61,2 °C
<i>XYLT2-A</i> 509 bp	hXYLT2_A2_f hXYLT2_A2_r	GCTTACCCGCGTGGGACTGA CTGAAGCTCCCACTACCAG	61,2 °C
<i>XYLT2-B</i> 491 bp	hXYLT2_B2_f hXYLT2_B2_r	AGCAGCATGTGTCGAGGTCT GTCTGCGGCACAACCTCTCT	65,9 °C
<i>XYLT2-C</i> 571 bp	hXYLT2_C3_f hXYLT2_C3_r	CCTCCATCATGGCCTTCTAA GATGCTGATGCCTTTGCTCT	58,8 °C
<i>XYLT2-D</i> 409 bp	hXYLT2_D2_f hXYLT2_D2_r	TCTTGGCAGGTAGAAGTC GACGTTAGGAACCACTACAG	54,0 °C
<i>XYLT2-E</i> 576 bp	hXYLT2_E3_f hXYLT2_E3_r	AGACCATCCTGGCTAACAC GTTTCCGACGACAGTTTG	58,8 °C
<i>XYLT2-F</i> 671 bp	hXYLT2_F1_f hXYLT2_F1_r pGL4_f pGL4_r	GGAGACAGAGGGAAACAATG GGGTTTCACCGTGTTAGC CTAGCAAAATAGGCTGTCCC CTTAATGTTTTTGGCATCTTCCA	58,8 °C

6.10.2 Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR

Tabelle 6.4: Oligonukleotide zur Amplifikation in der *real-time* PCR.

Gen/ Amplifikat- größe	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Annealing- Temp.
ACTA2 169 bp	ACTA/E8/1412U18	GACCGAATGCAGAAGGAG	59,6 °C
	ACTA/E9/1580L17	CGGTGGACAATGGAAGG	
B2M 137 bp	β2M/E1/84U22	TGTGCTCGCGCTACTCTCTCTT	58,0 °C
	β2M/E2/200L21	CGGATGGATGAAACCCAGACA	
COL1A1 151 bp	Col1A1/3908U17E49	GATGTGCCACTCTGACT	58,0 °C
	Col1A1/4058L15E50	GGGTTCTTGCTGATG	
COL3A1 298 bp	Col3A1/E34,35/2498U18	GTGGTAGCCCTGGTGAGA	58,0 °C
	Col3A1/E39/2780L16	GGGGTCTCCTGGGTTAC	
COL5A1 359 bp	Col5A1/E3/782U18	CGCTCTCCCGTCTTCCTC	58,0 °C
	Col5A1/E4/1021L20	CACCCTCAAACACCTCCTCA	
DCN 102 bp	hDCN/E1/572U16	CCTTCCGCTGTCAATG	58,0 °C
	hDCN/E2/656L18	GCAGGTCTAGCAGAGTTG	
GAPDH 223 bp	hGAPDH/E2,3/116U18	AGGTCGGAGTCAACGGAT	58,0 °C
	hGAPDH/E4/338L18	TCCTGGAAGATGGTGATG	
HPRT 258 bp	hHPRT1/E3/311U18	GCTGACCTGCTGGATTAC	58,0 °C
	hHPRT1/E6/568L18	TGCGACCTTGACCATCTT	
TGFβ1 331 bp	hTGFβ1/E3/1404U17	GCGATACCTCAGCAACC	58,0 °C
	hTGFβ1/E6/1734L18	ACGCAGCAGTTCTTCTCC	
XYLT1 163 bp	XT-I/E11/2489U18	ACTGCCGAATTCACACAC	58,0 °C
	XT-I/E11-12/2633L19	GTGCCTCCTCAGGTTTGAT	
XYLT2 112 bp	XT-II/E10/2258U18	CCTTGTGCTGCCCTTGAC	58,0 °C
	XT-II/E11/2352L18	GCCCTGGAAACTCTGCTC	

6.10.3 Oligonukleotide für die RFLP-Analyse

Tabelle 6.5: Oligonukleotide für die Einführung von Restriktionsschnittstellen.

Gen/ Amplifikat- größe	<i>XYLT2</i> -SNV	Primer- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
XYLT2 184 bp	c.-664T>G	Restr_664_B2	GGAGTCTCTTGGAGGTCTTGTTA
		hXYLT1_C1_f	AACAATCTCTTCCCCTCC
XYLT2 278 bp	c.-1044G>A	Restr_1044_C3	GCTGTCCCTAACATTTGTTTGAGAAAC
		hXYLT1_B2_f	ATGGATGGGGAAAAGGACAC

6.10.4 Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese

Tabelle 6.6: Oligonukleotide für die Klonierung und Modifizierung von *XYLT*-Promotorkonstrukten. Basen, die mutiert oder inseriert werden sind fett gedruckt.

Primer- Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>hXYLT1c</i> .-403C>T_f	TCCCCCGGGCGCCTTCCCCATTACCCTCCCCTCCAGCGGGGA
<i>hXYLT1c</i> .-403C>T_r	TCCCCGCTGGAGGGGAGGGTAATGGGGAAGGCGCCGGGGGGA
<i>hXYLT1c</i> .-1088C>A_f	GCTGGGAGGCTGCGGGGCCAGACTTTGGGGCTTGCATCCTGC
<i>hXYLT1c</i> .-1088C>A_r	GCAGGATGCAAGCCCCAAAGTCTGGCCCCGCAGCCTCCCAGC
<i>hXYLT1</i> _Insert_mut_f	ACAGGGGTGTGGGGAGGGGGCGCCGCGCGGGCCAGGCGCC
<i>hXYLT1</i> _Insert_mut_r	GCTCGGGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCGGCTCGCCGCT
<i>hXYLT2c</i> .-80delG_f	CCTAGGCGTGGAGGAGGGGGGGCGGCTCAGCCCCGCGCCCGTG
<i>hXYLT2c</i> .-80delG_r	CACGGGCGCGGGGCTGAGCCGCCCCCTCCTCCACGCCTAGG
<i>hXYLT2c</i> .-84G>C_f	CCTCCCTAGGCGTGGAGGAGGCGGGGGCGGCTCAGCCCCGCGC
<i>hXYLT2c</i> .-84G>C_r	GCGCGGGGCTGAGCCGCCCCGCTCCTCCACGCCTAGGGAGG
<i>hXYLT2c</i> .-188G>T_f	ACTGAAGGTGTTGCGAGCCCCAGCTCCACCCCTAGCCTGCGG
<i>hXYLT2c</i> .-188G>T_r	CCGCAGGCTAGGGGTGGAGCTGGGGCTCGCAACACCTTCAGT
<i>hXYLT2c</i> .-664T>G_f	GAGGGGCACTAAAAATCTGTTGTATCAAGACCTCCAAGAGAC
<i>hXYLT2c</i> .-664T>G_r	GTCTCTTGGAGGTCTTGATACAACAGATTTTTTAGTGCCCTC
<i>hXYLT2c</i> .-1044G>A_f	GCGGTGCTCATTGAACACGCCAGGTTCTCAAACAAATGTTAG
<i>hXYLT2c</i> .-1044G>A_r	CTAACATTTGTTTGAGAACCTGGCGTGTTCAATGAGCACCGC

6.10.5 miRNA-mimics, -Inhibitoren und siRNAs

miRNA-mimics, -Inhibitoren und siRNAs (Life Technologies, San Diego, USA) werden in Nuklease-freiem Wasser gelöst und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6.7: miRNA- und siRNA-Oligonukleotide zur Regulation der XT-Expression.

miRNA	miRNA ID	Sequenz (5'-3')
hsa-miR-18a-5p	MC12973	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
hsa-miR-34a-5p	MC11030	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
has-miR-18a-5p Inhibitor	MH12973	
hsa-miR-34a-5p Inhibitor	MH11030	
miRNA, <i>negative control</i>	#1 miRNA	
siRNA, <i>negative control</i>	#2 siRNA	

6.11 Plasmide

pGL4.10 [<i>luc2</i>]	Promega, Mannheim
pGL4.74 [<i>hRluc/TK</i>]	Promega, Mannheim
pGL4.10 <i>XYLT1</i> c.-1031 bis +1 Δ_{238}^* [<i>luc2</i>]	Müller, 2009
pGL4.10 <i>XYLT1</i> c.-1639 bis +1 Δ_{238}^* [<i>luc2</i>]	Müller, 2009
pGL4.10 <i>XYLT1</i> c.-263 bis +2 [<i>luc2</i>]	Müller, 2009
pGL4.10 <i>XYLT1</i> c.-2568 bis +2 [<i>luc2</i>]	Müller, 2009

6.12 Kommerzielle Reaktionssysteme

<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>Dual-Luciferase Reporter Assay System</i>	Promega, Mannheim
<i>Fugene 6 Transfection Reagent</i>	Promega, Mannheim
<i>Human Galectin-3 Immunoassay Kit</i>	R&D Systems, Abingdon, UK
<i>Human GDF-15 Immunoassay Kit</i>	R&D Systems, Abingdon, UK
<i>Lipofectamine 2000</i>	Life Technologies, San Diego, USA
<i>miRNeasy Micro Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>miScript II RT Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>miScript miRNA HC PCR-Array</i>	Qiagen, Hilden
<i>miScript SYBR Green Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>MSB Spin PCRAPace Kit</i>	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld
<i>NucleoSpin Blood</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin RNA II</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Platinum SYBR Green qPCR SupermixUDG</i>	Life Technologies, San Diego, USA
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange XL Site-directed mutagenesis</i>	Agilent, Santa Clara, USA
<i>Superscript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Life Technologies, San Diego, USA

6.13 Verbrauchsmaterial

Falcon-tube (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Heat-sealing film	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocelluloseplättchen	Sartorius, Göttingen
Parafilm	Fleischhacker, Mannheim
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Platten	Thermo Scientific, Schwerte
PCR-Reaktionsgefäße 200 μ L	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht

Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
<i>Receiver coloumn/plate</i>	Macherey-Nagel, Düren
Sequenzierplatten	Life Technologies, San Diego, USA
Spritzen (10 mL, 30 mL, 50 mL)	B. Braun, Melsungen
Sterile Einwegpipetten (5, 10, 205, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Szinitillations-Röhrchen	Zinsser Analytik, Frankfurt
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen

6.14 Software und Datenbanken

Chromas	Technelysium Pty Ltd, USA
Clone Manager Suite 9	Scientific & Educat. <i>Software</i> , USA
<i>DIANA mT</i>	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php
DNA Star 2.1	DNA Star Inc, USA
FlexSoft FX-5000 Software	Dunn, Asbach
Fusion Capt	Peqlab, Erlangen
Genomatix	Genomatix <i>Software</i> , München
Graphpad Prism 5.0	GraphPad <i>Software</i> , San Diego, USA
Haploview	Broad Institute, Cambridge, USA
Mastercycler <i>Software</i> 1.0	Eppendorf, Hamburg
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
<i>PicTar</i>	http://pictar.mdc-berlin.de/
Sequence Analysis 3.7	Perkin Elmer ABI, Foster City, USA
<i>TargetScan Human</i>	http://www.targetscan.org/

6.15 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer Xcell	Thermo Scientific, Schwerte
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatikpipette	Eppendorf, Hamburg
CellDyn Ruby	Abbott, Illinois, USA
CO ₂ -Inkubator 37 °C GalaxyR	Thermo Scientific, Schwerte
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
FlexCell Vacuum System	Dunn, Asbach
Fusion-SL 3500 WL	Peqlab, Erlangen
Gasbrenner <i>fireboy eco</i>	Integra Biosciences, Fernwald
Genetic Analyzer 3500	ABI, Foster City, USA
Inkubator 37 °C	Biometra ADT Line, Göttingen
Lichtmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar

LightCycler 480	Roche, Mannheim
Lumat LB9507	Berthold Technologies, Gütersloh
Magnetrührer RTCbasic	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Schwerte
PCR-Platten-Versiegler	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Realplex <i>Mastercycler Syst.</i>	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle PS 3002	Life Technologies, San Diego, USA
SpeedVac Vakuumzentrifuge	Bachofen Laborgeräte, Reutlingen
Sterilbank	Waldner electronics, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
Tecan Infinite 200	Tecan Group, Männedorf, CH
Thermocycler	Landgraf, Langenhagen
Thermocycler "T Gradient"	Biometra, Göttingen
Vortexer „Vortex-Genie 2“	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage type 1404	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
- ROTIXA/RP	Hettich AG, Bäch
- Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
- Millifuge	Millipore GmbH, Schwalbach
- Biofuge pico	Heraeus, Buckinghamshire, UK

7. Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACTA2	α -Glattmuskelaktin-Gen
ACTA2	α -Glattmuskelaktin
Afib	arthrofibrotisch/Arthrofibrose
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
β 2M	β 2-Mikroglobulin-Gen
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	centi
CCN	CYR61/CTGF/NOV-Familie
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CS	Chondroitinsulfat
C _T	<i>cycle threshold</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Da	Dalton
DCN	Decorin
DCN	Decorin-Gen
dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Phosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiotriol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzymklasse
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Gen
GlcA	Glukuronsäure
GlcAT-I	Glukuronyltransferase-I
GlcNAc	N-Acetylglukosamin

GalT	Galaktosyltransferase
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
<i>HPRT</i>	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase I-Gen
HS	Heparansulfat
IdoA	Iduronsäure
k	kilo
kb	Kilobasen
KS	Keratansulfat
L	Liter
LB	Luria Bertani Medium
μ	mikro
m	Meter
M	molar
m	milli
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl
min	Minute
miRNA	microRNA
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NHDF	<i>normal human dermal fibroblast</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PG	Proteoglykan
RC	radiochemischer Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichlooessigsäure
TEP	Totalendoprothese
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i>
<i>TGF-β1</i>	<i>transforming growth factor-β1-Gen</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
U	Unit
UDP	Uracildiphosphat
ü. N.-Kultur	Übernachtkultur
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
<i>XYLT</i>	Xylosyltransferase-Gen

8. Literatur

- Adinolfi, L. E., Giordano, M. G., Andreana, A., Tripodi, M. F., Utili, R., Cesaro, G., Ragone, E., Durante Mangoni, E. und Ruggiero, G. (2001). *Hepatic fibrosis plays a central role in the pathogenesis of thrombocytopenia in patients with chronic viral hepatitis*. *Br J Haematol* 113(3): 590-595.
- Akai, J., Kimura, A. und Hata, R. I. (1999). *Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats*. *Gene* 239(1): 65-73.
- Allen, J. B., Manthey, C. L., Hand, A. R., Ohura, K., Ellingsworth, L. und Wahl, S. M. (1990). *Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta*. *J Exp Med* 171(1): 231-247.
- Almeida, R., Lavery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P. und Clausen, H. (1999). *Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family*. *J Biol Chem* 274(37): 26165-26171.
- Asundi, V. K., Keister, B. F. und Carey, D. J. (1998). *Organization, 5'-flanking sequence and promoter activity of the rat GPC1 gene*. *Gene* 206(2): 255-261.
- Aumailley, M. und Gayraud, B. (1998). *Structure and biological activity of the extracellular matrix*. *J Mol Med* 76(3-4): 253-265.
- Bachmann, H. S., Siffert, W. und Frey, U. H. (2003). *Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique*. *Pharmacogenetics* 13(12): 759-766.
- Bader, A. G. (2012). *miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic*. *Front Genet* 3: 120.
- Bahr, C., Schön, S., Kuhn, J., Groop, P. H., Parkkonen, M., Wessman, M., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006). *Novel sequence variants in the human xylosyltransferase I gene and their role in diabetic nephropathy*. *Diabet Med* 23(6): 681-684.
- Bai, X., Wei, G., Sinha, A. und Esko, J. D. (1999). *Chinese hamster ovary cell mutants defective in glycosaminoglycan assembly and glucuronosyltransferase I*. *J Biol Chem* 274(19): 13017-13024.
- Bai, X., Zhou, D., Brown, J. R., Crawford, B. E., Hennet, T. und Esko, J. D. (2001). *Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6)*. *J Biol Chem* 276(51): 48189-48195.
- Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P. und Wenstrup, R. J. (1998). *Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997*. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet* 77(1): 31-37.
- Bhattacharyya, S., Chen, S. J., Wu, M., Warner-Blankenship, M., Ning, H., Lakos, G., Mori, Y., Chang, E., Nihijima, C., Takehara, K., Feghali-Bostwick, C. und Varga, J. (2008). *Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma*. *Am J Pathol* 173(4): 1085-1099.
- Bittermann, P. B. und Henke, C. A. (1991). *Fibroproliferative disorders*. *Chest* 99: 81S-84S.
- Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W. und Azizkhan, J. C. (1990). *Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter*. *Mol Cell Biol* 10(12): 6632-6641.
- Bodevin-Authelet, S., Kusche-Gullberg, M., Pummill, P. E., DeAngelis, P. L. und Lindahl, U. (2005). *Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation*. *J Biol Chem* 280(10): 8813-8818.
- Boon, R. A., Iekushi, K., Lechner, S., Seeger, T., Fischer, A., Heydt, S., Kaluza, D., Treguer, K., Carmona, G., Bonauer, A., Horrevoets, A. J., Didier, N., Girmatsion, Z., Biliczki, P., Ehrlich, J. R., Katus, H. A., Müller, O. J., Potente, M., Zeiher, A. M., Hermeking, H. und Dimmeler, S. (2013). *MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function*. *Nature* 495(7439): 107-110.
- Bosch, U., Zeichen, J., Lobenhoffer, P., Skutnek, M. und van Griensven, M. (1999). *Etiology of arthrofibrosis*. *Arthroskopie* 12: 215-221.
- Bosch, U. (2002). *Arthrofibrosis*. *Orthopäde* 31(8): 785-790.

- Bostrom, H., Gritli-Linde, A. und Betsholtz, C. (2002). *PDGF-A/PDGF alpha-receptor signaling is required for lung growth and the formation of alveoli but not for early lung branching morphogenesis*. *Dev Dyn* 223(1): 155-162.
- Boys, M. L., Bian, F., Kramer, J. B., Chio, C. L., Ren, X. D., Chen, H., Barrett, S. D., Sexton, K. E., Iula, D. M., Filzen, G. F., Nguyen, M. N., Angell, P., Downs, V. L., Wang, Z., Raheja, N., Ellsworth, E. L., Fakhoury, S., Bratton, L. D., Keller, P. R., Gowan, R., Drummond, E. M., Maiti, S. N., Hena, M. A., Lu, L., McConnell, P., Knafels, J. D., Thanabal, V., Sun, F., Alessi, D., McCarthy, A., Zhang, E., Finzel, B. C., Patel, S., Ciotti, S. M., Eisma, R., Payne, N. A., Gilbertsen, R. B., Kostlan, C. R., Pocalyko, D. J. und Lala, D. S. (2012). *Discovery of a series of 2-(1H-pyrazol-1-yl)pyridines as ALK5 inhibitors with potential utility in the prevention of dermal scarring*. *Bioorg Med Chem Lett* 22(10): 3392-3397.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. und Grotendorst, G. R. (1991). *Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10*. *J Cell Biol* 114(6): 1285-1294.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. und Cedar, H. (1994). *Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation*. *Nature* 371(6496): 435-438.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S. und Palcic, M. M. (2012). *Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases*. *Curr Opin Struct Biol* 22(5): 540-549.
- Brinkmann, T., Weilke, C. und Kleesiek, K. (1997). *Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*. *J Biol Chem* 272(17): 11171-11175.
- Bui, C., Huber, C., Tuysuz, B., Alanay, Y., Bole-Feysot, C., Leroy, J. G., Mortier, G., Nitschke, P., Munnich, A. und Cormier-Daire, V. (2014). *XYLT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2*. *Am J Hum Genet* 94(3): 405-414.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K. und Neidle, S. (2006). *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. *Nucleic Acids Res* 34(19): 5402-5415.
- Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Roden, L. und Fessler, J. H. (1984). *Silk-a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*. *Anal Biochem* 137(2): 505-516.
- Campbell, S. E. und Katwa, L. C. (1997). *Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts*. *J Mol Cell Cardiol* 29(7): 1947-1958.
- Carthew, R. W. und Sontheimer, E. J. (2009). *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. *Cell* 136(4): 642-655.
- Casanova, J. C., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2008). *Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II*. *Biochem Biophys Res Commun* 365(4): 678-684.
- Chen, S. J., Ning, H., Ishida, W., Sodin-Semrl, S., Takagawa, S., Mori, Y. und Varga, J. (2006). *The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression*. *J Biol Chem* 281(30): 21183-21197.
- Childs, C. B., Proper, J. A., Tucker, R. F. und Moses, H. L. (1982). *Serum contains a platelet-derived transforming growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(17): 5312-5316.
- Condac, E., Dale, G. L., Bender-Neal, D., Ferencz, B., Towner, R. und Hinsdale, M. E. (2009). *Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum*. *Glycobiology* 19(8): 829-833.
- Cs-Szabo, G., Roughley, P. J., Plaas, A. H. und Glant, T. T. (1995). *Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage*. *Arthritis Rheum* 38(5): 660-668.
- Dabiri, G., Campaner, A., Morgan, J. R. und Van De Water, L. (2006). *A TGF-beta1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts*. *J Invest Dermatol* 126(5): 963-970.
- de Boer, R. A., Yu, L. und van Veldhuisen, D. J. (2010). *Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure*. *Curr Heart Fail Rep* 7(1): 1-8.
- De Gobbi, M., Viprakasit, V., Hughes, J. R., Fisher, C., Buckle, V. J., Ayyub, H., Gibbons, R. J., Vernimmen, D., Yoshinaga, Y., de Jong, P., Cheng, J. F., Rubin, E. M., Wood, W. G.,

- Bowden, D. und Higgs, D. R. (2006). *A regulatory SNP causes a human genetic disease by creating a new transcriptional promoter*. Science 312(5777): 1215-1217.
- de Gouville, A. C. und Huet, S. (2006). *Inhibition of ALK5 as a new approach to treat liver fibrotic diseases*. Drug News Perspect 19(2): 85-90.
- De Paepe, A. und Malfait, F. (2012). *The Ehlers-Danlos syndrome, a disorder with many faces*. Clin Genet 82(1): 1-11.
- Derynck, R. und Feng, X. H. (1997). *TGF-beta receptor signaling*. Biochim Biophys Acta 1333(2): F105-150.
- Desmoulière, A., Rubbia-Brandt, L., Grau, G. und Gabbiani, G. (1992). *Heparin induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts*. Lab Invest 67(6): 716-726.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. und Gabbiani, G. (1993). *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol 122(1): 103-111.
- Dziedzic, D., Wegrzyn, G. und Jakobkiewicz-Banecka, J. (2010). *Impairment of glycosaminoglycan synthesis in mucopolysaccharidosis type IIIA cells by using siRNA: a potential therapeutic approach for Sanfilippo disease*. Eur J Hum Genet 18(2): 200-205.
- Esko, J. D., Stewart, T. E. und Taylor, W. H. (1985). *Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A 82(10): 3197-3201.
- Esko, J. D., Weinke, J. L., Taylor, W. H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G. und Gawish, A. (1987). *Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I*. J Biol Chem 262(25): 12189-12195.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N. und Filipowicz, W. (2010). *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. Annu Rev Biochem 79: 351-379.
- Faust, I., Roch, C., Kuhn, J., Prante, C., Knabbe, C. und Hendig, D. (2013). *Human xylosyltransferase-I - A new marker for myofibroblast differentiation in skin fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun 436(3): 449-454.
- Ferguson, M. W. und O'Kane, S. (2004). *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359(1445): 839-850.
- Fonseca, C., Lindahl, G. E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E. A., Holmes, A. M., Spagnolo, P., Pantelidis, P., Leoni, P., McHugh, N., Stock, C. J., Shi-Wen, X., Denton, C. P., Black, C. M., Welsh, K. I., du Bois, R. M. und Abraham, D. J. (2007). *A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis*. N Engl J Med 357(12): 1210-1220.
- Frey, U. H., Bachmann, H. S., Peters, J. und Siffert, W. (2008). *PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'*. Nat Protoc 3(8): 1312-1317.
- Fritz, T. A., Agrawal, P. K., Esko, J. D. und Krishna, N. R. (1997). *Partial purification and substrate specificity of heparan sulfate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase I: synthesis, NMR spectroscopic characterization and in vitro assays of two aryl tetrasaccharides*. Glycobiology 7(5): 587-595.
- Geiser, M., Cebe, R., Drewello, D. und Schmitz, R. (2001). *Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase*. Biotechniques 31(1): 88-90, 92.
- Georges, P. C., Hui, J. J., Gombos, Z., McCormick, M. E., Wang, A. Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P. A., Furth, E. E. und Wells, R. G. (2007). *Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(6): G1147-1154.
- Ghosh, A. K., Quaggin, S. E. und Vaughan, D. E. (2013). *Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches*. Exp Biol Med (Maywood) 238(5): 461-481.
- Ghosh, P. und Cheras, P. A. (2001). *Vascular mechanisms in osteoarthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol 15(5): 693-709.
- Gollwitzer, H., Burgkart, R., Diehl, P., Gradinger, R. und Bühren, V. (2006). *Therapy of arthrofibrosis after total knee arthroplasty*. Orthopäde 35(2): 143-152.
- Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T. und Kleesiek, K. (1999). *Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis*. J Invest Dermatol 112(6): 919-924.

- Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T. und Kleesiek, K. (2000a). *Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis*. *Acta Derm Venereol* 80(1): 60-61.
- Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T. und Kleesiek, K. (2000b). *Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II*. *J Mol Biol* 304(4): 517-528.
- Grinnell, F. (2003). *Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices*. *Trends Cell Biol* 13(5): 264-269.
- Grotendorst, G. R., Okochi, H. und Hayashi, N. (1996). *A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene*. *Cell Growth Differ* 7(4): 469-480.
- Hapgood, J. P., Riedemann, J. und Scherer, S. D. (2001). *Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements*. *Cell Biol Int* 25(1): 17-31.
- Hayman, E. G., Pierschbacher, M. D., Suzuki, S. und Ruoslahti, E. (1985). *Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum*. *Exp Cell Res* 160(2): 245-258.
- Heldin, C. H. und Westermark, B. (1999). *Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor*. *Physiol Rev* 79(4): 1283-1316.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. und Chaponnier, C. (2001). *Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity*. *Mol Biol Cell* 12(9): 2730-2741.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L. und Gabbiani, G. (2007). *The myofibroblast: one function, multiple origins*. *Am J Pathol* 170(6): 1807-1816.
- Hinz, B. (2010). *The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell*. *J Biomech* 43(1): 146-155.
- Hinz, B. und Gabbiani, G. (2010). *Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives*. *F1000 Biol Rep* 2: 78.
- Hitraya, E. G., Varga, J., Artlett, C. M. und Jimenez, S. A. (1998). *Identification of elements in the promoter region of the alpha1(I) procollagen gene involved in its up-regulated expression in systemic sclerosis*. *Arthritis Rheum* 41(11): 2048-2058.
- Hlavacek, M. und Novak, J. (1995). *The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints-III. Squeeze-film lubrication: axial symmetry under low loading conditions*. *J Biomech* 28(10): 1193-1198.
- Holian, J., Qi, W., Kelly, D. J., Zhang, Y., Mreich, E., Pollock, C. A. und Chen, X. M. (2008). *Role of Kruppel-like factor 6 in transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of proximal tubule cells*. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(5): F1388-1396.
- Honn, K. V., Singley, J. A. und Chavin, W. (1975). *Fetal bovine serum: a multivariate standard*. *Proc Soc Exp Biol Med* 149(2): 344-347.
- Hu, Y. und Walker, S. (2002). *Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases*. *Chem Biol* 9(12): 1287-1296.
- Hubmacher, D. und Apte, S. S. (2013). *The biology of the extracellular matrix: novel insights*. *Curr Opin Rheumatol* 25(1): 65-70.
- Hübner, G., Hu, Q., Smola, H. und Werner, S. (1996). *Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair*. *Dev Biol* 173(2): 490-498.
- Hwang, H. Y., Olson, S. K., Brown, J. R., Esko, J. D. und Horvitz, H. R. (2003). *The Caenorhabditis elegans genes sqv-2 and sqv-6, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase*. *J Biol Chem* 278(14): 11735-11738.
- Hynes, R. O. (2009). *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. *Science* 326(5957): 1216-1219.
- Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M. und Grotendorst, G. R. (1993). *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair*. *Mol Biol Cell* 4(6): 637-645.
- Iozzo, R. V. und Murdoch, A. D. (1996). *Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function*. *Faseb J* 10(5): 598-614.
- Jensen, M. A., Fukushima, M. und Davis, R. W. (2010). *DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis*. *PLoS One* 5(6): e11024.
- Jinnin, M. (2010). *Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis*. *J Dermatol* 37(1): 11-25.

- Junaid, A., Rosenberg, M. E. und Hostetter, T. H. (1997). *Interaction of angiotensin II and TGF-beta 1 in the rat remnant kidney*. J Am Soc Nephrol 8(11): 1732-1738.
- Jung, A., Ruckert, S., Frank, P., Brabletz, T. und Kirchner, T. (2002). *7-Deaza-2'-deoxyguanosine allows PCR and sequencing reactions from CpG islands*. Mol Pathol 55(1): 55-57.
- Kawakami, T., Ihn, H., Xu, W., Smith, E., LeRoy, C. und Trojanowska, M. (1998). *Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype*. J Invest Dermatol 110(1): 47-51.
- Kearns, A. E., Campbell, S. C., Westley, J. und Schwartz, N. B. (1991). *Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase*. Biochemistry 30(30): 7477-7483.
- Khair, M., Bourhim, M., Barre, L., Li, D., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S. und Ouzzine, M. (2013). *Regulation of xylosyltransferase I gene expression by interleukin 1beta in human primary chondrocyte cells: mechanism and impact on proteoglycan synthesis*. J Biol Chem 288(3): 1774-1784.
- Khvorova, A., Reynolds, A. und Jayasena, S. D. (2003). *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell 115(2): 209-216.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K. W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T. und Sugahara, K. (1998). *Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans*. J Biol Chem 273(12): 6615-6618.
- Kjellen, L. und Lindahl, U. (1991). *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem 60: 443-475.
- Kleesiek, K., Reinards, R., Okusi, J., Wolf, B. und Greiling, H. (1987). *UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase: a new marker of cartilage destruction in chronic joint diseases*. J Clin Chem Clin Biochem 25(8): 473-481.
- Kornberg, R. D. (2007). *The molecular basis of eukaryotic transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A 104(32): 12955-12961.
- Krenn, V., Ruppert, M., Knoss, P., Kendoff, D., Poremba, C., Thomsen, M., Skutek, M., Hassenpflug, J., Ascherl, R., Krukemeyer, M. G., Matziolis, G., Thomas, P. und Gehrke, T. (2013). *Synovialitis of the arthrofibrotic type: criteria of a new synovialitis type for the diagnosis of arthrofibrosis*. Z Rheumatol 72(3): 270-278.
- Krol, J., Loedige, I. und Filipowicz, W. (2010). *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet 11(9): 597-610.
- Kuhn, D. E., Martin, M. M., Feldman, D. S., Terry, A. V., Jr., Nuovo, G. J. und Elton, T. S. (2008). *Experimental validation of miRNA targets*. Methods 44(1): 47-54.
- Kuhn, J., Götting, C., Schnolzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T. und Kleesiek, K. (2001). *First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells*. J Biol Chem 276(7): 4940-4947.
- Kuhn, J., Prante, C., Schön, S., Götting, C. und Kleesiek, K. (2006). *Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Clin Chem 52(12): 2243-2249.
- Kuhn, J., Gressner, O. A., Götting, C., Gressner, A. M. und Kleesiek, K. (2009). *Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis*. Clin Chim Acta 409(1-2): 123-126.
- Kuroda, K. und Shinkai, H. (1997). *Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis*. Arch Dermatol Res 289(10): 567-572.
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. und Withers, S. G. (2008). *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. Annu Rev Biochem 77: 521-555.
- Leask, A. und Abraham, D. J. (2004). *TGF-beta signaling and the fibrotic response*. Faseb J 18(7): 816-827.
- Leask, A. (2008). *Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma*. Cell Signal 20(8): 1409-1414.
- Leask, A. (2010). *Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation*. Circ Res 106(11): 1675-1680.

- Lee, P. H., Trowbridge, J. M., Taylor, K. R., Morhenn, V. B. und Gallo, R. L. (2004). *Dermatan sulfate proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis is induced in fibroblasts by transfer to a three-dimensional extracellular environment*. J Biol Chem 279(47): 48640-48646.
- Levick, J. R. und Knight, A. D. (1987). *Osmotic flows across the blood-joint barrier*. Ann Rheum Dis 46(7): 534-539.
- Li, L., Asteriou, T., Bernert, B., Heldin, C. H. und Heldin, P. (2007). *Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB*. Biochem J 404(2): 327-336.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U. und Lidholt, K. (1998). *The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate*. J Biol Chem 273(41): 26265-26268.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P. und Betsholtz, C. (1997). *Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice*. Science 277(5323): 242-245.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods 25(4): 402-408.
- Masur, S. K., Dewal, H. S., Dinh, T. T., Erenburg, I. und Petridou, S. (1996). *Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(9): 4219-4223.
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jungel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R. E., Michel, B. A., Distler, J. H., Gay, S. und Distler, O. (2010). *MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum 62(6): 1733-1743.
- McFarland, K. L., Glaser, K., Hahn, J. M., Boyce, S. T. und Supp, D. M. (2011). *Culture medium and cell density impact gene expression in normal skin and abnormal scar-derived fibroblasts*. J Burn Care Res 32(4): 498-508.
- Miyake, N., Kosho, T., Mizumoto, S., Furuichi, T., Hatamochi, A., Nagashima, Y., Arai, E., Takahashi, K., Kawamura, R., Wakui, K., Takahashi, J., Kato, H., Yasui, H., Ishida, T., Ohashi, H., Nishimura, G., Shiina, M., Saitsu, H., Tsurusaki, Y., Doi, H., Fukushima, Y., Ikegawa, S., Yamada, S., Sugahara, K. und Matsumoto, N. (2010). *Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome*. Hum Mutat 31(8): 966-974.
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T. und Takehara, K. (1999). *Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model*. J Cell Physiol 181(1): 153-159.
- Moses, J., Oldberg, A., Cheng, F. und Fransson, L. A. (1997). *Biosynthesis of the proteoglycan decorin--transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region*. Eur J Biochem 248(2): 521-526.
- Moses, J., Oldberg, A. und Fransson, L. A. (1999). *Initiation of galactosaminoglycan biosynthesis. Separate galactosylation and dephosphorylation pathways for phosphoxyloxyloxy decorin protein and exogenous xyloside*. Eur J Biochem 260(3): 879-884.
- Müller, B., Prante, C., Gastens, M., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2008). *Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Matrix Biol 27(2): 139-149.
- Müller, B. (2009). *Identifizierung und funktionelle Analyse der humanen Xylosyltransferasen-I- und -II-Promotoren*. Universität Bielefeld, Dissertation.
- Müller, B., Prante, C., Kleesiek, K. und Götting, C. (2009). *Identification and characterization of the human xylosyltransferase I gene promoter region*. J Biol Chem 284(45): 30775-30782.
- Müller, B., Prante, C., Knabbe, C., Kleesiek, K. und Götting, C. (2013). *First identification and functional analysis of the human xylosyltransferase II promoter*. Glycoconj J 30(3): 237-245.
- Munz, B., Smola, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., Brauchle, M., Lein, I., Evans, L. W., Huylebroeck, D., Balling, R. und Werner, S. (1999). *Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair*. Embo J 18(19): 5205-5215.
- Nakajima, M., Mizumoto, S., Miyake, N., Kogawa, R., Iida, A., Ito, H., Kitoh, H., Hirayama, A., Mitsubuchi, H., Miyazaki, O., Kosaki, R., Horikawa, R., Lai, A., Mendoza-Londono, R., Dupuis, L., Chitayat, D., Howard, A., Leal, G. F., Cavalcanti, D., Tsurusaki, Y., Saitsu, H., Watanabe, S., Lausch, E., Unger, S., Bonafe, L., Ohashi, H., Superti-Furga, A., Matsumoto,

- N., Sugahara, K., Nishimura, G. und Ikegawa, S. (2013). *Mutations in B3GALT6, which encodes a glycosaminoglycan linker region enzyme, cause a spectrum of skeletal and connective tissue disorders*. Am J Hum Genet 92(6): 927-934.
- Ohga, E., Matsuse, T., Teramoto, S., Katayama, H., Nagase, T., Fukuchi, Y. und Ouchi, Y. (1996). *Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun 228(2): 391-396.
- Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K. und Urano, T. (1999a). *Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene*. J Biol Chem 274(41): 28841-28844.
- Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T. und Furukawa, K. (1999b). *Human homolog of Caenorhabditis elegans sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans*. J Biol Chem 274(33): 22915-22918.
- Olive, V., Jiang, I. und He, L. (2010). *mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network*. Int J Biochem Cell Biol 42(8): 1348-1354.
- Orphanides, G., Lagrange, T. und Reinberg, D. (1996). *The general transcription factors of RNA polymerase II*. Genes Dev 10(21): 2657-2683.
- Pandit, K. V., Milosevic, J. und Kaminski, N. (2011). *MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis*. Transl Res 157(4): 191-199.
- Patel, V. und Noureddine, L. (2012). *MicroRNAs and fibrosis*. Curr Opin Nephrol Hypertens 21(4): 410-416.
- Paulson, J. C. und Colley, K. J. (1989). *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. J Biol Chem 264(30): 17615-17618.
- Peplow, P. V. (2005). *Glycosaminoglycan: a candidate to stimulate the repair of chronic wounds*. Thromb Haemost 94(1): 4-16.
- Petridou, S., Maltseva, O., Spanakis, S. und Masur, S. K. (2000). *TGF-beta receptor expression and smad2 localization are cell density dependent in fibroblasts*. Invest Ophthalmol Vis Sci 41(1): 89-95.
- Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K. und Götting, C. (2007). *Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem 282(8): 5201-5206.
- Pönighaus, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2010). *Involvement of a cysteine protease in the secretion process of human xylosyltransferase I*. Glycoconj J 27(3): 359-366.
- Prante, C., Bieback, K., Funke, C., Schön, S., Kern, S., Kuhn, J., Gastens, M., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006). *The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I*. Stem Cells 24(10): 2252-2261.
- Prante, C., Milting, H., Kassner, A., Farr, M., Ambrosius, M., Schön, S., Seidler, D. G., Banayoso, A. E., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2007). *Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling*. J Biol Chem 282(36): 26441-26449.
- Prydz, K. und Dalen, K. T. (2000). *Synthesis and sorting of proteoglycans*. J Cell Sci 113 Pt 2: 193-205.
- Qin, W., Chung, A. C., Huang, X. R., Meng, X. M., Hui, D. S., Yu, C. M., Sung, J. J. und Lan, H. Y. (2011). *TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29*. J Am Soc Nephrol 22(8): 1462-1474.
- Qin, Y. und Hurley, L. H. (2008). *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions*. Biochimie 90(8): 1149-1171.
- Redell, J. B. und Tempel, B. L. (1998). *Multiple promoter elements interact to control the transcription of the potassium channel gene, KCNJ2*. J Biol Chem 273(35): 22807-22818.
- Reed, C. C. und Iozzo, R. V. (2002). *The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis*. Glycoconj J 19(4-5): 249-255.
- Rizzino, A., Kazakoff, P., Ruff, E., Kuszyński, C. und Nebelsick, J. (1988). *Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor beta, epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor*. Cancer Res 48(15): 4266-4271.

- Roch, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2009). *Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans*. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 685-691.
- Rubbia-Brandt, L., Sappino, A. P. und Gabbiani, G. (1991). *Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60(2): 73-82.
- Ruhland, C., Schönherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R. V., Bruckner, P. und Seidler, D. G. (2007). *The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis*. *Febs J* 274(16): 4246-4255.
- Ruoslahti, E. (1988). *Structure and biology of proteoglycans*. *Annu Rev Cell Biol* 4: 229-255.
- Sarrazy, V., Billet, F., Micallef, L., Coulomb, B. und Desmoulière, A. (2011). *Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments*. *Wound Repair Regen* 19 Suppl 1: s10-15.
- Sato, S., Nagaoka, T., Hasegawa, M., Tamatani, T., Nakanishi, T., Takigawa, M. und Takehara, K. (2000). *Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis*. *J Rheumatol* 27(1): 149-154.
- Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Steiner, G. und Smolen, J. (2001). *The stressed synovium*. *Arthritis Res* 3(2): 80-86.
- Schön, S., Prante, C., Müller, S., Schottler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2005). *Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type I diabetic patients with and without nephropathy*. *Kidney Int* 68(4): 1483-1490.
- Schön, S., Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagen, F. W., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006a). *Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage* 14(5): 442-448.
- Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006b). *Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II*. *J Biol Chem* 281(20): 14224-14231.
- Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006c). *The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A125S) is a risk factor for diabetic nephropathy in type I diabetes*. *Diabetes Care* 29(10): 2295-2299.
- Schön, S., Schulz, V., Prante, C., Hendig, D., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. und Götting, C. (2006d). *Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course*. *J Med Genet* 43(9): 745-749.
- Schreml, J., Durmaz, B., Cogulu, O., Keupp, K., Beleggia, F., Pohl, E., Milz, E., Coker, M., Ucar, S. K., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Kuhn, J. und Ozkinay, F. (2013). *The missing "link": an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation*. *Hum Genet* 133(1): 29-39.
- Schultz, J., Witt, S. A., Glascock, B. J., Nieman, M. L., Reiser, P. J., Nix, S. L., Kimball, T. R. und Doetschman, T. (2002). *TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II*. *J Clin Invest* 109(6): 787-796.
- Schwartz, N. B. (1977). *Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein*. *J Biol Chem* 252(18): 6316-6321.
- Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. und Rajewsky, N. (2008). *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. *Nature* 455(7209): 58-63.
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L. und Gabbiani, G. (1998). *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*. *J Cell Biol* 142(3): 873-881.
- Sethupathy, P., Megraw, M. und Hatzigeorgiou, A. G. (2006). *A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets*. *Nat Methods* 3(11): 881-886.
- Shimajiri, S., Arima, N., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., Wang, K. Y. und Sasaguri, Y. (1999). *Shortened microsatellite d(CA)21 sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene*. *FEBS Lett* 455(1-2): 70-74.

- Shi-Wen, X., Kennedy, L., Renzoni, E. A., Bou-Gharios, G., du Bois, R. M., Black, C. M., Denton, C. P., Abraham, D. J. und Leask, A. (2007a). *Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts*. *Arthritis Rheum* 56(12): 4189-4194.
- Shi-Wen, X., Renzoni, E. A., Kennedy, L., Howat, S., Chen, Y., Pearson, J. D., Bou-Gharios, G., Dashwood, M. R., du Bois, R. M., Black, C. M., Denton, C. P., Abraham, D. J. und Leask, A. (2007b). *Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts*. *Matrix Biol* 26(8): 625-632.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B. Z. und Cedar, H. (1999). *DNA methylation represses transcription in vivo*. *Nat Genet* 22(2): 203-206.
- Skutek, M., van Griensven, M., Zeichen, J., Brauer, N. und Bosch, U. (2001). *Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts*. *Eur J Appl Physiol* 86(1): 48-52.
- Sonnlyal, S., Shi-Wen, X., Leoni, P., Naff, K., Van Pelt, C. S., Nakamura, H., Leask, A., Abraham, D., Bou-Gharios, G. und de Crombrughe, B. (2010). *Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis*. *Arthritis Rheum* 62(5): 1523-1532.
- Sugahara, K., Yamashina, I., De Waard, P., Van Halbeek, H. und Vliegenthart, J. F. (1988). *Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-O-sulfate)beta 1-3Gal beta 1-4XYL beta 1-O-Ser*. *J Biol Chem* 263(21): 10168-10174.
- Sugiyama, M., Ichida, T., Sato, T., Ishikawa, T., Matsuda, Y. und Asakura, H. (1998). *Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers*. *Gastroenterology* 114(3): 550-558.
- Sugumaran, G., Katsman, M. und Silbert, J. E. (1998). *Subcellular co-localization and potential interaction of glucuronosyltransferases with nascent proteochondroitin sulphate at Golgi sites of chondroitin synthesis*. *Biochem J* 329 (Pt 1): 203-208.
- Swann, D. A., Garg, H. G., Jung, W. und Hermann, H. (1985). *Studies on human scar tissue proteoglycans*. *J Invest Dermatol* 84(6): 527-531.
- Taniguchi, T., Asano, Y., Akamata, K., Noda, S., Masui, Y., Yamada, D., Takahashi, T., Ichimura, Y., Toyama, T., Tamaki, Z., Tada, Y., Sugaya, M., Kadono, T. und Sato, S. (2012). *Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis*. *J Rheumatol* 39(3): 539-544.
- Taniyama, Y., Morishita, R., Nakagami, H., Moriguchi, A., Sakonjo, H., Shokei, K., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J. und Ogihara, T. (2000). *Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters*. *Circulation* 102(2): 246-252.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M. A., Licht, J. D., Pena, J. T., Rouhanifard, S. H., Muckenthaler, M. U., Tuschl, T., Martin, G. R., Bauersachs, J. und Engelhardt, S. (2008). *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. *Nature* 456(7224): 980-984.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. und Brown, R. A. (2002). *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5): 349-363.
- Unterhauser, F. N., Bosch, U., Zeichen, J. und Weiler, A. (2004). *Alpha-smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. Winner of the AGA-DonJoy Award 2003*. *Arch Orthop Trauma Surg* 124(9): 585-591.
- van Almen, G. C., Verhesen, W., van Leeuwen, R. E., van de Vrie, M., Eurlings, C., Schellings, M. W., Swinnen, M., Cleutjens, J. P., van Zandvoort, M. A., Heymans, S. und Schroen, B. (2011). *MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure*. *Aging Cell* 10(5): 769-779.
- Venkatesan, N., Barre, L., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S. und Ouzzine, M. (2009). *Modulation of xylosyltransferase I expression provides a mechanism regulating glycosaminoglycan chain synthesis during cartilage destruction and repair*. *Faseb J* 23(3): 813-822.

- Venkatesan, N., Barre, L., Bourhim, M., Magdalou, J., Mainard, D., Netter, P., Fournel-Gigleux, S. und Ouzzine, M. (2012). *Xylosyltransferase-I regulates glycosaminoglycan synthesis during the pathogenic process of human osteoarthritis*. PLoS One 7(3): e34020.
- Verrecchia, F., Chu, M. L. und Mauviel, A. (2001a). *Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach*. J Biol Chem 276(20): 17058-17062.
- Verrecchia, F., Rossert, J. und Mauviel, A. (2001b). *Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis*. J Invest Dermatol 116(5): 755-763.
- Verrecchia, F. und Mauviel, A. (2002). *Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation*. J Invest Dermatol 118(2): 211-215.
- Voglmeir, J., Voglauer, R. und Wilson, I. B. (2007). *XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity*. J Biol Chem 282(9): 5984-5990.
- Wankell, M., Munz, B., Hubner, G., Hans, W., Wolf, E., Goppelt, A. und Werner, S. (2001). *Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis*. Embo J 20(19): 5361-5372.
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M. und Gustafsson, C. M. (2012). *A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop*. Nucleic Acids Res 40(20): 10334-10344.
- Watanabe, H., Yamada, Y. und Kimata, K. (1998). *Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function*. J Biochem 124(4): 687-693.
- Weilke, C., Brinkmann, T. und Kleesiek, K. (1997). *Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor*. Clin Chem 43(1): 45-51.
- Wells, R. G. (2008). *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior*. Hepatology 47(4): 1394-1400.
- Werner, S. und Alzheimer, C. (2006). *Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease*. Cytokine Growth Factor Rev 17(3): 157-171.
- Westergren-Thorsson, G., Hernnas, J., Sarnstrand, B., Oldberg, A., Heinegard, D. und Malmstrom, A. (1993). *Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats*. J Clin Invest 92(2): 632-637.
- Wilson, I. B. (2002). *Functional characterization of Drosophila melanogaster peptide O-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/N-acetylglucosaminyltransferase family*. J Biol Chem 277(24): 21207-21212.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. und Diederichs, S. (2009). *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol 11(3): 228-234.
- Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J. und Hinz, B. (2007). *Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix*. J Cell Biol 179(6): 1311-1323.
- Wren, J. D., Forgacs, E., Fondon, J. W., 3rd, Pertsemliadis, A., Cheng, S. Y., Gallardo, T., Williams, R. S., Shohet, R. V., Minna, J. D. und Garner, H. R. (2000). *Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications*. Am J Hum Genet 67(2): 345-356.
- Wynn, T. A. (2008). *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol 214(2): 199-210.
- Yamaguchi, Y., Mann, D. M. und Ruoslahti, E. (1990). *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*. Nature 346(6281): 281-284.
- Yamakage, A., Kikuchi, K., Smith, E. A., LeRoy, E. C. und Trojanowska, M. (1992). *Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts*. J Exp Med 175(5): 1227-1234.
- Yanaba, K., Asano, Y., Tada, Y., Sugaya, M., Kadono, T. und Sato, S. (2012). *Clinical significance of serum growth differentiation factor-15 levels in systemic sclerosis: association with disease severity*. Mod Rheumatol 22(5): 668-675.
- Yin, M., Talwalkar, J. A., Glaser, K. J., Manduca, A., Grimm, R. C., Rossman, P. J., Fidler, J. L. und Ehman, R. L. (2007). *Assessment of hepatic fibrosis with magnetic resonance elastography*. Clin Gastroenterol Hepatol 5(10): 1207-1213 e1202.

- Zeichen, J., van Griensven, M., Albers, I., Lobenhoffer, P. und Bosch, U. (1999). *Immunohistochemical localization of collagen VI in arthrofibrosis*. Arch Orthop Trauma Surg 119(5-6): 315-318.
- Zeichen, J., van Griensven, M., Lobenhoffer, P. und Bosch, U. (2000). *Expression of type VI collagen in arthrofibrotic tissue. An immunohistochemical study*. Unfallchirurg 103: 640-644.

9. Publikationen, Präsentationen und Förderungen

Publikationen in *peer-review* Zeitschriften

1. **Faust I.**, Roch C., Kuhn J., Prante C., Knabbe C., Hendig D. (2013). Human xylosyltransferase-I - A new biomarker for myofibroblast differentiation in skin fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436 (3) 449-454.
2. Kuzaj P., Kuhn J., **Faust I.**, Knabbe C., Hendig D. (2014). Measurement of HMG CoA reductase activity in different human cell lines by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2) 641-645.
3. **Faust I.**, Traut P., Nolting F., Petschallies J., Neumann E., Kunisch E., Kuhn J., Knabbe C., Hendig D.. Arthrofibrotic remodeling after knee replacement therapy is locally mediated by human xylosyltransferase-I (Manuskript eingereicht).
4. **Faust I.**, Böker K. O., Lichtenberg C., Kuhn J., Knabbe C., Hendig D.. First description and analysis of the complete human xylosyltransferase-I promoter region (Manuskript in Vorbereitung).

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. **Faust I.**, Roch C., Kuhn J., Prante C., Knabbe C., Hendig D. (2012).
Increased expression of human xylosyltransferase-I is correlated with myofibroblast differentiation.
8th International Symposium on Glycosyltransferases, Hannover, Germany.
2. **Faust I.**, Roch C., Kuhn J., Prante C., Knabbe C., Hendig D. (2012).
Human xylosyltransferase – a suitable biomarker for myofibroblast differentiation?
9. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland.
Clin. Chem. Lab. Med. 50(9): A205-270.

3. **Faust I.**, Traut P., Petschallies J., Neumann E., Kunisch E., Kuhn J., Prante C., Knabbe C., Hendig D. (2013).
Humane Xylosyltransferase-I - ein neuer Biomarker für Arthrofibrose nach Knie-Endoprothetik?
6. Endoprothetik-Kongress, Berlin, Deutschland.

4. Hendig D., **Faust I.**, Knabbe C. (2013).
Human xylosyltransferase-I - a new target in myofibroblast differentiation and fibrogenesis.
Gordon Research Seminar/Conference „Collagen“, New London, NH, USA.

5. **Faust I.**, Böker K. O., Kuhn J., Knabbe C., Hendig D. (2013).
Human xylosyltransferases are regulated by miRNA-34a and miRNA-18a.
10. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Dresden, Deutschland.
Clin. Chem. Lab. Med. 51(10): eA1-85.

6. **Faust I.**, Traut P., Petschallies J., Neumann E., Kunisch E., Kuhn J., Knabbe C., Hendig D. (2014).
Humane Xylosyltransferase-I - Schlüsselenzym der Ausbildung einer lokalen Arthrofibrose nach Knie-Totalendoprothetik.
7. Endoprothetik-Kongress, Berlin, Deutschland.

Förderungen

1. Anschubfinanzierung durch die DGKL-Nachwuchsakademie für das Fach Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Februar 2014.

10. Anhang

10.1 Sequenz des *XYLT1*-Promotors

-1877 TGGCAAGGCTGATCTCGAACTTCTGACCTCAGGTGATCCTCCTGTCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGCGATT

-1807 ACAGGCATGAGCCACCGCGCCCAGGCCATCTCACTATATTTAATGATTAACATCCACATCAGGCTTCT

-1737 CTAGACCTCAGGCTTGCTGAAGATGAGATTAAACCTCATTACCTTTGGATGCGTGACCTGGCCCCAGTG

-1667 TCTGACACAAGCTTTGTATTACGGATGCTTGTGGAGTGGATGAAACAATCTCTTCCCCTCCCTGCCTC

-1597 ATTGTCTGATGAGCCTTCATTACACTCCACTTTCTTCTTTGTAAATTAGGATGAGGTGAAAAAGCACA

-1527 GCAGACAAGATGCGAAGCATTACGCAAGTCCTCAATTCACAAACTGATTTGATCTGCTGTTGTATTCC

-1457 CAGAGTGCTAGGTCCCGTATGGGACACCAACGCCATCCCATATGCTCACTGTTCTGCGCTGCTGTGTATA

-1387 AAGCCCTGGGCAAGAGGACAAGGGAGGGAAAAACCAGAAAGACTGAGTCAGAGAAGGCTCGGGATGAAAT

-1317 TTGAGTCCATTGGGATCATTCTGCCTAAACGACAGAGGAGAAAGCTTGGGCTCAGGGAGGAGTCCTCCTC

-1247 CTCCTGGCTCAAGGTCACCGGGACAGACCAGTCAGGATGGGAAAGAACTCCACTTTCAAGAGCAAGACCT

-1177 GTTTCCCAGGACCTGGGCCCTGTGCAGACAGGAAGGGGGACTTCAGGATGGATGGGGAAAAAGGACACGC

-1107 TGGGAGGCTGCGGGGCCAG^{c.-1088C>A}CCTTTGGGGCTTGCATCCTGCGAAGGTTGAGTAACTCCACGGGTCTCCCTT

-1037 TTGCCGCTATACCACTTGCCAACCTGGGTTTTGGAGTCTCTGGCTTGTGAGTCCTCAGGGACCAGAGAAGT

-967 GACTCAGTGAACACTTAGTACATCGTTGGCACCGGGGATTGTGTGTGATTCAGGAGTCACTCACAGAGCT

-897 TGTGCTGATTAACCTCCAGAACTCACCCAAAGCCTCCTCCCCACCCCTTCAAGCCCAGGATGAAGGGATC

-827 AGACTGTGGCTCTGACACTCCTGAAATGTTTCTCACGTGTCCACCTGCCAACCGGTCTGGTACCGACAGA

-757 AGATCCCTGGACCGCGAACTCCGGGGCTAGGAGCTTCTCCACGCACTGCCTCCTTCCAGCGGCCACAG

-687 GGAAAACAGGACCTCGGGACCCCTCTCTTCTGACCTCCCCTGGATTCTGAGCGGGCCACCCCTCAACC

-617 AAAGGTCCCTGTTTCGCGGCCCTGCCTCTCTTTTTTCGCCTTGGAATTGTCCCCCTCGCCCCCATC

-547 CTACTCCCCTACGTCCTGAGGGGTGTCTGTCTTCTCTGATCGCCCCACCCCTTCTTTCCCTCCTCC

-477 TTTTCTCCTCGGCTCCTCCCCAGGCCCGCCCTCTCCGCCTCGGCCCGCGTCCCCCGGGCGCCTTCC

-407 CCAT^{c.-403C>T}ACCCTCCCCTCCAGCGGGGACAGGGGTGTGGGGAGGGGG**CGCCGCGCGGGCCAGGCGCCCGCCCC**

-337 **TCCCTGCGCGCCCCGTCCCCGAGCGCGCGCCCGGGCGCCCCCTCCGCGGCCTCCCCGCTCCCGCCTCCCG**

-267 **CCTTCTCCTCCTCCTGGTGACGTCCGGGTCCCTGCCCGTCTGAAACTCCGCGCCGCGGGCGGTGGAGGCG**

-197 **GCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGAGGAGGAGCAGCGGGCAGCCGAGGCGG**

-127 **CGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGAGCGGGGAGCCCGAGCGGCAGCCGCGGGCGGGGAGCTGCGGGGAGCGCGG**

-57 GGGCGGGCGGGGAGCGGTGCCGGGGTCCCCGCGCCTCGCTCGCCGGCCGCGCTCCGAAG⁺¹**ATG**GTGGCGGGCGC

Abbildung 10.1: Vollständige, in dieser Arbeit identifizierte, *XYLT1*-Promotorsequenz (*XYLT1_{complete}*). Die Basenposition ist links neben der Sequenz numerisch dargestellt und erfolgt rückläufig ab dem Translationsstartpunkt c.+1 (ATG, rote Markierung). Der Sequenzabschnitt *XYLT1_{238*}* ist fett markiert, die detektierten SNV sind blau hervorgehoben.

10.2 Sequenz des *XYLT2*-Promotors

-2568 TCAAGCGATCCTCCTATCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGAATTACAGGCACCACAATAACCAGATAACGA

-2498 ATTTGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAACAGTGGGCTGGGCTCGGCGGCTCATGCTTGTAATCCCAGCA

-2428 CTTTGGGAGGCCGAGACAGGTGGATCACAAAGTTCAGGAGTTTGAGAATAGCCTGGCCAACATGGTGAAAC

-2358 CCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATAAGCCGGGCATGGTGGCGCGCACCTATAACCCCAGCTACTCGGG

-2288 AGACCAAGGCAGGAGAATTTCTTGAATCCGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGGGATTGTACCACTGCA

-2218 CTCCACCCTGGGTGGCAGAACGAGACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCAGGC

-2148 GCGGTGGCCACGCCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCTGAGGTGGGCAGATCATGAGGTCAGGAGATTG

-2078 AGACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGTCTCTCCTAAGAATACAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGCCAGT

-2008 CGTGGTGGTGGGCGCCTGTAGTCCAGCTACTACTTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCTGG

-1938 GAGGCAGAGCATGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAGACTCCGTC

-1868 TCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGAGAAATGGGGGAAAGGAAAGGAAAGGATAGCCACTAAAATGTTAA

-1798 TGATGATCATCTTAAGGGGTGGGATTGTAGGTGACTTTTACTTTTTTTCTTATTCGTTTAGTGTTTAAAT

-1728 GTTATATAATGGATATTTATTACTTATATAATCAGTGAAAAATAAAGCTATTTTCATTGTTGTGGGGGGA

-1658 ATTCTTGGCAGGTAGAAGTCCCTAGAGGATCTGATTTAATGAGCACACAAGATCAATATTTAATTAACAT

-1588 ATCAATTGCCGGGATGTCAACTGATGTTTTCCAAAATCATTGAAGTGTAGGCTCTCTTAAGTAGCCAAAC

-1518 TGTCGTCGGAAACATAGTTTACAATTCTCCCATTTAACAAACGCGGAGGAACAGAATGATTACAAATGCT

-1448 AAAGCGCAGAAGACGATTAAAGGAGGTTATTTATGTACCATCAAATGCTTGTGTATCCTGTACACATCAG

-1378 TTTAGAATTCTCTCATCAACCCAACCTTGTGGCAACTTCCAAACCCCTCCATCATGGCCTTCTAACTTTT

-1308 CAAACCTTTTTTTTTTGTAAAGCCACTTCTCTTTCCAGACCTCTCTGTAGTGGTTCCTAACGTCTTCCCTTT

-1238 AAACCTTCTAACTTGTGTTTTGCTATTTTTATGACTTCCCTCCAGTGCCTGGCTTCCCCAGCTGGGGA

-1168 TTCACCTTGCTTTGGTGGCCACTGTTTTGCTCTTCTCGCCTTCCCTCTCTCCATGGGCCTGCCAGGCTTA

-1098 GGGAAGGCCGCAGGTGCTTAGACCTTGTCCAATGCGGTGCTCATTGAACACGCCGGGTTCTCAAACAAAT c.-1044G>A

-1028 GTTAGGGACAGCTGGTTAGACGGGAATCTGGGCCTCCCCTGCTTGCTTTCCGCAACATTTCTTGAGCATT

-958 GCTGGGTGTCCAAGGCAGGGCGAGATCCCAGAGCAGTCACGACCGGATGTATGATTGGTGCTCACTGCAC

-888 AGTGCTGGGGACGCACAGGGAGGATGCCACTGATGGTGTAGGGGGTGGGGACTTGGCAGAGGGAGCAGCA

-818 TGTGTCGAGGTCTACTGGTTCTCCAAGTTTGGTCCCAGAGCAAAGGCATCAGCATCACCTGGGAACCTGC

-748 TGAAAATTCTAATGCTTAGGCCTCACTACCGACCTACCAAAGCAGACACTCTGGGGGAGGGAGGAGGGCC

-678 ACTAAAAATCTGTTTATCAAGACCTCCAAGAGACTCCAACACACGCTAGAGTAGTTTGAGAACCACGAC c.-664T>G

-608 TCTGGGAGCGGCCTGAGGATGCTTAGGATGAGCGCAGAGCGGAAAGGAGGATTCGTGAAGGCTCTCTGAT

-538 GCCAGTCAAGGGTTAGACTTTGCCCCGCAGGTGCGGCCTCCAGGTTTTTAAGCAGACGCCTGTGGCTCT

```

-468 CACACGCCCTCTCCCAAGGCGGCGTCTCTGGGAGCCCTGGCGTTCCTGGGCCCCCGGGACCGAGAGCTT
-398 ACCCGCGTGGGACTGAACTCGCCCACGACCCCCGACACCAGGCAAGAGAGGTTGTGCCGCAGACCCCTCCA
-328 CTCCCCAGCACCCAGGCGCTCGCCGTCCAGGTGGAGGGGAGCACACGTGGGAGCCAGGGGCACCGCGGAG
-258 ACACGAGCGCAGAAGGCACGCGCTCAAGCCCACGCCCGCGACTGCCGGGACTGAAGGTGTTGCGAGCCCC
-188 c.-188G>A
GGCTCCACCCCTAGCCTGCGGTGCGCCGTGCTTTGGCCCCGCAGGCCCCGCCCCCGCCCCGCCCCGGCG
-118 c.-84G>C c.-80delG
CGCGCCCGGCCCGCCTCCCTAGGCGTGGAGGAGGGGGGGCGGCTCAGCCCCGCGCCCGTGGCGCGCTCG
-48 CGGCCGGGTTGCAGGGCTGGGCGCGCGCCCCGCGTCCCGGGCAGGAAG+1ATGGTGGCGAGCGCGGAGTGC

```

Abbildung 10.2: Vollständige *XYLT2*-Promotorsequenz (*GenBank accession no.* NG_012175.1). Die Basenposition ist links neben der Sequenz nummerisch dargestellt und erfolgt rückläufig ab dem Translationsstartpunkt c.+1 (ATG, rote Markierung). Die detektierten SNV sind blau hervorgehoben.

10.3 *In silico* Analyse: miRNA Scores

Tabelle 10.1: Auflistung der mittels *in silico* Analyse identifizierten *XYLT1*-regulierenden miRNAs. Eine hohe Spezifität entspricht einem niedrigen *TargetScan Human Score* und einem hohen *Pic Tar/DIANA mT Score*.

miRNA	<i>Score TargetScan Human</i>	<i>Score Pic Tar</i>	<i>Score DIANA mT</i>
18a	-0,31		9,20
18b	-0,31		9,20
34a	-0,64	5,92	13,85
34b	-0,64	2,12	
34c	-0,64	2,12	12,56
101			14,24
124ab	-0,42		33,95
144	-0,48		33,46
145	-0,09		
153			26,36
199ab	-0,14		
203	-0,03	2,73	
204b	-0,25		
211	-0,25		
449a	-0,64		13,14
449b	-0,64		12,56
488			
495			37,39
506	-0,42		33,42
626			11,00

Tabelle 10.2: Auflistung der mittels *in silico* Analyse identifizierten *XYLT2*-regulierenden miRNAs.

miRNA	<i>Score TargetScan Human</i>	<i>Score Pic Tar</i>	<i>Score DIANA mT</i>
182*		2,72	
18ab	-0,43	3,26	22,75
25	-0,22	2,97	7,40
29abcd	-0,07		
32	-0,22	3,27	37,91
92	-0,22	3,27	
92a			21,96
92b			22,42
138ab	-0,28		
145	-0,10		
153		3,27	
196b			9,55
199ab	-0,13		
326		3,26	
367	-0,22	2,97	

10.4 miRNA-Array: Rohdaten

Tabelle 10.3: Rohdaten des miRNA-Array-Genexpressionsprofils in unbehandelten Kontrollfibroblasten und mit TGF- β 1 induzierten Fibroblasten (jeweils n=2). Gezeigt sind die gemittelten C_T -Werte sowie die Standardabweichungen.

miRNA ID	C_T Kontrolle	SD	C_T TGF- β 1	SD	miRNA ID	C_T Kontrolle	SD	C_T TGF- β 1	SD
hsa-let-7a-5p	18,83	1,17	19,19	0,63	hsa-miR-143-5p	27,91	0,23	27,09	0,62
hsa-let-7b-5p	20,03	0,73	20,22	0,93	hsa-miR-144-3p	33,94	1,51	34,05	1,34
hsa-let-7c	21,91	1,14	22,28	1,22	hsa-miR-144-5p	34,30	1,00	34,97	0,05
hsa-let-7d-5p	22,64	0,87	22,93	1,05	hsa-miR-145-5p	20,80	0,40	20,34	0,74
hsa-let-7d-3p	24,25	1,15	24,89	1,03	hsa-miR-145-3p	26,14	0,57	25,11	0,87
hsa-let-7e-5p	20,48	0,91	20,86	0,94	hsa-miR-146a-5p	25,26	3,86	25,86	3,66
hsa-let-7f-5p	20,03	1,17	20,69	0,85	hsa-miR-146b-5p	26,14	0,02	27,12	0,22
hsa-let-7g-5p	21,30	1,14	21,88	0,76	hsa-miR-147a	32,31	2,83	32,68	2,13
hsa-let-7g-3p	27,86	1,15	28,05	1,00	hsa-miR-148a-3p	25,12	3,00	25,65	3,18
hsa-let-7i-5p	19,45	1,00	20,21	0,68	hsa-miR-155-3p	32,16	0,45	33,53	1,07
hsa-miR-1	34,10	1,28	32,57	3,44	hsa-miR-15a-5p	23,13	1,66	23,53	1,12
hsa-miR-100-5p	18,55	1,07	19,11	0,64	hsa-miR-15b-5p	21,81	0,88	22,24	0,76
hsa-miR-101-3p	23,24	1,63	23,65	1,25	hsa-miR-15b-3p	27,23	1,07	27,66	0,96
hsa-miR-101-5p	31,95	0,41	32,51	2,16	hsa-miR-16-5p	19,48	1,04	20,01	0,74
hsa-miR-103a-3p	21,25	1,09	22,00	0,71	hsa-miR-17-5p	22,83	1,20	23,39	1,23
hsa-miR-105-5p	35,00	0,00	35,00	0,00	hsa-miR-181a-5p	22,21	2,36	22,66	1,86
hsa-miR-106a-3p	35,00	0,00	35,00	0,00	hsa-miR-181a-3p	27,33	1,89	27,43	1,56
hsa-miR-106b-5p	22,18	1,47	22,83	1,20	hsa-miR-181b-5p	22,93	2,06	23,01	1,70
hsa-miR-106b-3p	28,42	0,91	28,48	1,00	hsa-miR-181c-5p	22,71	2,54	23,00	1,87
hsa-miR-107	25,86	0,49	26,83	0,42	hsa-miR-181c-3p	29,75	0,58	30,41	0,86
hsa-miR-10a-5p	24,47	1,92	24,97	1,71	hsa-miR-181d	27,72	0,98	27,77	1,22
hsa-miR-10a-3p	32,09	4,12	32,15	4,04	hsa-miR-182-5p	33,39	0,01	33,39	0,95
hsa-miR-10b-5p	24,19	1,33	24,78	1,35	hsa-miR-182-3p	35,00	0,00	35,00	0,00
hsa-miR-10b-3p	29,07	1,04	29,73	1,07	hsa-miR-183-5p	35,00	0,00	34,00	1,41
hsa-miR-1180	28,48	1,41	28,96	1,55	hsa-miR-183-3p	33,85	0,40	33,94	1,00
hsa-miR-1207-5p	29,03	0,71	29,18	1,20	hsa-miR-184	32,45	3,61	32,62	3,37
hsa-miR-122-5p	33,86	0,06	33,65	0,39	hsa-miR-185-5p	24,34	0,98	24,71	0,87
hsa-miR-122-3p	34,90	0,15	35,00	0,00	hsa-miR-186-5p	23,06	1,31	23,70	1,14
hsa-miR-1224-3p	33,37	0,51	33,41	2,25	hsa-miR-186-3p	30,97	0,38	31,13	1,24
hsa-miR-1224-5p	31,81	0,35	31,83	0,85	hsa-miR-187-3p	30,09	0,91	29,86	1,29
hsa-miR-124-3p	28,54	4,35	29,65	3,87	hsa-miR-187-5p	31,26	0,82	31,91	0,69
hsa-miR-124-5p	33,71	1,82	34,36	0,91	hsa-miR-18a-5p	24,96	1,05	25,29	0,70
hsa-miR-125a-3p	28,07	0,86	28,62	0,83	hsa-miR-18a-3p	29,26	0,71	29,93	0,12
hsa-miR-125a-5p	19,93	0,96	20,37	0,74	hsa-miR-18b-5p	26,48	1,30	27,04	1,07
hsa-miR-125b-5p	16,61	1,12	17,09	0,91	hsa-miR-18b-3p	33,34	1,05	34,51	0,69
hsa-miR-126-3p	27,12	1,42	27,83	1,31	hsa-miR-190a	25,31	0,93	26,06	0,54
hsa-miR-126-5p	29,07	1,14	29,52	1,02	hsa-miR-1908	29,60	0,98	30,02	1,70
hsa-miR-1265	33,92	0,34	33,88	1,07	hsa-miR-191-5p	22,02	1,01	22,54	0,98
hsa-miR-127-3p	23,10	0,45	23,36	0,37	hsa-miR-191-3p	29,65	0,60	30,21	0,83
hsa-miR-127-5p	26,54	0,91	26,86	0,47	hsa-miR-1914-3p	33,90	0,10	33,43	1,36
hsa-miR-128	25,05	0,80	25,6	0,74	hsa-miR-192-5p	28,27	1,17	28,58	1,41
hsa-miR-1284	34,87	0,19	35,00	0,00	hsa-miR-192-3p	34,03	0,49	34,95	0,07
hsa-miR-129-1-3p	28,87	1,00	29,88	1,44	hsa-miR-193a-3p	25,37	1,04	25,33	0,97
hsa-miR-1290	26,03	0,33	25,93	0,73	hsa-miR-193a-5p	24,79	0,78	25,01	0,95
hsa-miR-129-2-3p	28,01	0,83	28,73	1,21	hsa-miR-193b-3p	22,44	1,08	22,84	1,12
hsa-miR-129-5p	30,20	0,61	30,90	0,39	hsa-miR-193b-5p	26,77	0,67	26,81	0,93
hsa-miR-130a-3p	22,13	2,14	23,01	1,73	hsa-miR-194-5p	27,15	1,22	27,27	1,16
hsa-miR-130b-3p	23,96	1,75	24,85	1,46	hsa-miR-195-5p	19,95	0,64	20,62	0,54
hsa-miR-132-3p	25,06	0,27	25,39	0,35	hsa-miR-195-3p	29,12	0,42	28,85	0,64
hsa-miR-132-5p	28,78	0,03	29,10	0,38	hsa-miR-196a-5p	30,52	4,01	31,11	3,70
hsa-miR-1324	34,21	0,70	35,00	0,00	hsa-miR-196a-3p	30,96	1,47	30,71	1,19
hsa-miR-133a	34,36	0,91	34,18	1,16	hsa-miR-196b-5p	29,14	6,66	28,97	5,35
hsa-miR-133b	35,00	0,00	34,73	0,39	hsa-miR-197-3p	25,46	0,49	25,87	0,66
hsa-miR-134	26,22	0,29	26,60	0,53	hsa-miR-199b-3p	18,40	0,66	18,77	0,59
hsa-miR-135a-5p	30,86	0,22	31,68	0,74	hsa-miR-199a-5p	20,08	1,34	20,44	1,21
hsa-miR-135b-5p	30,09	0,31	30,45	0,29	hsa-miR-199b-5p	20,25	1,16	21,35	0,69
hsa-miR-136-5p	25,23	1,26	25,16	0,76	hsa-miR-19a-3p	21,68	1,15	21,97	0,94
hsa-miR-137	23,08	2,06	23,86	1,89	hsa-miR-19a-5p	32,70	0,57	34,06	1,34
hsa-miR-138-5p	23,80	1,32	24,34	1,17	hsa-miR-19b-3p	22,14	1,12	22,32	1,05
hsa-miR-139-3p	28,94	0,82	28,96	0,93	hsa-miR-200a-3p	31,63	1,84	31,79	0,41
hsa-miR-139-5p	29,80	0,30	30,36	0,54	hsa-miR-200a-5p	32,80	1,05	33,3	1,34
hsa-miR-140-3p	23,93	0,99	24,58	0,64	hsa-miR-200b-3p	29,71	0,28	29,92	0,59
hsa-miR-140-5p	23,74	1,28	24,40	1,14	hsa-miR-200c-3p	30,18	1,23	30,06	0,77
hsa-miR-141-3p	32,12	1,85	32,82	0,89	hsa-miR-200c-5p	34,27	1,03	34,24	0,08
hsa-miR-142-3p	31,76	1,55	32,98	2,86	hsa-miR-202-3p	33,70	0,77	32,98	1,36
hsa-miR-142-5p	34,23	1,09	34,72	0,40	hsa-miR-203a	32,83	3,08	31,79	1,22
hsa-miR-143-3p	20,81	0,83	20,47	0,80	hsa-miR-204-5p	32,94	2,91	33,85	1,63

miRNA ID	C _T Kontrolle	SD	C _T TGF-β1	SD	miRNA ID	C _T Kontrolle	SD	C _T TGF-β1	SD
hsa-miR-205-5p	34,71	0,42	34,70	0,43	hsa-miR-324-5p	24,83	1,14	25,56	1,11
hsa-miR-205-3p	34,84	0,23	34,70	0,43	hsa-miR-325	34,82	0,25	34,91	0,13
hsa-miR-206	35,00	0,00	34,13	1,24	hsa-miR-326	29,26	1,91	29,56	1,44
hsa-miR-208a	34,59	0,58	35,00	0,00	hsa-miR-328	27,90	0,82	28,31	0,81
hsa-miR-208b	35,00	0,00	34,77	0,33	hsa-miR-330-3p	29,14	0,88	29,15	0,41
hsa-miR-20a-5p	21,95	1,12	22,43	1,01	hsa-miR-331-5p	30,44	0,71	30,31	0,99
hsa-miR-20a-3p	27,73	0,62	27,81	0,84	hsa-miR-335-5p	27,85	1,56	29,60	3,42
hsa-miR-20b-5p	23,79	1,46	24,05	1,33	hsa-miR-335-3p	26,95	0,58	29,31	2,53
hsa-miR-20b-3p	29,75	1,55	30,29	1,34	hsa-miR-337-5p	25,58	1,61	26,06	1,06
hsa-miR-21-3p	24,83	0,21	23,39	0,74	hsa-miR-338-5p	31,23	1,38	31,69	0,57
hsa-miR-210	26,40	0,81	26,44	1,03	hsa-miR-339-3p	27,78	1,05	27,68	1,01
hsa-miR-211-5p	35,00	0,00	34,95	0,08	hsa-miR-33a-5p	25,54	1,15	25,27	1,20
hsa-miR-212-3p	28,65	0,18	28,94	0,41	hsa-miR-33a-3p	29,91	0,98	29,99	1,02
hsa-miR-214-3p	21,62	0,46	22,08	0,61	hsa-miR-33b-5p	29,13	0,97	28,79	1,20
hsa-miR-215	33,78	1,02	34,05	1,35	hsa-miR-340-5p	27,92	1,31	28,34	1,35
hsa-miR-216a-5p	31,29	1,75	31,91	2,18	hsa-miR-340-3p	29,84	0,71	30,91	1,17
hsa-miR-217	32,47	2,01	33,19	2,57	hsa-miR-342-3p	24,80	0,03	24,99	0,29
hsa-miR-218-5p	23,86	0,08	25,18	0,52	hsa-miR-342-5p	31,09	0,83	31,13	1,22
hsa-miR-218-1-3p	29,70	0,74	31,59	0,65	hsa-miR-345-5p	26,81	0,66	27,89	0,58
hsa-miR-219-5p	28,89	0,90	29,37	1,34	hsa-miR-346	30,37	1,27	30,21	0,98
hsa-miR-22-3p	17,77	1,70	18,19	1,30	hsa-miR-34a-5p	20,40	1,10	21,14	0,93
hsa-miR-22-5p	22,56	0,81	22,65	0,67	hsa-miR-34a-3p	25,72	1,36	26,43	1,08
hsa-miR-221-3p	18,39	0,40	19,24	0,13	hsa-miR-34b-3p	28,45	0,08	29,30	0,13
hsa-miR-221-5p	24,42	0,20	25,35	0,18	hsa-miR-34b-5p	29,91	0,85	30,53	0,74
hsa-miR-222-3p	18,81	0,01	19,94	0,35	hsa-miR-34c-3p	28,38	0,16	29,21	0,22
hsa-miR-222-5p	33,12	0,64	33,09	0,06	hsa-miR-34c-5p	25,32	0,51	26,01	0,60
hsa-miR-223-3p	33,88	1,58	34,72	0,40	hsa-miR-361-5p	25,81	0,99	26,16	1,00
hsa-miR-223-5p	34,10	0,33	35	0,00	hsa-miR-363-3p	34,54	0,25	35,00	0,00
hsa-miR-224-5p	23,68	0,28	23,59	0,93	hsa-miR-363-5p	33,67	0,15	35,00	0,00
hsa-miR-224-3p	27,22	0,53	27,55	0,73	hsa-miR-365b-3p	20,68	0,70	21,13	0,91
hsa-miR-23a-3p	17,99	1,12	18,22	1,02	hsa-miR-370	24,66	0,37	24,29	0,68
hsa-miR-23a-5p	28,32	1,06	27,97	0,74	hsa-miR-372	34,98	0,03	34,24	1,08
hsa-miR-23b-3p	19,70	0,91	19,88	1,02	hsa-miR-373-3p	35,00	0,00	35,00	0,00
hsa-miR-23b-5p	28,61	0,70	28,3	0,97	hsa-miR-373-5p	21,25	1,21	21,74	1,07
hsa-miR-24-3p	18,16	1,15	18,46	0,85	hsa-miR-374a-5p	22,34	0,89	22,99	1,29
hsa-miR-25-3p	23,18	0,77	23,71	0,79	hsa-miR-374c-5p	23,37	0,66	23,66	1,06
hsa-miR-25-5p	31,39	1,05	31,42	0,18	hsa-miR-375	30,50	0,74	31,01	0,99
hsa-miR-26a-5p	18,94	0,82	19,63	0,86	hsa-miR-376a-3p	25,59	0,36	25,68	0,64
hsa-miR-26b-5p	20,89	0,07	20,66	1,12	hsa-miR-376b-3p	25,34	1,19	26,79	2,37
hsa-miR-27a-3p	18,04	1,26	18,25	0,78	hsa-miR-376c-3p	22,52	0,54	22,88	0,29
hsa-miR-27a-5p	27,82	0,83	27,46	0,35	hsa-miR-377-3p	24,11	1,39	24,56	1,03
hsa-miR-27b-3p	19,90	0,79	20,12	0,99	hsa-miR-377-5p	29,91	0,04	29,86	0,03
hsa-miR-27b-5p	27,26	0,47	26,76	0,88	hsa-miR-378a-3p	29,66	0,59	29,74	0,84
hsa-miR-28-3p	25,17	0,74	25,43	0,99	hsa-miR-378a-5p	31,96	0,31	31,81	0,39
hsa-miR-28-5p	23,84	1,19	24,4	1,04	hsa-miR-379-5p	25,06	0,28	25,37	0,33
hsa-miR-296-3p	29,60	0,15	29,73	0,47	hsa-miR-381-3p	25,95	1,09	26,38	0,88
hsa-miR-298	31,94	0,68	32,1	1,22	hsa-miR-382-5p	25,11	0,16	25,46	0,03
hsa-miR-299-5p	24,69	0,11	25,1	0,08	hsa-miR-383	33,78	0,04	34,51	0,69
hsa-miR-29a-3p	18,00	1,79	19,19	1,16	hsa-miR-409-3p	24,53	0,19	24,93	0,25
hsa-miR-29a-5p	23,86	1,67	24,77	1,05	hsa-miR-410	27,17	0,99	27,85	0,82
hsa-miR-29b-3p	21,24	2,91	23,26	1,74	hsa-miR-411-5p	24,91	0,42	25,28	0,34
hsa-miR-29b-2-5p	30,59	1,32	31,64	1,06	hsa-miR-421	26,73	0,75	26,96	0,52
hsa-miR-29c-3p	18,07	1,99	19,35	1,38	hsa-miR-423-3p	22,87	1,10	23,39	0,86
hsa-miR-300	34,73	0,39	35,00	0,00	hsa-miR-423-5p	24,23	0,78	24,59	0,76
hsa-miR-301a-3p	25,72	1,61	26,24	1,50	hsa-miR-424-5p	19,41	0,51	18,99	1,39
hsa-miR-302a-3p	31,50	3,54	32,29	3,84	hsa-miR-424-3p	25,49	0,52	24,69	1,61
hsa-miR-302a-5p	32,85	3,05	33,03	2,79	hsa-miR-425-5p	24,24	1,09	24,93	0,91
hsa-miR-302b-3p	31,72	4,65	32,17	4,01	hsa-miR-425-3p	28,05	0,98	28,62	0,59
hsa-miR-302b-5p	33,11	2,04	33,82	1,67	hsa-miR-4258	31,77	0,82	31,73	1,35
hsa-miR-302c-3p	32,80	3,12	33,18	1,00	hsa-miR-429	31,91	1,47	32,33	1,14
hsa-miR-30a-5p	20,61	1,55	21,38	1,18	hsa-miR-431-5p	26,76	0,93	27,08	0,68
hsa-miR-30b-5p	22,48	1,21	23,18	1,12	hsa-miR-432-5p	28,75	0,00	28,9	0,45
hsa-miR-30c-5p	21,29	1,04	22,32	0,91	hsa-miR-433	28,43	0,28	28,37	0,94
hsa-miR-30c-1-3p	30,63	1,65	30,87	0,01	hsa-miR-449a	26,74	1,53	27,63	1,52
hsa-miR-30d-5p	22,40	1,13	23,09	0,91	hsa-miR-451a	30,25	1,24	30,61	0,19
hsa-miR-30d-3p	30,04	1,65	30,72	1,92	hsa-miR-454-3p	25,00	0,85	25,66	1,05
hsa-miR-30e-5p	20,69	1,59	21,50	1,17	hsa-miR-455-5p	27,39	1,28	27,72	0,84
hsa-miR-30e-3p	24,29	1,03	24,87	0,85	hsa-miR-483-5p	30,84	5,74	30,62	4,48
hsa-miR-31-5p	19,81	0,86	20,35	0,40	hsa-miR-484	23,74	0,88	24,55	0,53
hsa-miR-31-3p	23,74	1,35	24,32	0,71	hsa-miR-485-5p	29,02	0,11	29,13	0,77
hsa-miR-32-5p	26,08	2,10	26,36	1,63	hsa-miR-486-3p	33,25	2,47	33,9	1,56
hsa-miR-32-3p	29,56	0,83	30,16	0,88	hsa-miR-486-5p	27,57	3,10	27,95	3,20
hsa-miR-320a	22,89	0,33	22,79	0,55	hsa-miR-488-3p	34,72	0,40	35,00	0,00
hsa-miR-320b	27,68	0,44	27,31	1,12	hsa-miR-489	26,54	0,78	26,8	0,91
hsa-miR-323b-5p	32,53	0,42	33,08	1,10	hsa-miR-490-3p	26,91	1,07	27,44	1,20
hsa-miR-324-3p	25,31	1,00	25,88	1,05	hsa-miR-491-5p	28,22	0,60	28,18	0,60

miRNA ID	C _T Kontrolle	SD	C _T TGF-β1	SD	miRNA ID	C _T Kontrolle	SD	C _T TGF-β1	SD
hsa-miR-493-3p	25,99	0,28	26,29	0,23	cel-miR-39-3p	35,00	0,00	35,00	0,00
hsa-miR-495-3p	24,45	0,30	24,60	0,50	SNORD61	21,18	1,71	22,02	0,71
hsa-miR-497-5p	24,34	0,44	24,87	0,79	SNORD68	19,70	0,74	19,95	0,30
hsa-miR-498	35,00	0,00	34,81	0,28	SNORD72	23,70	0,88	24,18	0,34
hsa-miR-499a-3p	34,18	0,57	33,36	0,18	SNORD95	20,67	0,59	20,72	0,47
hsa-miR-499a-5p	31,16	0,35	31,93	0,88	SNORD96A	20,50	0,97	20,71	0,78
hsa-miR-500a-5p	27,91	0,54	28,48	0,58	RNU6-2	16,81	1,80	17,75	1,10
hsa-miR-504	31,98	1,39	32,14	0,70					
hsa-miR-505-3p	25,99	0,66	26,33	0,55					
hsa-miR-506-3p	32,95	0,90	33,62	1,58					
hsa-miR-508-5p	34,62	0,31	35,00	0,00					
hsa-miR-509-3p	33,27	2,45	34,80	0,29					
hsa-miR-511	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-512-5p	34,99	0,01	34,32	0,96					
hsa-miR-513a-5p	33,13	2,64	33,54	2,07					
hsa-miR-514a-3p	32,53	3,49	32,62	2,11					
hsa-miR-517b-3p	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-518b	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-519d	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-520f	34,64	0,30	34,08	1,31					
hsa-miR-520g	34,77	0,33	35,00	0,00					
hsa-miR-522-3p	35,00	0,00	34,35	0,76					
hsa-miR-524-5p	34,02	1,39	35,00	0,00					
hsa-miR-532-5p	27,28	1,17	27,83	0,76					
hsa-miR-539-5p	27,51	0,66	27,96	0,58					
hsa-miR-542-3p	25,16	0,25	24,94	0,37					
hsa-miR-542-5p	26,74	0,28	26,67	0,62					
hsa-miR-549a	29,71	1,94	30,10	1,45					
hsa-miR-551b-3p	31,64	1,56	32,83	0,16					
hsa-miR-567	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-570-3p	31,76	1,46	32,17	0,87					
hsa-miR-574-3p	23,02	1,16	23,32	1,25					
hsa-miR-575	31,95	1,01	31,86	0,87					
hsa-miR-580	35,00	0,00	34,83	0,24					
hsa-miR-581	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-583	34,84	0,23	35,00	0,00					
hsa-miR-588	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-589-3p	30,61	1,15	31,98	0,63					
hsa-miR-600	34,50	0,71	33,98	1,45					
hsa-miR-605	33,88	0,30	34,07	1,32					
hsa-miR-606	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-608	30,40	0,62	30,71	0,91					
hsa-miR-622	34,01	1,40	33,78	1,73					
hsa-miR-626	34,23	0,66	33,84	0,97					
hsa-miR-639	33,95	0,33	34,68	0,46					
hsa-miR-643	33,97	1,46	35,00	0,00					
hsa-miR-649	34,39	0,87	34,73	0,39					
hsa-miR-652-3p	27,80	0,79	28,10	0,64					
hsa-miR-661	30,04	0,78	30,55	1,21					
hsa-miR-7-5p	25,92	0,37	26,10	0,88					
hsa-miR-708-5p	25,07	1,23	25,38	0,85					
hsa-miR-708-3p	30,83	1,94	30,71	0,18					
hsa-miR-720	21,25	0,08	21,21	0,71					
hsa-miR-744-5p	25,37	0,59	25,69	0,69					
hsa-miR-765	33,70	1,84	33,86	1,04					
hsa-miR-770-5p	23,83	0,50	24,01	0,57					
hsa-miR-802	35,00	0,00	35,00	0,00					
hsa-miR-885-5p	29,20	1,18	29,48	1,15					
hsa-miR-888-5p	34,20	0,93	34,50	0,71					
hsa-miR-9-5p	32,98	0,25	33,35	0,83					
hsa-miR-9-3p	34,55	0,64	34,82	0,25					
hsa-miR-920	30,60	0,75	30,86	0,78					
hsa-miR-924	33,64	0,93	34,51	0,70					
hsa-miR-92a-3p	22,47	0,69	22,59	0,57					
hsa-miR-92a-1-5p	33,01	1,08	31,39	0,42					
hsa-miR-92b-3p	24,73	0,88	25,08	0,95					
hsa-miR-92b-5p	27,44	0,52	27,35	0,80					
hsa-miR-93-5p	23,00	1,41	24,13	0,97					
hsa-miR-93-3p	28,05	1,30	28,63	0,93					
hsa-miR-95	33,81	1,34	33,72	0,96					
hsa-miR-96-5p	33,59	2,00	34,19	1,15					
hsa-miR-98-5p	24,72	0,48	25,10	0,71					
hsa-miR-99a-5p	22,64	0,04	23,64	0,29					
hsa-miR-99a-3p	29,67	0,67	31,31	1,49					
hsa-miR-99b-5p	22,39	0,91	23,02	0,76					
cel-miR-39-3p	35,00	0,00	34,59	0,58					

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Datum, Ort

Unterschrift