

**Untersuchungen zur Synthese  
der extrazellulären Matrix bei physiologischen  
und pathophysiologischen Prozessen**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Christian Prante  
aus Oerlinghausen

Bielefeld / Bad Oeynhausen

Dezember 2006

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

**Prof. Dr. med. Knut Kleesiek**

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin

Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen

Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum

in Bad Oeynhausen

in der Zeit von

August 2003 bis Dezember 2006



1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2007

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Götting für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen sowie für die gute Betreuung dieser Arbeit.

Dr. Jens Dreier, Dr. Martin Gastens, Dr. Joachim Kuhn, Dr. Sandra Müller, Dr. Michael Schmidt, Dr. Sylvia Schön, Dr. Veronika Schulz, Dr. Sabine Siegling, Dr. Elmar Thyzel, Dipl.-Biochem. Michael Ambrosius, Dipl.-Biol. Susanne Busch, Dipl.-Biol. Javier C. Casanova, Dipl.-Biochem. Carsten Funke, Dipl.-Biol. Doris Hendig, Dipl.-Biotech. Claudia Pönighaus, Dipl.-Biol. Manuela Schöttler, Dipl.-Ing. Melanie Störmer, Alexandra Adam sowie Marlen Ewald danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen ehemaligen Diplomanden Benjamin Müller und Berit Abel sowie den ehemaligen Praktikanten Sascha Browski, Andreas Uhmeyer und Markus Brockmann möchte ich besonders für ihren Beitrag am Fortgang meiner Arbeit danken.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und Geräten sowie für hilfreiche Diskussionen möchte ich den folgenden Kooperationspartnern danken:

- Herrn PD Dr. Hendrik Milting und Dipl.-Biol. Astrid Kassner, Erich und Hanna Klessmann-Institut für kardiovaskuläre Forschung und Entwicklung, HDZ-NRW;
- Dr. Martin Farr, Klinik für Kardiologie, HDZ-NRW;
- Dr. Karen Bieback und Dr. Susanne Kern, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Mannheim.

Im gesonderten Maße möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Anna Bucko und bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt haben.

---

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>2</b>
2.1	Die extrazelluläre Matrix.....	2
2.2	Aufbau und Funktion der Proteoglykane.....	3
2.3	Glykosaminoglykane .....	4
2.4	Glykosyltransferasen .....	5
2.5	Xylosyltransferasen.....	7
2.6	Dilatative Kardiomyopathie.....	8
2.7	Humane mesenchymale Stammzellen .....	9
2.7.1	Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	11
2.7.2	Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	11
2.8	RNA-Interferenz.....	12
2.9	Gegenstand der Arbeit .....	14
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>15</b>
3.1	<b>Funktion und Regulation der XT-I bei fibrotischen Gewebsalterationen</b> .....	<b>15</b>
3.1.1	Patientenkollektiv .....	15
3.1.2	Expression der XT-I-mRNA in Myokardproben von DCM-Patienten und pathologisch unauffälligen Kontrollen .....	15
3.1.3	Gesteigerte XT-I-Aktivität und vermehrter Proteoglykangehalt im dilatierten kardialen Gewebe .....	17
3.1.4	Mechanischer Stress als Induktor einer gesteigerten XT-I-Expression .....	18
3.1.5	Halbwertszeit der XT-I-mRNA bei mechanisch gestressten HCFs .....	19
3.1.6	TGF- $\beta_1$ -induzierte Regulation der XT-I-Expression in HCFs .....	19
3.1.7	Inhibition der TGF- $\beta_1$ -aktivierten XT-I-Genexpression .....	20
3.1.8	Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand von mechanisch gestressten oder mit TGF- $\beta_1$ inkubierten HCFs .....	22
3.1.9	Spezifische Reduktion der XT-I-mRNA in mechanisch gestressten HCFs .....	23
3.2	<b>Regulation der ECM-Biosynthese bei der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen</b> .....	<b>25</b>
3.2.1	Expression von Standardmarkern der chondrogenen Differenzierung .....	25
3.2.2	Expression von XT-I und XT-II während der chondrogenen Differenzierung....	25
3.2.3	Transkriptionelle Regulation von EXTL2, GalNAcT und GlcAC5E während der chondrogenen Differenzierung.....	27

3.2.4	Unterschiedliche Regulation der Proteoglykan-Core-Proteine Decorin, Aggrecan, Perlecan und Glypican-3 .....	28
3.2.5	Immunhistologischer Nachweis von XT-I, Decorin und Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykanen im Verlauf der Chondrogenese .....	29
<b>3.3</b>	<b>Regulation der ECM-Biosynthese bei der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Verifizierung der osteogenen Differenzierung über die Detektion von Standardmarkern .....	31
3.3.2	Quantifizierung der mRNA-Expression osteogener Marker .....	33
3.3.3	Relative mRNA-Expression von XT-I und XT-II während der osteogenen Differenzierung .....	35
3.3.4	mRNA-Expression von Enzymen, die für die Initiation der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat- und Heparansulfat-Biosynthese relevant sind .....	37
3.3.5	Expression von Proteoglykan-Core-Proteinen während der osteogenen Differenzierung .....	39
<b>3.4</b>	<b>Aufklärung der physiologischen Funktion der humanen Xylosyltransferasen .....</b>	<b>41</b>
3.4.1	Auswahl und Optimierung geeigneter RNAi-Systeme zur Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression .....	41
3.4.1.1	Optimierung der Transfektion für siRNA- und shRNA-Vektoren .....	42
3.4.1.2	Auswahl geeigneter siRNA-Oligonukleotide und shRNA-Vektoren zur effizienten Reduktion des XT-I- und XT-II-mRNA-Gehalts .....	43
3.4.2	Reduktion der XT-I-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen .....	45
3.4.2.1	Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-Isi65 .....	45
3.4.2.2	Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I-siRNA vermitteltem <i>Knock-down</i> .....	46
3.4.3	Reduktion der XT-II-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen .....	47
3.4.3.1	Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-II-si68 .....	48
3.4.3.2	Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-II-siRNA vermitteltem <i>Knock-down</i> .....	49
3.4.4	Parallele Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen .....	50
3.4.4.1	Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-Isi65 und XT-II-si68 .....	51
3.4.4.2	Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach parallelem XT-I- und XT-II-siRNA vermitteltem <i>Knock-down</i> .....	52
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktion und Regulation der XT-I bei kardialer Fibrose .....</b>	<b>54</b>
4.1.1	Expression der XT-I in Myokardproben von DCM-Patienten .....	54

4.1.2	Mechanischer Stress als Induktor einer gesteigerten XT-I-Expression .....	55
4.1.3	TGF- $\beta_1$ -induzierte Regulation der XT-I-Expression in HCFs .....	56
4.1.4	Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand von mechanisch gestressten und mit TGF- $\beta_1$ inkubierten HCFs .....	56
4.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse bei der DCM .....	57
<b>4.2</b>	<b>Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....</b>	<b>58</b>
4.2.1	Unterschiedliche Regulationsmuster der XT-I und XT-II während der chondrogenen Differenzierung .....	58
4.2.2	Regulation der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Biosynthese während der chondrogenen Differenzierung .....	59
4.2.3	Regulation der Heparansulfat-Biosynthese nach Induktion der chondrogenen Differenzierung .....	60
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung .....	60
<b>4.3</b>	<b>Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen .....</b>	<b>62</b>
4.3.1	Expressionskinetik der XT-I und XT-II im Rahmen der osteogenen Differenzierung .....	62
4.3.2	Regulation der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Biosynthese während der osteogenen Differenzierung .....	63
4.3.3	Regulation der Heparansulfat-Biosynthese bei der osteogenen Differenzierung .....	63
4.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse bei der osteogenen Differenzierung .....	64
<b>4.4</b>	<b>Analyse der physiologischen Funktion von XT-I und XT-II durch die siRNA-vermittelte Suppression der mRNA-Expression beider Gene .....</b>	<b>65</b>
4.4.1	Expressionsverhalten von SAOS-2- und SW1353-Zellen nach gezielter Reduktion der XT-I-Expression .....	65
4.4.2	Expressionsverhalten von SAOS-2- und SW1353-Zellen nach gezielter Reduktion der XT-II-Expression .....	65
4.4.3	Reduktion der mRNA-Expression beider Xylosyltransferasen nach paralleler Transfektion mit XT-I- und XT-II-siRNA .....	66
4.4.4	Zusammenfassung der siRNA-Ergebnisse .....	67
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>69</b>
5.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen .....	69
5.1.2	Parallele Isolierung von RNA und DNA aus eukaryotischen Zellen .....	70
5.1.3	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	70
5.1.4	Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	71
5.1.5	RNA-Formamid-Agarose-Gelelektrophorese .....	71
5.1.6	Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligonukleotiden .....	71
5.1.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel .....	72

---

5.1.8	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	73
5.1.9	Amplifikation von DNA .....	73
5.1.9.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	73
5.1.9.2	<i>Real-Time</i> PCR .....	74
5.1.9.3	Etablierung von <i>Real-Time</i> PCR-Systemen zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression.....	74
5.1.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	77
5.1.11	Sequenzierung von DNA Fragmenten .....	77
5.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA .....	79
5.1.12.1	Plasmidisolierung von 5 ml Übernacht-Kulturen .....	79
5.1.12.2	Plasmidisolierung von 50 ml Übernacht-Kulturen .....	79
5.1.13	DNA-Spaltung mit Endonukleasen.....	79
5.1.14	Ligation mit der T4-Ligase.....	80
<b>5.2</b>	<b>Histologische Methoden .....</b>	<b>80</b>
5.2.1	Vorbereitung von Mikrotomschnitten.....	80
5.2.2	Immunhistologische Färbung .....	81
5.2.3	Nachweis von Proteoglykanen durch Alcianblau-Färbung.....	81
5.2.4	Nachweis von Kollagen durch Siriusrot-Färbung .....	81
5.2.5	Nachweis der Kalziumdeposition durch Färbung nach <i>von Kossa</i> .....	82
5.2.6	Farbnachweis für die alkalische Phosphatase-Aktivität .....	82
<b>5.3</b>	<b>Proteinchemische und klinisch-chemische Methoden .....</b>	<b>82</b>
5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	82
5.3.2	Coomassie-Blau-Färbung .....	84
5.3.3	Western-Blot .....	84
5.3.4	Immundetektion von immobilisierten Proteinen .....	85
5.3.5	Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität.....	85
5.3.5.1	Präparation des Akzeptors Seidenfibroin .....	86
5.3.5.2	Radiochemischer XT-Aktivitätstest.....	86
5.3.5.3	XT-Aktivitätstest mittels HPLC-Elektronenspray-Ionisations- Massenspektroskopie (HPLC-ESI-MS).....	87
5.3.6	Bestimmung der Gesamt-Kalziumkonzentration.....	87
5.3.7	Bestimmung der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand .....	88
5.3.8	Quantifizierung des Glykosaminoglykangehaltes im Zellkulturüberstand .....	88
<b>5.4</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>89</b>
5.4.1	Myokardiale Gewebeproben von DCM-Patienten.....	89
5.4.2	Isolierung und Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten .....	89
5.4.3	Mechanische Expansion und Kontraktion kardialer Fibroblasten .....	90
5.4.4	Bestimmung der Halbwertszeit von XT-I mRNA bei mechanisch gestressten kardialen Fibroblasten.....	90
5.4.5	Inkubation von kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta_1$ und dessen spezifischen Inhibitoren .....	90
5.4.6	Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen .....	90

---

5.4.7	Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	91
5.4.8	Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen.....	91
5.4.9	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	91
5.4.10	Kultivierung humaner Zelllinien.....	92
5.4.11	Passagieren von adhärennten Zellen.....	92
5.4.12	Kryokonservierung und Revitalisierung humaner Zellen.....	92
5.4.13	Anzucht von <i>E. coli</i> –Zellen in Flüssigkultur.....	93
5.4.14	Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....	93
5.4.15	Transfektion humaner Zellen.....	93
5.4.15.1	Transfektion von shRNA-Plasmiden in humane Zellen.....	93
5.4.15.2	Transfektion von shRNA-Vektoren mit Fugene6.....	94
5.4.15.3	Transfektion von siRNA in humane Zellen.....	95
5.4.15.4	siRNA-Transfektion mit Lipofectamin 2000.....	95
5.4.15.5	siRNA-Transfektion mit RiboJuice.....	96
5.4.16	Transformation von <i>E. coli</i> .....	96
5.4.17	Bestimmung der Zellzahl.....	97
<b>5.5</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Material und Geräte.....</b>	<b>98</b>
6.1	Zelllinien.....	98
6.2	Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien.....	98
6.3	Bakterienstämme.....	98
6.4	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> .....	99
6.5	Vektoren.....	99
6.6	Reagenzien, Enzyme, Antikörper.....	99
6.7	Reagenziensätze.....	101
6.8	Software.....	101
6.9	Sonstige Materialien.....	102
6.10	Puffer und Lösungen.....	102
6.11	Geräte.....	103
<b>7</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>107</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen und Präsentationen.....</b>	<b>119</b>
9.1	Publikationen.....	119
9.2	Kongressbeiträge und Posterpräsentationen.....	121

<b>9.3</b>	<b>Kongressvorträge .....</b>	<b>124</b>
<b>9.4</b>	<b>Auszeichnungen .....</b>	<b>124</b>

## 1 Zusammenfassung

Proteoglykane bilden einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). An der Biosynthese der Glykosaminoglykan(GAG)-Ketten sind eine Vielzahl von Glykosyltransferasen beteiligt, wobei die Xylosyltransferase I (XT-I), durch den Transfer von Xylose auf spezifische Serinreste des Proteoglykan-Core-Proteins, die Synthese des Tetrasaccharid-Linkers initiiert. Für das zur XT-I hoch homologe Protein, Xylosyltransferase II (XT-II), konnte bislang keine physiologische Funktion nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals eine detaillierte Analyse zur Funktion und Regulation der XT-I bei pathophysiologischer Remodellierung der ECM. Anhand von humanen Herzgewebeproben konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) neben einer gesteigerten Expression des Enzyms auch eine vermehrte Deposition von GAG-Ketten und Proteoglykanen im Myokard aufweisen. Durch die Verwendung eines Modellsystems zur *in vitro*-Simulation der DCM konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Hochregulation der XT-I-Expression durch mechanischen Stress erfolgt. Als Induktor der XT-I-Genexpression wurde TGF- $\beta_1$  identifiziert, welcher bei mechanischer Expansion kardialer Fibroblasten vermehrt sezerniert wird. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der TGF- $\beta_1$ -Signalkaskade konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der XT-I-Transkription über den Signalweg der p38-MAP-Kinase reguliert wird. Über eine gezielte siRNA-vermittelte Degradierung der XT-I-mRNA in kardialen Fibroblasten sowie anschließende Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand konnte zudem erstmals bestätigt werden, dass die XT-I das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der kardialen GAG-Biosynthese darstellt.

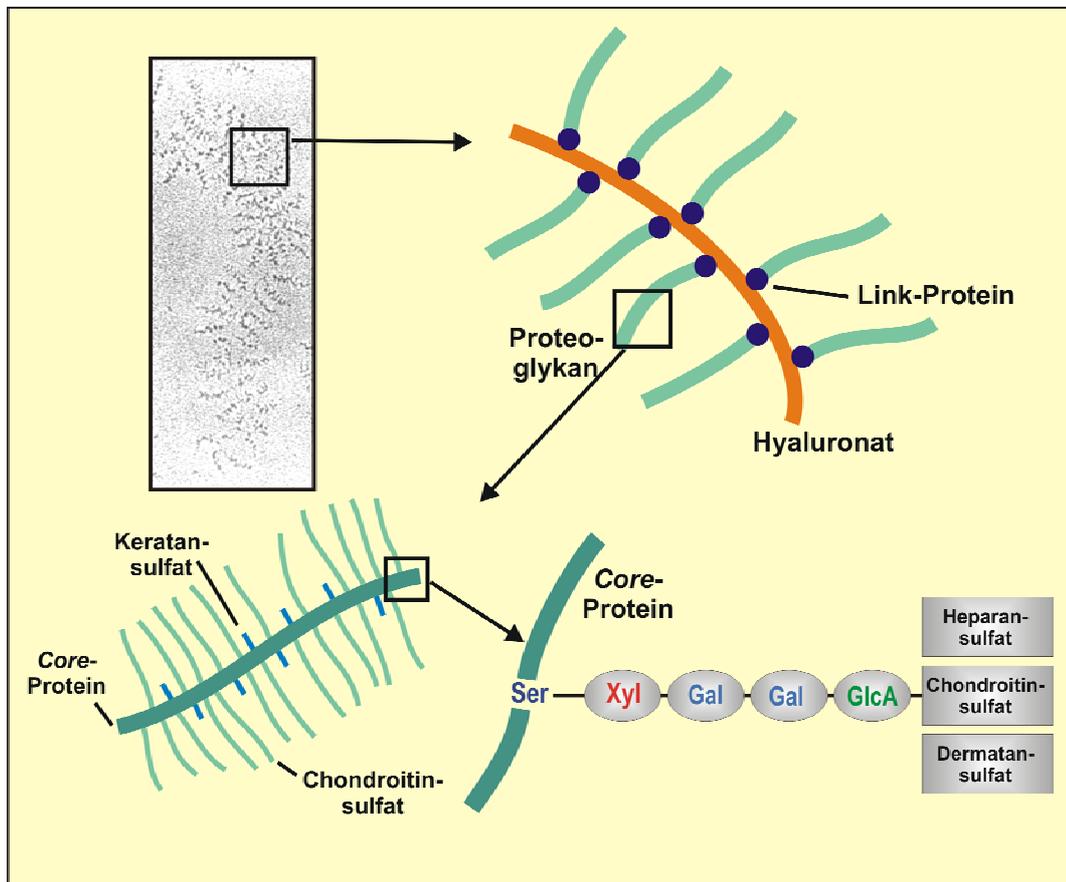
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von *Real-Time* PCR-Systemen zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression der an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligten Enzyme und Core-Proteine etabliert. Unter Verwendung dieser Systeme konnte umfassend die Regulation der Genexpression bei der physiologischen Ausbildung der ECM während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht werden. Die Expressionsanalyse zeigte, dass sowohl die GAG-bildenden Enzyme als auch die Proteoglykan-Core-Proteine vielfach die gleichen Regulationsmuster aufweisen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl bei Chondrogenese als auch bei Osteogenese die XT-I, aufgrund einer den anderen Enzymen vorgelagerten Expression, vermutlich eine Schlüsselposition bei der Assemblierung der GAG-Ketten einnimmt. Für die XT-II wurde bei beiden Differenzierungswegen jeweils eine zur XT-I differierende Expressionskinetik detektiert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Analyse der Expression von Schlüsselenzymen und Core-Proteinen der Proteoglykanbiosynthese eine Möglichkeit darstellt, die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Stammzellendifferenzierung zu kategorisieren.

Durch die Verwendung von shRNA und siRNA wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die mRNA-Expression beider humaner Xylosyltransferasen gezielt *in vitro* um mehr als 80% reduziert. Durch die siRNA-vermittelte Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression in SW1353- und SAOS2-Zellen konnte dadurch erstmals nachgewiesen werden, dass die XT-II eine Xylosyltransferaseaktivität aufweist. Zusätzlich zeigte sich, dass die XT-II in aktiver Form in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und dort eine, im Vergleich zur XT-I, abweichende Akzeptorspezifität aufweist. Darüber hinaus wurde bei der Regulation beider Xylosyltransferasen ein Rückkopplungsmechanismus detektiert. So konnte nachgewiesen werden, dass bei einer singulären Reduktion eines der beiden Enzyme eine vermutlich kompensatorische Hochregulation des jeweils anderen Enzyms erfolgt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die extrazelluläre Matrix

Der Anteil des Gewebes, der von tierischen Zellen in den Interzellularraum sezerniert wird, ist als extrazelluläre Matrix (ECM) definiert. Die ECM kommt grundsätzlich in allen Grundgewebetypen vor, wo sie bestimmend für die Eigenschaften der jeweiligen Gewebeart ist. Das Resultat der Forschung der letzten Jahre ist, dass die ECM heute nicht mehr nur als gewebeinterner Wasserspeicher mit Stützfunktion angesehen wird, sondern vielmehr als ein System aus der Gesamtheit komplex interagierender Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran befinden. Neben Faserproteinen wie Kollagen oder Fibronectin sind vor allem Proteoglykane ein wichtiger Bestandteil der ECM [1].



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung eines Proteoglykan-Aggregats. Die Glykosaminoglykan(GAG)-Ketten sind über einen Tetrasaccharid-Linker an das Core-Protein gebunden.

## 2.2 Aufbau und Funktion der Proteoglykane

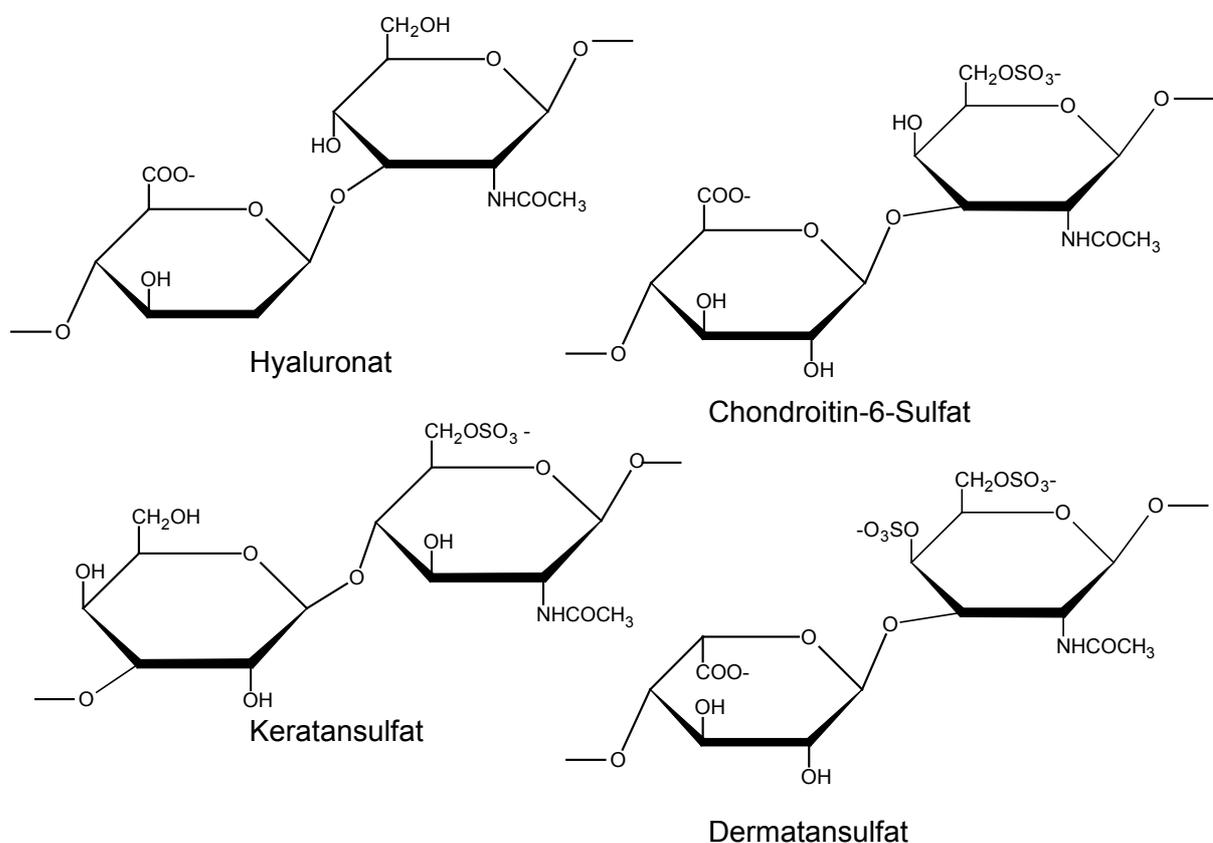
Proteoglykane sind eine heterogene Gruppe von Glykokonjugaten, die sich aus Polysacchariden und Peptiden zusammensetzen. Dabei können Glykosaminoglykane (GAG), die Polysaccharide der Proteoglykane, bis zu 95% der Gesamtmasse dieser Konjugate ausmachen [2]. GAG-Ketten, wie z.B. Heparansulfat, Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat bestehen aus repetitiven Disaccharid-Einheiten, die an das *Core*-Protein gebunden sind. In Abhängigkeit vom *Core*-Protein können eine oder mehr als 100 unverzweigte GAG-Ketten an das Peptidrückgrat gebunden sein. Insgesamt sind bisher mehr als 30 verschiedene *Core*-Proteine identifiziert worden, wobei das Molekulargewicht von 10-500 kDa variiert [3]. Basierend auf der Sequenz des *Core*-Proteins wurde eine simplifizierte Einteilung in zwei Gruppen vorgeschlagen. Die Klassifizierung unterscheidet zwischen kleinen leucinreichen Proteoglykanen (z.B. Decorin) und den modularen großen Proteoglykanen, welche in zwei Subgruppen unterteilt sind. Dabei wird differenziert zwischen den Hyalektanen, die hyaluron- und lektinbindende Domänen aufweisen, (z.B. Aggrecan und Versican) und den nicht hyaluronsäurebindenden Proteoglykanen (z.B. Perlecan) [4].

Eines der am besten untersuchten Proteoglykane stellt das Aggrecan dar. Es kommt in großen multimolekularen Aggregaten vor, die aus einer Vielzahl von Proteoglykan-Monomeren bestehen. Diese sind jeweils über ein *Link*-Protein nicht-kovalent an ein Hyaluronatmolekül gebunden. Annähernd 90% der Masse des Aggrecans ist bedingt durch den Kohlenhydratanteil, welcher prädominant aus Chondroitinsulfat-, aber auch zu einem geringeren Anteil aus Keratansulfatketten besteht [5, 6]. Aggrecan bildet den größten Teil des Knorpels, wobei durch den anionischen Charakter der Aggrecan-Aggregate ein Turgordruck aufgebaut wird, der verantwortlich für die Kompressionsstabilität ist [7, 8].

Neben der Stabilisierung verschiedener Gewebetypen beinhalten Proteoglykane eine Reihe anderer physiologischer Funktionen. So interagiert z.B. das kleine leucinreiche Proteoglykan Decorin mit den Kollagen-Typen I und II und beeinflusst entscheidend die Kinetik der Kollagenfibrillogenese sowie den Durchmesser von und die Distanz zwischen den Fibrillen [9-11]. Zudem ist Decorin in der Lage, über sein *Core*-Protein das Cytokin *transforming growth factor beta1* (TGF- $\beta_1$ ) mit hoher Affinität zu binden und somit die Bioaktivität zu beeinflussen [12-15].

### 2.3 Glykosaminoglykane

Zu den GAG zählen Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Heparin, Hyaluronat und Keratansulfat. Sie sind aus alternierenden Disaccharideinheiten aufgebaut und können sowohl als Bestandteil eines Proteoglykans oder auch in freier Form im Organismus vorliegen [16]. Die zwei alternierenden Monosaccharide sind jeweils ein Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) und eine Uronsäure (D-Glukuron- oder L-Iduronsäure). Eine Vielzahl der Hydroxylgruppen des Aminozuckers ist mit Sulfat verestert, woraus eine hohe Ladungsdichte der GAG-Kette resultiert [2]. Die charakteristische Form der langgestreckten Polymerkette ergibt sich aus der Ausbildung dieser energetisch günstigen Konformation.



**Abb. 2.2:** Darstellung der Disaccharideinheiten wichtiger Glykosaminoglykane (GAG).

Die Synthese der GAG-Ketten wird, abgesehen vom Keratansulfat, durch die sequentielle Addition der vier Monosaccharide Xylose, Galaktose, Galaktose und Glukuronsäure an das Proteoglykan-Core-Protein eingeleitet. Der initiale Transfer der Xylose auf das Core-Protein wird dabei durch das Enzym Xylosyltransferase I (XT-I) eingeleitet. Ausgehend von dem Tetrasaccharid-Linker erfolgt durch weitere Glykosyltransferasen eine Elongation der GAG-Kette, welche abschließend aus bis zu 1000 Disaccharideinheiten aufgebaut ist [4, 17, 18].

Chondroitinsulfat besteht aus einer repetitiven Sequenz von N-Acetylgalaktosamin und Glukuronsäure. Der Aminozucker kann durch unterschiedliche Sulfotransferasen sowohl an der Position C4 als auch C6 verestert werden, wodurch zwischen Chondroitin-4-Sulfat und Chondroitin-6-Sulfat unterschieden wird. Durch das Enzym Glukuronyl-C5-Epimerase (GlcAC5E) erfolgt an der Position C5 die Epimerisierung der Glukuronsäure zu Iduronsäure und führt somit zur Ausbildung von Dermatansulfat [19].

Die Biosynthese von Heparin und Heparansulfat erfolgt nach der Addition von N-Acetylglukosamin und D-Glukuronsäure an den Tetrasaccharid-Linker. Nachdem beide Saccharide partiell enzymatisch N-deacetyliert und N- oder O-sulfatiert wurden, katalysiert die GlcAC5E eine Epimerisierung der Glukuronsäure zu Iduronsäure [20]. Bezüglich der Substitutionsmuster von Heparin und Heparansulfat zeigen sich deutliche Unterschiede bei der N-Sulfatierung und N-Acetylierung. Während für Heparin prädominant eine N-Sulfatierung beobachtet wird, zeigt sich das Substitutionsmuster von Heparansulfat deutlich vielseitiger [21].

Abweichend von den bereits beschriebenen GAG können Keratansulfate sowohl N-glykosidisch als auch O-glykosidisch an das Proteoglykan-Core-Protein gebunden sein [22]. Im Vergleich zu anderen GAG sind die ausgebildeten Disaccharidketten sehr kurz (Abb. 2.1).

Hyaluronat stellt das längste GAG dar und wird im Gegensatz zu anderen GAG nicht in intrazellulären Kompartimenten, sondern an der inneren Oberfläche der Plasmamembran synthetisiert. Durch das Enzym HA-Synthase wird dabei die Addition von jeweils N-Acetylglukosamin und D-Glukuronsäure katalysiert [23-25].

## 2.4 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen sind Enzyme, die den Transfer eines aktivierten Zuckers auf ein Akzeptormolekül katalysieren und somit die Synthese von Saccharidketten initiieren bzw. elongieren. Bei dem Akzeptormolekül kann es sich um das nicht-reduzierende Ende einer wachsenden Oligosaccharidkette, um ein Protein oder um ein Lipid handeln [26]. Die meisten Glykosyltransferasen benötigen für die von ihnen katalysierte Transglykosidierung ein bivalentes Kation als Kofaktor, welches in der Regel  $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  ist [27]. Aufgrund ihrer Substratspezifität können die Glykosyltransferasen in verschiedene Familien unterteilt werden. Nach der Art des transferierten UDP-, GDP- oder CMP-Zuckers wird zwischen Galaktosyltransferasen, Glukosyltransferasen, Fukosyltransferasen, N-Acetylglukosaminyltransferasen, N-Acetylgalaktosaminyltransferasen, Sialyltransferasen und

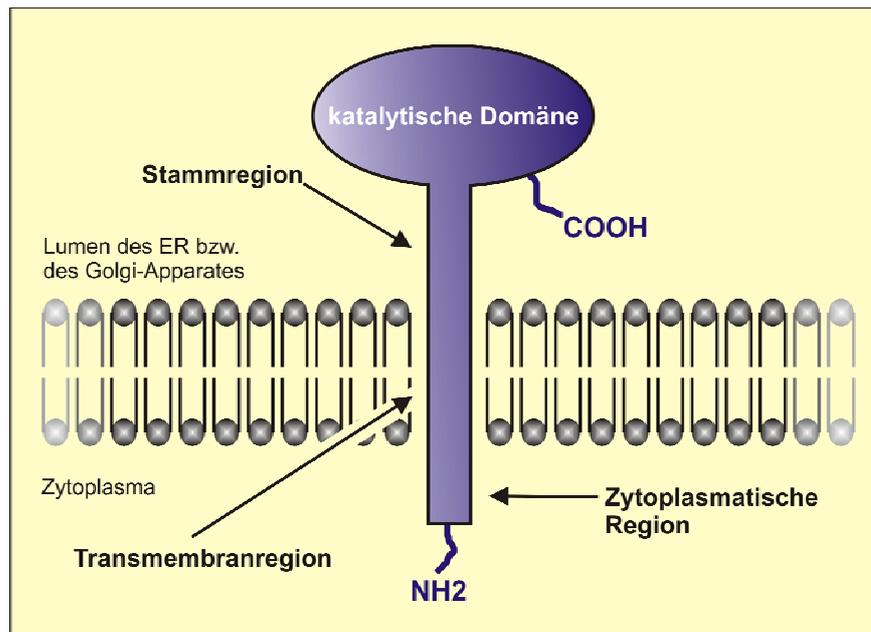
Xylosyltransferasen unterschieden [28]. In Abhängigkeit von der Glykosyltransferase kann der Transfer des Zuckers unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum erfolgen. 1997 wurde durch Campell *et al.* eine Kategorisierung der bis dahin bekannten Glykosyltransferasen in 26 Familien vorgenommen. Die Einteilung erfolgte dabei nach Sequenzhomologien, nach Donorzucker und nach Inversion bzw. Retention des Substratzuckers [29]. Mittlerweile ist die Anzahl von Glykosyltransferasefamilien, basierend auf Sequenzanalysen, auf weit über 70 angewachsen [28].

Abweichend von der deduzierten Aminosäuresequenz weist die Tertiärstruktur der im Golgi-Apparat lokalisierten Enzyme signifikante Homologien auf [26, 30]. Dabei sind die Mehrzahl der Glykosyltransferasen lumenorientierte Typ II Transmembran-Proteine, die eine kurze N-terminale cytoplasmatische Domäne, einen hydrophoben Membran-Anker, eine Stammregion variabler Länge sowie eine enzymatisch aktive globuläre Domäne aufzeigen (Abb. 2.3) [26]. Das pH-Optimum dieser Enzyme liegt zumeist in einem Bereich von pH 5 - pH 7, was den pH-Werten in den verschiedenen Kompartimenten des ER-Golgi-Plasmalemmas entspricht.

In den vergangenen Jahren konnte bereits eine Vielzahl von Glykosyltransferasen kloniert und deren Kristallstruktur aufgeklärt werden. Anhand der 3-D-Strukturen konnten zwei verschiedene Tertiärstrukturen identifiziert werden. Die Typ-A-Struktur bei Glykosyltransferasen setzt sich aus parallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammen, die jeweils von  $\alpha$ -Helices flankiert werden. Zusätzlich haben Typ-A-Glykosyltransferasen ein konserviertes DxD-Motiv (x = beliebige Aminosäure) gemeinsam, welches durch die Koordination zweiwertiger Kationen an der Bindung des aktivierten Zuckers beteiligt ist.

Die Tertiärstruktur der Typ-B-Glykosyltransferasen beschreibt zwei aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Ketten zusammengesetzte Rossmann-ähnliche Strukturen, welche bei der Ligandenbindung eine veränderte Konformation einnehmen [26, 27].

Neben der XT-I, welche den initialen Schritt der GAG-Biosynthese katalysiert, sind die Glykosyltransferasen N-Acetylgalaktosaminyltransferase I (GalNAcT) und die N-Acetylglucosaminyltransferase I (EXTL2) entscheidend an der Elongation der GAG-Ketten beteiligt. Nach Ausbildung des Tetrasaccharid-Linkers transferiert die GalNAcT die Addition von GalNAc und ist somit neben der Glukuronyltransferase II essentiell an der Synthese von Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Ketten beteiligt [31-33]. Das Enzym EXTL2 katalysiert den Transfer von GlcNAc auf den Tetrasaccharid-Linker und initiiert dadurch die Synthese von Heparin und Heparansulfat [34-36].



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur einer Glykosyltransferase.

## 2.5 Xylosyltransferasen

Die XT-I wird der Glykosyltransferasefamilie 14 zugeordnet. Sie katalysiert den initialen Schritt bei der Bildung des Tetrasaccharid-Linkers und ist somit ein Schlüsselenzym bei der GAG-Biosynthese [37, 38]. Das Enzym transferiert dabei die aktivierte Form der D-Xylose, die UDP-D-Xylose, auf bestimmte Serinreste des Proteoglykan-Core-Proteins. Der XT-I-vermittelte Prozess der Xylosylierung stellt somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Biosynthese von Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat, Heparansulfat und Heparin-Ketten dar und erfolgt posttranslational im Golgi-Apparat [39].

Die Xylosylierung von Serinresten durch die XT-I erfolgt nur innerhalb einer definierten Aminosäuresequenz. Durch kinetische Studien und einen Vergleich der Aminosäuresequenzen glykosylierter Proteoglykane konnte eine Consensus-Sequenz, bestehend aus den Aminosäuren a-a-a-a-G-S-G-a-b-a (a = E oder D, b = G, E oder D), für den XT-I katalysierten Xylosetransfer identifiziert werden [40]. Basierend auf dieser Consensus-Sequenz erfolgte erstmalig die Etablierung spezifischer Testsysteme zur Quantifizierung der XT-I-Enzymaktivität [41]. Frühere Testsysteme nutzten deglykosylierte Proteoglykane aus Knorpelgewebe als Akzeptorsubstrat. Bedingt durch die extremen Reaktionsbedingungen, welche für die Deglykosylierung notwendig sind, erfolgte eine unterschiedliche Fragmentierung der Proteine. Durch die Verwendung des nicht glykosylierten Seidenfibroins von *Bombyx mori* konnte erstmals ein für die XT-I spezifischer und hochsensitiver Enzymaktivitätstest entwickelt werden. Das Seidenfibroin setzt sich aus

den repetitiven Aminosäuresequenzen S-G-A-G-A-G zusammen, welches somit die Erkennungssequenz der XT-I enthält. Die Quantifizierung der XT-I-Aktivität basiert auf der Detektion des XT-I-vermittelten Transfers von UDP-[<sup>14</sup>C]-Xylose auf den Akzeptor Seidenfibroin [41]. Unter Verwendung des XT-I-Enzymaktivitätstests konnte bereits in verschiedenen Probenmaterialien, wie z.B. in Körperflüssigkeit, die Enzymaktivität der löslichen Form der XT-I quantifiziert werden. Durch diese Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die XT-I an einer Reihe von biologischen und auch pathobiologischen Prozessen bei der Synthese und Umstrukturierung der ECM signifikant beteiligt ist [41-50].

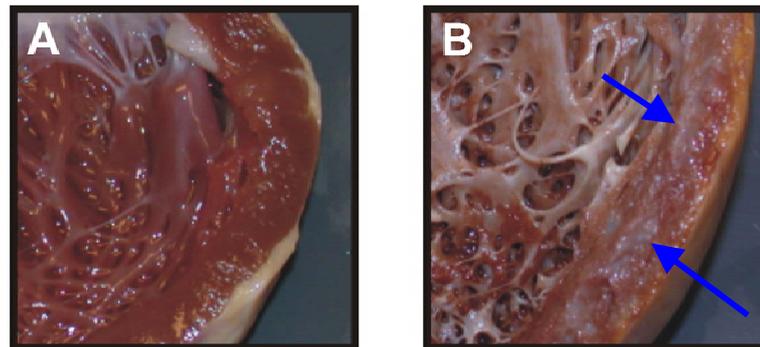
Sowohl die Isolierung der XT-I als auch die Klonierung der XT-I-cDNA erfolgten in der Arbeitsgruppe des Instituts für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin im Herz- und Diabeteszentrum NRW [51-54]. Dabei konnte erstmalig ein zur XT-I hoch homologes Gen identifiziert werden, die Xylosyltransferase II (XT-II). Die humane XT-II zeigt auf Aminosäure-Ebene eine Sequenzhomologie zur XT-I von 55% auf. Innerhalb der C-terminalen katalytischen Domäne beider Proteine zeigt sich eine Sequenzhomologie von über 80% [51]. Bislang konnte die physiologische Funktion der XT-II nicht geklärt werden. Aufgrund der hochkonservierten Struktur beider XYLT-Gene kann vermutet werden, dass die XT-II analog zur XT-I eine Glykosyltransferaseaktivität aufzeigt.

## 2.6 Dilatative Kardiomyopathie

Die kardiale Fibrose ist ein Prozess, der charakterisiert ist durch einen massiven Umbau der myokardialen ECM. Bedingt durch die Substitution von funktionellem Gewebe durch nicht-elastisches fibrotisches Gewebe kommt es zu einer Einschränkung der Herzfunktion und somit schließlich zur Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz [55-60]. Die *New York Heart Association* (NYHA) teilt die Herzinsuffizienz in vier Schweregrade ein. Dabei entspricht die NYHA-Klasse I einer leichten Funktionsstörung des Herzens, die nur unter außergewöhnlicher Belastung wahrgenommen wird. Bei einer starken körperlichen Einschränkung mit Atemnot im Ruhezustand erfolgt die Zuordnung des Betroffenen in die NYHA-Klasse IV.

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) stellt neben anderen Formen der Herzinsuffizienz die häufigste Ursache der Herzmuskelschwäche dar. Die Ätiologie ist bei dieser Erkrankung sehr heterogen; sie kann sowohl primär, bedingt durch genetische Defekte, als auch sporadisch als Folge einer Virusmyokarditis auftreten [61, 62]. Zusätzlich kann die DCM das sekundäre Ergebnis anderer kardiovaskulärer Erkrankungen sein [63]. Charakteristisch für die DCM ist eine erhöhte ventrikuläre Wandspannung, aus der eine gesteigerte mechanische Belastung

des kardialen Gewebes resultiert. Bedingt durch diesen mechanischen Stress erfolgt bei den humanen kardialen Fibroblasten (HCFs) eine vermehrte Sezernierung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$  [64]. Dieses Zytokin ist bekanntermaßen für die Induktion der Kollagenexpression verantwortlich [65]. Als ein geeignetes Modellsystem zur Simulation der kardialen Fibrose hat sich die zyklische mechanische Expansion von *in vitro*-kultivierten kardialen Fibroblasten etabliert [66].



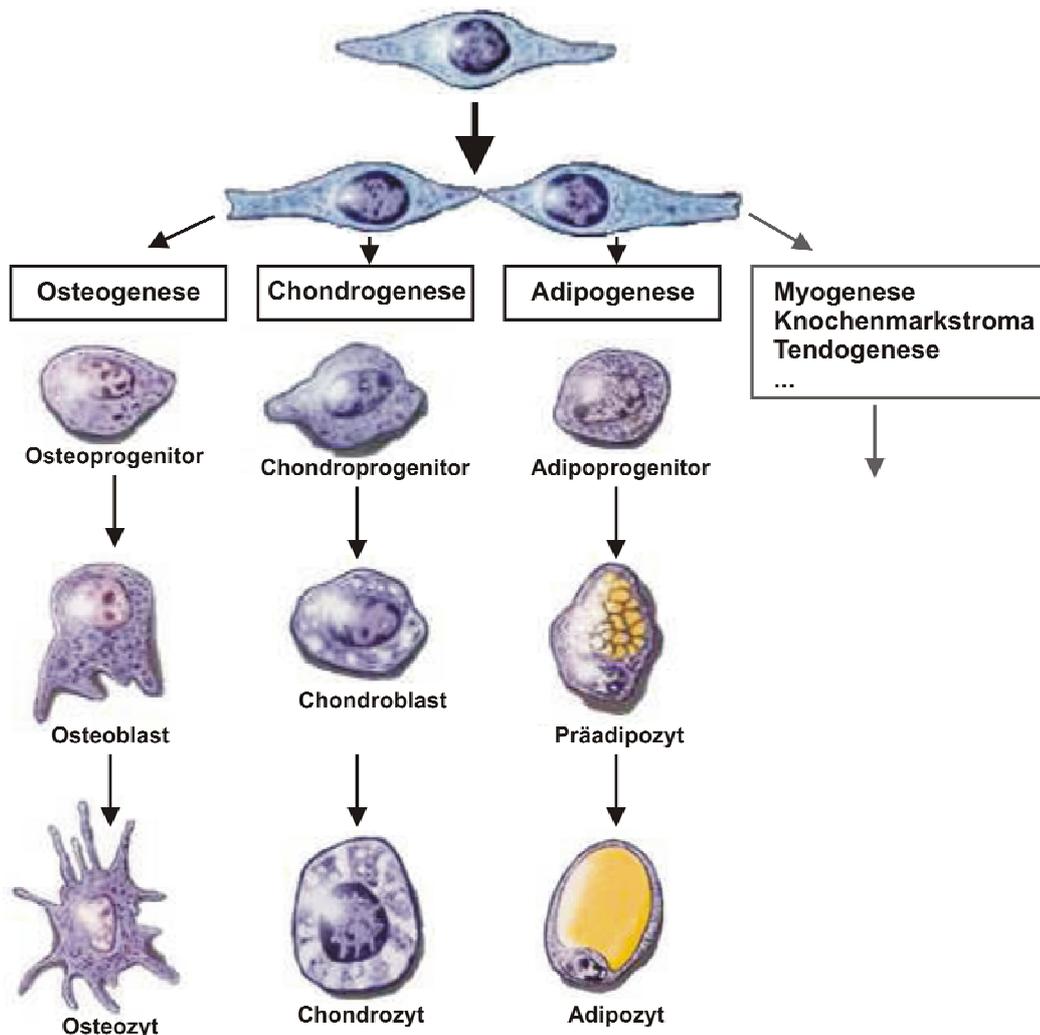
**Abb. 2.4:** Vergleichende Darstellung des linken Ventrikels eines gesunden (A) und eines DCM-Patienten (B). Deutlich zu sehen sind weiß gefärbte Bereiche des Myokards, bedingt durch interstitielle Fibrose.

Der fibrotische Umbau des kardialen Gewebes während der DCM ist gekennzeichnet durch eine veränderte Homeostase der ECM. Dabei sind ein verändertes Verhältnis der Kollagen Typ I- und Typ III-Expression und eine gesteigerte Produktion von Proteoglykanen ein Hauptcharakteristikum für das Fortschreiten der myokardialen Fibrose [57, 67, 68]. Während der fibrotischen Gewebsdegeneration kann im ventrikulären Gewebe vorwiegend die Akkumulation der Proteoglykane Decorin und Biglykan detektiert werden [69-71]. Sowohl Decorin als auch Biglykan gehören zu der Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane und besitzen ein ähnliches *Core*-Protein. Dieses ist am N-Terminus mit einer bzw. zwei Chondroitinsulfat- oder Dermatansulfat-Ketten assoziiert.

## 2.7 Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) bilden im Organismus eine geringe Population von multipotenten Progenitorzellen. Diese zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, z.B. sowohl in hämatopoetische als auch in chondrogene, osteogene und adipogene Zellen zu differenzieren [72]. Die Isolierung dieser Zellen erfolgt vorwiegend nach einem modifizierten Protokoll von Friedenstein, wobei die mesenchymalen Stammzellen über ihre

Adhärenz an Plastikoberflächen von anderen Zelltypen abgetrennt werden [73]. Bisher gestaltet sich die Identifikation der hMSCs sehr schwierig, da noch keine spezifischen Oberflächenantigene für diesen Zelltyp bekannt sind [74]. Die Anreicherung der isolierten hMSCs wird aufgrund der fehlenden Oberflächen-Antigene über einen Prozess der negativen Selektion durchgeführt [75]. Ein indirekter Nachweis wird deshalb in einer Vielzahl von Studien erst retrospektiv durch die Differenzierungskapazität der isolierten Zellen erbracht.



**Abb. 2.5:** Vereinfachtes Modell der mesenchymalen Stammzellendifferenzierung. Dargestellt sind die drei am besten etablierten Systeme der Mesengese. (nach [72], modifiziert)

### 2.7.1 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Aufgrund der limitierten Fähigkeit von Knorpelgewebe, sich selbst zu regenerieren, stellt die Implantation von autologen Chondrozyten, die aus hMSCs gewonnen wurden, eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit dar. Insbesondere die Fähigkeit von hMSCs, sich vielfach selbst zu replizieren, bietet die Möglichkeit, eine ausreichende Menge an Donor-Material für die Zelltherapie zur Verfügung zu stellen. Im Vergleich zu embryonalen Stammzellen besteht zudem bei einer Transplantation von differenzierten autologen hMSCs der Vorteil, dass keine Histokompatibilitätsprobleme berücksichtigt werden müssen.

In zahlreichen Studien konnte eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und chemischen Faktoren identifiziert werden, welche die chondrogene Differenzierung induzieren bzw. positiv beeinflussen. Zu den potentesten Induktoren der Chondrogenese zählen neben dem *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie [76]. Diese setzt sich aus über 40 verschiedenen Polypeptid-Wachstumsfaktoren zusammen, die besonders C-Terminal hoch konserviert sind. Abgesehen von verschiedenen Isoformen des TGF- $\beta$  sowie des *bone morphogenetic protein* (BMP) zählen zur TGF- $\beta$ -Familie unter anderem Activin und *growth differentiation factor-5* (GDF-5) [77, 78].

Die Induktion der Chondrogenese durch Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie erfolgt hauptsächlich über zwei verschiedene intrazelluläre Signalwege. Der erste Signalweg basiert auf der Aktivierung von *Smad*-Signalmolekülen, während parallel durch den zweiten Signalweg MAP-Kinasen aktiviert werden [79, 80]. Beide Signalkaskaden werden dabei über den selben TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex aktiviert, wobei zusätzlich eine Verbindung zum *Wnt*-Signalweg diskutiert wird [81].

### 2.7.2 Osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Zusätzlich zur Chondrogenese stellt die osteogene Differenzierung von hMSCs mittlerweile ein gut etabliertes System dar, welches im Bereich des *tissue-engineering* ein breites Anwendungsspektrum findet.

Die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten kann *in vitro* durch eine Inkubation mit dem Glukokortikoid Dexamethason, Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat induziert werden [82]. Im Rahmen der Osteogenese lässt sich die osteoblastoide Zelllinie in vier Differenzierungsstadien einteilen: Osteoprogenitor, Präosteoblast, Osteoblast und Osteozyt. Charakteristisch für die Osteoprogenitorzellen ist dabei ihre hohe Proliferationsrate. Standardmarker für die Osteogenese wie z.B. die alkalische Phosphatase (AP), Kollagen

Typ I und Osteocalcin können für dieses Entwicklungsstadium noch nicht detektiert werden. Ein positiver Nachweis dieser Standardmarker erfolgt jedoch für die Präosteoblasten, welche sowohl die AP, Kollagen Typ I, Osteocalcin als auch das *bone sialoprotein* (BSP) exprimieren. Differenzierte Osteoblasten sind zur Zellteilung nicht mehr fähig, zeigen jedoch eine gesteigerte Expression sämtlicher osteogener Matrixkomponenten. Der Hauptanteil der Osteoblasten unterliegt zum Ende der Ossifikation der Apoptose [83, 84].

Das genaue genetische und hormonelle Zusammenspiel, welches die osteogene Differenzierung steuert, ist bislang nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. *Babx 1*, *Cbfa 1*, *Osf 2*, *Dlx 5*, *Ihh*, *BMP* und *Leptin* an der Regulation der einzelnen Differenzierungsstadien beteiligt sind [85, 86]. Auch die ECM fungiert während der Osteogenese keinesfalls als eine passive Komponente. So konnte gezeigt werden, dass die Alphakette von Kollagen Typ I eine kurze Domäne von 15 Aminosäuren aufweist, an die mesenchymale Progenitorzellen binden, wodurch die osteoblastäre Entwicklung initiiert wird [87].

Die Biosynthese und die Epimerisierung von Proteoglykanen in der ECM ist sowohl bei der osteogenen als auch bei der chondrogenen Differenzierung bislang nur sehr unzureichend untersucht worden. Gerade in Bezug auf die physikalische Belastbarkeit von dem *in vitro*-generierten Knochen bzw. Knorpelgewebe ist jedoch das Verständnis der Matrixbiosynthese essentiell.

## 2.8 RNA-Interferenz

Die Reduktion der Genexpression durch Degradierung der mRNA (*posttranscriptional gene silencing*) ist eine neue Technik, die sich innerhalb weniger Jahre als ein bedeutendes Werkzeug, z.B. für die Funktionsaufklärung von Genen, etabliert hat. Bei der RNA-Interferenz (RNAi) bewirkt doppelsträngige RNA, welche nicht zur Proteinsynthese vorgesehen ist, in der Zelle eine enzymatische Degradierung der zu ihr komplementären mRNA. Der Mechanismus der RNAi wurde erstmals bei Pflanzen entdeckt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass er in annähernd allen eukaryotischen Organismen wie z.B. Nematoden, Fliegen und mammalen Zelllinien vorkommt [88]. Bei der RNAi und den damit verbundenen Phänomenen handelt es sich um einen evolutionär konservierten Mechanismus, welcher den Organismus vor exogenen (z.B. Viren) und endogenen (z.B. mobilen genetischen Elementen) genetischen Parasiten schützt. Mittlerweile ist bekannt, dass dieser Prozess insgesamt ein konserviertes regulatorisches Motiv zur endogenen Kontrolle der Genexpression darstellt [89].

Durch Untersuchungen der RNAi in *Drosophila* und *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass 21-23 Basen lange doppelsträngige RNA-Nukleotide mit einem Überhang am 3'-Ende, einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxy-Gruppe für die Suppression der mRNA-Expression verantwortlich sind [90, 91]. Die Struktur dieser kurzen RNA-Oligonukleotide ließ vermuten, dass ein RNase III-ähnliches Enzym an der Degradierung dieser doppelsträngigen RNA beteiligt ist. Durch *Bernstein et al.* konnte 2001 erstmals ein Enzymkomplex, der als *Dicer* bezeichnet wurde, in *Drosophila* identifiziert werden [92]. Dieser Enzymkomplex beinhaltet Domänen zur Bindung und zur Entwindung der doppelsträngigen RNA. Zusätzlich zu zwei RNase III-Motiven konnten gezeigt werden, dass der *Dicer* mit anderen Proteinen assoziiert ist, welche unter ATP-Verbrauch an der Spaltung der doppelsträngigen RNA beteiligt sind. Die resultierende, jeweils einzelsträngige, *small interfering RNA* (siRNA) wird von einem Enzymkomplex, dem sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC), gebunden. Dieser ist für die Spaltung der mRNA an der zur siRNA komplementären Region zuständig [93, 94].

Die Erkenntnis, dass 21-23 Basen lange doppelsträngige RNA-Nukleotide ausreichen, um annähernd jedes Gen einer Zelle gezielt zu supprimieren, bedeutete die endgültige Etablierung dieser Methode. Somit konnte die Interferon-Antwort der Zelle umgangen werden, wodurch die Effizienz der siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression deutlich gesteigert wurde.

Abgesehen von synthetischer siRNA, welche z.B. durch Transfektion transient in eine Zelle eingeschleust wird, sind mittlerweile zahlreiche andere Methoden entwickelt worden, durch die eine stabile mRNA-Suppression realisiert wird. Eine Möglichkeit zur Etablierung eines stabilen RNAi-Effekts stellt die intrazelluläre Produktion von *small hairpin RNA* (shRNA) dar. Bei dieser vektorbasierten Methode wird hinter einen RNA-Polymerase-III-Promotor ein siRNA-Konstrukt kloniert, welches im Zellinneren zu einem einzelsträngigen RNA-Molekül transkribiert wird. Dieses hybridisiert aufgrund seiner komplementären *sense*- und *antisense*-Sequenz zu einem Doppelstrang, der zwischen den beiden homologen Bereichen eine Haarnadelstruktur aufweist. Nachdem die shRNA an den *Dicer* gebunden hat, wird diese unter Abspaltung der Haarnadelstruktur zur siRNA prozessiert und kann wiederum über den RISC-Komplex die zu ihr komplementäre mRNA degradieren [95, 96].

## 2.9 Gegenstand der Arbeit

Die Xylosyltransferase I ist entscheidend an der Biosynthese der extrazellulären Matrix beteiligt. Durch den initialen Transfer von UDP-Xylose auf Serinreste des Proteoglykan-Core-Proteins stellt die XT-I einen limitierenden Faktor bei der Ausbildung von Proteoglykanen dar. Für das zur XT-I homologe Protein XT-II konnte bislang weder eine enzymatische Aktivität noch eine physiologische Funktion detektiert werden.

Im Rahmen der Dissertation sollte erstmals die Funktion sowie die Regulation der XT-I während der pathologischen Degenerierung der extrazellulären Matrix detailliert untersucht werden. Hierbei sollten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die kausalen Zusammenhänge zwischen einer Matrixdeposition und der vermehrten Expression der XT-I aufgeklärt werden.

Die Regulation der XT-I- und XT-II-Expression, als auch weiterer an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligter Enzyme und Core-Proteine, sollte zusätzlich bei physiologischen Prozessen mit einer zentralen Beteiligung der Proteoglykane analysiert werden. Hierbei sollten während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen mögliche gemeinsame oder auch differierende Regulationsmuster der am Matrixaufbau beteiligten Komponenten identifiziert werden.

Über die gezielte Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression sollte erstmalig eine Aufklärung der physiologischen Funktion der XT-II erfolgen. Zusätzlich war zu klären, inwieweit die Expression beider Xylosyltransferasen einer gekoppelten Regulation unterliegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktion und Regulation der XT-I bei fibrotischen Gewebsalterationen

Die ECM ist essentiell für die physiologische Funktion und die Integrität des humanen Herzens. Eine häufige und weit verbreitete vorkommende Erkrankung des Herzmuskels stellt die DCM dar. Charakteristisch für diese Krankheit ist eine fibrotische Degenerierung mit einer Matrixdeposition im affizierten Gewebe. Die XT-I stellt von beiden Xylosyltransferasen das in diesem Gewebe prädominant exprimierte Enzym dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Analyse der Regulation sowie der physiologischen Funktion der XT-I bei dieser Krankheit Gewebeproben von DCM-Patienten als auch Kontrollproben von gesunden Patienten untersucht. Zusätzlich wurde *in vitro* an HCFs die Induktion der XT-I-Expression als auch die Regulation näher analysiert.

#### 3.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden 18 DCM-Patienten (14 Männer) in einem Alter von 51-65 Jahren ( $58 \pm 5$  Jahre, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) mit einer linksventrikulären Dysfunktion im Endstadium untersucht. Für sämtliche Patienten dieses Kollektivs wurde echokardiographisch ein linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) von  $> 55$  mm ( $74 \pm 7$  mm) bestimmt. Des Weiteren wurden sie aufgrund ihrer Symptomatik der NYHA-Klasse IV eingeteilt.

Ventrikuläre Proben von 6 Patienten (Männer) in einem Alter von 18-64 Jahren ( $50 \pm 19$  Jahre) ohne pathologische Befunde wurden als Kontrolle verwendet.

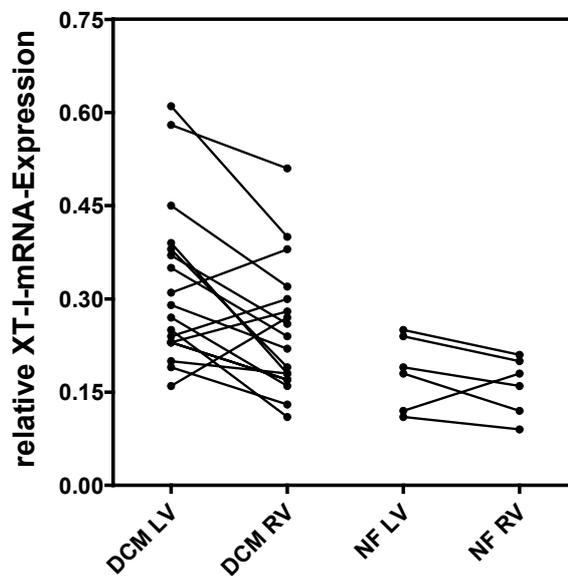
#### 3.1.2 Expression der XT-I-mRNA in Myokardproben von DCM-Patienten und pathologisch unauffälligen Kontrollen

Sowohl von DCM- als auch von Kontroll-Patienten wurde die XT-I-mRNA-Expression jeweils im linken und rechten Ventrikel untersucht. Die mRNA-Expressionswerte sind dabei auf das konstant exprimierte Haushaltsgen beta2-Mikroglobulin relativiert.

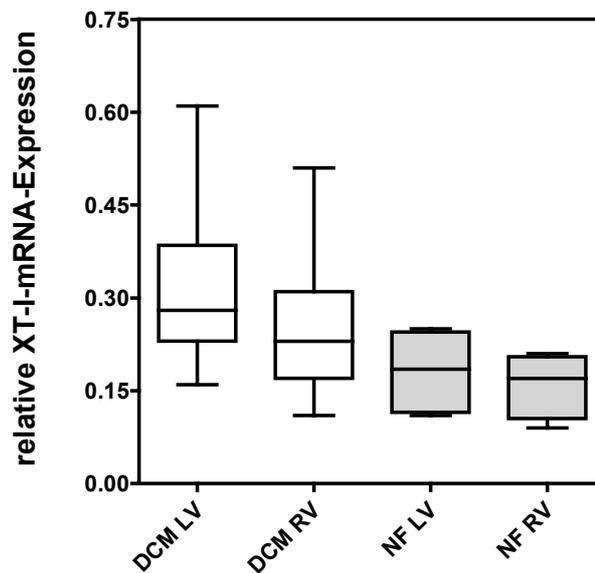
Die Analyse der mRNA-Expression zeigte sowohl bei dem DCM- als auch bei dem Kontrollkollektiv eine differierende Expressionsrate zwischen dem linken und rechten Ventrikel (Ratio links/rechts bei DCM 1,28; Kontrolle 1,14; Abb. 3.1). Bei annähernd 80% der insgesamt untersuchten Patienten konnte eine gesteigerte XT-I-mRNA-Expression im linken Ventrikel beobachtet werden.

Zusätzlich zeigte sich, dass links- und rechtsventrikuläre Myokardproben von DCM-Patienten insgesamt erhöhte Expressionswerte im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Dabei war

der mRNA-Gehalt im linksventrikulärem Gewebe des DCM-Kollektivs 1,8-fach ( $\pm 0,6$ ) erhöht, wobei bis zu 5,5-fach gesteigerte XT-I-mRNA-Werte determiniert wurden (Abb. 3.2).



**Abb. 3.1:** Gepaarte Darstellung der XT-I-mRNA-Expression des jeweils linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels eines DCM-Patienten (DCM) im Vergleich zu gesunden Patienten (NF).

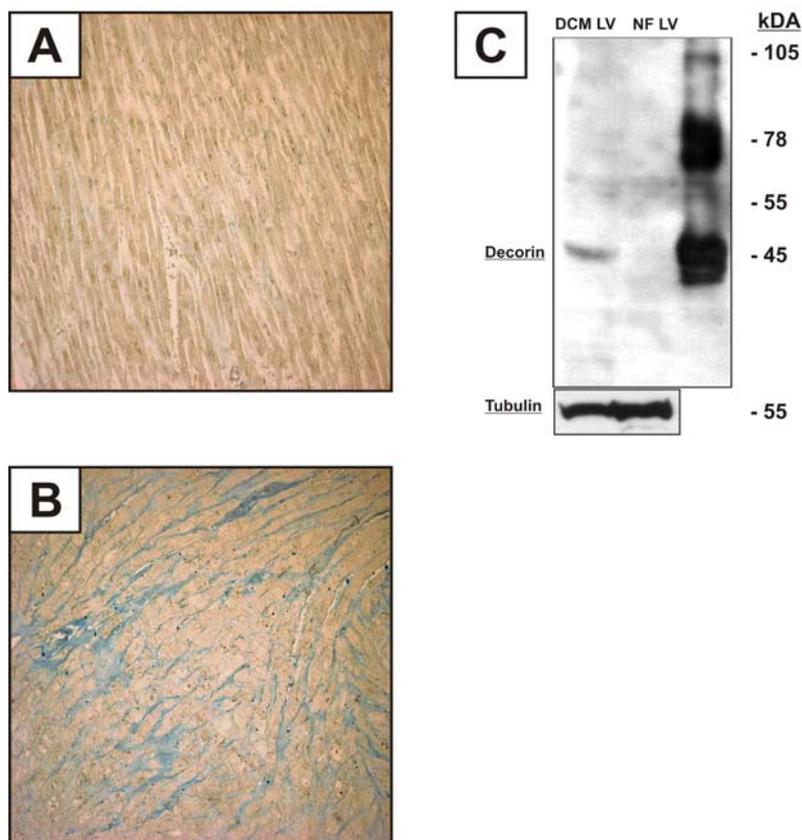


**Abb. 3.2:** Relative XT-I-mRNA-Expression in links (LV) und rechts (RV) ventrikulären Gewebeproben von DCM-Patienten (DCM) im Vergleich zu einem gesundem Kontrollkollektiv (NF).

### 3.1.3 Gesteigerte XT-I-Aktivität und vermehrter Proteoglykangehalt im dilatierten kardialen Gewebe

Zur Untersuchung, inwieweit sich ein gesteigerter XT-I-mRNA-Gehalt auf die XT-I-Enzymaktivität und die Deposition von Proteoglykanen auswirkt, wurde die XT-I-Aktivität im Zellysat der kardialen Proben bestimmt. Zusätzlich erfolgte sowohl histochemisch der Nachweis von Proteoglykanen als auch immunologisch die Detektion des im Herzen prädominant vorkommenden Proteoglykans Decorin.

Die Analyse der XT-I-Enzymaktivität zeigte in den linksventrikulären Proben der DCM-Patienten einen 1,5-fachen ( $\pm 0,4$ ) Anstieg der Enzymaktivität. Deutlicher ausgeprägt waren die Unterschiede sowohl zwischen linksventrikulären DCM-Proben und Kontrollen bei der Alcianblau-Färbung als auch speziell bei dem mittels Western-Blot detektiertem Decorin-Core-Protein (Abb. 3.3).



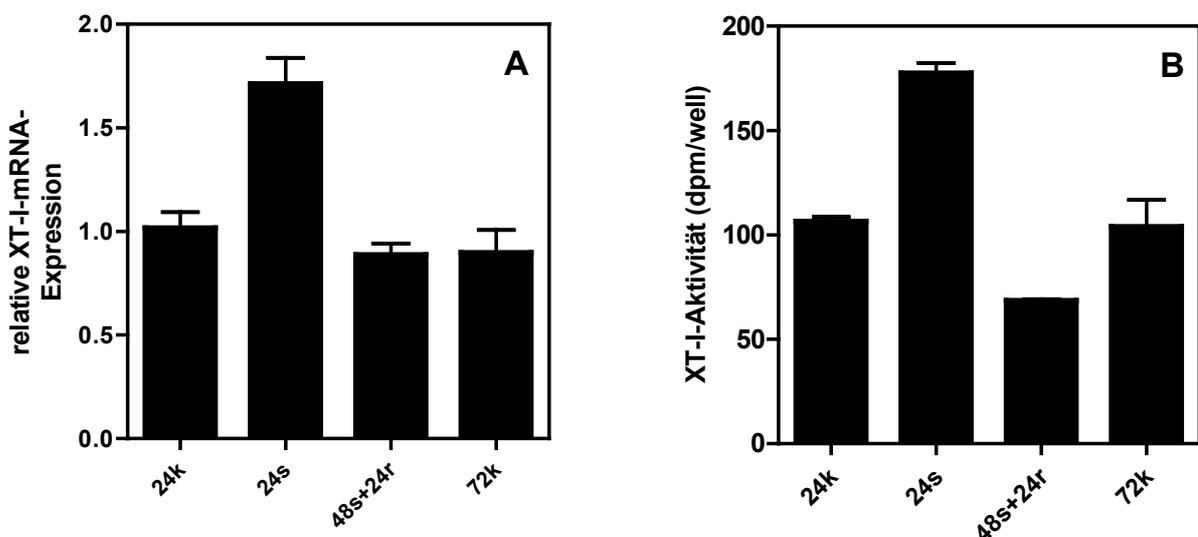
**Abb 3.3:** (A, B) Lichtmikroskopische Darstellung einer linksventrikulären Myokardprobe aus einem gesunden Ventrikel (A) und aus dem eines DCM-Patienten (B). (C) Immunologische Detektion des kardialen Proteoglykans Decorin. Mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem *Western-Blot* erfolgte die Auftrennung und der Nachweis des Decorin-Core-Proteins aus dem Zellysat gepoolter linksventrikulärer Proben von DCM-Patienten (DCM LV) und von Kontrollen (NF LV).

### 3.1.4 Mechanischer Stress als Induktor einer gesteigerten XT-I-Expression

Die Dilatation des Herzens ist ursächlich für eine erhöhte ventrikuläre Wandspannung. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass unter dieser mechanischen Belastung des Myokards von den HCFs vermehrt TGF- $\beta_1$  sezerniert wird. Diese Überproduktion von TGF- $\beta_1$  ist auch bekanntermaßen dafür verantwortlich, dass im fibrotischen Gewebe vermehrt Kollagen Typ I gebildet wird. Zur Eruiierung, inwieweit dieser mechanische Stress auch verantwortlich für eine gesteigerte XT-I-Expression ist und welche Signalwege dabei involviert sind, wurden HCFs einer zyklischen mechanischen Deformierung ausgesetzt.

Bei *in-vitro*-kultivierten HCFs, die über 24 h in 1 Hz-Intervallen jeweils um 5% ihrer Zelllänge expandiert wurden, konnte ein Steigerung der XT-I-Expressionsrate beobachtet werden. Für die XT-I wurde ein 1,7-facher ( $\pm 0,1$ ) Anstieg der mRNA-Expression detektiert. Parallel dazu erfolgte für die Enzymaktivität im Zellkulturüberstand ein 1,6-facher ( $\pm 0,1$ ) Anstieg.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass mechanisch gestresste HCFs, die nach ihrer mechanischen Deformation für weitere 24 h ohne exogene Manipulation kultiviert wurden, wieder eine normalisierte XT-I-Expression aufweisen (Abb. 3.4).

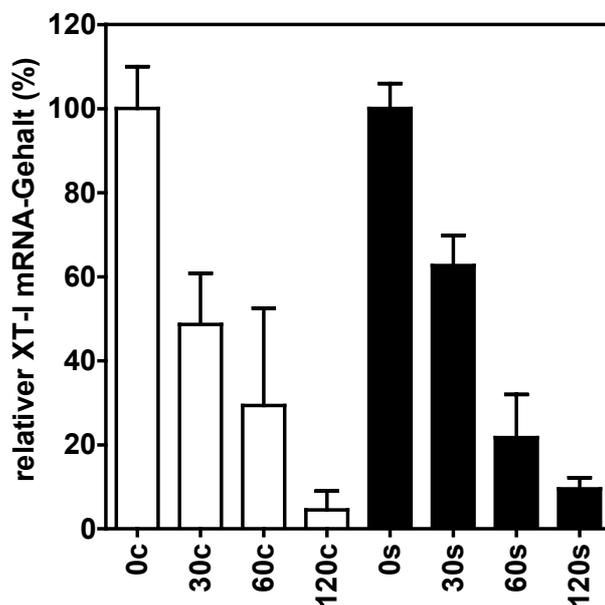


**Abb. 3.4:** Einfluss von mechanischem Stress auf die XT-I-mRNA-Expression (A) und die XT-I-Enzymaktivität (B). Humane kardiale Fibroblasten (HCFs) wurden über einen Zeitraum von 24 h (24k) bzw. 48 h mechanisch expandiert. Im Anschluss an eine 48stündige mechanische Belastung der Zellen wurden diese für weitere 24 h ohne exogenen Stress kultiviert (48s+24r). Zusätzlich wurden HCFs, welche keinem mechanischem Stress ausgesetzt waren, über 72 h als Kontrolle (72k) kultiviert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.1.5 Halbwertszeit der XT-I-mRNA bei mechanisch gestressten HCFs

Zur Bestätigung, dass bei mechanisch gestressten HCFs eine gesteigerte mRNA-Expression nicht ein Effekt einer verlängerten mRNA-Halbwertszeit ist, wurde diese bei HCFs detailliert analysiert.

Die Transkription der mRNA wurde bei HCFs, die mechanisch gestresst wurden, sowie bei nicht gestressten Kontrollen nach 24 h mithilfe von Actinomycin D blockiert. Anschließend erfolgte die Analyse der mRNA-Degradation über einen Zeitraum von 2 h. Es wurden dabei keine signifikanten Unterschiede beim Abbau der XT-I-mRNA detektiert (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Auswirkung von mechanischem Stress auf die Halbwertszeit der XT-I-mRNA. Nach 24 h zyklischem mechanischen Stress wurden die HCFs mit 5 µg/ml Actinomycin D inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der XT-I-mRNA-Degradation über einen Zeitraum von 120 min. (c, Kontrolle; s, mechanisch gestresst). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.1.6 TGF-β<sub>1</sub>-induzierte Regulation der XT-I-Expression in HCFs

Andere Studien konnten bereits zeigen, dass TGF-β<sub>1</sub> ein potenter Induktor der Kollagen Typ I-Expression in HCFs ist. Zur Untersuchung, inwieweit TGF-β<sub>1</sub> auch für die Induktion der XT-I-Expression in HCFs verantwortlich ist, wurden diese Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TGF-β<sub>1</sub> über einen Zeitraum von bis zu 48 h inkubiert. Bei einer Konzentration von 1,5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> im Zellkulturmedium wurde nach 8 h ein Anstieg in der XT-I-mRNA-Expression und nach 24 h der maximale mRNA-Gehalt als auch die höchste Enzymaktivität im Zellkulturüberstand detektiert. Die Durchführung der Experimente mit HCFs unterschiedlicher Patienten zeigte keine Varianzen auf. Nach 24stündiger Kultivierung der Zellen mit 1,5 ng TGF-β<sub>1</sub> wurde ein 7,4-facher (±1,4) Anstieg der XT-I-mRNA-Expression sowie ein 3,2-facher (±0,3) Anstieg der enzymatischen Aktivität ermittelt (Abb. 3.6).

Bei einer 24stündigen Inkubation der Fibroblasten mit TGF-β<sub>1</sub> und einem polyklonalem TGF-β<sub>1</sub>-Antikörper konnte der positiv-induktive Effekt des Zytokins auf die XT-I-Expression

signifikant um 65% ( $\pm 16\%$ ) auf mRNA-Ebene reduziert werden. Die Enzymaktivität im Zellkulturüberstand war dabei um 21% ( $\pm 2\%$ ) vermindert.

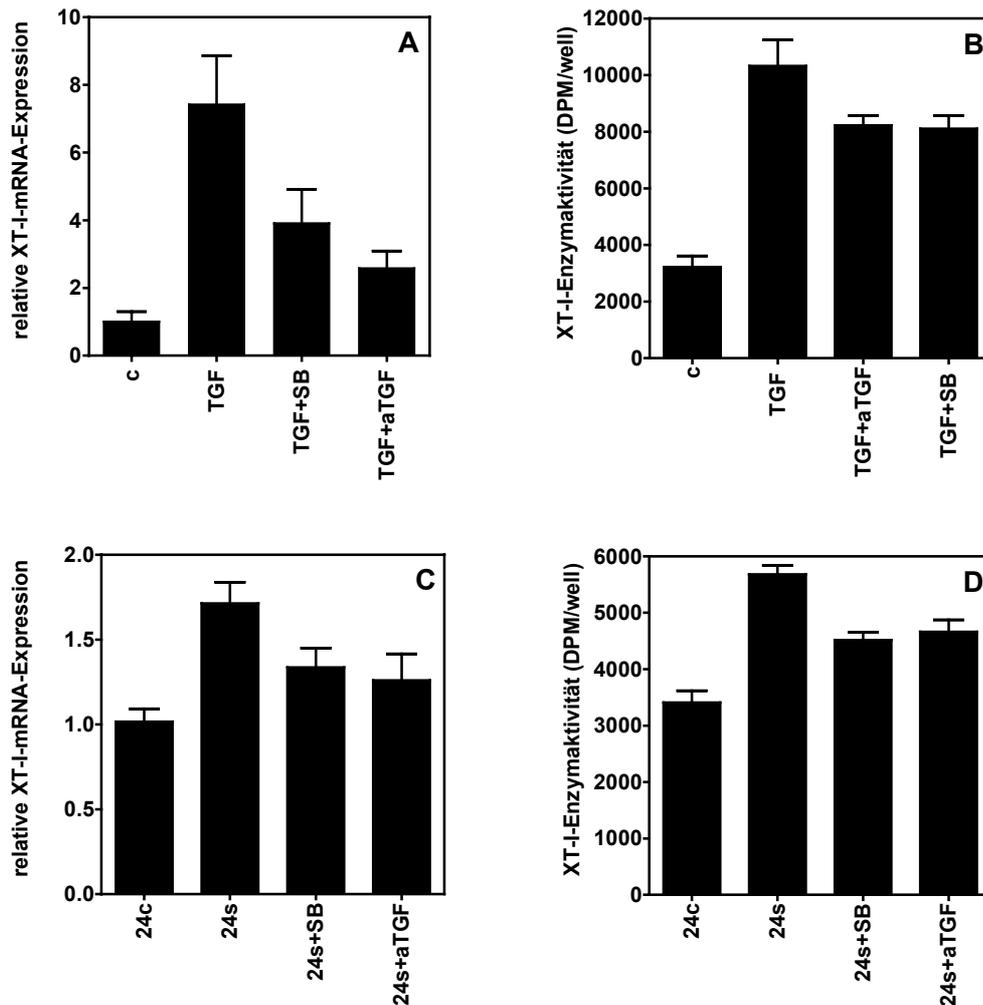
### 3.1.7 Inhibition der TGF- $\beta_1$ -aktivierten XT-I-Genexpression

Zur Analyse, welche Signalwege an der XT-I-Genexpression beteiligt sind, wurden HCFs, die mechanisch gestresst oder exogen mit TGF- $\beta_1$  behandelt wurden, mit verschiedenen Inhibitoren der Stress-aktivierten bzw. TGF- $\beta_1$ -aktivierten Signalkaskaden inkubiert.

Geringe Auswirkungen zeigten Inhibitoren wie z.B. Dicoumarol, welche die Phosphorylierung der Stress-aktivierten Januskinasen unterbinden. Eine deutliche Auswirkung auf die XT-I-Expression bei mechanisch gestressten als auch bei mit TGF- $\beta_1$ -inkubierten Fibroblasten konnte mit dem spezifischen p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 beobachtet werden.

HCFs, die mit SB 203580 vor der Zugabe von TGF- $\beta_1$  präinkubiert wurden, zeigten nach 24 h eine um den Faktor 1,9 ( $\pm 0,5$ ) verminderte XT-I-mRNA-Expression. Die Enzymaktivität im Zellkulturüberstand war zeitgleich 1,3-fach ( $\pm 0,1$ ) herabgesetzt.

Mechanisch gestresste HCFs zeigten ebenfalls nach 24 h bei einer Präinkubation mit SB 203580 im Vergleich zur gestressten Kontrolle verminderte XT-I-mRNA- als auch Enzymaktivitätswerte (XT-I-mRNA:  $-1,3$ -fach ( $\pm 0,04$ ); XT-Aktivität:  $-1,3$ -fach ( $\pm 0,05$ )) (Abb. 3.6).

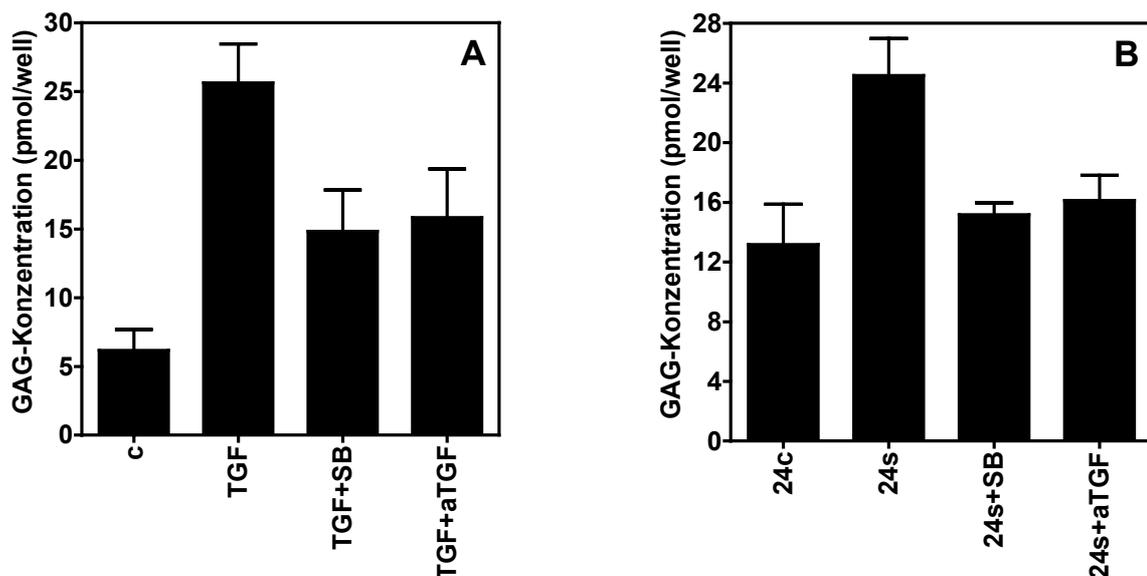


**Abb. 3.6:** (A, B) Einfluss von TGF- $\beta_1$ , anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper und SB 203580 auf die XT-I-mRNA-Expression und Enzymaktivität in HCFs. (C, D) Einfluss von mechanischem Stress auf HCFs bei paralleler Inkubation mit anti-TGF- $\beta_1$  oder SB 203580. (A) Die XT-I-mRNA-Expression und die Enzymaktivität (B) wurde nach 24stündiger Inkubation mit 1,5 ng/ml TGF- $\beta_1$  (TGF), mit 1,5 ng/ml TGF- $\beta_1$  und SB 203580 (TGF+SB) oder 1,5 ng/ml TGF- $\beta_1$  und 50 ng/ $\mu$ l anti-TGF- $\beta_1$  im Vergleich zu unbehandelten Zellen (c) analysiert. (C) HCFs wurden für 24 h mechanisch gestresst und parallel mit den oben aufgeführten Konzentration von SB 203580 (24s+SB) oder anti-TGF- $\beta_1$  (24s+aTGF) inkubiert. Die mRNA-Expression der XT-I, als auch die Enzymaktivität, wurde jeweils im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, die mechanisch gestresst (24s) bzw. nicht deformiert wurden (24c) analysiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.1.8 Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand von mechanisch gestressten oder mit TGF- $\beta_1$ inkubierten HCFs

Die Detektion von GAG im Zellkulturüberstand der unter 3.1.6 und 3.1.7 kultivierten HCFs zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen der Regulation der XT-I und der determinierten Konzentration von GAG im Zellkulturüberstand.

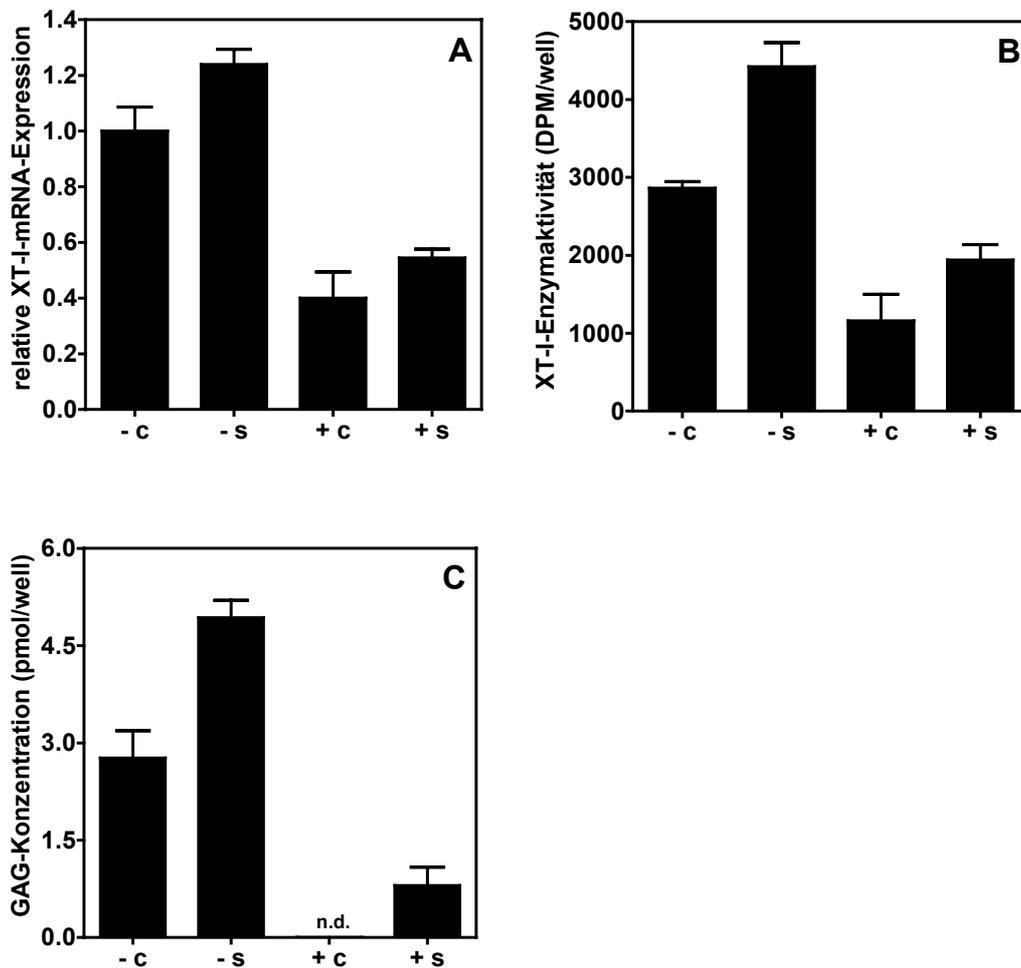
So wurde bei mit TGF- $\beta_1$  inkubierten HCFs eine 4,1-fache ( $\pm 0,9$ ) Zunahme der GAG-Konzentration sowie bei einer parallelen Präinkubation mit SB 203580 bzw. anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper analog zu den mRNA und Aktivitätswerten eine deutliche Abnahme um den Faktor  $-1,4$  ( $\pm 0,1$ ) bzw.  $-1,3$  ( $\pm 0,1$ ) beobachtet. Auch bei mechanisch gestressten Fibroblasten konnte eine vermehrte Akkumulation von GAG im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die gestressten HCFs zeigten eine 1,9-fach ( $\pm 0,4$ ) erhöhte GAG-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Die Inkubation mit SB 203580 bzw. anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper bewirkte bei mechanisch gestressten HCFs eine verminderte GAG-Produktion, die sich auf dem Niveau der Kontrollen befand (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** (A) Analyse der GAG-Konzentration im Zellkulturüberstand von HCFs, die mit 1,5 ng/ml TGF- $\beta_1$  (TGF) oder parallel mit 10  $\mu$ M SB203580 (TGF+SB) bzw. 50 ng/ml anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper (TGF+aTGF) inkubiert wurden. (B) Quantifizierung von GAG im Zellkulturüberstand bei Kontrollen (24c) und mechanisch gestressten HCFs (24s) sowie von mechanisch expandierten HCFs, die parallel mit den oben aufgeführten Konzentration von SB 203580 (24s+SB) oder anti-TGF- $\beta_1$  (24s+aTGF) inkubiert wurden. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.1.9 Spezifische Reduktion der XT-I-mRNA in mechanisch gestressten HCFs

Zur Bestätigung, dass die Induktion der XT-I-Expression in HCFs hauptverantwortlich für eine gesteigerte GAG-Konzentration im Zellkulturüberstand ist, wurde die mRNA-Translation gezielt durch siRNA herabreguliert.



**Abb. 3.8:** Verringerte Expression der XT-I und von GAG in HCFs nach der Transfektion mit XT-I-si65. HCFs wurden transfiziert mit siRNA gegen XT-I (+) oder mit einer Kontroll-siRNA (-). 24 h nach der Transfektion wurden die HCFs für weitere 24 h mechanisch gestresst (s) bzw. als Kontrolle weiterkultiviert (c) (n. d.: nicht detektierbar). Im Anschluss erfolgte die Detektion der XT-I-mRNA (A) der XT-I-Ezymaktivität (B) und der GAG-Konzentration im Zellkulturüberstand (C). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Mit einer Transfektionseffizienz von ca. 70% konnten HCFs mit dem siRNA-Oligonukleotid XT-I-si65 bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert werden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mechanisch gestresst und anschließend die XT-I-Expression sowie der GAG-Gehalt im Zellkulturüberstand analysiert.

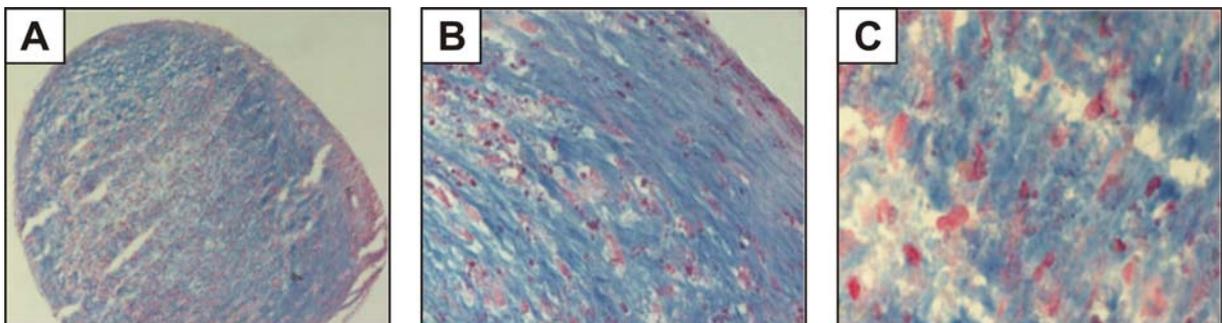
Bei mechanisch nicht deformierten, mit XT-I-siRNA transfizierten HCFs, zeigte sich eine signifikant reduzierte XT-I-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle ( $-60\% \pm 4\%$ ). Unter mechanischer Belastung zeigten sowohl Zellen, die mit Kontroll-siRNA oder mit XT-I-siRNA transfiziert wurden, einen Anstieg der XT-I-mRNA-Expression. HCFs, die mit XT-I-siRNA transfiziert waren, zeigten jedoch im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verminderte mRNA-Expressionsraten ( $-56\% \pm 5\%$ ). Die XT-I-Enzymaktivität verhielt sich parallel zu den mRNA-Daten, wobei insgesamt die siRNA-vermittelten Effekte stärker ausgeprägt waren (Abb. 3.8). Diese Beobachtung spiegelte sich bei den korrespondierenden GAG-Konzentrationen wider. So konnten bei HCFs, die mit XT-si65 transfiziert und mechanisch nicht gestresst waren, keine GAG mehr im Zellkulturüberstand detektiert werden. Wurden diese Zellen mechanisch gestresst, war der GAG-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle noch um  $83\% (\pm 4\%)$  vermindert.

### 3.2 Regulation der ECM-Biosynthese bei der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Zur Untersuchung der Rolle der humanen Xylosyltransferasen bei der chondrogenen Matrixassemblierung mesenchymaler Stammzellen erfolgte eine detaillierte Analyse des Differenzierungsprozesses. Dabei wurde sowohl die mRNA-Expression chondrogener Standardmarker als auch wichtiger an der ECM-Biosynthese beteiligter Enzyme und Proteoglykan-Core-Proteinen analysiert. Neben der mRNA-Quantifizierung der XT-I wurde zusätzlich die Enzymaktivität im Zellkulturüberstand detektiert. Durch den histologischen Nachweis von Standardmarkern der Chondrogenese sowie von Chondroitinsulfat-GAG, Decorin und der XT-I wurden mRNA- und Enzymaktivitätsdaten verifiziert.

#### 3.2.1 Expression von Standardmarkern der chondrogenen Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung konnte für alle als Zellkugeln kultivierte hMSCs erfolgreich durchgeführt werden. Histologisch zeigten sich für Chondrozyten charakteristische Hohlräume und eine beträchtliche Deposition von Kollagen (nicht dargestellt) und extrazellulären Matrixproteoglykanen (Abb. 3.9).



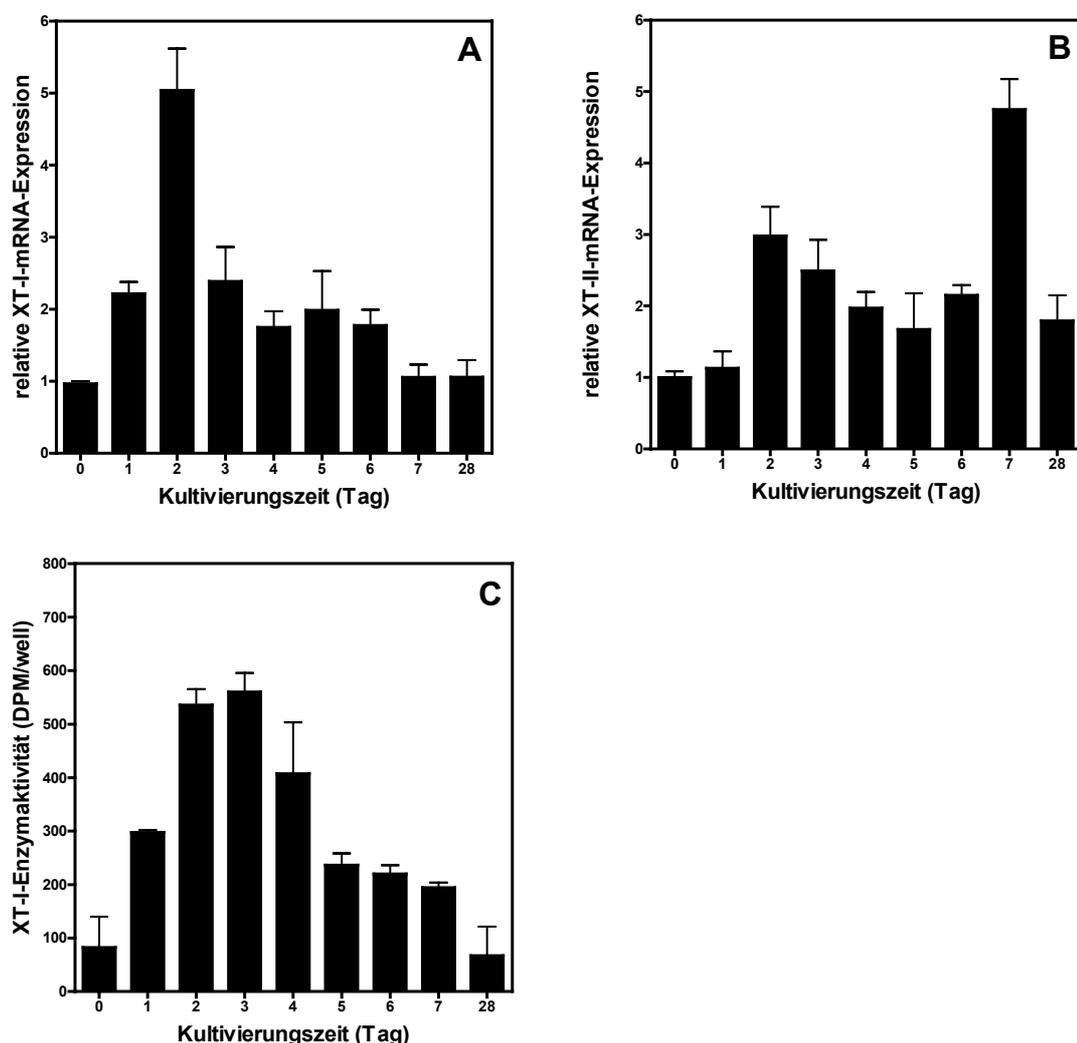
**Abb. 3.9:** Lichtmikroskopische Darstellung von Kryoschnitten differenzierter chondrogener Pellets. Extrazelluläre Matrix wurde mithilfe von Alcianblau angefärbt. Zellnuklei wurden mit Kernechtrot gegengefärbt. Vergrößerung: (A)x100; (B)x400; (D)x1.000.

#### 3.2.2 Expression von XT-I und XT-II während der chondrogenen Differenzierung

Beide Xylosyltransferasen wurden über den gesamten Zeitraum der chondrogenen Differenzierung auf mRNA-Ebene exprimiert. Dabei wurde für die XT-I eine signifikante Hochregulation 48 h nach der Induktion der chondrogenen Differenzierung detektiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Zelllysate ein 5-fach (Mittelwert)  $\pm 0,6$  (Standardabweichung) gesteigerter XT-I-mRNA-Gehalt detektiert. Innerhalb von weiteren fünf Tagen erreichte die mRNA-Expression wieder annähernd das Ausgangsniveau und persistierte dort bis zum Ende der Kultivierung.

Der Verlauf der Enzymaktivität sezernierter XT-I im Zellkulturüberstand verhielt sich analog zu den mRNA-Daten. Nach einem initialen Anstieg der Enzymaktivität mit einem Aktivitätsmaximum an Tag 3 ( $+580\% \pm 120\%$ ) sank die Aktivität nach einer Woche wieder annähernd auf des Ausgangsniveau ab.

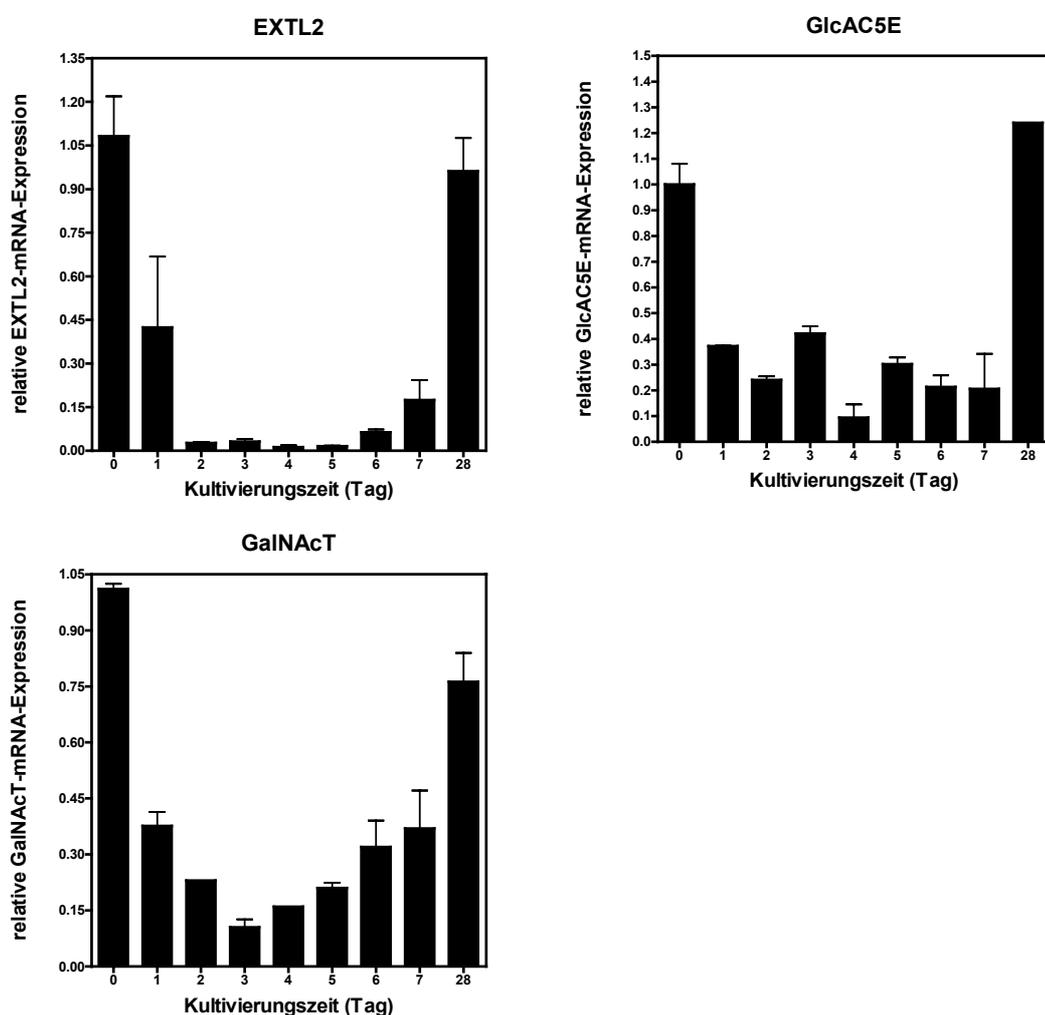
Die Quantifizierung der XT-II-mRNA-Expression zeigte eine zur XT-I abweichende Kinetik. So wurde für die XT-II ebenfalls nach zwei Tagen ein Anstieg der mRNA-Expression beobachtet, das maximale Expressionsniveau wurde jedoch mit einer 4,7-fach ( $\pm 0,6$ ) gesteigerten mRNA-Expression nach sieben Tagen der Chondrogenese detektiert (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10:** Relative mRNA-Expression der XT-I (A) und XT-II (B). Nach Induktion der Chondrogenese wurden die hMSCs über einen Zeitraum von 28 Tagen unter Differenzierungsbedingungen kultiviert und die mRNA-Expression analysiert. Zusätzlich wurde die XT-I-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand bestimmt (C). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.2.3 Transkriptionelle Regulation von EXTL2, GalNAcT und GlcAC5E während der chondrogenen Differenzierung

In mesenchymalen Stammzellen und in den differenzierenden chondrogenen Pellets wurde die mRNA der für die Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat- bzw. Heparansulfat-Synthese essentiellen Enzyme durchweg exprimiert. Für diese drei Enzyme wurden signifikant reduzierte mRNA-Level nach der Induktion der Chondrogenese beobachtet. Alle Enzyme zeigten drei bis vier Tage nach der Induktion ein mRNA-Expressionsminimum auf und einen Expressionsanstieg zum Ende der Kultivierung, wobei die mRNA-Expression zu diesem Zeitpunkt wieder dem Ausgangsniveau entsprach (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11:** Relative mRNA-Expression von EXTL2, GlcAC5E und GalNAcT während der chondrogenen Differenzierung von hMSCs. Die Analyse der Genexpression erfolgte über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Für die mRNA-Expression des für die Initiation der Heparansulfat-Biosynthese verantwortliche Enzym EXTL2 wurde nach vier Tagen eine um den Faktor  $-87$ -fach ( $\pm 3$ )

herabregulierte Wertlage detektiert. Die mRNA-Expression der GalNAcT, welches für die Initiation der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat-Biosynthese verantwortlich ist, zeigte nach drei Tagen der Chondrogenese eine um den Faktor  $-9,6 (\pm 0,2)$  verminderte mRNA-Syntheserate. Die GlcAC5E, welche für die Epimerisierung von Chondroitinsulfat zu Dermatan- und Heparansulfat verantwortlich ist, zeigte nach vier Tagen eine um den Faktor  $-10,7 (\pm 0,5)$  reduzierte mRNA-Expression.

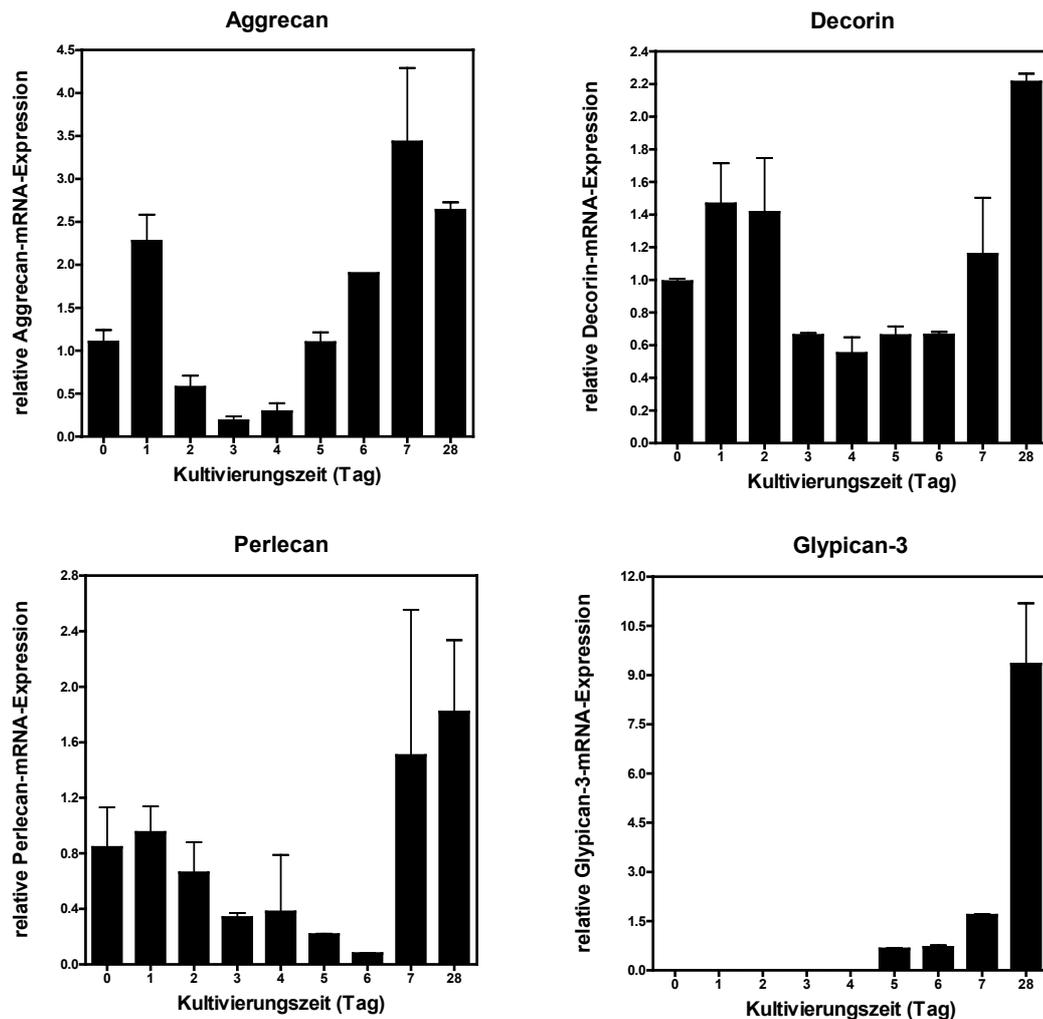
### **3.2.4 Unterschiedliche Regulation der Proteoglykan-Core-Proteine Decorin, Aggrecan, Perlecan und Glypican-3**

Aggrecan, welches einen Standardmarker der Chondrogenese darstellt, weist eine Vielzahl von Chondroitinsulfat-Ketten sowie auch wenige Keratansulfat-Ketten auf. Im Gegensatz dazu ist an dem Decorin-Core-Protein nur eine Chondroitinsulfat-Kette gebunden.

Für Aggrecan wurde analog zu vorherigen Studien eine signifikante Hochregulation der mRNA detektiert [67]. Dabei zeigte sich ein zur Expression der XT-II ähnlicher Verlauf, der nach einer initialen Expressionssteigerung direkt nach Induktion der Stammzellendifferenzierung und einer darauffolgenden verringerten Expressionsrate nach fünf Tagen wieder einen Expressionsanstieg aufzeigte. Zum Ende der 4wöchigen Kultivierung wurde eine 3,1-fach ( $\pm 0,8$ ) gesteigerte mRNA-Expression des Aggrecans detektiert.

Die mRNA-Expression des Decorin-Core-Proteins zeigte ebenfalls eine sehr ähnliche Expressionskinetik. Nach einer initial gesteigerten Expressionsrate und einer anschließenden Abnahme der Expressionsrate wurde zum Ende der Kultivierung ein um den Faktor 2,2 ( $\pm 0,1$ ) erhöhter mRNA-Gehalt detektiert.

Für das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan wurde eine zu den Chondroitinsulfat-Proteoglykanen leicht abweichende mRNA-Expressionskinetik verzeichnet. So erfolgte nach Induktion der Chondrogenese eine Reduktion der mRNA-Expression bis an Tag 6, das Expressionsmaximum zum Ende der Kultivierung wurde an Tag 28 mit einer 2,2-fach ( $\pm 0,4$ ) erhöhten mRNA-Expression beobachtet. Die Expressionskinetik der Glypican-3-mRNA zeigte einen zu allen anderen analysierten Proteoglykanen abweichenden Verlauf. Glypican-3-mRNA wurde erst fünf Tage nach Induktion der Chondrogenese detektiert und zeigte einen drastischen Anstieg der mRNA-Expression mit einer 9,3-fachen ( $\pm 2,2$ ) Expressionsteigerung nach 28 Tagen (Abb. 3.12).



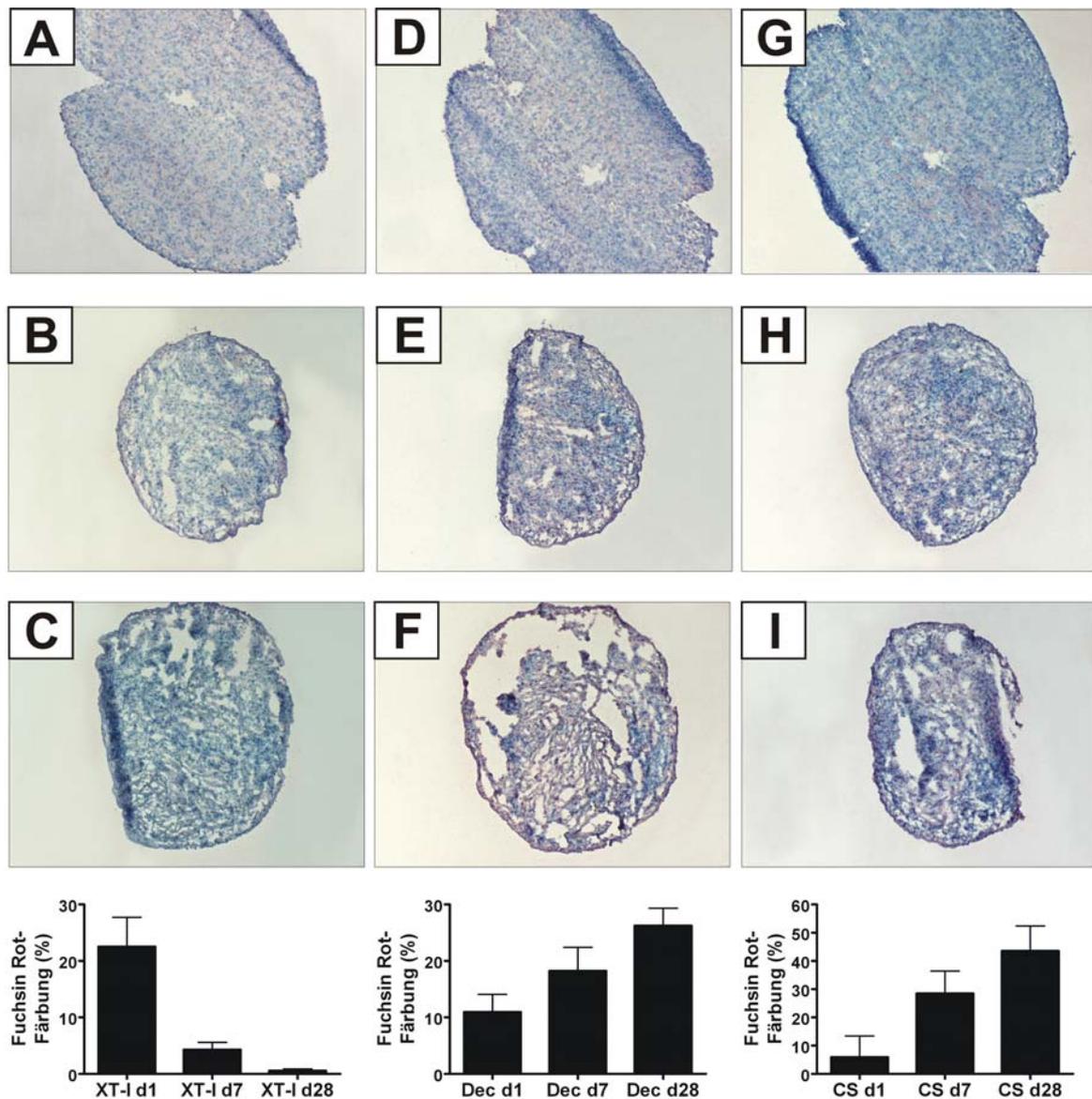
**Abb. 3.12:** Darstellung der relativen Quantifizierung der mRNA-Expression von Aggrecan, Decorin, Perlecan und Glypican-3 während der chondrogenen Differenzierung von hMSCs. Die Analyse der Genexpression erfolgte über einen Kultivierungszeitraum von 28 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.2.5 Immunhistologischer Nachweis von XT-I, Decorin und Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykanen im Verlauf der Chondrogenese

Bei Kryoschnitten chondrogener Pellets, die jeweils nach einem Tag, nach einer Woche und nach 28 Tagen der Stammzellendifferenzierung angefertigt wurden, erfolgte die immunhistologische Detektion der XT-I, des Decorin-Core-Proteins als auch von Chondroitinsulfat-GAG-Ketten. Die anschließende Quantifizierung von gebundenem Antikörper zeigte eine Expressionskinetik des jeweils detektierten Proteins, welche sich äquivalent zu der korrespondierenden mRNA-Expression verhielt.

Für die XT-I wurde in frühen chondrogenen Pellets die höchste Proteinkonzentration detektiert. Das Enzym konnte dabei in diskreten Bereichen um neu synthetisierte Matrix nachgewiesen werden.

Sowohl für das Decorin-Core-Protein als auch für Chondroitinsulfat-GAG-Ketten wurde eine deutliche Akkumulation in ausgereiften chondrogenen Pellets detektiert (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13:** Immunohistochemische Detektion von XT-I, Decorin und Chondroitinsulfat-Proteoglykanen während der chondrogenen Differenzierung von hMSCs. Chondrogene Pellets wurden nach einem Tag (A, D, G) nach sieben Tagen (B, E, H) und nach 28 Tagen (C, F, I) immunologisch gefärbt. Über eine rote Farbreaktion erfolgte der Nachweis von gebundenem Antikörper. Der Anteil der Rotfärbung wurde jeweils für die XT-I (A, B, C), Decorin (D, E, F) und Chondroitinsulfat-GAG (G, H, I) quantifiziert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

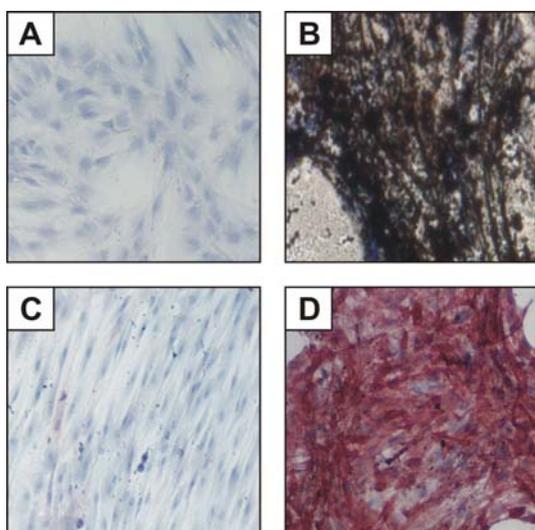
### 3.3 Regulation der ECM-Biosynthese bei der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Neben der chondrogenen Differenzierung stellt die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ein gut etabliertes System dar. Zur genauen Analyse äquivalenter bzw. differierender Expressionskinetiken dieser beiden Differenzierungslinien wurde im Rahmen der Osteogenese sowohl die Expression von Standardmarkern als auch von Proteoglykanen bzw. Enzymen, welche an der ECM-Biosynthese beteiligt sind, untersucht.

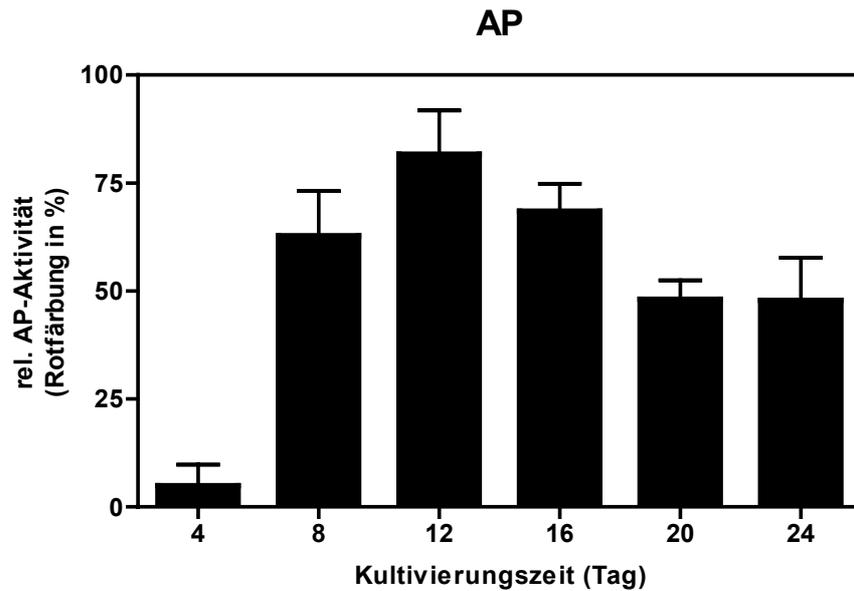
#### 3.3.1 Verifizierung der osteogenen Differenzierung über die Detektion von Standardmarkern

Während der osteogenen Differenzierung konnte, analog zu vorherigen Studien, sowohl ein typischer Anstieg der Gesamtkalziumkonzentration in den Zellkulturschalen als auch der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand detektiert werden. Innerhalb der ersten Kultivierungstage wurde eine Kalziumkonzentration  $< 50 \mu\text{g}/\text{Zellkulturschale}$  gemessen. Nach einem signifikantem Anstieg der Kalziumkonzentration zum Ende der Kultivierung lag diese nach 24 Tagen bei  $350 \mu\text{g}/\text{Zellkulturschale}$  (Mittelwert) (Abb. 3.16). Der histologische Kalziumnachweis nach VON KOSSA verhielt sich dazu parallel (Abb. 3.14).

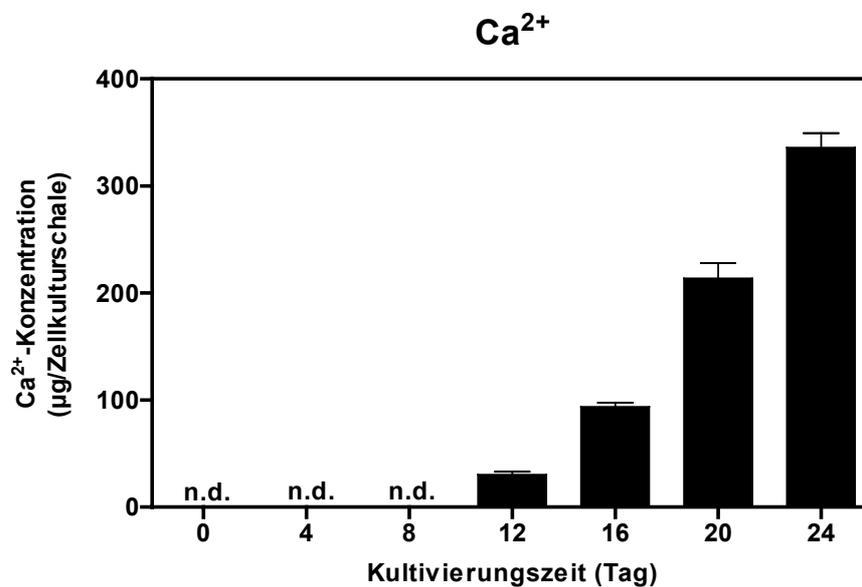
Für die Phosphatkonzentration wurde nach vier Tagen ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ein Anstieg beobachtet und eine maximale Akkumulation im Zellkulturüberstand nach zwölf Tagen ( $140 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) osteogener Differenzierung detektiert. Analog dazu zeigte die histochemische Analyse der AP-Aktivität einen ausgeprägten Anstieg bei frühen Differenzierungsstadien und ein Aktivitäts-Maximum nach zwölf Tagen. Ähnlich wie bei der Phosphatkonzentration wurde in späteren Stadien der Osteogenese wieder ein leichter Rückgang der AP-Aktivität beobachtet (Abb. 3.15, 3.16).



**Abb. 3.14:** Lichtmikroskopische Aufnahme von hMSCs vor und nach Induktion der osteogenen Differenzierung. (A) VON KOSSA-Nachweis der Kalziumdeposition vor Induktion der osteogenen Differenzierung sowie nach 24 Tagen Kultivierung unter differenzierenden Bedingungen (B). (C) Färbung der AP-Aktivität zu Beginn der Osteogenese und zum Zeitpunkt maximaler AP-Aktivität nach zwölf Tagen osteogener Differenzierung (D).



**Abb. 3.15:** Histochemische Quantifizierung der AP-Aktivität von hMSCs während der osteogenen Differenzierung. Über die enzymatische Umsetzung des Substrates Naphthol AS-MX Phosphat zu Naphthol AS-MX erfolgt eine der AP-Aktivität entsprechende Rotfärbung der inkubierten Zellen. Der prozentuale Anteil rot gefärbter Zellen ist in der Abbildung dargestellt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



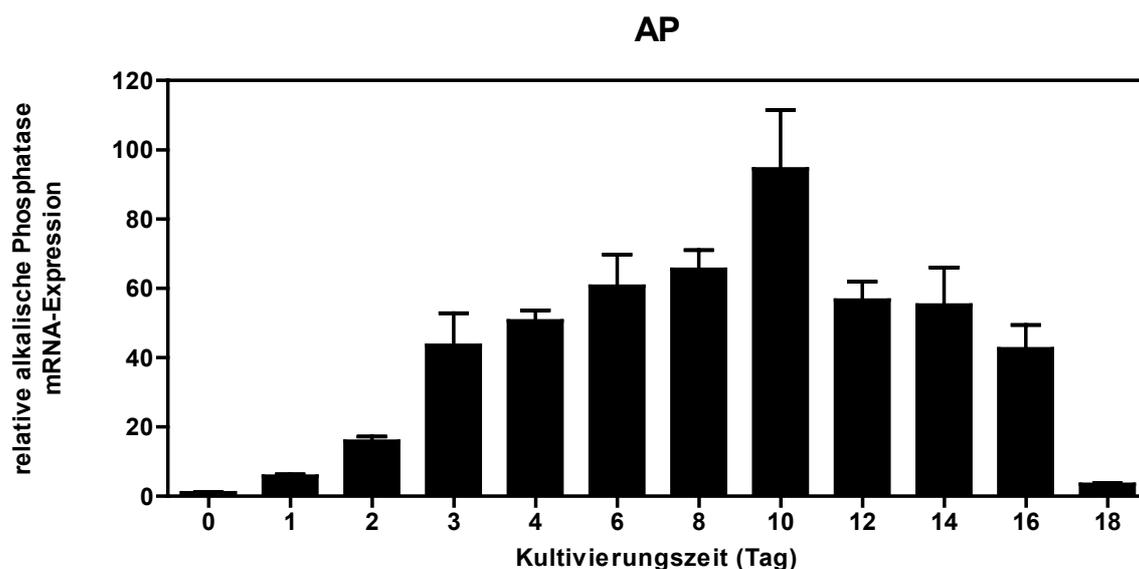
**Abb. 3.16:** Analyse der Gesamtkalziumkonzentration in der Zellkulturschale. Über einen Zeitraum von 24 Tagen erfolgte die Bestimmung der Kalziumdeposition in Intervallen von vier Tagen. Innerhalb der ersten acht Tage konnte kein Kalzium detektiert werden (n.d., untere Nachweisgrenze: 0,27 mmol/l). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.3.2 Quantifizierung der mRNA-Expression osteogener Marker

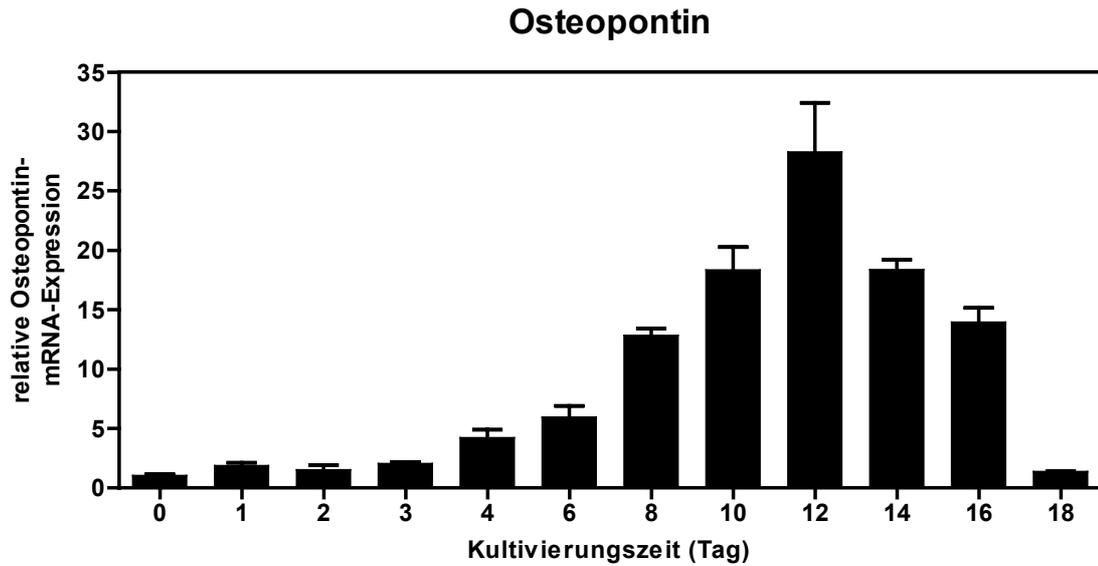
Vergleichbar mit Kollagen Typ II und Aggrecan bei der chondrogenen Differenzierung stellt die charakteristische Expressionskinetik von Kollagen Typ I, Osteopontin und der AP bei der osteogenen Differenzierung eine Grundlage zur Einteilung der Entwicklungsstadien dar.

Die mRNA-Expression der AP zeigte ein zur Enzymaktivität äquivalentes Expressionsmuster mit einem vorgelagertem Expressionsmaximum an Tag 10 der Osteogenese. Zu diesem Zeitpunkt wurde im Vergleich zu undifferenzierten Zellen eine um den Faktor 95 (Mittelwert) ( $\pm 17$ , Standardabweichung) erhöhte mRNA-Expression detektiert.

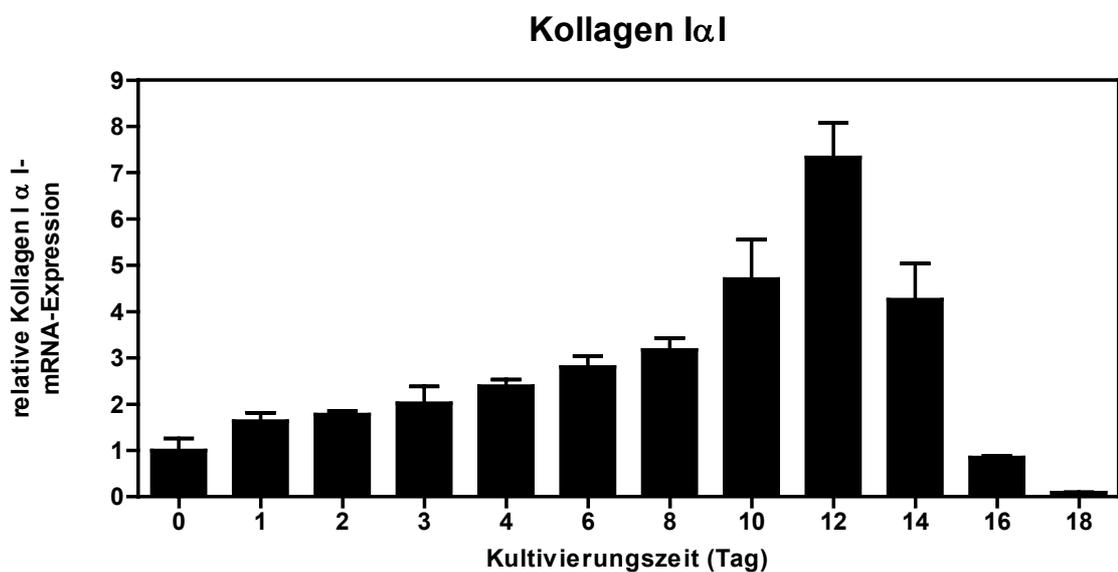
Die Expressionsanalytik der Osteopontin- und Kollagen I $\alpha$ 1-mRNA zeigte ebenfalls eine identische Kinetik, wobei die maximale positive Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrolle an Tag 12 mit einer 28-fach ( $\pm 4$ ) gesteigerten Osteopontin und einer 7-fach ( $\pm 1$ ) gesteigerten Kollagen-mRNA detektiert wurde. Im Verlauf der weiteren Kultivierung wurde für beide Zielgene jeweils eine verminderte Expressionsrate beobachtet.



**Abb. 3.17:** Relative mRNA-Expression des für die Osteogenese spezifischen Markergens AP. Die relativen Expressionswerte sind über einen Kultivierungszeitraum von 18 Tagen dargestellt. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



**Abb. 3.18:** Verlauf der relativen mRNA-Expression des für die Osteogenese spezifischen Markergens Osteopontin. Dargestellt ist die mRNA-Kinetik während eines Kultivierungszeitraums von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



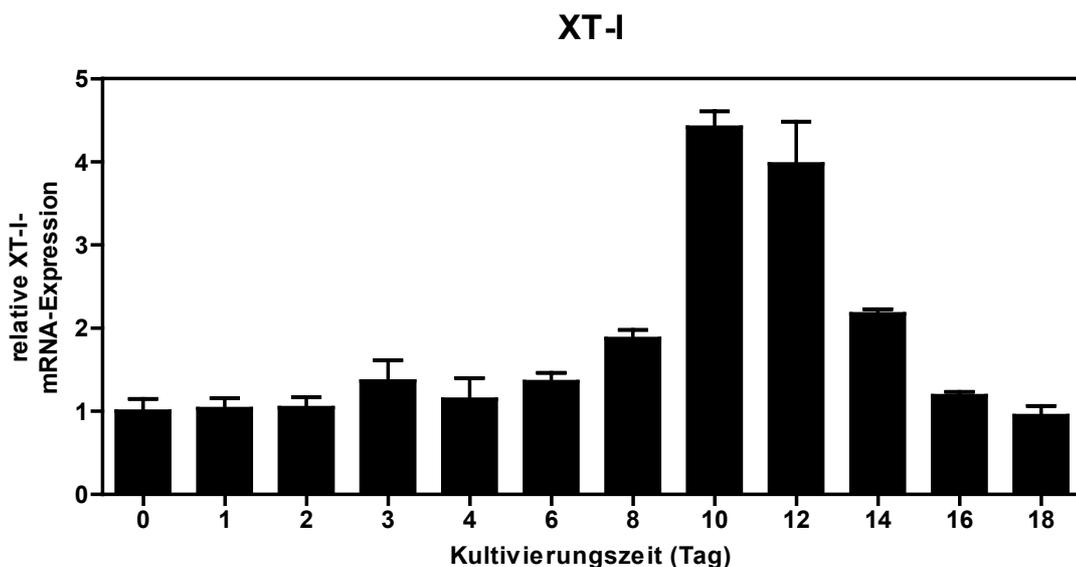
**Abb. 3.19:** Relative mRNA-Expression des für die Osteogenese charakteristischen Gens Kollagen I $\alpha$ I über einen Kultivierungszeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.3.3 Relative mRNA-Expression von XT-I und XT-II während der osteogenen Differenzierung

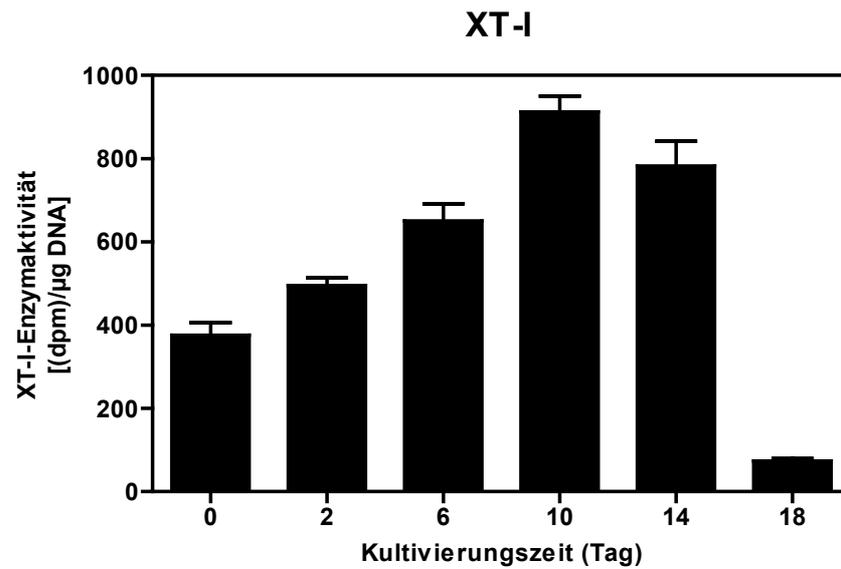
Die mRNA beider Xylosyltransferasen wurde im gesamten Zeitraum der osteogenen Differenzierung detektiert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur chondrogenen Differenzierung, dass die mRNA-Expression der XT-I erst zu einem späteren Zeitpunkt der Stammzellendifferenzierung signifikant hochreguliert wird. So wurde erst nach zehn Tagen osteogener Differenzierung eine 4,4-fach ( $\pm 0,2$ ) gesteigerte mRNA-Expression detektiert (Abb. 3.20). Der Verlauf der mRNA-Expression verhielt sich dabei analog zu den unter 3.3.2 aufgeführten osteogenen Markern.

Die Enzymaktivität der XT-I im Zellkulturüberstand zeigte einen ähnlichen Verlauf, wobei eine maximale Aktivität mit einer 2,4-fachen ( $\pm 0,1$ ) Steigerung nach ebenfalls zehn Tagen gemessen wurde (Abb. 3.21).

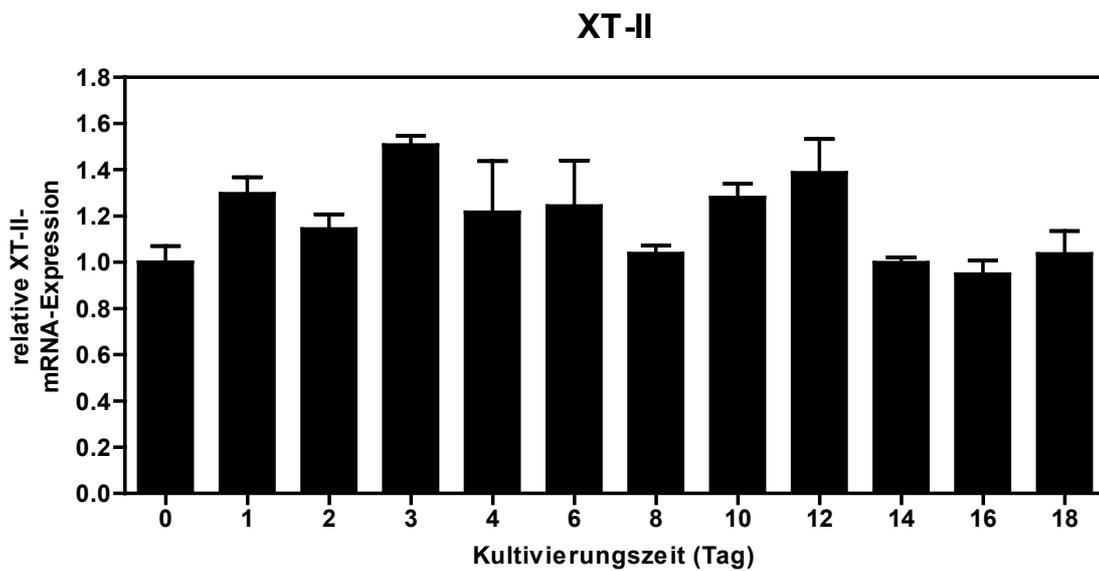
Im Gegensatz zur chondrogenen Differenzierung wurden bei der osteogenen Differenzierung für die mRNA-Expression der XT-II über den gesamten Zeitraum der Kultivierung keine signifikanten Expressionsunterschiede beobachtet (Abb. 3.22).



**Abb. 3.20:** Relative Quantifizierung der XT-I-mRNA-Expression im Verlauf der osteogenen Differenzierung. Dargestellt ist der Verlauf der Genexpression über einen Zeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



**Abb. 3.21:** Enzymatische Aktivität der XT-I im Verlauf der 18tägigen osteogenen Differenzierung. Als Akzeptor der O-Xylosylierung wurde Seidenfibroin verwendet. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



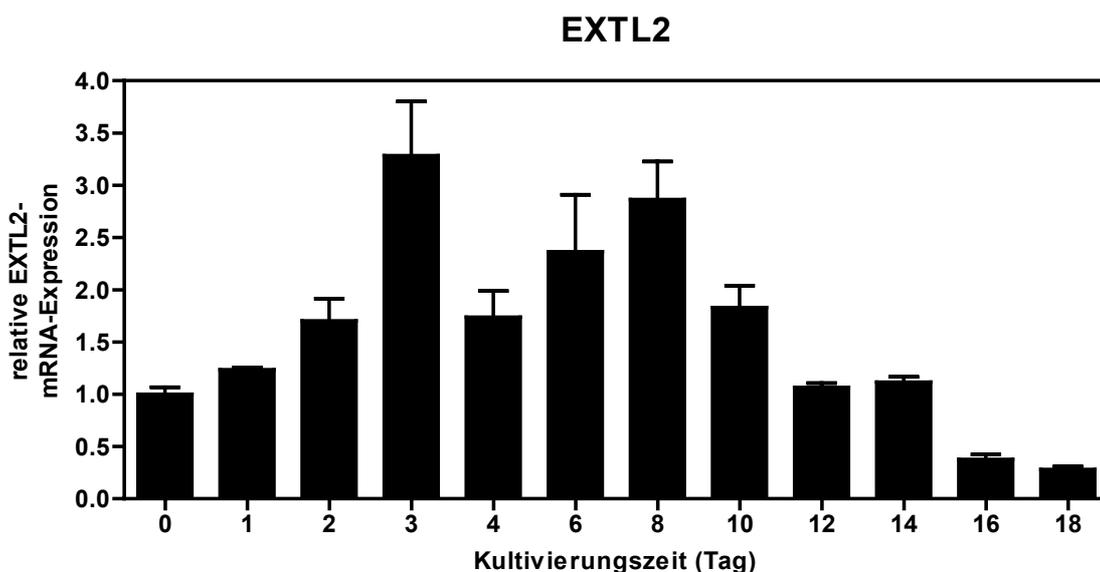
**Abb. 3.22:** Verlauf der relativen Expression der XT-II-mRNA im Rahmen der osteogenen Differenzierung. Die Analyse des mRNA-Gehalts erfolgte über einen Zeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.3.4 mRNA-Expression von Enzymen, die für die Initiation der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat- und Heparansulfat-Biosynthese relevant sind

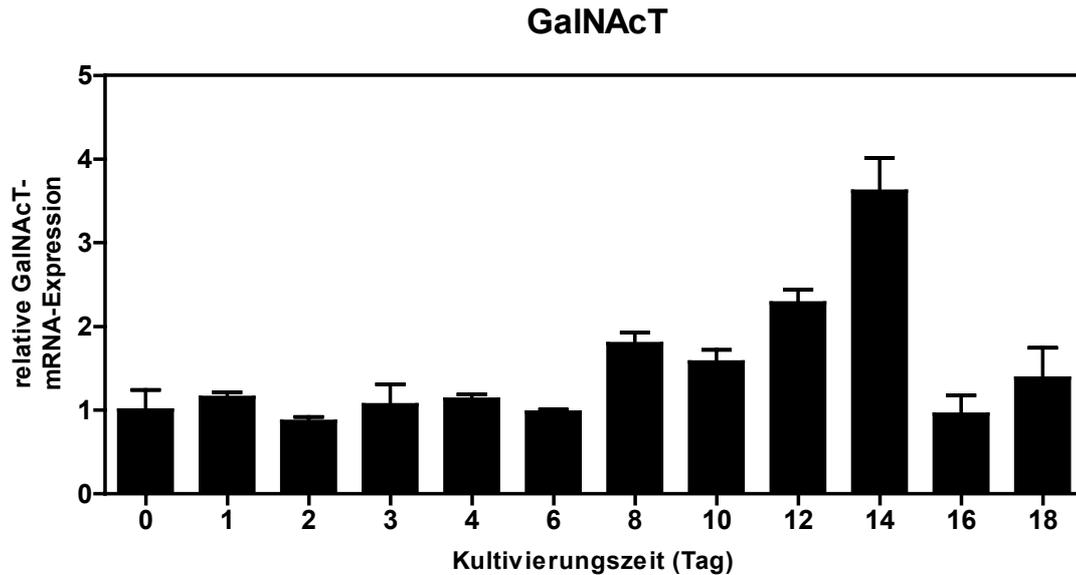
Konträr zur chondrogenen Differenzierung zeigte sich der Verlauf der mRNA-Expression der Enzyme EXTL2, GalNAcT und GlcAC5E bei der Osteogenese. Das an der Heparansulfat-Biosynthese beteiligte Enzym EXTL2 zeigte während der osteogenen Differenzierung eine zur Chondrogenese antiparallele Kinetik der mRNA-Expression. Nach einem Anstieg des mRNA-Gehalts nach Induktion der Osteogenese wurde von Tag 3 bis Tag 10 eine bis zu 3,6-fach ( $\pm 0,4$ ) gesteigerte mRNA-Expression detektiert. Bis zum Ende der Kultivierung war von Tag 10 an eine kontinuierliche Abnahme der mRNA-Expressionsrate zu verzeichnen (Abb. 3.23).

Die mRNA-Expression der GalNAcT, welche ein Schlüsselenzym der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat-Biosynthese darstellt, zeigte eine Hochregulation in den Stadien einer fortgeschrittenen Osteogenese. Nach Erreichen des maximalen Expressionslevels mit einer 3,6-fach ( $\pm 0,4$ ) erhöhten mRNA-Expression erfolgte in den folgenden Tagen wieder eine Reduktion des mRNA-Gehalts auf das Ausgangsniveau (Abb. 3.24).

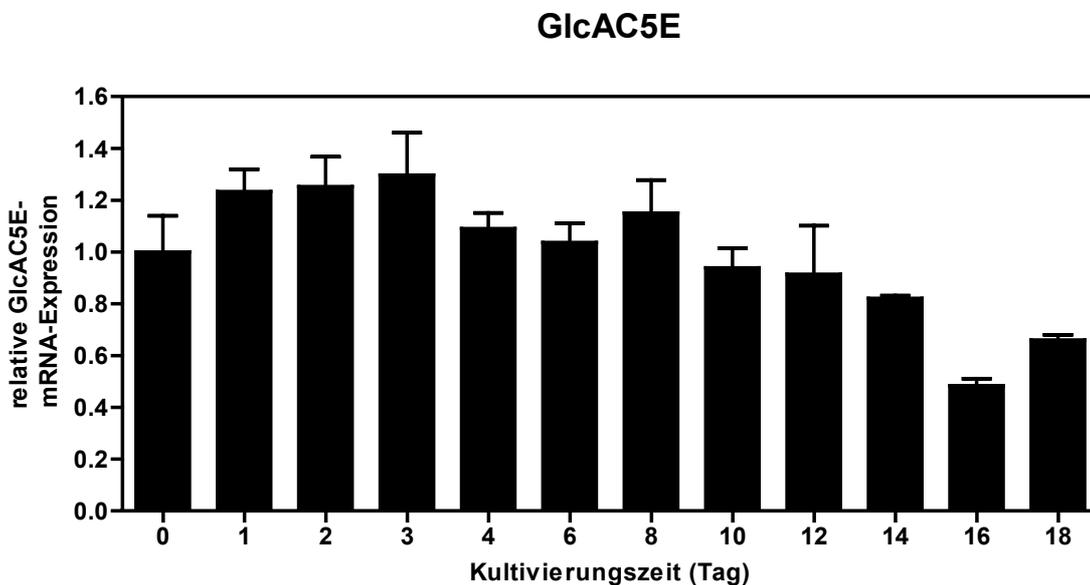
Das für die Epimerisierung von Chondroitinsulfat zu Dermatansulfat verantwortliche Enzym GlcAC5E, welches während der Chondrogenese nur temporär auf mRNA-Ebene herabreguliert wurde, zeigte im Verlauf der osteogenen Differenzierung eine kontinuierliche Abnahme des mRNA-Gehalts. Zum Ende der Osteogenese wurde an Tag 16 eine um 48% ( $\pm 3\%$ ) zum Ausgangsniveau verringerte mRNA-Expression detektiert (Abb. 3.25).



**Abb. 3.23:** Relative Quantifizierung der Genexpression des an der Heparansulfat-Biosynthese beteiligten Enzyms EXTL2. Der mRNA-Gehalt wurde im Verlauf der osteogenen Differenzierung über einen Zeitraum von 18 Tagen detektiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



**Abb. 3.24:** Relative Quantifizierung der Genexpression des an der Chondroitinsulfat-/Dermatansulfat-Biosynthese beteiligten Enzyms GalNAcT. Der mRNA-Gehalt wurde im Verlauf der osteogenen Differenzierung über einen Zeitraum von 18 Tagen detektiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

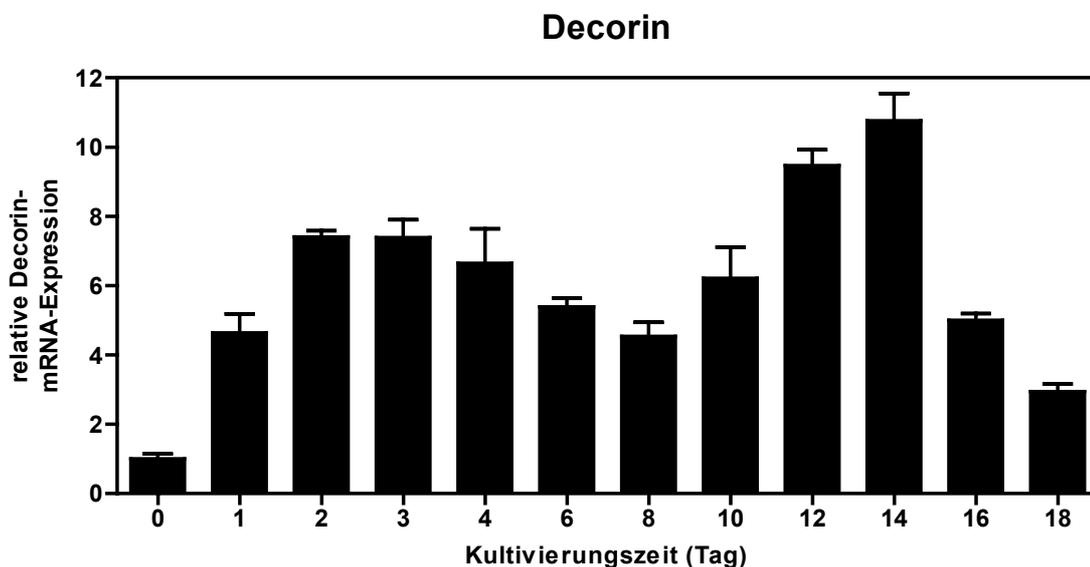


**Abb. 3.25:** Darstellung der mRNA-Expression des Enzyms GlcAC5E. Die Detektion des relativen mRNA-Gehalts erfolgte über einen Kultivierungszeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

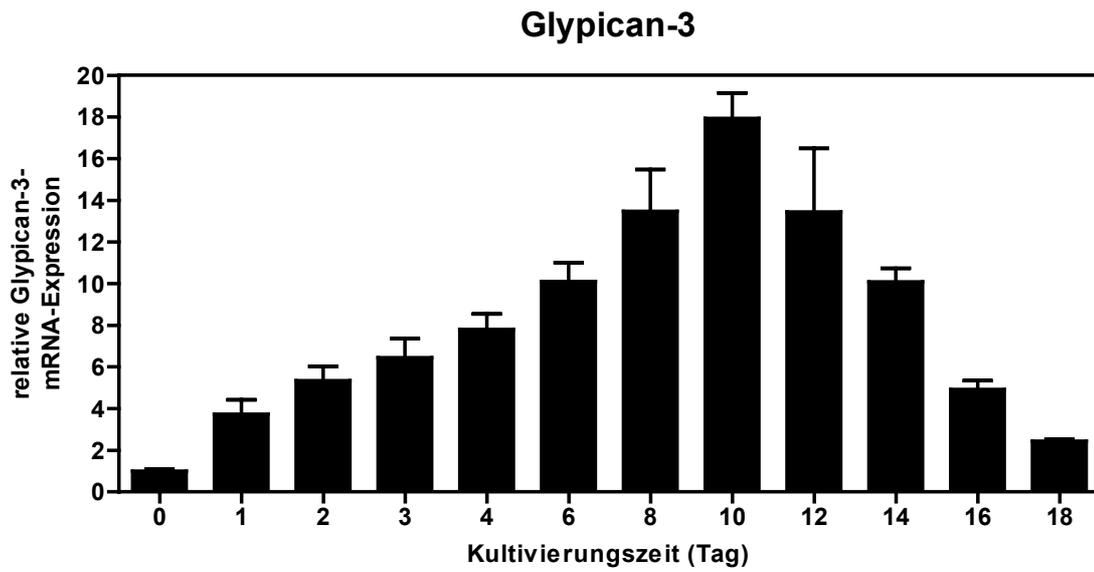
### 3.3.5 Expression von Proteoglykan-Core-Proteinen während der osteogenen Differenzierung

Für das in der osteogenen Matrix prädominant vorkommende Proteoglykan Decorin, welches mit einer Chondroitinsulfat- oder Dermatansulfat-Kette assoziiert ist, wurde eine mRNA-Kinetik mit zwei zeitlich getrennten Expressionsmaxima beobachtet. Parallel zur Chondrogenese erfolgte kurz nach der Induktion der Stammzellendifferenzierung ein Expressionsanstieg. Nach einer darauffolgenden reduzierten mRNA-Expression wurde der maximale Decorin-mRNA-Gehalt zum Ende der Kultivierung detektiert. Während der osteogenen Differenzierung wurden die Expressionsmaxima an Tag 2 mit einer 7,4-fach ( $\pm 0,2$ ) gesteigerten mRNA und an Tag 14 mit einer 10,8-fachen ( $\pm 0,8$ ) Expressionssteigerung über dem Ausgangsniveau detektiert (Abb.3.26).

Das mit mehreren Heparansulfat-Ketten assoziierte Proteoglykan Glypican-3 zeigte einen zur XT-I oder auch AP äquivalenten Anstieg der mRNA-Expression bis zu Tag 10. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine um Faktor 17,9 ( $\pm 1,2$ ) gesteigerte mRNA-Expression detektiert. Daran anschließend erfolgte eine Herabregulation der Glypican-3-mRNA, wobei nach 18 Tagen noch eine annähernd verdreifachte Expressionsrate im Vergleich zum Ausgangsniveau detektiert werden konnte (Abb. 3.27).



**Abb. 3.26:** Relative Quantifizierung der Genexpression des Proteoglykan-Core-Proteins Decorin während der osteogenen Differenzierung. Die Abbildung zeigt den Verlauf der mRNA-Expression über einen Kultivierungszeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.



**Abb. 3.27:** Relative Quantifizierung der Genexpression des Proteoglykan-Core-Proteins Glypican-3 während der Osteogenese. Die Abbildung zeigt den Verlauf der mRNA-Expression über einen Kultivierungszeitraum von 18 Tagen. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.4 Aufklärung der physiologischen Funktion der humanen Xylosyltransferasen

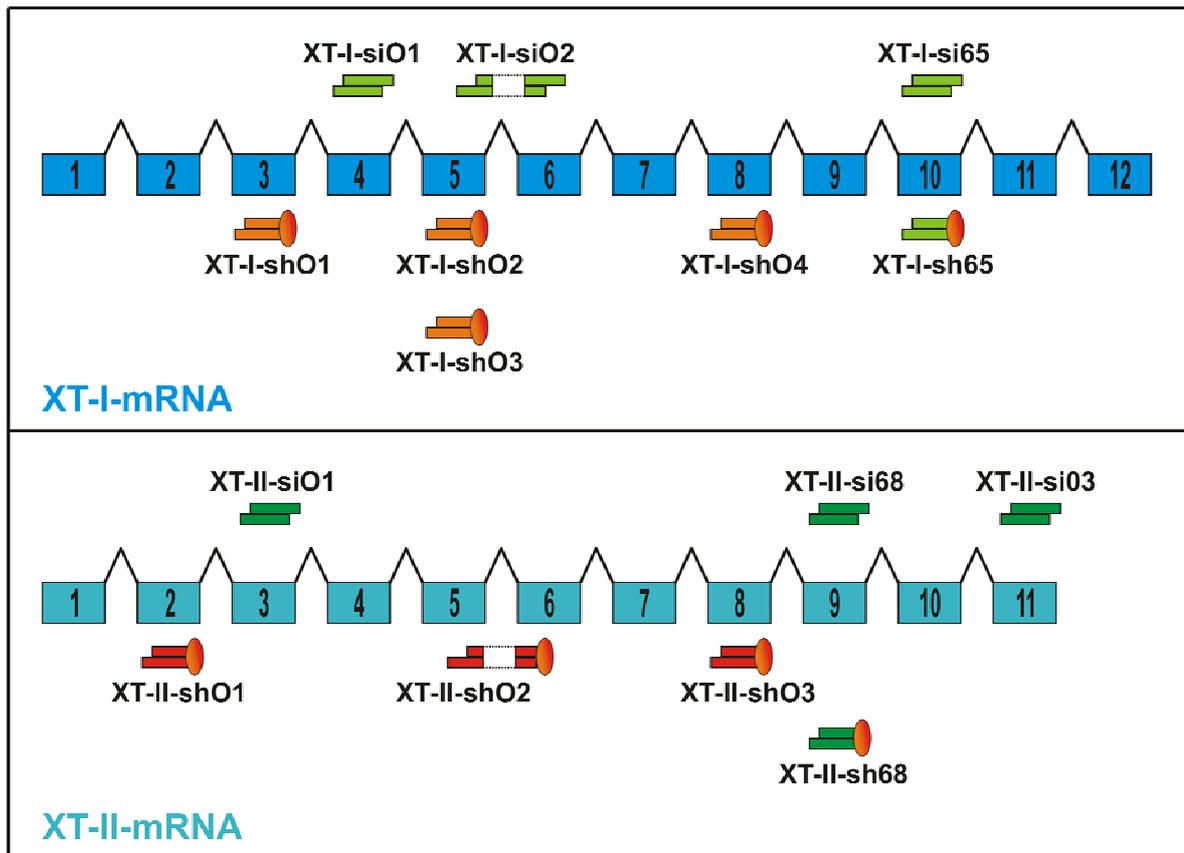
Die physiologische Funktion des zur XT-I hoch homologen Proteins XT-II konnte bislang nicht determiniert werden. Zur Aufklärung der Funktion beider Xylosyltransferasen wurden, basierend auf der RNAi-Technik, erstmals verschiedene Methoden entwickelt, welche gezielt die mRNA-Expression einer XT oder auch beider Xylosyltransferasen in humanen Zelllinien herabregulieren. Im Rahmen dieser Experimente wurden sowohl SW1353-Zellen, welche vorwiegend die XT-I sezernieren, als auch SAOS-2-Zellen, welche die XT-I und XT-II in einem äquivalenten Verhältnis exprimieren, verwendet.

Die Auswirkungen der verminderten Genexpression einer bzw. beider Xylosyltransferasen wurden sowohl auf mRNA mittels *Real-Time* PCR als auch auf Proteinebene über die Enzymaktivität analysiert. Dabei erfolgte die Detektion der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand unter Verwendung zweier Testsysteme, welche unterschiedliche Akzeptoren für die O-Xylosylierung darstellen. Die Enzymaktivität der XT-I konnte dabei spezifisch durch die Quantifizierung des Transfers radioaktiv markierter UDP-Xylose auf den Akzeptor Seidenfibroin ermittelt werden. Des Weiteren wurde erstmalig das vom Bikunin abgeleitete Peptid Bio-BIK-F zur Detektion der O-Xylosylierung eingesetzt.

#### 3.4.1 Auswahl und Optimierung geeigneter RNAi-Systeme zur Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression

Zur Etablierung des siRNA- bzw. des shRNA-vermittelten *Knock-downs* beider Xylosyltransferasen wurden jeweils zur XT-I- bzw. XT-II-mRNA komplementäre Sequenzen ausgesucht, welche sich an unterschiedlichen Stellen der jeweiligen mRNA befinden (Abb. 3.28).

Für die siRNA-Nukleotide bzw. shRNA-Vektoren erfolgte anschließend eine Optimierung der Transfektionsparameter und zusätzlich bei shRNA-Vektoren eine Selektionierung über Antibiotika (3.4.1.1). Die Effizienz der jeweiligen *Antisense*-Nukleotide bei der Supprimierung der XT-mRNA-Expression wurde jeweils in SAOS-2- und SW1353-Zellen determiniert und anschließend ein geeignetes System für die folgenden Analysen ausgewählt (3.4.1.2).



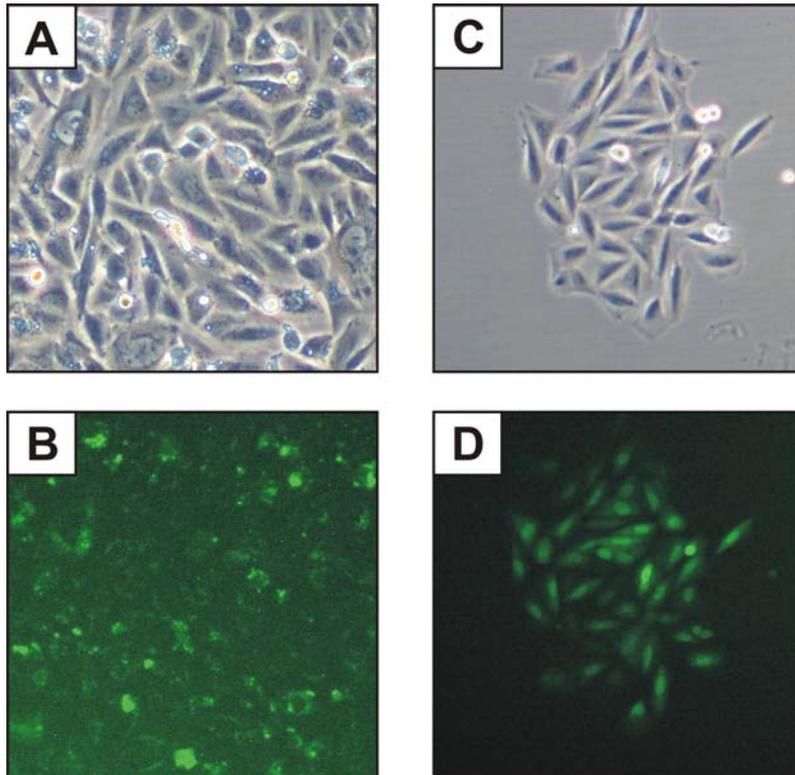
**Abb. 3.28:** Darstellung der prozessierten XT-I- und XT-II-mRNA sowie die Lokalisierung der zur siRNA komplementären Exons.

### 3.4.1.1 Optimierung der Transfektion für siRNA- und shRNA-Vektoren

Eine Optimierung der Transfektionsbedingungen sowie die anschließende Auswahl effektiver siRNA- und shRNA-Sequenzen erfolgte bei SAOS-2- und SW1353-Zellen.

Mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 konnten, bezüglich der Transfektionseffizienz sowie bei der Zellvitalität, die besten Resultate für die Vermittlung von siRNA erzielt werden. Die lichtmikroskopisch bestimmte Transfektionseffizienz mit diesem Reagenz lag bei den getesteten Zelllinien über 90%. Als optimale Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion wurde eine Konfluenz der Zellen von ca. 30% ermittelt. Alle folgenden siRNA-Experimente wurden mit den evaluierten Parametern durchgeführt.

Die besten Ergebnisse für die Transfektion von shRNA-Vektoren wurden mit dem Reagenz Fugene6 erzielt. Bei einer Zelldichte von 70% wurde eine Transfektionseffizienz von ca. 50% ermittelt. Zellen, die mit shRNA-Vektoren transfiziert wurden, konnten anschließend über die vektorvermittelte Zeocin-Resistenz selektioniert werden. Aus diesem Grund war eine weitere Optimierung der Transfektion von shRNA-Vektoren nicht erforderlich (Abb. 3.29).



**Abb. 3.29:** Mikroskopische Aufnahme von transient oder stabil transfizierten SAOS-2-Zellen. (A, B) Abgebildet sind SAOS-2-Zellen transfiziert mit FAM-markierter siRNA. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamin 2000 verwendet. (C, D) SAOS-2-Zellen transfiziert mit einem GFP-kodierenden shRNA-Vektor. Als Transfektionsreagenz wurde Fugen6 verwendet. Abgebildet ist eine monoklonale Zellpopulation, die über das Antibiotika Zeocin selektioniert wurde.

#### 3.4.1.2 Auswahl geeigneter siRNA-Oligonukleotide und shRNA-Vektoren zur effizienten Reduktion des XT-I- und XT-II-mRNA-Gehalts

XT-I- als auch XT-II-siRNA-Oligonukleotide wurden analog zu den in 3.4.1.1 optimierten Parametern in einem Konzentrationsbereich von 5-45 nmol/l in SAOS-2- und SW1353-Zellen transfiziert und die Auswirkungen auf die XT-mRNA-Expression nach 48 h mittels *Real-Time quantitative* PCR analysiert. Als interner Standard wurde bei der relativen mRNA-Quantifizierung das konstant exprimierte „Haushaltsgen“ Ubiquitin verwendet.

Bei einer eingesetzten Konzentration von 15 nmol/l wurde für alle siRNA's das beste Ergebnis in Bezug auf Effektivität und Spezifität beim XT-*Knock-down* erhalten. Dabei wurden die besten Resultate zur Suppression des zellulären XT-I-mRNA-Gehalts mit dem Oligonukleotid XT-Isi65 (Reduktion der XT-I-mRNA um 90%) und zur Unterdrückung der XT-II-mRNA-Expression mit dem Oligonukleotid XT-IIsi68 (Reduktion der XT-II-mRNA um 80%) erhalten. Bei einer parallelen Transfektion von XT-Isi65 und XT-IIsi68 (Gesamt-siRNA-Konzentration: 30 nmol/l) konnte zeitgleich in einem Ansatz die mRNA beider Xylosyltransferasen jeweils mit der gleichen Effizienz wie bei einer Einzeltransfektion herunterreguliert werden.

Nach der Transfektion von shRNA-Vektoren in SAOS-2- und SW1353-Zellen erfolgte über die vektorvermittelte Zeocin-Resistenz eine Selektion der Zellen, welche den Vektor stabil in das Genom integriert hatten. Für die Reinkulturen stabil transfizierter Zellen wurde bei den

unterschiedlichen shRNA-Varianten jedoch nur eine Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression von maximal 50% detektiert. Dabei zeigten bei einer mRNA-Suppression von 9-30% die von der XT-Isi65 und XT-IIsi68 abgeleiteten shRNA-Sequenzen einen sehr geringen Effekt auf die Genexpression beider Xylosyltransferasen (Tab. 3.1).

Da durch die Verwendung von siRNA im Vergleich zur shRNA deutlich bessere Resultate bei der Reduktion der mRNA-Expression beider Xylosyltransferasen erzielt wurden, erfolgten die Analysen des mRNA-Knock-downs nach Transfektion mit den synthetischen Oligonukleotiden XT-Isi65 und XT-IIsi68.

**Tab. 3.1:** Auflistung der mRNA-Suppression durch siRNA- bzw. shRNA-Oligonukleotide. Angegeben ist die mittlere Reduktionsrate ( $\pm$ Standardabweichung) der XT-mRNA-Expression nach transienter Transfektion mit siRNA (ca. 90% Transfektionseffizienz) sowie nach erfolgter stabiler Selektion der shRNA-Vektoren (100% der Zellen haben den Vektor in das Genom integriert). Maximale Reduktionsraten der XT-mRNA sind hervorgehoben.

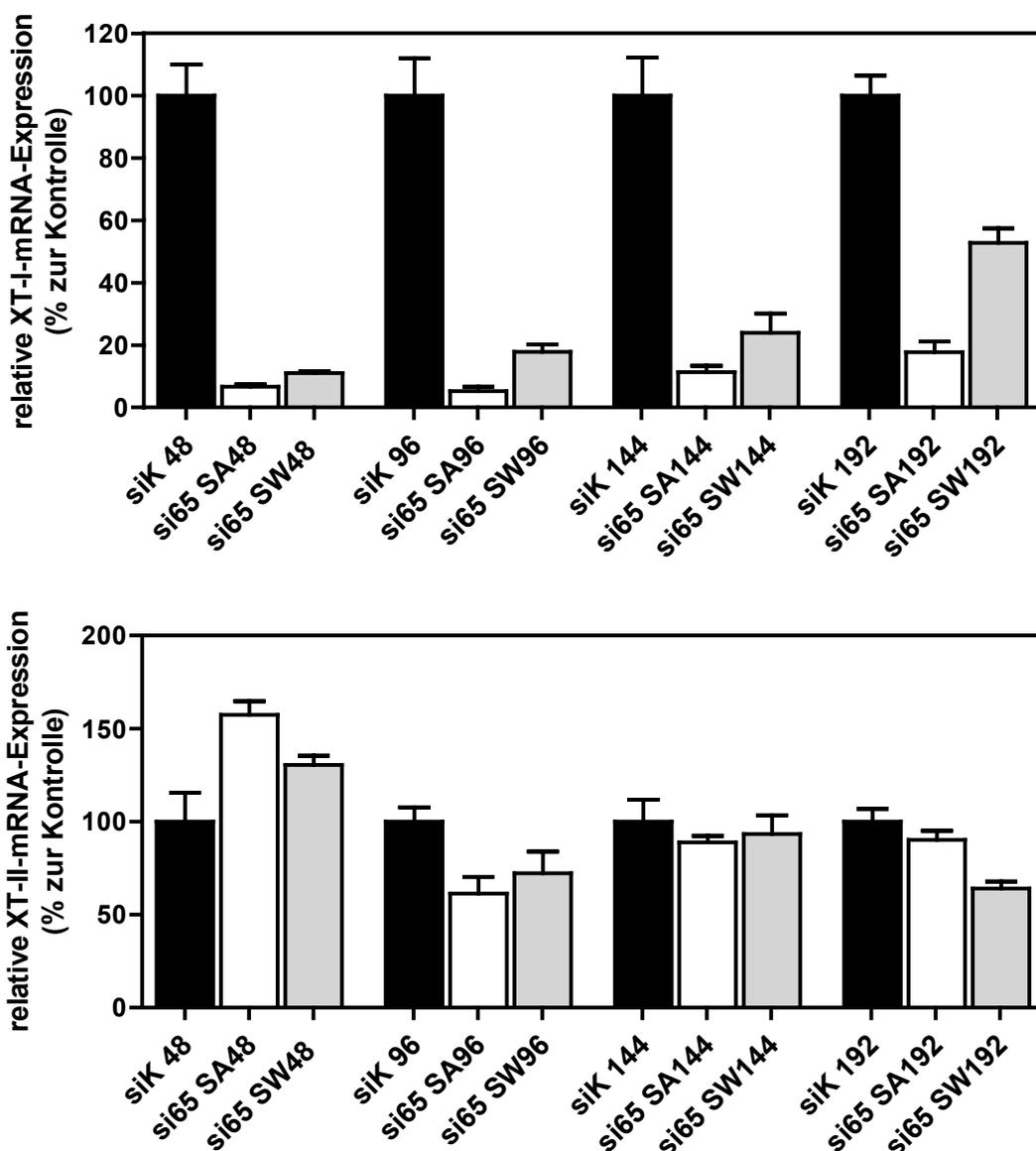
XT-I-siRNA-Oligonukleotid / XT-I-shRNA-Oligonukleotid	Reduktion der XT-I-mRNA-Expression in:	
	SAOS-2-Zellen	SW1353-Zellen
siRNA-Kontrolle	0% ( $\pm$ 5%)	0% ( $\pm$ 6%)
XT-IsiO1	11% ( $\pm$ 3%)	9% ( $\pm$ 4%)
XT-IsiO2	<b>76%</b> ( $\pm$ 8%)	<b>71%</b> ( $\pm$ 9%)
XT-Isi65	<b>93%</b> ( $\pm$ 2%)	<b>89%</b> ( $\pm$ 3%)
shRNA-Kontrolle	0% ( $\pm$ 6%)	0% ( $\pm$ 4%)
XT-I-siRNA-Oligonukleotid / XT-I-shRNA-Oligonukleotid	Reduktion der XT-I-mRNA-Expression in:	
	SAOS-2-Zellen	SW1353-Zellen
XT-IshO1	43% ( $\pm$ 8%)	40% ( $\pm$ 11%)
XT-IshO2	21% ( $\pm$ 12%)	20% ( $\pm$ 6%)
XT-IshO3	27% ( $\pm$ 9%)	20% ( $\pm$ 11%)
XT-IshO4	52% ( $\pm$ 5%)	52% ( $\pm$ 3%)
XT-Ish65	9% ( $\pm$ 2%)	13% ( $\pm$ 4%)
XT-II-siRNA-Oligonukleotid / XT-II-shRNA-Oligonukleotid	Reduktion der XT-II-mRNA-Expression in:	
	SAOS-2-Zellen	SW1353-Zellen
siRNA-Kontrolle	0% ( $\pm$ 6%)	0% ( $\pm$ 3%)
XT-IIsiO1	<b>73%</b> ( $\pm$ 6%)	<b>76%</b> ( $\pm$ 7%)
XT-IIsi68	<b>80%</b> ( $\pm$ 14%)	<b>86%</b> ( $\pm$ 8%)
XT-IIsiO3	9% ( $\pm$ 3%)	6% ( $\pm$ 2%)
shRNA-Kontrolle	0% ( $\pm$ 3%)	0% ( $\pm$ 5%)
XT-IIshO1	27% ( $\pm$ 4%)	36% ( $\pm$ 6%)
XT-IIshO2	43% ( $\pm$ 7%)	49% ( $\pm$ 9%)
XT-IIshO3	47% ( $\pm$ 4%)	40% ( $\pm$ 10%)
XT-IIsh68	17% ( $\pm$ 4%)	29% ( $\pm$ 3%)

### 3.4.2 Reduktion der XT-I-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen

Zur Analyse bezüglich der Auswirkungen eines reduzierten XT-I-mRNA-Gehalts sowohl auf die XT-II-mRNA-Expression als auch auf die XT-Aktivität wurde mit dem Oligonukleotid XT-Isi65 die Genexpression der XT-I in beiden Zelllinien supprimiert.

#### 3.4.2.1 Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-Isi65

Bereits 48 h nach Transfektion der SAOS-2-Zellen mit der XT-I-siRNA konnte eine signifikante Reduktion des XT-I-mRNA-Gehalts von 93% (Mittelwert) ( $\pm 2\%$ , Standardabweichung) im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden.



**Abb. 3.30:** Darstellung der relativen XT-I- und XT-II-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen nach Transfektion mit XT-Isi65. Der mRNA-Gehalt der XT-I und XT-II wurde in SAOS-2 (si65 SA)- und SW1353-Zellen (si65 SW) in Relation zur mRNA-Expression von Zellen gesetzt, die mit einer Kontroll-siRNA (siK) transfiziert wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der Transfektion über einen Zeitraum von 192 h. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

Über den Kultivierungszeitraum von acht Tagen war ein leichter Anstieg der XT-I-mRNA-Expression zu verzeichnen. Die Expressionsrate der XT-I lag jedoch selbst am Ende der Kultivierungsphase noch 82% ( $\pm 4\%$ ) unterhalb der entsprechenden Kontrolle. Ein ähnlicher Verlauf der XT-I-mRNA-Expression zeigte sich bei SW1353-Zellen. Im Vergleich zu SAOS-2 wurde ein deutlich beschleunigter Anstieg der XT-I-mRNA-Expression zum Ende der Kultivierung beobachtet.

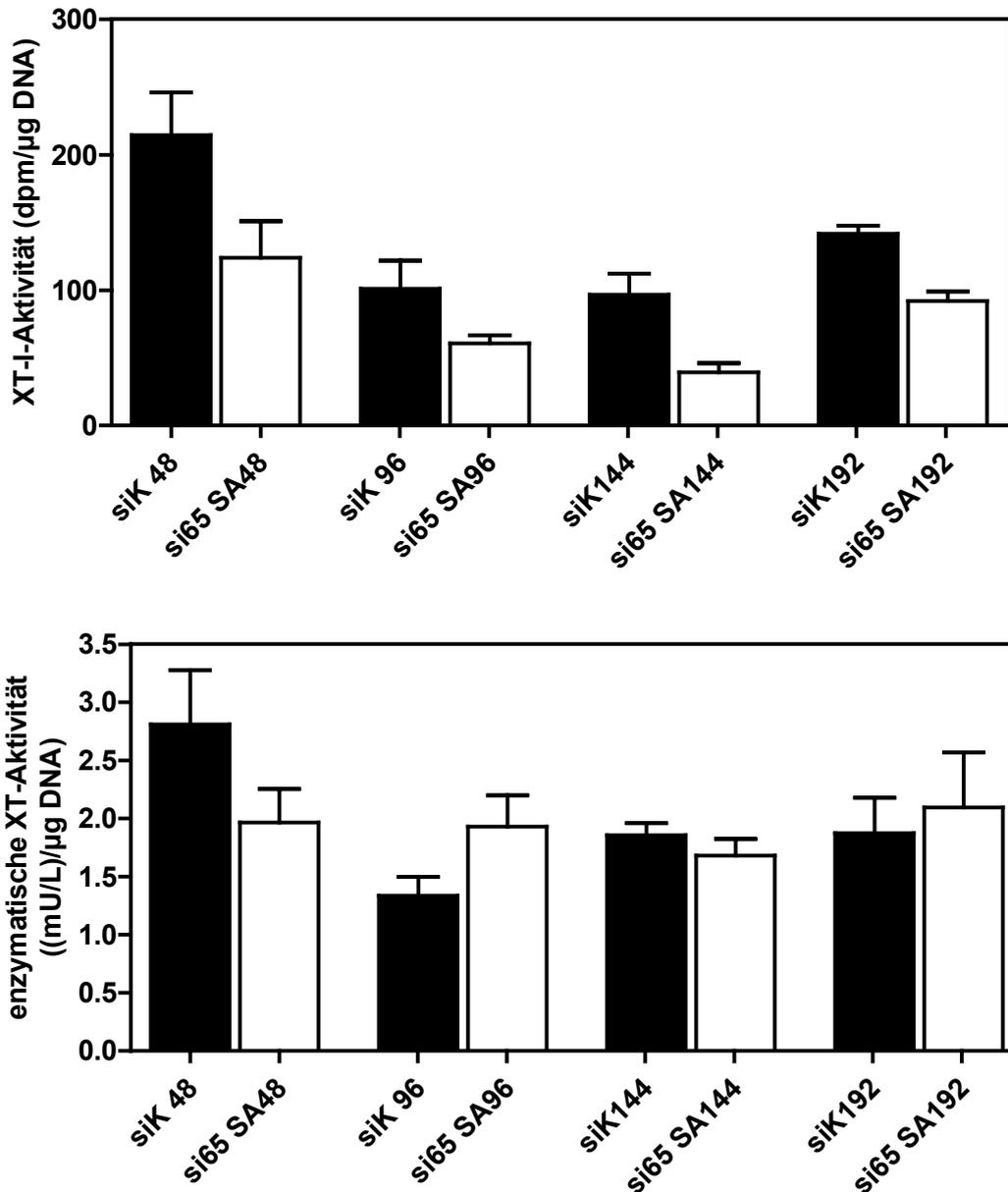
Bei SAOS-2-Zellen wurde für den mRNA-Gehalt der XT-II, 48 h nach der Transfektion mit XT-I-siRNA, ein signifikanter Anstieg von 57% ( $\pm 13\%$ ) detektiert. Die gesteigerte XT-II-mRNA-Expressionsrate fiel nach weiteren 48 h unter das Niveau der Kontrollen und stabilisierte sich zum Ende der Kultivierung auf dem Ausgangsniveau. Für SW1353-Zellen wurde eine äquivalente Kinetik detektiert (Abb. 3.30).

#### **3.4.2.2 Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I-siRNA vermitteltem *Knock-down***

Die Bestimmung der XT-I-Aktivität im Zellkulturüberstand ergab für beide Zelllinien eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität. Bei SAOS-2-Zellen wurde das Aktivitätsminimum nach 144 h Kultivierung detektiert. Zu diesem Zeitpunkt war die XT-Aktivität um 41% ( $\pm 15\%$ ) gegenüber den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen erniedrigt (Abb. 3.31). Am Ende der Kultivierung war ein Anstieg der XT-I-Aktivität beider Transfektionsansätze zu beobachten, wobei jedoch das Verhältnis der Enzymaktivitäten zueinander nicht verschoben war.

Bereits nach 48 h zeigte sich bei SW1353-Zellen eine minimale XT-I-Aktivität im Zellkulturüberstand. Zu diesem Zeitpunkt war die Enzymaktivität im Vergleich zum Kontrollniveau um 58% ( $\pm 3\%$ ) erniedrigt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte analog zu SAOS-2-Zellen ein Anstieg der Enzymaktivität beobachtet werden.

Abweichend zur XT-I-Aktivität wurde für die XT-Aktivität, welche mit dem Bio-BIK-F-Peptid bestimmt wurde, eine differierende Kinetik bei SAOS-2-Zellen aufgenommen. In der frühen Phase des *Knock-downs* wurde analog eine herabregulierte Enzymaktivität detektiert. Nach 96 h erfolgte jedoch ein Anstieg der XT-Aktivität, der zum Ende der Kultivierung auf Kontrollniveau zurückging (Abb. 3.31). Bei SW1353-Zellen wurden keine signifikanten Aktivitätsunterschiede detektiert.



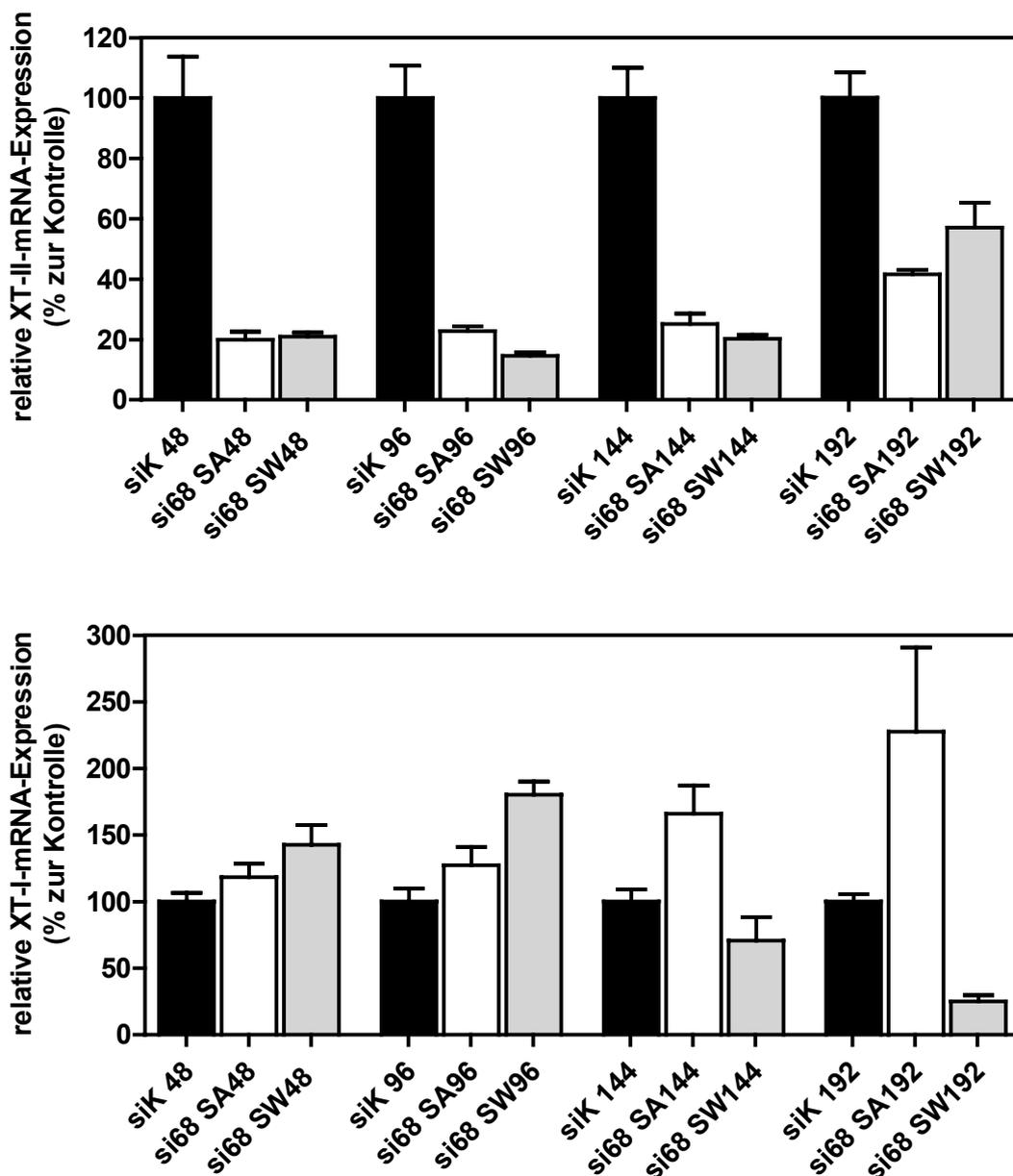
**Abb. 3.31:** XT-Aktivität im Zellkulturüberstand von SAOS-2-Zellen transfiziert mit XT-I-si65 (si65 SA). Die mit dem Akzeptor Seidenfibroin (obere Abbildung) und dem Akzeptor Bio-BIK-F (untere Abbildung) determinierte Enzymaktivität wurde in Intervallen von 48 h nach der Transfektion der SAOS-2-Zellen detektiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.4.3 Reduktion der XT-II-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen

Zur Analyse bezüglich der Auswirkungen eines reduzierten XT-II-mRNA-Gehalts auf die XT-I-mRNA-Expression sowie auf die XT-Aktivität wurde mit dem Oligonukleotid XT-II-si68 die Genexpression der XT-II in beiden Zelllinien supprimiert.

### 3.4.3.1 Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-II-si68

SAOS-2- und SW1353-Zellen zeigten nach der Transfektion mit XT-II-si68 einen stark reduzierten XT-II-mRNA-Gehalt. Eine maximale Reduktion der mRNA wurde bei SAOS-2-Zellen nach 48 h beobachtet, wobei die XT-II-mRNA-Expression 80% ( $\pm 14\%$ ) unterhalb des Niveaus der Kontrolle lag. Analog zur Kinetik der XT-I-mRNA-Suppression konnte im Verlauf der Kultivierung eine Abnahme des siRNA-Effektes verzeichnet werden, wobei die mRNA-Expression nach 192 h noch um 48% ( $\pm 9\%$ ) im Vergleich zur Kontrolle reduziert war.



**Abb. 3.32:** Darstellung der relativen XT-II und XT-I-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen nach Transfektion mit XT-II-si68. Der mRNA-Gehalt der XT-II und XT-I wurde in SAOS-2 (si68 SA)- und SW1353-Zellen (si68 SW) in Relation zur mRNA-Expression von Zellen gesetzt, die mit einer Kontroll-siRNA (siK) transfiziert wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der Transfektion über einen Zeitraum von 192 h. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

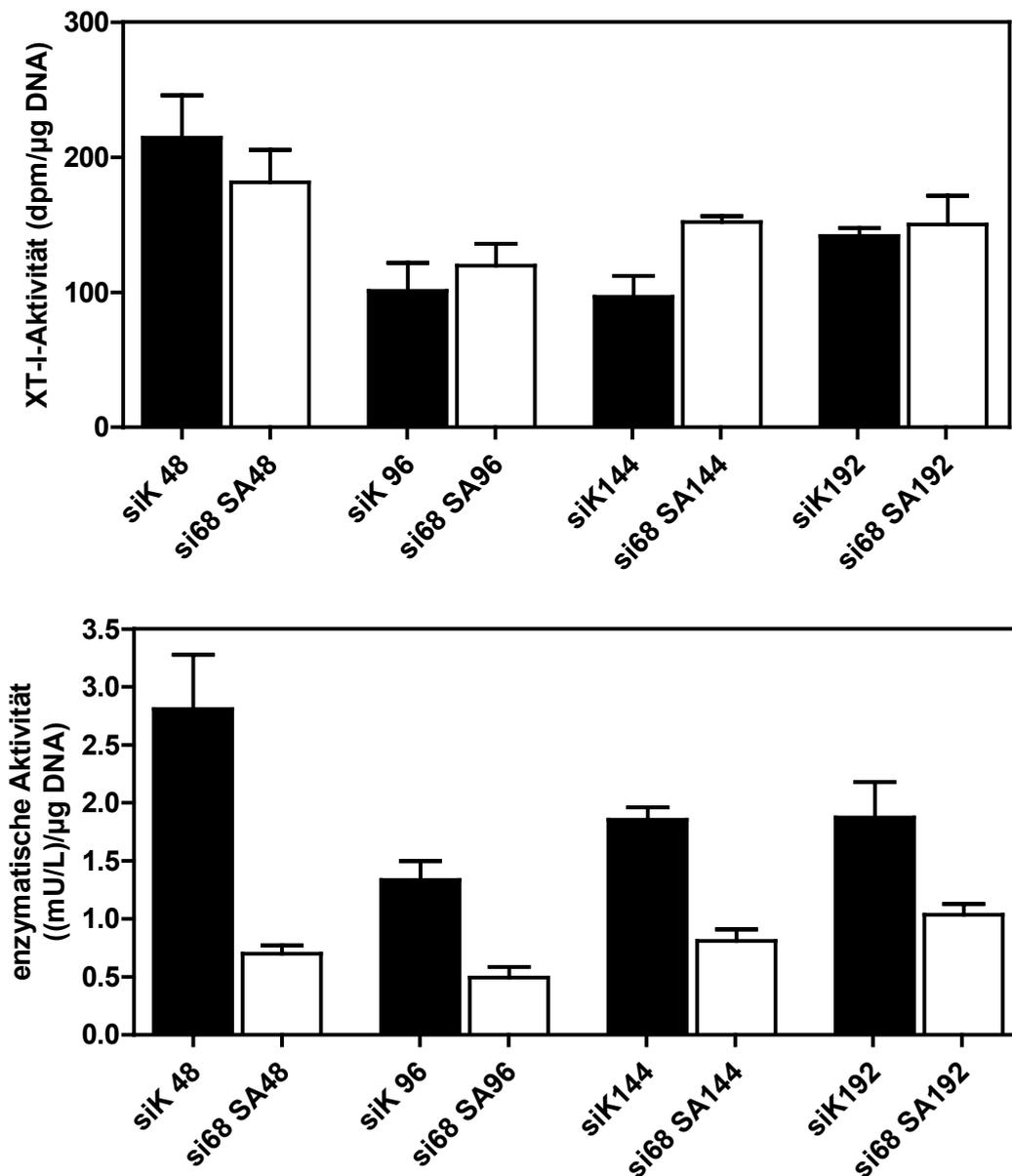
Bei SW1353-Zellen wurde eine identische Kinetik beobachtet. Die maximale Reduktion der XT-I-mRNA-Expression erfolgte nach 96 h ( $-86\% \pm 8\%$ ).

Eine Reduktion der XT-II-mRNA bewirkte eine signifikante Hochregulation der XT-I-mRNA-Expression bei beiden Zelllinien. Bei SAOS-2-Zellen konnte über den gesamten Kultivierungszeitraum ein stetiger Anstieg detektiert werden. Nach 192 h lag der XT-I-mRNA-Gehalt mit  $163\% (\pm 26\%)$  deutlich über der Expressionsrate der Kontrollen. In SW1353-Zellen erfolgte nach einem initialem Anstieg der XT-I-mRNA-Expression eine kontinuierliche Reduktion der Transkriptionsrate. Nach 192 h wurde ein um  $75\% (\pm 6\%)$  zur Kontrolle verminderter mRNA-Gehalt determiniert (Abb. 3.32).

#### **3.4.3.2 Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-II-siRNA vermitteltem *Knock-down***

Die XT-I-Aktivität, die mit dem Akzeptor Seidenfibroin determiniert wurde, zeigte bei SAOS-2-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, nach 48 h keine signifikante Veränderung. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Anstieg der XT-I-Aktivität, die nach 144 h mit  $57\% (\pm 15\%)$  deutlich oberhalb der XT-I-Aktivität der Kontrolle lag. Zum Ende der Kultivierung konnten keine Unterschiede zwischen dem XT-II-siRNA- und dem Kontroll-siRNA-Ansatz detektiert werden (Abb. 3.33). Ein Anstieg der XT-I-Aktivität wurde bei SW1353-Zellen, in einer zur mRNA äquivalenten Kinetik, beobachtet. Dabei konnte nach 96 h die maximale Enzymaktivität mit einer um  $76\% (\pm 13\%)$  zur Kontrolle erhöhten Wertlage detektiert werden (nicht dargestellt).

Die gleichen Zellkulturüberstände zeigten bei den mit dem Bio-BIK-F-Peptid bestimmten XT-Aktivitäten eine Reduktion der Enzymaktivität der XT-II-siRNA-Proben. Nach 96 h wurde bei SAOS-2-Zellen die geringste Enzymaktivität, welche  $63\%$  unterhalb der Kontrolle lag, detektiert (Abb. 3.33). Unter Verwendung dieses Messsystems konnten bei SW1353-Zellen keine Aktivitätsänderungen verzeichnet werden.



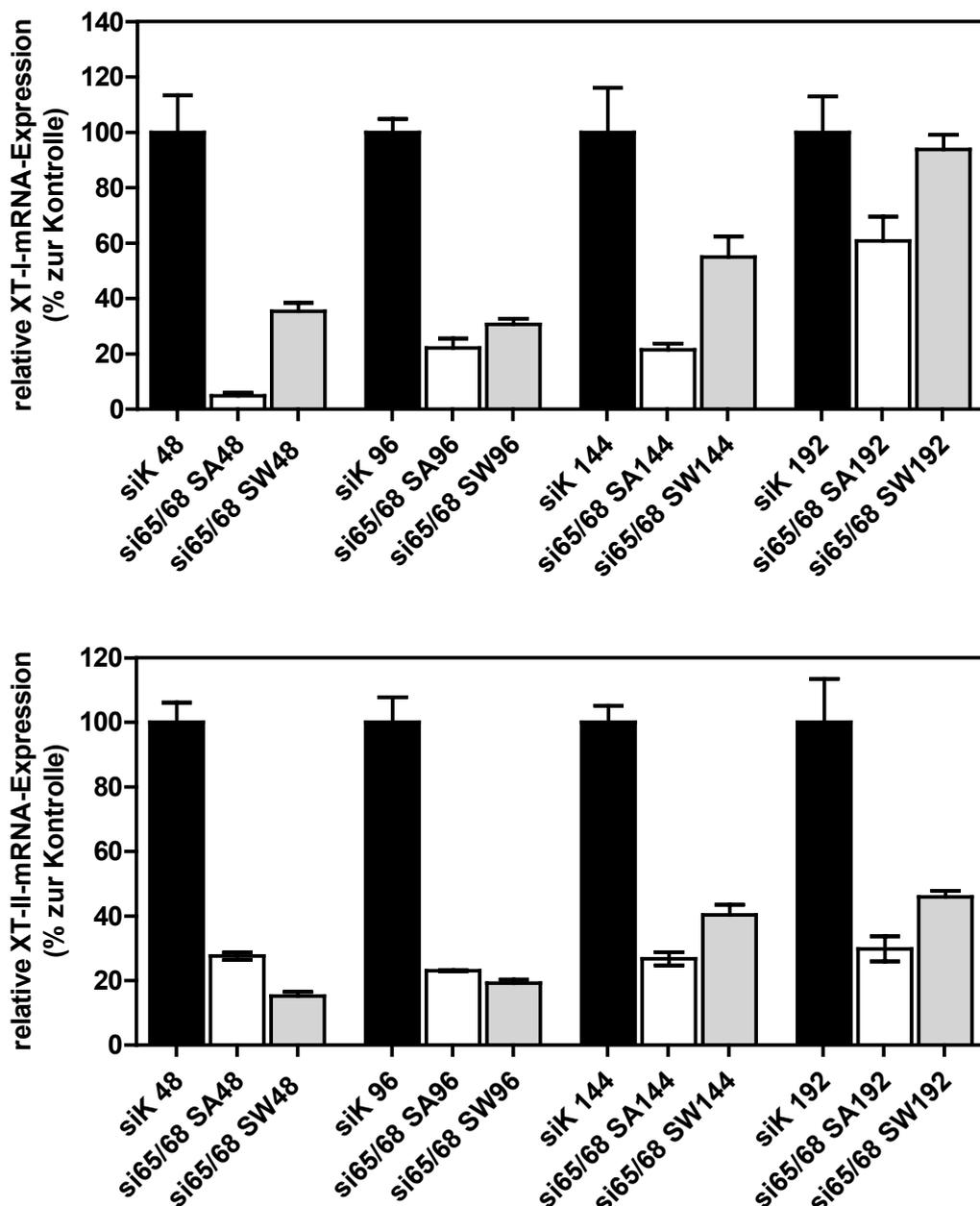
**Abb. 3.33:** XT-Aktivität im Zellkulturüberstand von SAOS-2-Zellen transfiziert mit XT-II si68 (si68 SA). Die mit dem Akzeptor Seidenfibroin (obere Abbildung) und dem Akzeptor Bio-BIK-F (untere Abbildung) determinierte Enzymaktivität wurde in Intervallen von 48 h nach der Transfektion der SAOS-2-Zellen detektiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 3.4.4 Parallele Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression in SAOS-2- und SW1353-Zellen

Zur Untersuchung des zellulären Expressionsverhaltens nach einer parallelen Reduktion der mRNA-Expression beider Xylosyltransferasen erfolgte jeweils eine doppelte Transfektion beider siRNA-Oligonukleotide in die Zelllinien.

### 3.4.4.1 Analyse der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression nach Transfektion mit XT-Isi65 und XT-IIIsi68

Für die XT-I-mRNA-Expression konnte, analog zur Einzeltransfektion mit XT-Isi65, eine signifikante Reduktion des XT-I-mRNA-Gehalts bereits nach 48 h detektiert werden. Über den Verlauf der Kultivierung zeigte sich im Vergleich ein deutlich schnellerer Rückgang des siRNA-Effekts.



**Abb. 3.34:** Parallele Transfektion von SAOS-2-Zellen bzw. SW1353-Zellen mit XT-Isi65 und XT-IIIsi68. Dargestellt ist die relative XT-I- und XT-II-mRNA-Expression von mit XT-siRNA transfizierten SAOS-2 (si65/68 SA)- und SW1353-Zellen (si65/68 SW). Der mRNA-Gehalt ist in Relation zur mRNA-Expression von Zellen gesetzt, die mit einer Kontroll-siRNA (siK) transfiziert wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach der Transfektion über einen Zeitraum von 192 h. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

So befand sich bei SW1353-Zellen bereits nach 192 h die mRNA-Expression der mit XT-siRNA-transfizierten Zellen auf dem gleichen Niveau wie die der Kontrollen (Abb. 3.34).

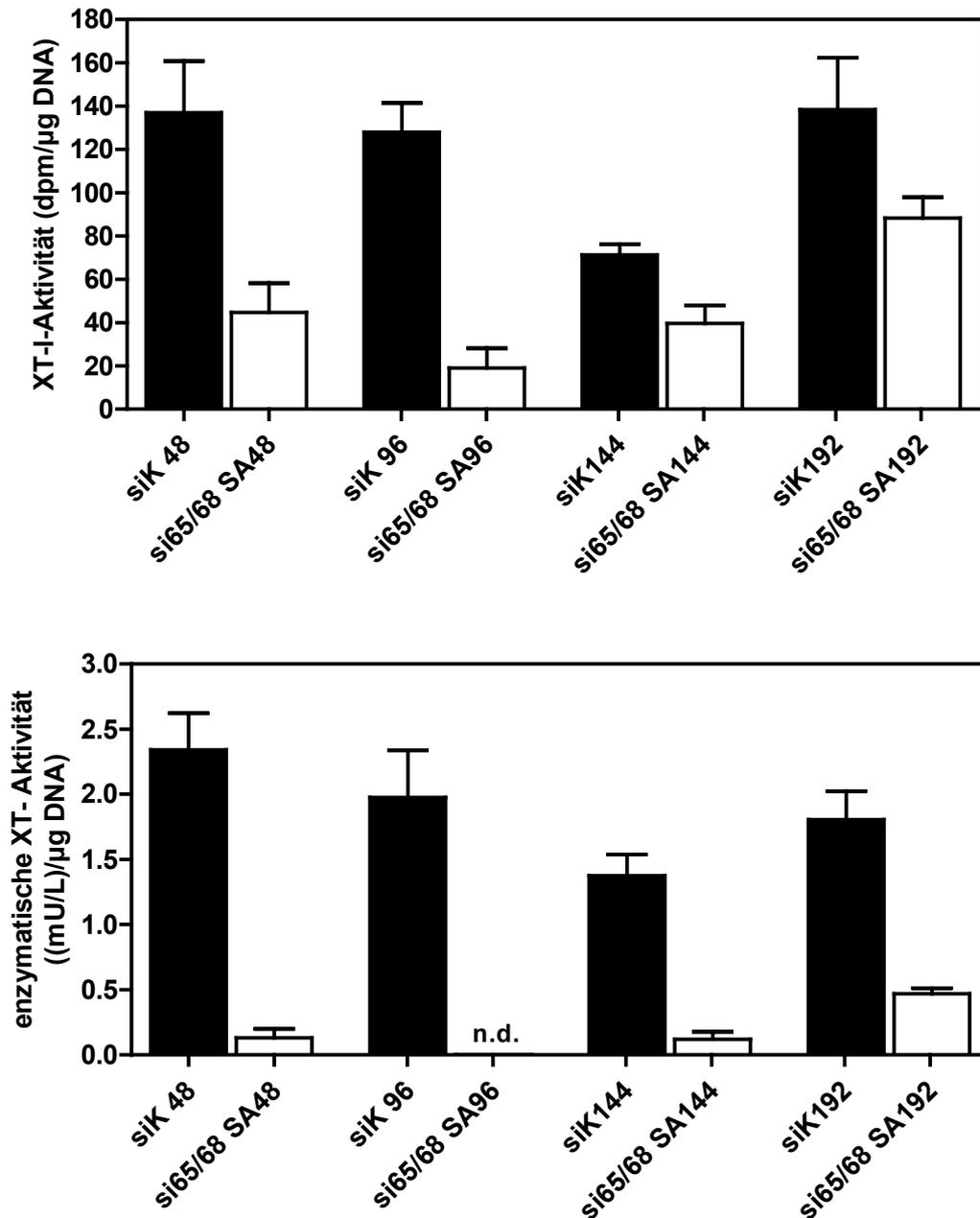
Die Expression der XT-II-mRNA zeigte im Vergleich zur Einzeltransfektion mit XT-II-siRNA keine Unterschiede auf. Die mRNA-Expression bei SAOS-2-Zellen war über den gesamten Zeitraum von 192 h annähernd um 70% ( $\pm 9\%$ ) vermindert. Hingegen erfolgte bei SW1353-Zellen nach 192 h ein leichter Anstieg der XT-II-mRNA-Expression auf 45% ( $\pm 6\%$ ) vom Kontrollniveau.

#### **3.4.4.2 Analyse der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach parallelem XT-I- und XT-II-siRNA vermitteltem *Knock-down***

Die Kinetik der radiochemisch detektierten XT-I-Enzymaktivität zeigte einen zur Einzeltransfektion mit XT-I-siRNA parallelen Verlauf. Abweichend zeigte sich jedoch, dass die Enzymaktivitäten im Zellkulturüberstand der doppelt transfizierten SAOS-2-Zellen eine deutlich stärker verminderte XT-I-Aktivität aufweisen.

Mit 19 dpm/ $\mu$ g DNA wurde nach 48 h die geringste Enzymaktivität detektiert, wobei dies einer um 85% zur Kontrolle herabregulierten XT-I Expression entspricht (Abb. 3.35). Bei einer zu SAOS-2-Zellen identischen Enzymkinetik wurde bei SW1353-Zellen nach ebenfalls 48 h eine minimale um 67% ( $\pm 9\%$ ) verringerte XT-I-Aktivität beobachtet.

Eine vergleichbare Kinetik, mit stärker verminderten XT-Enzymaktivitäten, wurde mit dem Bio-BIK-F-Peptid bei beiden Zelllinien detektiert. Nach 96 h konnte bei den doppelt transfizierten SAOS-2-Zellen keine XT-Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 3.35:** XT-I-Aktivität im Zellkulturüberstand von SAOS-2-Zellen nach paralleler Transfektion mit XT-Isi65 und XT-Isi68 (si65/68 SA). Die mit dem Akzeptor Seidenfibroin (obere Abbildung) und dem Akzeptor Bio-BIK-F (untere Abbildung) determinierte Enzymaktivität wurde in Intervallen von 48 h nach der Transfektion der SAOS-2-Zellen detektiert. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung.

## 4 Diskussion

Die Synthese der GAG-Ketten erfolgt durch den initialen Transfer von Xylose auf ausgewählte Serin-Reste im Proteoglykan-Core-Protein und wird durch die XT-I katalysiert [42, 44, 51]. Eine Beteiligung dieses Enzyms an einer Vielzahl biologischer sowie pathologischer Prozesse konnte bereits in vorherigen Studien gezeigt werden [45, 46, 48, 50, 97-101]. Die regulatorischen Mechanismen, die für eine gesteigerte XT-I-Expression verantwortlich sind, als auch der kausale Zusammenhang zwischen einer vermehrten Enzymaktivität und einer erhöhten Deposition von GAG konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Die XT-II stellt ein zur XT-I hoch homologes Gen dar [51]. Dabei war die physiologische Funktion dieses Gens bislang gänzlich unbekannt. Es konnte weder ein Nachweis auf Proteinebene noch auf Enzymaktivitätsebene erbracht werden.

### 4.1 Funktion und Regulation der XT-I bei kardialer Fibrose

Die DCM stellt die häufigste Form der Herzmuskelschwäche dar. Bisher gibt es keine effektive Therapie, welche die fortschreitende Dilatation und Fibrosierung des Myokards nachhaltig reduzieren kann. Im Endstadium der DCM stellt neben einer Implantation ventrikulärer Unterstützungssysteme die Transplantation des Organs die einzige Möglichkeit zur Aufrechterhaltung der Kreislauffunktion des Patienten dar.

Bei der DCM ist neben einer Überproduktion von Kollagen die vermehrte Biosynthese von Proteoglykanen charakteristisch für die kardiale Fibrose [57, 67, 68, 102]. Dabei sind vor allem erhöhte Werte des Zytokins TGF- $\beta_1$ , welches von HCFs sezerniert wird, hauptverantwortlich für die Progression der intensiven Matrixdeposition [66, 103]. Proteoglykane mit ihrer Diversität an GAG-Ketten, welche einen Hauptbestandteil der ECM im Myokard darstellen, vermitteln multiple Funktionen. Es handelt sich dabei um die Modulation der Wachstumsfaktoraktivitäten, die Regulation der Kollagenfibrillogenese und die Zugfestigkeit des Gewebes [104-107]. Die Kenntnisse über die regulatorischen Mechanismen, welche zu einer erhöhten Produktion von GAG-Ketten und Proteoglykanen führen, sind sehr unzureichend.

#### 4.1.1 Expression der XT-I in Myokardproben von DCM-Patienten

In anderen Studien konnte bereits dargestellt werden, dass es während der linksventrikulären Fibrosierung zu einer vermehrten Produktion von Kollagen Typ I und Proteoglykanen im affektierten Gewebe kommt [67, 69-71]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte

erstmalig nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer linksventrikulären DCM neben einer deutlich gesteigerten Deposition von GAG im Vergleich zu einem gesunden Kontroll-Kollektiv zusätzlich signifikant erhöhte Expressionswerte für die XT-I-mRNA im linken Ventrikel aufweisen. Diese Daten konnten außerdem mit einer erhöhten XT-I-Enzymaktivität korreliert werden.

Die Ergebnisse der kardialen Fibrose stehen im Einklang mit vorherigen Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass eine gesteigerte GAG-Biosynthese bei dem generalisierten fibrotischen Prozess der systemischen Sklerose mit einer erhöhten XT-I-Aktivität korreliert [43].

Die Tatsache, dass sowohl DCM-Patienten als auch gesunde Kontroll-Patienten eine erhöhte XT-I-Expression im linken Ventrikel aufweisen, lässt sich wahrscheinlich über die unterschiedliche mechanische Belastung beider Ventrikel erklären. Die mechanische Belastung des Myokards wurde bereits als Induktor der gesteigerten Kollagen Typ I-Biosynthese diskutiert [66].

Während der rechte Ventrikel für die Beförderung von sauerstoffarmen Blut in die Lungenstrombahn zuständig ist, pumpt der linke Ventrikel das mit Sauerstoff angereicherte Blut über die Aorta in den gesamten Körper. Der linke Ventrikel ist somit einer größeren mechanischen Belastung ausgesetzt, welche z.B. bei einem Hypertonus, bedingt durch Arteriosklerose, deutlich ansteigt und somit oft ursächlich für die DCM ist.

#### **4.1.2 Mechanischer Stress als Induktor einer gesteigerten XT-I-Expression**

Das Fortschreiten der zumeist irreversiblen Erkrankung DCM geht mit einer Dilatation des Herzens einher. Die Vergrößerung und somit der Funktionsverlust des Myokards korrelieren mit einer erhöhten ventrikulären Wandspannung. Unter dieser mechanischen Belastung kommt es durch kardiale Fibroblasten zu einer vermehrten Sezernierung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$ , welche für eine gesteigerte Produktion von Kollagen Typ I verantwortlich ist [108].

Anhand der Ergebnisse der *in vitro*-kultivierten und mechanisch gestressten HCFs konnte gezeigt werden, dass die Expressionsrate der XT-I unter mechanischer Expansion signifikant hochreguliert wird. Dabei konnte über eine Analyse der XT-I-mRNA-Halbwertszeit eindeutig nachgewiesen werden, dass eine reale Steigerung der XT-I-Transkriptionsrate und keine verlängerte mRNA-Stabilität vorliegt.

Über die Zugabe von neutralisierendem anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper wurde nachgewiesen, dass bei *in vitro*-kultivierten und mechanisch gestressten HCFs das Zytokin TGF- $\beta_1$  wesentlich für die Induktion der XT-I-Expression verantwortlich ist.

Bereits aus anderen Studien ist bekannt, dass Decorin in der Lage ist TGF- $\beta_1$  zu binden und zusätzlich in HCFs ein starker Induktor der Decorin-Expression ist [3, 109]. Das bedeutet, dass Decorin eventuell als ein negatives regulatorisches Element bei der kardialen Fibrose agiert. Ebenfalls konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit belegt werden, dass im kardialen Gewebe von DCM-Patienten ein deutlich gesteigerter Decorin-Gehalt immunologisch detektiert werden kann. Die Tatsache, dass bei *in vitro*-kultivierten HCFs jedoch keine signifikante Expressionssteigerung des *Core*-Proteins detektiert wurde, könnte aus dem vereinfachten Modellsystem resultieren.

#### **4.1.3 TGF- $\beta_1$ -induzierte Regulation der XT-I-Expression in HCFs**

Zur direkten Analyse des TGF- $\beta_1$ -induzierten Effekts auf die XT-I-Expression wurden HCFs mit rekombinantem TGF- $\beta_1$  inkubiert. Die durch TGF- $\beta_1$  bedingte Hochregulation der XT-I-Expression konnte wiederum durch die Zugabe des p38-MAP-Kinase Inhibitors SB 203580 effektiv reduziert werden.

Das bedeutet, dass Transkriptionsfaktoren des *Smad*-Signalwegs an der transkriptionellen Regulation der XT-I beteiligt sind. Die Analyse eines 600 bp großen potentiellen Promotorbereichs der XT-I ergab, dass sich vor dem ersten Exon der XT-I-DNA zahlreiche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die über eine *Smad*-Signalkaskade aktiviert werden, befinden. Eine Klonierung des Promotors und somit eine Identifizierung wichtiger Transkriptionsfaktorbindestellen konnte aufgrund eines sehr hohen GC-Gehalts der zu klonierenden Sequenz leider nicht erfolgreich durchgeführt werden.

#### **4.1.4 Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand von mechanisch gestressten und mit TGF- $\beta_1$ inkubierten HCFs**

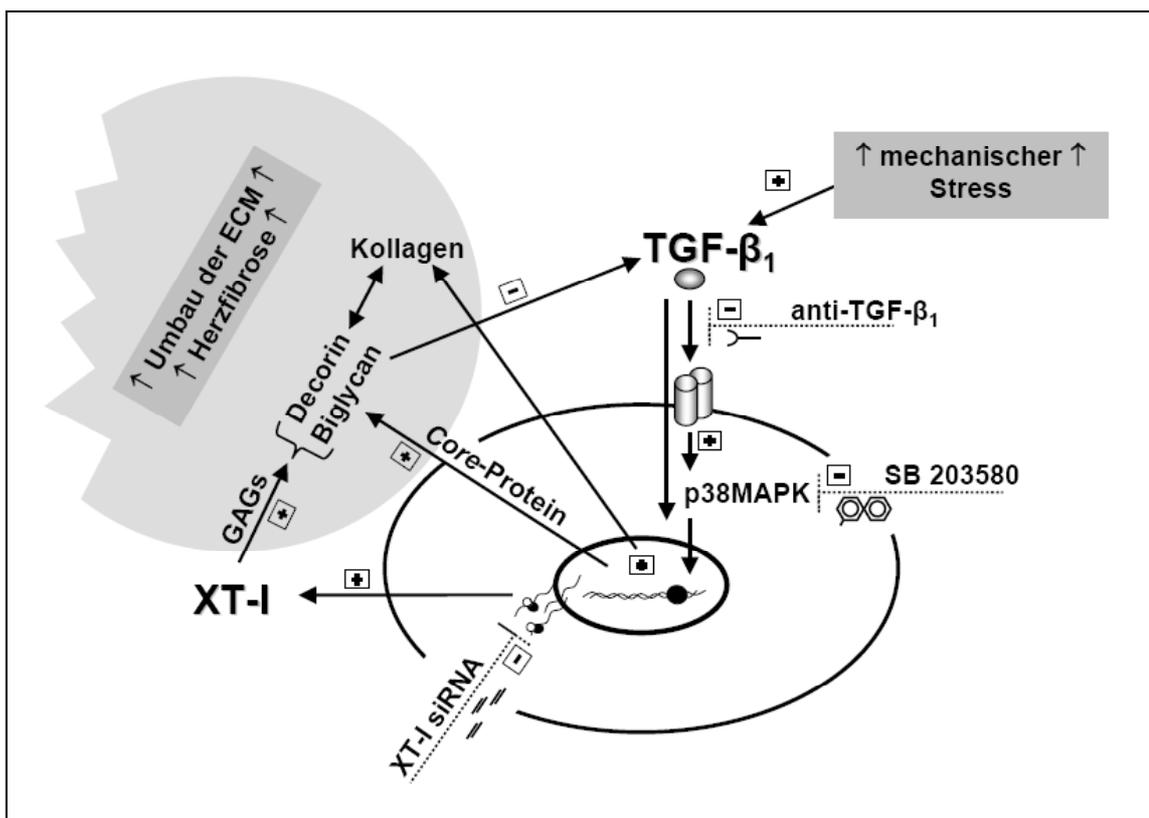
Sowohl bei mechanisch gestressten HCFs als auch bei mit TGF- $\beta_1$  inkubierten Fibroblasten konnte im Zellkulturmodell erstmals gezeigt werden, dass das Expressionsniveau der XT-I direkt mit der GAG-Syntheserate korreliert. Über die Detektion der GAG wurde somit erstmals nachgewiesen, dass die Regulation der XT-I bei HCFs in einem direkten Zusammenhang mit der GAG-Konzentration im Zellkulturüberstand steht.

Dieser kausale Zusammenhang konnte besonders eindrucksvoll durch die Verwendung von siRNA demonstriert werden. Die Ergebnisse der mit XT-I-siRNA transfizierten HCFs zeigen eindeutig, dass die XT-I das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der kardialen GAG-Synthese ist. Dieses Ergebnis bestätigt somit vorherige Studien, bei denen die XT-I als limitierender Faktor der GAG-Biosynthese diskutiert wurde [39, 110].

Zusätzlich zeigt die spezifische Inhibition der XT-I in HCFs einen möglichen therapeutischen Ansatz auf, durch den die vermehrte Produktion von GAG und der dadurch bedingte Funktionsverlust des Myokards bei der DCM reduziert werden kann.

#### 4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse bei der DCM

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals neue Einblicke in die pathologischen Mechanismen des Umbaus der myokardialen Matrix bei der DCM aufgezeigt werden. Während der Progression der Krankheit stellt die erhöhte ventrikuläre Wandspannung mit einer vermehrten Sezernierung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta_1$  einen potenten Induktor der XT-I-Expression dar. Die Induktion der XT-I-Genexpression erfolgt über Transkriptionsfaktoren der p38-MAP-Kinase-Kaskade, wobei eine gesteigerte XT-I-Enzymaktivität wiederum in direktem Zusammenhang mit einer verstärkten Deposition von GAG steht (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Modell für das regulatorische Zusammenspiel von XT-I, TGF- $\beta_1$ , Proteoglykanen und GAG bei der kardialen Fibrose. Die verschiedenen interferierenden Faktoren wie anti-TGF- $\beta_1$ -Antikörper, p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB 203580 und XT-I-siRNA während des Prozesses der kardialen Fibrose sind ebenfalls illustriert.

## 4.2 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Während der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen stellen sowohl die Neusynthese als auch der Umbau der ECM einen entscheidenden Faktor für die physiologische Effizienz des *in vitro*-kultivierten Knorpels dar [111, 112]. Besonders die mechanische Belastbarkeit korreliert direkt mit dem Proteoglykangehalt im Knorpelgewebe. Die Kenntnisse über die Regulation der an der Proteoglykanbiosynthese beteiligten Enzyme sind jedoch nur unzureichend. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals der TGF- $\beta_3$ -induzierte Effekt bei der Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen differenziert analysiert. Dabei wurde die Expression der XT-I und weiterer an der Initiation und Differenzierung der Chondroitinsulfat-, Dermatan-sulfat- und Heparansulfat-Proteoglykanbiosynthese beteiligter Enzyme und Core-Proteine auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

### 4.2.1 Unterschiedliche Regulationsmuster der XT-I und XT-II während der chondrogenen Differenzierung

Die XT-I katalysiert den initialen und geschwindigkeitslimitierenden Schritt bei der Biosynthese der GAG-Ketten in Chondroitinsulfat-, Dermatan-sulfat-, und Heparansulfat-Proteoglykanen und stellt somit ein Schlüsselenzym für die ECM-Biosynthese dar [37, 38]. Eine gesteigerte mRNA-Expression sowie eine erhöhte Enzymaktivität im Zellkulturüberstand während der frühen Phase der chondrogenen Differenzierung zeigen die essentielle Funktion dieses Enzyms beim Aufbau einer, für das Knorpelgewebe charakteristischen, chondrogenen Matrix.

Die prädominante Beteiligung der XT-I an frühen Stadien des Knorpelsaufbaus konnte zusätzlich durch die immunhistologischen Färbungen bestätigt werden. So wurde erstmals gezeigt, dass in frühen Stadien der Chondrogenese, in denen die Neubildung der ECM prädominant stattfindet, die XT-I in der gesamten Knorpelmatrix exprimiert wird. Zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme des XT-I Gehalts in der Knorpelmatrix. Dies könnte bedeuten, dass die Synthese des Tetrasaccharid-Linkers zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist und dass die XT-I in fortgeschrittenen Stadien der ECM-Synthese keine weitere physiologische Funktion mehr beinhaltet. Die Expressionskinetik der immunologisch detektierten Chondroitinsulfat-GAG-Ketten scheint dies zu bestätigen, da eine vermehrte Detektion dieser Oligosaccharid-Ketten erst in späteren Differenzierungsstadien erfolgte.

Leicht differierende Expressionskinetiken der XT-I-mRNA im Vergleich zur Enzymaktivität der XT-I lassen sich über unterschiedliche Halbwertszeiten der beiden Parameter erklären. Die XT-I wird zusammen mit Proteoglykanen vom Golgi-Apparat in den extrazellulären Raum

sezerniert. Das physiologisch stabile Enzym kann somit im Zellkulturüberstand akkumulieren und dadurch selbst nach einer Reduktion der XT-I-mRNA-Expression erhöhte Enzymaktivitätslevel bedingen.

Die XT-II zeigte während der chondrogenen Differenzierung eine zur XT-I differierende mRNA-Expression. Ein gesteigerter mRNA-Gehalt wurde parallel zur XT-I zwei Tage nach Induktion der Chondrogenese und ein Expressionsmaximum nach sieben Tagen der Stammzellendifferenzierung beobachtet. Da im Rahmen der chondrogenen Stammzellendifferenzierung zwischen Tag 7 und Tag 28 keine weiteren Messpunkte aufgenommen wurden, ist somit ein zu späteren Differenzierungsstadien hin verschobenes mRNA-Expressionsmaximum möglich.

Die physiologische Funktion der XT-II war bisher unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch erstmals durch den gezielten Einsatz von *Antisense*-RNA bestätigt werden, dass die XT-II nicht nur aufgrund ihrer Sequenzhomologie zur XT-I als Xylosyltransferase bezeichnet werden darf, sondern auch aufgrund der erstmals nachgewiesenen Xylosyltransferaseaktivität. Mit dieser neuen Erkenntnis erscheint die Regulation der XT-II-mRNA-Expression, mit einem im Vergleich zur XT-I späteren Expressionsmaximum, durchaus interessant. So ist die XT-II möglicherweise an der GAG-Kettensynthese bei späteren Differenzierungsstadien der Knorpelbildung involviert oder für die Glykosylierung von *Core*-Proteinen zuständig, welche sich nicht im Spezifitätsspektrum der XT-I befinden.

#### **4.2.2 Regulation der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Biosynthese während der chondrogenen Differenzierung**

Abgesehen von Aggrecan, welches den Hauptbestandteil der ECM des Knorpels ausmacht, wurde die Regulation des Decorin-*Core*-Proteins detailliert analysiert. Bei Decorin kann eine Chondroitinsulfat- oder Dermatansulfat-Kette am Proteinerückgrat gebunden sein, welche wahrscheinlich zusätzlich zum *Core*-Protein bei der Kollagenfibrillogenese an der Diskriminierung des Fibrillenabstands beteiligt ist [104-106].

Die immunhistochemische Analyse zeigte eine breite Verteilung des *Core*-Proteins innerhalb der Cryoschnitte differenzierender Chondrocyten. Erwartungsgemäß wurde eine äquivalente Lokalisation des immunologisch detektierten Decorins und der chemisch angefärbten ECM detektiert. Dabei konnte parallel zur mRNA-Expression während der Knorpeldifferenzierung ebenfalls immunologisch ein Anstieg des Decorin-Gehalts beobachtet werden.

In diesem Zusammenhang ist die mRNA-Expression der GlcAC5E sehr interessant. Die GlcAC5E katalysiert die irreversible Epimerisierung von Chondroitinsulfat zu Dermatansulfat [113]. Nach Induktion der Chondrogenese wurde für die mRNA dieses Enzyms eine

signifikante Abnahme innerhalb der ersten Kultivierungswoche und ein signifikant gesteigerter mRNA-Gehalt zum Ende der Chondrogenese beobachtet.

Eine Epimerisierung der einzigen Chondroitinsulfat-GAG-Kette des Decorins zu Dermatansulfat könnte in diesem Zusammenhang Auswirkungen auf die Kollagenfibrillogenese haben. Da für Kollagen Typ II ein maximaler Anstieg der mRNA-Expression und des Proteingehalts (nachgewiesen über Siriusrot-Färbung) erst zum Ende der Chondrogenese detektiert wurde, interagiert dieses Protein eventuell vermehrt mit Decorin, welches eine Dermatansulfat-Kette trägt.

Für die GalNAcT, welches ein Schlüsselenzym bei der Initiation der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Ketten ist, konnte eine zur GlcAC5E ähnliche transkriptionelle Regulation beobachtet werden. Es wurde intermediär ein reduzierter mRNA-Gehalt und eine gesteigerte mRNA-Expression nach fünf Tagen chondrogener Differenzierung festgestellt.

#### **4.2.3 Regulation der Heparansulfat-Biosynthese nach Induktion der chondrogenen Differenzierung**

Im Rahmen der Chondrogenese wurde die Regulation der Heparansulfat-Proteoglykane Glypican-3 und Perlecan näher untersucht. Sowohl Glypican-3 als auch Syndecan-2 gehören zu der Gruppe der Zelloberflächenproteoglykane und sind an der Initiation und Regulation der chondrogenen Entwicklung beteiligt [114].

Für Glypican-3 konnte erst nach fünf Tagen chondrogener Differenzierung eine mRNA-Expression detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigte sich ein signifikanter Expressionsanstieg, der sich parallel zur Transkription von EXTL2 verhielt. Dieses parallele Expressionsverhalten zeigt eine direkte Korrelation zwischen dem Heparansulfat-Ketten initiierenden Enzym und seinem Substrat.

Perlecan ist das prädominante Heparansulfat-Proteoglykan im Knorpel und beinhaltet eine wichtige physiologische Funktion bei der Entwicklung der chondrogenen Matrix [115-118]. Nach einer initialen Reduktion des mRNA-Gehalts wurde auch für dieses Proteoglykan parallel zur GalNAcT ein Expressionsanstieg nach sieben Tagen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass während der chondrogenen Morphogenese sowohl die Expression der modifizierenden Enzyme als auch die der Proteoglykan-Core-Proteine den gleichen Regulationsmustern folgen.

#### **4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung**

Im Einklang mit vorherigen Studien zeigte sich, dass die Detektion von Standardmarkern der Chondrogenese wie Aggrecan und Kollagen Typ II eine Einteilung der ECM-Biosynthese in

verschiedene Stadien zulässt [111, 119]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte nun erstmals gezeigt werden, dass auch die differenzierte Analyse der am Aufbau der GAG-Ketten beteiligten Enzyme sehr hilfreich für eine Beurteilung des Fortschritts der ECM-Synthese ist.

Erhöhte Expressionswerte von XT-I, EXTL2 und GalNAcT sind ein Hinweis auf eine neu synthetisierte Matrix, wobei eine gesteigerte Expression der GlcAC5E in Verbindung mit einer irreversiblen Epimerisierung von Chondroitinsulfat zu Dermatansulfat steht.

In Bezug auf den Verlauf der chondrogenen Differenzierung konnte erstmals nachgewiesen werden, dass sowohl die Schlüsselenzyme der GAG-Biosynthese als auch die korrespondierenden *Core*-Proteine in sehr koordinierten parallelen Expressionsmustern reguliert werden. In diesem Zusammenhang ist die gesteigerte Expression von Kollagen Typ II in frühen Stadien der Chondrogenese sehr interessant. Sowohl Kollagen als auch Proteoglykane zeigen nach ca. fünf Tagen teilweise identische Expressionsmuster, wodurch das komplexe Zusammenspiel dieser Matrixkomponenten verdeutlicht wird.

Die XT-I scheint im Rahmen der Chondrogenese eine Ausnahmeposition einzunehmen. Dieses für die GAG-Biosynthese essentielle Enzym ist in sehr frühen Stadien der Matrixsynthese signifikant erhöht. Aus diesem Grund scheint die XT-I bei der chondrogenen Proteoglykanbiosynthese den limitierenden Faktor darzustellen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit vorherigen Studien, welche die XT-I als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Proteoglykan-Biosynthese identifiziert haben. Andere Studien konnten zudem zeigen, dass die XT-I-Aktivität im Serum ein biochemischer Marker zur Beurteilung der Ausprägung von Gelenkknorpelschäden bei Osteoarthritis ist und dass Mutationen im XT-II-Gen mit einer frühen Manifestation dieser Krankheit in Verbindung stehen [100]. Es scheinen also beide Xylosyltransferasen essentiell am Aufbau, an der Regeneration und am Abbau der ECM beteiligt zu sein.

### 4.3 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Bei der osteogenen Differenzierung stellen neben Kollagen Typ I auch Proteoglykane einen Hauptbestandteil der organischen Komponente der kalzifizierten Matrix dar. Besonders bei der Strukturgebung der osteogenen Matrix sind Proteoglykane wie z.B. Decorin von essentieller Bedeutung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der AP, welche im Rahmen der Ossifikation für den Aufbau anorganischer Matrix essentiell ist, positiv mit der Expression der XT-I korreliert [120].

Im Rahmen der Arbeit wurden deshalb erstmals die Regulationsmuster der an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligten Enzyme und *Core*-Proteine differenziert analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die analysierten Zielgene während der osteogenen Differenzierung eine zur Chondrogenese differierende Expressionskinetik aufweisen.

#### 4.3.1 Expressionskinetik der XT-I und XT-II im Rahmen der osteogenen Differenzierung

Die XT-I zeigte als initiales Enzym der GAG-Biosynthese einen Expressionsanstieg auf mRNA- und Enzymebene mit einem maximalen Expressionsniveau an Tag 10 und verminderten Expressionswerten zum Ende der Osteogenese. Analog zu Ossifikationsstudien mit SAOS-2-Zellen konnte auch bei der osteogenen Stammzellendifferenzierung eine zur XT-I parallel regulierte AP beobachtet werden.

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf die vermutlich elementare Bedeutung der XT-I zum Zeitpunkt der osteogenen Matrixformation. Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Proteoglykane besonders in der Phase der osteogenen Matrixassemblierung immunologisch verstärkt detektiert werden können [121, 122].

Im Vergleich zur Chondrogenese zeigt sich, dass die XT-I ein um acht Tage versetztes Expressionsmaximum aufweist und somit zumeist zeitgleich mit anderen an der Matrixformation beteiligten Enzymen und Proteoglykan-*Core*-Proteinen exprimiert wird. Bei der chondrogenen Differenzierung wurde die XT-I zu deutlich früheren Stadien der Matrixformation und zudem nicht im Verbund mit anderen an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligten Zielgenen hochreguliert.

In diesem Zusammenhang ist die Regulation der XT-II sehr interessant. Während bei der osteogenen Differenzierung für die XT-II keine signifikante Expressionsänderung im Verlauf der Kultivierung beobachtet wurde, konnte bei der Chondrogenese eine gesteigerte XT-II-Expression mit zwei Expressionsmaxima detektiert werden. Diese differierenden Expressionskinetiken beider Differenzierungswege könnten bedeuten, dass die XT-II während der chondrogenen Differenzierung wichtige Funktionen bei der GAG-Biosynthese beinhaltet,

jedoch nicht bei der osteogenen Differenzierung. Ein möglicher Grund sind die bei den beiden Differenzierungswegen jeweils unterschiedlichen Proteoglykane, welche prädominant exprimiert werden und somit natürlich auch unterschiedliche O-Xylosylierungstellen aufweisen.

#### **4.3.2 Regulation der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Biosynthese während der osteogenen Differenzierung**

Die im Verlauf der Osteogenese detektierte Expressionskinetik der GalNAcT, welche ein Schlüsselenzym der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-GAG-Ketten darstellt, zeigte einen zur XT-I identischen Expressionsverlauf. Das Transkriptionsmaximum der GalNAcT wurde jedoch erst nach 14 Tagen osteogener Differenzierung beobachtet.

Ein zu späteren Kultivierungsstadien verschobenes Expressionsmaximum dieses Enzyms könnte analog zur chondrogenen Differenzierung bedeuten, dass erst nach der Initiation des Tetrasaccharid-Linkers durch die XT-I die Transkriptionsrate weiter, an der GAG-Biosynthese beteiligter, Enzyme hochreguliert wird.

In diesem Zusammenhang ist die Regulation der Expression des Proteoglykan-Core-Proteins Decorin besonders interessant. So wurde bereits drei Tage nach Induktion der Osteogenese ein Expressionsanstieg beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch weder für die XT-I noch für GalNAcT ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau detektiert werden. Erst zu späteren Kultivierungszeiten wurden sowohl für die XT-I, die GalNAcT und das Decorin-Core-Protein parallel gesteigerte Expressionswerte beobachtet.

Möglicherweise liegt das Decorin-Core-Protein in frühen Stadien bei der osteogenen Differenzierung in einer nicht-glykosylierten Form vor, wie es bereits im Prädentin gefunden wurde.

Die Expressionskinetik der GlcAC5C, welche für die Epimerisierung von Chondroitinsulfat zu Dermatansulfat verantwortlich ist, zeigte im Rahmen der Osteogenese eine kontinuierliche Reduktion der mRNA-Expressionsrate. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen anderer Studien, bei denen gezeigt werden konnte, dass das Decorin-Core-Protein zu späteren Differenzierungsstadien vorwiegend mit einer Chondroitinsulfat-Kette in der Knochenmatrix vorliegt [123, 124].

#### **4.3.3 Regulation der Heparansulfat-Biosynthese bei der osteogenen Differenzierung**

Bereits zu vergleichsweise frühen Ossifikationsstadien wurde eine erhöhte mRNA-Expression des Enzyms EXTL2 als auch des Heparansulfat-Proteoglykans Glypican-3

detektiert. Das Expressionsmaximum der Glypican-3-mRNA zeigte sich zeitgleich mit dem der AP und lag somit im Zeitfenster der verstärkten Matrixmineralisierung.

Eine Beteiligung von Glypican-3 an initialen Prozessen der Ossifikation wurde noch nicht belegt. Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine Mutation im Glypican-3-Gen, bei dem Simpson-Golabi-Syndrom, eine gestörte Skelettentwicklung verursacht [125].

#### **4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse bei der osteogenen Differenzierung**

Zusammenfassend zeigte sich, dass auch bei der Osteogenese die Regulation sowohl von Schlüsselenzymen der GAG-Biosynthese als auch von Proteoglykan-Core-Proteinen in einer sehr koordinierten Weise stattfindet. Die Expressionskinetik der untersuchten Zielgene zeigte jedoch im Vergleich zur chondrogenen Differenzierung signifikante Unterschiede. Dies erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass sich die Assemblierung der ECM bei der Osteogenese im Vergleich zur Chondrogenese in einer kürzeren Zeitspanne vollzieht und zudem auch die Zusammensetzung der ECM eine andere ist.

Sehr interessant ist die differierende Expressionskinetik der XT-II. Bei der Knorpelbildung wurde für dieses Enzym eine deutlich gesteigerte mRNA-Expressionsrate detektiert, wohingegen bei der Kalzifizierung der osteogenen Matrix keine Veränderung des Expressionsniveaus beobachtet wurde.

#### **4.4 Analyse der physiologischen Funktion von XT-I und XT-II durch die siRNA-vermittelte Suppression der mRNA-Expression beider Gene**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals unter Verwendung von siRNA ein spezifischer *Knock-down* und somit eine differenzierte Analyse der physiologischen Funktion beider Xylosyltransferasen. Sowohl SW1353-Zellen, welche vorwiegend die XT-I sezernieren, als auch SAOS-2-Zellen, welche die XT-I und XT-II in einem ausgeglichenen Verhältnis exprimieren, wurden für die siRNA-Experimente verwendet. Die physiologische Funktion der XT-II war zu diesem Zeitpunkt noch vollständig ungeklärt.

##### **4.4.1 Expressionsverhalten von SAOS-2- und SW1353-Zellen nach gezielter Reduktion der XT-I-Expression**

Durch die siRNA-vermittelte Reduktion der XT-I-mRNA-Expression konnte sowohl in SW1353- als auch in SAOS-2-Zellen die XT-I-mRNA-Expression signifikant um mehr als 90% reduziert werden. Das bei SAOS-2-Zellen im Vergleich zu SW1353-Zellen der siRNA-Effekt deutlicher ausgeprägt war, lässt sich sicherlich einerseits über eine signifikant geringere XT-I-mRNA-Expression in SAOS-2-Zellen erklären, andererseits über eine langsamere Proliferationsrate der SAOS-2-Zellen.

Insbesondere bei SAOS-2-Zellen konnten aufgrund der Auswirkungen des XT-I-*Knock-downs* auf mRNA- und Enzymebene erstmals neue Erkenntnisse über beide Xylosyltransferasen gewonnen werden. Aufgrund der relativ geringen XT-I-Expression dieser Zelllinie wurde durch den XT-I-siRNA-Transfer sowohl die XT-I-mRNA als auch die XT-I-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand signifikant reduziert. Parallel zur Reduktion der XT-I-mRNA erfolgte eine Hochregulation der XT-II-mRNA-Expression. Mit einer zeitlichen Verzögerung von 48 h konnte mithilfe des neuen Akzeptorsubstrats Bio-BIK-F erstmals auch eine erhöhte O-Xylosilierungsaktivität im Zellkulturüberstand detektiert werden, welche nicht durch die XT-I bedingt war. Durch Ergebnisse des XT-I-*Knock-downs* konnten somit erstmals Zusammenhänge bei der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression aufgezeigt werden. Zusätzlich konnte durch die erhöhte Xylosyltransferaseaktivität im Zellkulturüberstand, welche nach der siRNA-Transfektion nicht durch die XT-I bedingt war, ein erster Hinweis auf eine mögliche XT-II-Aktivität gegeben werden.

##### **4.4.2 Expressionsverhalten von SAOS-2- und SW1353-Zellen nach gezielter Reduktion der XT-II-Expression**

Die Vermutung, dass nach einer Reduktion einer XT die jeweils andere XT über einen Rückkopplungsmechanismus hochreguliert wird und somit eine verminderte XT-Aktivität

kompensiert, konnte auch durch eine Supprimierung der XT-II-mRNA bei beiden Zelllinien bestätigt werden.

Sowohl bei SAOS-2- als auch bei SW1353-Zellen erfolgte nach einer Reduktion der XT-II-mRNA zeitgleich versetzt eine signifikante Hochregulation der XT-I-mRNA.

Während bei SAOS-2-Zellen eine kontinuierliche Steigerung der XT-I-mRNA-Expressionsrate über den gesamten Kultivierungszeitraum detektiert wurde, erfolgte bei SW1353-Zellen nach einer initialen Hochregulation der XT-I-mRNA zum Ende der Kultivierung eine Verminderung der Transkriptionsrate auf eine Wertlage unterhalb des Kontrollniveaus.

Diese Ergebnisse sprechen für einen sensitiven Feedbackmechanismus beider Zelllinien, wobei ein Defizit an XT-II-Aktivität durch eine vermehrte Expression der XT-I kompensiert wird. Vermutlich wird bei SW1353-Zellen aufgrund einer, im Vergleich zu SAOS-2-Zellen, deutlich höheren XT-I-Expressionsrate eine Kompensation der XT-II-Aktivität eher erreicht und somit über einen Feedbackmechanismus die XT-I-Expressionsrate schneller wieder herabgesetzt.

Basierend auf den detektierten Xylosyltransferaseaktivitäten im Zellkulturüberstand konnten die RNA-Daten bestätigt werden.

Die reduzierte XT-II-mRNA-Expression stand in einem direkten Zusammenhang mit einer signifikant verminderten XT-Aktivität, die mithilfe des Bio-BIK-F-Peptids detektiert wurde. Für die radiochemisch determinierte XT-I-Aktivität wurde ein Aktivitätsanstieg beobachtet, der mit der erhöhten XT-I-mRNA-Expression in beiden Zelllinien korrelierte.

Anhand dieser Ergebnisse kann somit erstmals eindeutig bewiesen werden, dass die XT-II analog zur XT-I in aktiver Form in den Zellkulturüberstand sezerniert wird, eine Xylosyltransferaseaktivität aufweist und analog zur XT-I eine O-Glykosylierung innerhalb einer Konsensussequenz mit einem GSG-Motiv katalysiert.

#### **4.4.3 Reduktion der mRNA-Expression beider Xylosyltransferasen nach paralleler Transfektion mit XT-I- und XT-II-siRNA**

Einen ersten Hinweis auf die physiologische Relevanz beider Xylosyltransferasen bei proliferierenden exogen nicht stimulierten Zellen zeigen die mRNA und Enzymaktivitätsdaten nach der parallelen Suppression der Genexpression von XT-I und XT-II.

Die Effizienzen bei der Reduktion der mRNA-Expression beider Xylosyltransferasen waren identisch mit denen der Einzeltransfektionen. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Kinetik des transienten siRNA-Effektes. So wurde die XT-I-mRNA bei beiden Zelllinien innerhalb der Kultivierungszeit deutlich schneller wieder hochreguliert. Die Expressionskinetik der XT-II-mRNA zeigte hingegen einen zur Einzeltransfektion identischen

Verlauf mit deutlich verminderten XT-II-mRNA-Expressionswerten über den gesamten Kultivierungszeitraum.

Diese mRNA-Ergebnisse, die auch mit den jeweiligen Enzymaktivitätstests korrelieren, zeigen, dass die XT-I im Vergleich zur XT-II in beiden Zelllinien vermutlich eine höhere Priorität im Metabolismus unter den gewählten Kultivierungsbedingungen einnimmt.

#### 4.4.4 Zusammenfassung der siRNA-Ergebnisse

Im Rahmen dieser siRNA-Experimente konnte erstmalig die Vermutung, dass die XT-II eine Xylosyltransferaseaktivität aufzeigt, bestätigt werden. Darüber hinaus wurde bewiesen, dass die XT-II, analog zur XT-I, in aktiver Form in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Die Ergebnisse geben zudem einen ersten Einblick in die koordinierte Genexpression beider Xylosyltransferasen, welche anscheinend über einen *Feedback*-Mechanismus reguliert werden und somit jeweils eine verminderte XT-Aktivität des homologen Enzyms ausgleichen können.

#### 4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Regulation der XT-I detailliert bei der pathologischen Gewebsdegeneration der DCM aufgeklärt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die XT-I-Expression über den p38-MAP-Kinase-Weg induziert wird. In zukünftigen Studien sollte eine Klonierung des Promotorbereiches der XT-I Aufschluss über die an der Genexpression beteiligten Transkriptionsfaktoren geben. Ein besseres Verständnis über die transkriptionelle Aktivierung der XT-I wäre insbesondere im Hinblick auf die ubiquitäre Beteiligung dieses Enzyms an einer Vielzahl von biologischen und pathobiologischen Prozessen sehr wichtig.

Abgesehen von der XT-I konnten die komplexen Regulationsmuster der an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligten Enzyme und *Core*-Proteine, bei der Formation der ECM während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung näher beleuchtet werden. Insbesondere die differierenden Expressionsmustern beider Xylosyltransferasen sollten Gegenstand weiterer Studien sein. Durch eine gezielte Inaktivierung jeweils eines dieser beiden Enzyme könnten die physiologischen Funktionen der XT-I und XT-II, im Rahmen der Neubildung bzw. beim Umbau extrazellulärer Matrix, genauer analysiert werden.

Als erster Schritt eines *Knock-out's* beider Xylosyltransferasen wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich ein siRNA-vermittelter *Knock-down* etabliert. Bereits durch die Verwendung von siRNA konnte erstmalig für die XT-II eine Xylosyltransferaseaktivität nachgewiesen

werden. Zudem wurde ein kompensatorischer Rückkopplungsmechanismus aufgezeigt, der die Expression beider Xylosyltransferasen synchronisiert.

Die Entwicklung einer XT-I- und einer XT-II-*Knock-out*-Maus könnten wichtige Hinweise auf die genaue Funktion beider Enzyme geben und somit auch dem Verständnis für die Mechanismen bei biologischen und pathobiologischen Stoffwechselprozessen dienen.

Bereits durch den Einsatz des Bio-BIK-F-Peptids konnte für die XT-II eine O-Xylosylierungsaktivität nachgewiesen werden. In folgenden Studien sollten weitere spezifische Akzeptoren dieses Enzyms determiniert werden, um dadurch Konvergenzen oder auch Diskrepanzen bei der Substratspezifität der XT-I und XT-II detailliert zu analysieren.

## 5 Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion der Gesamt-RNA mit dem *RNeasy Mini Kit* basiert auf einer Anionentauscherchromatographie, bei der die RNA an einer modifizierten Silikatoberfläche gebunden wird.

Standardprotokoll für adhärent wachsende Zellen:

Nachdem das Kultivierungsmedium von den Zellen abgenommen und nicht adhärente Zellen mit PBS-Lösung aus der Zellkulturschale entfernt sind, erfolgt die Lyse der Zellen mit 500 µl Puffer RLT (inkl. 10% β-Mercaptoethanol) direkt in der Kultivierungsschale. Anschließend wird das Lysat auf eine *QIAshredder-Säule* überführt und für 2 min bei 10000 g homogenisiert. Der Durchlauf wird mit 350 µl Ethanol (70%) vermischt, anschließend vollständig auf die *RNeasy Säule* aufgetragen und für 60 s bei 10000 g zentrifugiert. Zum Entsalzen der Säule wird einmal mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit 500 µl Puffer RPE gewaschen und jeweils für 60 s bei 10000 g zentrifugiert. Nach dem Waschen mit Puffer RPE wird zum Trocknen der Säule der Durchlauf verworfen, die Säule zusätzlich für 2 min bei 10000 g zentrifugiert und anschließend in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt. Es werden 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und für 60 s bei 10000 g zentrifugiert. Zu der eluierten RNA werden 4 µl RNase-Inhibitor (*RNase Out*) zugegeben.

Standardprotokoll für kardiale Gewebeproben:

Das Myokardgewebe wird in einem vorgekühlten, sterilen, RNase-freien Mörser homogenisiert und in ein steriles Mikrozentrifugengefäß überführt. Nach Zugabe von 600 µl Puffer RLT (inkl. 10% β-Mercaptoethanol) wird das Lysat auf eine *QIAshredder-Säule* aufgetragen und für 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird anschließend für 3 min bei 10000 g zentrifugiert, der Überstand abgezogen und mit 600 µl Ethanol (70%) versetzt. Die präzipitierte RNA wird auf die *RNeasy-Säule* übertragen und analog zu dem Standardprotokoll für adhärente Zellen aufgearbeitet.

### 5.1.2 Parallele Isolierung von RNA und DNA aus eukaryotischen Zellen

Für eine parallele Isolierung von RNA und DNA aus eukaryotischen Zellen wird die Zellyse analog zu 5.1.1 durchgeführt. Zur parallelen Extraktion von DNA aus dem vorhandenen Ansatz wird nach der Fällung der Nukleinsäuren mit Ethanol ein Aliquot von 70 µl entnommen und die DNA unter Verwendung des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* isoliert.

Dabei wird das entnommene Aliquot auf eine *DNA-Blood-Kit* Säule überführt und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wird anschließend durch Zentrifugation, jeweils für 1 min bei 10000 g mit 500 µl Puffer AW1 und 500 µl Puffer AW2, entsalzt. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule zur Entfernung von Ethanolresten für 1 min bei 20000 g zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt mit 100 µl Puffer AE und Zentrifugation für 1 min bei 10000 g.

### 5.1.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Eine Quantifizierung der RNA- oder DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wird durch die Messung der Absorption bei der Wellenlänge  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $OD_{260}$ ) ermöglicht. Die Probe wird hierfür gegen den Leerwert ( $H_2O$ ) in einer Quarzküvette mit 10 mm Strahlengang gemessen. Zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration  $c$  wird der Messwert mit dem Extinktionsfaktor  $f$  multipliziert, wobei für doppelsträngige DNA  $f = 50$  und einzelsträngige RNA  $f = 40$  gilt. Zur Hintergrundkorrektur erfolgt eine zusätzliche Absorptionsmessung der Probe bei  $\lambda = 320 \text{ nm}$  ( $OD_{320}$ ). Die Nukleinsäurekonzentration der Probe berechnet sich nach der folgenden Gleichung:

$$c(\text{RNA/DNA})/[\text{ng}/\mu\text{l}] = f \times (OD_{260} - OD_{320}) \times D_F$$

dabei ist:

$c$  (RNA/DNA) = die Konzentration der RNA/DNA-Lösung in ng/µl

$OD_{260/320}$  = die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260/320 \text{ nm}$

$D_F$  = der Verdünnungsfaktorder

$f$  = ein spezifischer Faktor, abhängig von der Nukleinsäure

#### 5.1.4 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung und zur Bestimmung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge verwendet. Verschiedene Faktoren wie z.B. die Agarosekonzentration, die angelegte Spannung oder der Laufpuffer beeinflussen dabei die elektrophoretische Mobilität der negativ geladenen Nukleinsäuren in der Gelmatrix. Die Wanderung im elektrischen Feld wird im Wesentlichen durch zwei Theorien beschrieben: der Reptationstheorie und dem Ogston-Siebeffekt.

Als Matrix wird 1-2% Agarose (w/v) in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur optischen Detektion der doppelsträngigen Nukleinsäuren 10 µl Ethidiumbromid (1% in wässriger Lösung) zugesetzt (Extinktion: 302 nm, Emission: 590 nm).

Nach der Polymerisation des Gels wird die Gelkammer, mit eingesetztem Probenkamm, in der Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer überschichtet und der Probenkamm anschließend entfernt. Die jeweiligen Nukleinsäureproben werden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 30% Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von ca. 16 V/cm<sup>2</sup>.

Zur Längenbestimmung der zu trennenden Oligonukleotide werden zusätzlich zu den Proben Längenstandards, die Fragmente mit genau definierter Größe enthalten, aufgetragen.

Verwendete Längenstandards:

DNA-Längenstandard	Fragmentgrößen (bp)
1 kb Längenstandard	12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 8103, 7162, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
pUC19/Mspl- Längenstandard	501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34, 26

#### 5.1.5 RNA-Formamid-Agarose-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Überprüfung einer RNA-Isolierung wird eine Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Als Matrix wird ein 1,5 %iges Agarosegel gemäß den Standardbedingungen vorbereitet. Es werden je 2 µl RNA-Probe, 2 µl Formamid sowie 2 µl Auftragspuffer vermischt und anschließend bei 16 V/cm<sup>2</sup> aufgetrennt.

#### 5.1.6 Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Für die Klonierung synthetischer Oligonukleotide in den psiRNA3-hH1GFPzeo-G2-Vektor wurden die einzelsträngigen, komplementären Nukleotide nach dem folgendem Protokoll hybridisiert:

---

2,0 µl	Oligonukleotid 1 (25 µM)
2,0 µl	Oligonukleotid 2 (25 µM)
3,0 µl	MgCl <sub>2</sub> -Lösung (15 mM)
23 µl	Wasser

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wird der Ansatz für 3 min bei 95°C inkubiert. Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgt durch anschließendes Abkühlen des Ansatzes auf RT für 3 min. Zur Klonierung des nun doppelsträngigen Konstruktes erfolgt eine Phosphorylierung der 5'-Enden mit der T4-Polynukleotidkinase:

Standardprotokoll zur Phosphorylierung:

5,0 µl	Oligonukleotid
2,0 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
2,5 µl	T4-DNA-Ligase Puffer (10 mM ATP)
15,5 µl	Wasser

Die Phosphorylierung wird für 10 min bei 37°C durchgeführt und anschließend die T4-Kinase für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### 5.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Nach dem Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell erfolgt die Extraktion der DNA mithilfe des *QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit*. Das Prinzip der DNA-Aufreinigung basiert auf einer Bindung der Nukleinsäuren an eine Kieselgelmatrix unter Hochsalzbedingungen. Die Durchführung richtet sich nach dem Standardprotokoll.

Zu der ausgeschnittenen Gelbande wird das dreifache Volumen an Puffer QX1 und 30 µl QIAEX II zugefügt und bei 50°C für 10 min inkubiert. Die Lyse der Agarose und Adsorption der DNA werden durch das Vortexen des Ansatzes in 2 min Intervallen beschleunigt. Anschließend wird für 30 s bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird mit 500 µl Puffer QX1 gewaschen und erneut bei 10000 g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet zweimal mit 500 µl Puffer gewaschen und für ca. 15 min luftgetrocknet. Zur Elution der DNA wird das Pellet in 20 µl Tris-HCl, pH 8,5, gelöst, für 5 min bei RT inkubiert und für 30 s bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält die aufgereinigte DNA.

### 5.1.8 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription wird aus Zellen oder Geweben isolierte mRNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*; cDNA) umgeschrieben. Für diese Reaktion wird die Aktivität des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) genutzt. Es werden Oligo-dT-Primer verwendet, die dazu führen, dass nur polyadenylierte RNA revers transkribiert wird.

Zur cDNA-Synthese wird im Rahmen dieser Arbeit eine kommerziell erhältliche Reverse Transkriptase eingesetzt (*SuperScript II* Reverse Transkriptase). Es werden 1 ng bis 5 µg RNA mit 1 µL Oligo-dT-Primer (7 pmol), 1 µL dNTPs (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 12 µL aufgefüllt. Dieser Ansatz wird 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 4 µL 5x *First-Strand-Buffer* sowie 2 µL 0,1 M DTT. Der Ansatz wird gemischt und bei 42°C für 2 min inkubiert. Schließlich wird 1 µL *SuperScript II* RT hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird für 5 min bei 25°C und anschließend für 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen für 15 min bei 70°C inaktiviert.

### 5.1.9 Amplifikation von DNA

#### 5.1.9.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur DNA-Amplifikation. Es basiert auf drei sich wiederholenden Schritten, die in den aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt werden:

1. Denaturierung doppelsträngiger DNA
2. Primer Annealing
3. Primer Extension durch eine thermostabile Polymerase

Standard PCR-Ansatz (50 µl):

- 2,0 µl *Template*-DNA
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer (250 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-Mercaptoethanol)
- 0,5 µl *Forward-Primer* (25 µM)
- 0,5 µl *Reverse-Primer* (25 µM)
- 0,5 µl dNTP-Mix( dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 25 mM)
- 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 41,2 µl Wasser

Standard-PCR-Programm:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung der HotStar-Taq-DNA-Polymerase	15 min	94°C	1
Denaturierung	1 min	94°C	35
<i>Annealing</i>	1 min	55°C	
Elongation	1 min	72°C	
terminale Elongation	15 min	72°C	1
Kühlen	5 min	4°C	1

### 5.1.9.2 *Real-Time* PCR

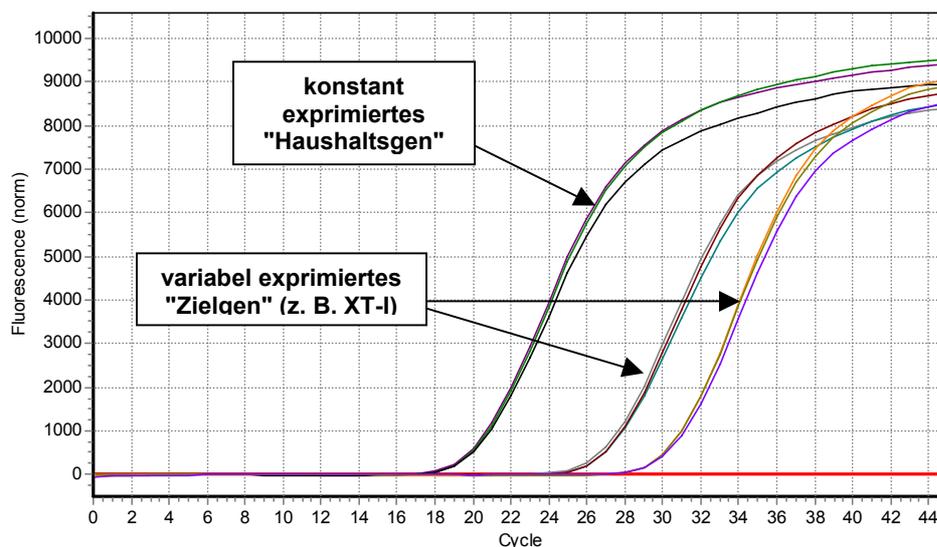
Bei der *Real-Time* PCR (Echtzeit-PCR) handelt es sich um ein PCR-Verfahren, welches den Prozess der Amplifikation und der Detektion eines PCR-Produktes vereint. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Detektion von PCR-Amplifikaten der Farbstoff *SYBR-Green* verwendet. Dieser bindet am Ende der Elongationsphase der PCR an die doppelsträngig vorliegenden PCR-Produkte und kann dann bei  $\lambda = 480$  nm angeregt und bei  $\lambda = 520$  nm detektiert werden. Wird bei einer konstanten PCR-Effizienz eine differierende Ausgangskonzentration an *Template* für die PCR-Amplifikation eingesetzt, so kann dies nach einer gewissen Anzahl von PCR-Zyklen spezifisch über die  $C_P$ -Werte determiniert werden. Der  $C_P$ -Wert ist dabei definiert als der Zeitpunkt, an dem das Hintergrundrauschen überschritten wird und somit eine Detektion der resultierenden Produkte z.B. über den Farbstoff *SYBR-Green* erfolgen kann. Für eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression eines Zielgens werden die ermittelten  $C_P$ -Werte mit denen eines konstant exprimierten „Haushaltsgens“-Gens ins Verhältnis gesetzt. Als „Haushaltsgene“ eignen sich dabei besonders Gene, die ubiquitär exprimiert werden und auch bei variablen exogenen Einflüssen auf eine Zelle ein konstantes mRNA-Expressionsniveau aufweisen.

Alle Messungen werden auf dem *LightCycler*-System der Firma Roche oder dem *Mastercycler ep realplex*-System der Firma Eppendorf durchgeführt.

### 5.1.9.3 Etablierung von *Real-Time* PCR-Systemen zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression

Zur Quantifizierung des relativen mRNA-Gehalts, der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene, wurden Testsysteme basierend auf der *Real-Time* PCR etabliert. Bei der Entwicklung dieser Testsysteme wurde darauf geachtet, dass die Amplifikation der Zielsequenz

intronüberspannend und somit spezifisch für die revers-transkribierte Ziel-mRNA (z.B. XT-I-mRNA) ist. Die verwendeten Primer zur Amplifikation und Detektion der verschiedenen mRNA-Sequenzen wurden so ausgewählt, dass diese eine Hybridisierungstemperatur von 58°C aufweisen sowie PCR-Produkte mit annähernd identischer Produktgröße und Schmelztemperatur generieren. Durch die Vorgabe dieser stringenten Kriterien wurden *Real-Time quantitative* PCR-Systeme entwickelt, bei denen sämtliche „Zielgene“ bei dem gleichen PCR-Temperaturprofil und mit annähernd gleicher PCR-Effizienz amplifiziert werden konnten. Als konstanter interner Standard, welcher für die Aussage differierender mRNA-Gehalte eines „Zielgens“ notwendig ist, wurden analog zu den oben aufgeführten Parametern *Real-Time* PCR-Systeme für ein breites Spektrum von ubiquitär exprimierten „Haushaltsgenen“ etabliert. Erst nachdem ein konstantes Expressionsniveau für ein „Haushaltsgen“, wie z.B. Ubiquitin oder  $\beta$ 2-Mikroglobulin, verifiziert wurde, erfolgte dessen Verwendung als interner Standard im Rahmen der *Real-Time quantitative* PCR.



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung einer *Real-Time quantitative* PCR zur Detektion des zum „Haushaltsgen“ relativen mRNA-Gehalts eines variabel exprimierten „Zielgens“.

Standard *Real-Time* PCR-Ansatz (20 $\mu$ l):

- 10,0  $\mu$ l Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (3 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1,0  $\mu$ l nicht acetyliertes BSA (1 mg/ml) (nur beim *LightCycler*-System)
- 0,5  $\mu$ l *Forward-Primer* (25  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l *Reverse-Primer* (25  $\mu$ M)
- 3,0  $\mu$ l Wasser (4,0  $\mu$ l beim *Realplex*-System)
- 5,0  $\mu$ l *Template*

Standard *Real-Time* PCR-Protokoll:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Uracil-N-Glykosidase Verdau	2 min	50°C	1
Aktivierung der Platinum-Taq-DNA-Polymerase	2 min	94°C	1
Denaturierung	5 sec	94°C	45
<i>Annealing</i>	10 sec	55°C	
Elongation	15 sec	72°C	
Kühlen	30 sec	30°C	1

Folgende *Primer* wurden für eine spezifische, intronüberspannende Amplifikation der Ziel- und „Haushaltsgene“ verwendet:

Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
XT-I	XT-I_F	CGGTCCTGGAGAACAGCC
	XT-I_R	CCCAATGATTTCTGATTCAC
XT-II	XT-II_F	TGGCCTGTGAGACCCCTCG
	XT-II_R	AGAAGGTGGGTCTGGAGACT
EXTL-2	EXTL-2_F	GAGAAGGCACCAGATGAA
	EXTL-2_R	CTCCAATCAGCACCATAG
GalNAcT	GalNAcT_F	CTTACACGGCCTCTGATT
	GalNAcT_R	GCTAGAGGCACGATAACA
GlcAC5E	GlcAC5E_F	CAGTTGCAAGGATACACC
	GlcAC5E_R	ACAATGTGGAAGTCCGAG
Decorin	Decorin_F	CCTTCCGCTGTCAATG
	Decorin_R	GCAGGTCTAGCAGAGTTG
Aggrecan	Aggrecan F	CCTCAGAGGAACCATCAGC
	Aggrecan R	CCACTGTGGAAGTAAGACC
Perlecan	Perlecan F	GCAGTTGGCTTCATCAG
	Perlecan R	GCAGTTGGCTTCATCAG
Syndecan-2	Syndecan F	AATGACAGCTGCTAGGAC
	Syndecan R	GGAGCTGATGAGGATGTA
Glypican-3	Glypican-3_F	GATACAGCCAAAAGGCAG
	Glypican-3_R	ATCATTCCATCACCAGAG

Gen	Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz
Kollagen Iα1	Collagen I_F	CGATGGCTGCACGAGTCACACCAG
	Collagen I_R	GTTGGGATGGAGGGAGTTTAC
Kollagen IIα1	Collagen II F	CCGGGCAGAGGGCAATAGCAG
	Collagen II R	GTTCAATGATGGGGAGGCGTGAG
AP	AP_F	ACGTGGCTAAGAATGTCATC
	AP_R	CTGGTAGGCGATGTCCTTA
Osteopontin	hOPN_F	TTGCTTTTGCCTCCTA
	hOPN_R	TTACTTGGAAGGGTCTGT
β <sub>2</sub> -Mikroglobulin	β2M_F	CGTCATCCAGCAGAGA
	β2M_R	GACAAGTCTGAATGCTCC'
GAPDH	GAPDH_F	CATGGATGACCTTGGCCAG
	GAPDH_R	TCTTCACTACCATGGAGAAGG
Ubiquitin	Ubi_F	CTCCACCTCCAGGGTGAT
	Ubi_R	GATTCAGGATAAGGAAGGCAT

#### 5.1.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR- und Restriktions-Produkten wird mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* durchgeführt. Das Prinzip dieser Aufreinigung ist dabei analog zum *QIAEX II Kit* und funktioniert als Affinitätschromatographie.

Zu dem jeweiligen Amplifikat werden 5 Volumenteile Puffer PB zugefügt und vermischt. Die *QIAquick Spin* Säule wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen eingesetzt und nach Zugabe der DNA-Lösung für 60 s bei 10000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wird die Säule in ein neues Zentrifugengefäß überführt und 50 µl Puffer EB zur Elution der DNA auf die Säule pipettiert. Diese wird 60 s bei RT inkubiert und anschließend für 60 s bei 10000 g zentrifugiert. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20°C.

#### 5.1.11 Sequenzierung von DNA Fragmenten

Die DNA Sequenzierung basiert auf dem Didesoxyverfahren (auch Kettenabbruchverfahren) nach F. Sanger. Das verwendete *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaktion Kit* enthält neben Desoxynukleotiden (dNTP) auch Didesoxynukleotide (ddNTP), die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen kovalent markiert sind. Der Einbau dieser ddNTP-Moleküle bewirkt einen Kettenabbruch, woraus eine lineare Anreicherung der unterschiedlich

langen fluoreszenzmarkierten Produkte resultiert. Eine photometrische Analyse der Produkte ermöglicht eine Rekonstruktion der Sequenz.

Für die Sequenzierreaktion wird folgender Ansatz verwendet:

- 6,0 µl Plasmid-DNA/PCR-Produkt
- 1,5 µl *Primer* (2,5 µM)
- 4,0 µl Sequenzier-*Prämix* (Puffer, MgCl<sub>2</sub>, Taq-Polymerase)
- 8,5 µl HPLC-gereinigtes Wasser

Temperaturprofil:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Denaturierung	2 min	95°C	1
Denaturierung	10 s	94°C	25
<i>Annealing</i>	10 s	48°C	
Elongation	240 s	72°C	

Folgende Primer wurden für die Sequenzierung verwendet:

Vektor	Sequenzier- <i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz</i>
psiRNA-hH1GFPzeo G2	OL178_F OL408_R	TCTTTTCTACGGGGTCTGAC GCGTTACTATGGGAACATAC
pCR-2.1-TOPO	M13_F M13_R	GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC

Die Aufreinigung des Sequenzieransatzes erfolgt mittels *Micro Bio Spin* P-30 Säulen:

Vor der Verwendung wird die Säule zur Resuspension des Gels und Entfernung von Luftblasen mehrfach invertiert. Die Spitze der Säule wird abgebrochen, die obere Kappe entfernt und die Säule in ein 2 ml Zentrifugengefäß für 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Die gepackte Säule wird in ein neues Zentrifugengefäß gestellt und 20 µl Sequenzieransatz aufgetragen. Anschließend wird für 4 min bei 3000 g zentrifugiert. Das Eluat enthält die aufgereinigte DNA und wird mit 20 µl HPLC-gereinigtem Wasser verdünnt. Nach 2 min Denaturierung bei 94°C kann der Ansatz für die Analyse eingesetzt werden.

## 5.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA

### 5.1.12.1 Plasmidisolierung von 5 ml Übernacht-Kulturen

Isolierungen von maximal 20 µg Plasmid-DNA werden mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* durchgeführt. Dieses basiert auf einer alkalischen Lyse der Zellen mit NaOH und anschließender Aufreinigung über eine Säulenaffinitätschromatographie.

Die ü/N-Kultur wird für 5 min bei 3500 g zentrifugiert, der Überstand wird anschließend verworfen. Das Pellet wird in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zur Zellyse wird 250 µl Puffer P2 zugefügt, mehrfach invertiert und für maximal 5 min inkubiert. 350 µl Puffer N3 werden zur Neutralisation zugegeben, das Lysat für 10 min bei 17000 g zentrifugiert und der Überstand auf eine *QIAprep Spin* Säule dekantiert. Die Säule wird für 30 s bei 17000 g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wird die Säule mit 0,5 ml Puffer PB sowie 0,75 ml Puffer PE gewaschen und für jeweils 30 s bei 17000 g zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird mit 50 µl 10 mM Tris-HCl eluiert. Die Dauer der Inkubation und der Zentrifugation (bei 17000 g) beträgt jeweils 1 min.

### 5.1.12.2 Plasmidisolierung von 50 ml Übernacht-Kulturen

Die Isolierung von bis zu 200 µg Plasmid-DNA erfolgt mit dem *HiSpeed Plasmid Midi Kit*. Dabei basiert die Methode, analog zum *QIAprep Spin Kit*, auf einer alkalischen Lyse mit anschließender Aufreinigung über einen Anionenaustauscher.

Es werden 50 ml ü/N-Kultur für 20 min bei 3500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 6 ml Puffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 6 ml Puffer P2 lysiert. Die Lösung wird durch Invertieren gemischt und nach 5 min mit 6 ml Puffer P3 neutralisiert. Genomische DNA und Zelltrümmer werden mithilfe des *QiAfilter Cartridges* abgetrennt und der Durchlauf auf eine mit 4 ml Puffer QVT äquilibrierte *HiSpeed* Säule aufgetragen. Anschließend wird mit 20 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Nach einer Präzipitation mit 3,5 ml Isopropanol wird die Lösung durch einen *QIAprecipitator* gedrückt und somit die DNA an die Membran gebunden. Die *QIAprecipitator*-Membran wird mit 2 ml Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend mit Luft getrocknet. Die Elution der DNA erfolgt durch 1 ml Puffer TE.

## 5.1.13 DNA-Spaltung mit Endonukleasen

Endonukleasen sind Restriktionsenzyme bakteriellen Ursprungs. Sie erkennen spezifisch DNA-Sequenzen und spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge hydrolytisch.

Standardprotokoll für Restriktionen:

20 µl	DNA (Plasmid/PCR-Produkt)
4 µl	10x Puffer
3 µl	Restriktionsenzym (5U/µl)
13 µl	Wasser

Der Restriktionsansatz wird für 90 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt oder für folgende Restriktionen mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.

#### 5.1.14 Ligation mit der T4-Ligase

Ligasen sind NAD- bzw. ATP-abhängige Enzyme, welche die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5-Phosphat-Gruppe an einem DNA-Ende und der 3-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende schließen. Durch eine Ligase können DNA-Fragmente in eine zirkuläre Form überführt werden und stehen somit für eine Transformation bzw. Transfektion zur Verfügung.

Standard Ligationsprotokoll:	3 µl	Plasmid-DNA
	9 µl	<i>Insert</i> -DNA
	2 µl	10x Puffer
	3 µl	T4-DNA-Ligase (1U/µl)
	3 µl	Wasser

Der Ligationsansatz wird für 8 h bei 25-10°C inkubiert.

## 5.2 Histologische Methoden

### 5.2.1 Vorbereitung von Mikrotomschnitten

Objektträger mit Paraffinschnitten werden für 3 h bei 52°C getrocknet und danach zur Entfernung des Paraffins für 15 min in Xylol eingetaucht. Die Schnitte werden für jeweils 10 min in einer absteigenden alkoholischen Reihe von 100%, 70%, 40% (Ethanol) und anschließend in dest. Wasser rehydriert und können danach für histologische Färbungen verwendet werden.

Kryoschnitte werden vor ihrer Verwendung für 30 min in 4°C-kaltem Aceton auf dem Objektträger fixiert und abschließend mit PBS-Puffer rehydriert.

### 5.2.2 Immunhistologische Färbung

Zur Reduktion einer unspezifischen Antikörperbindung werden die rehydrierten Schnitte für 30 min mit 100 µl einer Lösung von 3% FCS und 2% BSA in TBS inkubiert. Anschließend wird die Lösung entfernt, 100 µl des Primärantikörpers (verdünnt in *Antibody Solution*, Universal LSAB Plus-Kit AP; Dako) aufgetragen und für 60 min in einer Feuchtkammer mit gesättigter Atmosphäre inkubiert. Nachdem die Antikörperlösung durch dreimaliges Spülen mit TBS entfernt ist, wird der biotinylierte Sekundärantikörper (Universal LSAB Plus-Kit AP; Dako) aufgetragen und für 15 min inkubiert. Anschließend werden die Schnitte von Sekundärantikörper durch dreimaliges Spülen mit TBS befreit und gebundener Antikörper über eine Farbreaktion mit der Fuchsin-Plus *staining solution* (Dako) nachgewiesen.

Die verwendeten Primärantikörper werden in den folgenden Verdünnungen eingesetzt:

1. polyklonal Kaninchen IgG gegen humane XT-I: 1/100 verd. (Peptid OEK3)
2. polyklonal Kaninchen IgG gegen humanes Decorin (*core*-Protein): 1/100 verd.
3. monoklonal Hamster IgM gegen Chondroitinsulfat (CS-56, Sigma): 1/50 verd.

### 5.2.3 Nachweis von Proteoglykanen durch Alcianblau-Färbung

Proteoglykane und somit die extrazelluläre Matrix von Gewebeschnitten werden durch die Alcianblau-Färbung detektiert. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Bindung des kationischen Farbstoffs Alcianblau an die polysulfatierten GAG-Ketten von Proteoglykanen. Die Selektivität der Bindung des kationischen Farbstoffes an Proteoglykanen wird dabei über eine Absenkung des pH-Wertes erreicht.

Die zu färbenden Kryoschnitte werden in eiskaltem Aceton fixiert anschließend für 30 min in Alcianblau-Lösung (1% Alcianblau in 3% Essigsäure) inkubiert und danach in Kernechtrot-Lösung (0,1% Kernechtrot in 5% Aluminiumsulfat-Lösung) zur Färbung der Zellkerne für 5 min gegengefärbt.

### 5.2.4 Nachweis von Kollagen durch Siriusrot-Färbung

Der spezifische histochemische Nachweis von Kollagenfasern erfolgt mittels der Polarisationsmikroskopie, mit welcher selektiv die mit Siriusrot gefärbten Kollagene detektiert werden können.

Die Knorpelproben werden dafür 60 min in Siriusrot-Lösung (0,1% Siriusrot und 1,2% Pikrinsäure in wässriger Lösung) inkubiert, anschließend mit 10 mM HCl von überschüssigem Farbstoff befreit und danach für jeweils 5 min in einer aufsteigenden

alkoholischen Reihe von 50%, 70% und 100% Ethanol dehydriert. Nach Überschichtung mit xylohaltigem Eindeckmedium erfolgt die polarisationsmikroskopische Detektion.

### **5.2.5 Nachweis der Kalziumdeposition durch Färbung nach von Kossa**

Die Deposition von extrazellulärem Kalzium wird mithilfe der von Kossa-Färbung, nach einem modifizierten Protokoll von Cheng *et al.* nachgewiesen [126].

Dabei werden die Zellkulturproben mit PBS von nichtadhärenten Zellen befreit und für 10 min mit kaltem phosphatgepufferten Formalin (10%) fixiert. Formalinreste werden von den fixierten Zellen mit Wasser entfernt, anschließend wird für 1 h mit 5%-iger (w/v) Silbernitratlösung unter UV-Licht inkubiert. Nach dreimaligen Spülen mit Wasser wird überschüssiges Silber durch Inkubation mit 5%-iger Natriumthiosulfatlösung (w/v) für 2 min entfernt. Nachdem die Natriumthiosulfatlösung von der Probe durch Spülen mit Wasser entfernt ist, erfolgt die Färbung von Zellkernen und extrazellulärer Matrix, indem die Probe für 5 min mit Hämatoxylin-Lösung inkubiert wird. Abschließend wird der pH-Wert der hämatoxylingefärbten Probe durch Leitungswasser eingestellt.

### **5.2.6 Farbnachweis für die alkalische Phosphatase-Aktivität**

Das Nachweisprinzip beruht auf der enzymatischen Umsetzung des Substrates Naphthol AS-MX Phosphat zu Naphthol AS-MX, das sofort an ein Diazoniumsalz gebunden wird und an den Stellen mit Phosphatase-Aktivität ein unlösliches, sichtbares Pigment bildet.

Die Zellen wurden zunächst für 30 s in zitratgepuffertem Aceton fixiert, zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend nach Zugabe von 3 ml der Alkalifarbstofflösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie für 2 min mit Wasser gewaschen und zur Gegenfärbung der Zellkerne für 5 min mit Mayers-Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend zur mikroskopischen Untersuchung mit 2 ml Leitungswasser überschichtet.

## **5.3 Proteinchemische und klinisch-chemische Methoden**

### **5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an hydrophobe Bereiche der Proteine und nivelliert somit nicht-kovalente Wechselwirkungen, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro

Masseneinheit entstehen. Zur Auflösung der Sekundär- sowie Tertiärstruktur werden die Proben mit SDS erhitzt. Disulfidbrücken werden durch Thiolverbindungen wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert.

Es werden vorgefertigte Gradientengele (4-12% Polyacrylamid) in einem Bis-Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Das Gel wird in der Elektrophoresekammer befestigt, 200 ml MOPS-SDS Laufpuffer (20fach verdünnt) mit 500  $\mu$ l NuPAGE Antioxidanz in die innere Pufferkammer eingefüllt und die Taschen mit einer Spritze gespült. Die äußere Pufferkammer wird mit 800 ml MOPS-SDS Laufpuffer (20fach verdünnt) befüllt.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden 17  $\mu$ l Probe, 6,25  $\mu$ l SDS-Probenpuffer sowie 2,5  $\mu$ l 0,5 M DTT vermischt und für 10 min auf 70°C erhitzt. Anschließend werden 15  $\mu$ l Probe sowie 10  $\mu$ l eines Proteinstandards aufgetragen. Die Elektrophorese wird für ca. 2 h bei 120 V und 50 mA durchgeführt.

Laufpuffer (20x):	104,6 g	MOPS
	60,6 g	Tris
	10,0 g	SDS
	3,0 g	EDTA
	mit Wasser auf 500 ml auffüllen	
	pH-Wert auf 7,7 einstellen	

Probenpuffer (4x):	4,0 g	Sucrose
	0,68 g	Tris
	0,67 g	Tris-HCl, pH 8,5
	0,80 g	SDS
	6,0 mg	EDTA
	750 $\mu$ l	Serva Blau G250 (1%)
	250 $\mu$ l	Phenol Rot (1%)
	mit Wasser auf 10 ml auffüllen	

See *Blue Pre-Stained-Standard*:

Protein-Längenstandard	Größe (kDa)
Myosin	200,0
BSA	66,3
Glutamat-Dehydrogenase	55,4
Alkohol-Dehydrogen	42,6
Carboanhydrase	31,0
Myoglobin	17,8
Lysozym	14,4
Aprotinin	6,0
Insulin (B-Kette)	3,5

### 5.3.2 Coomassie-Blau-Färbung

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine werden unter Verwendung von *Coomassie-Brilliant-Blau* (Coomassie R 250) angefärbt und optisch erfasst. Eine Proteinfärbung nach dieser Methode bedingt eine Nachweisgrenze von ca. 2 µg Protein.

Standardprotokoll:

Das SDS-Gel wird für 30 min in Coomassie R 250 (0,1% in Entfärber) geschwenkt und anschließend in Entfärber gewaschen, bis der Gelhintergrund farblos ist.

Entfärber:	50%	Wasser
	40%	Methanol
	10%	Essigsäure

### 5.3.3 Western-Blot

Nach erfolgter Trennung der Proteine im SDS-Gel können diese über Elektrotransfer auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Membran übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert werden.

Der Transfer erfolgt in einer *Miniblot*-Apparatur im Nassverfahren. Dazu wurde ein Stapel aus zwei *Blotting pads*, zwei Filterpapieren, dem Elektrophoresegel, eine PVDF-Membran, zwei Filterpapieren und zwei *Blotting*-Schwämme in die Blotvorrichtung eingespannt.

*Blotting*-Schwämme und Filterpapiere werden vor ihrer Verwendung mit Transferpuffer angefeuchtet, die PVDF-Membran wird kurz in Methanol geschwenkt, anschließend in Wasser gewaschen und vor dem Auftragen auf den Blotstapel in Transferpuffer äquilibriert. Nachdem die Blotkammer mit Transferpuffer gefüllt ist, erfolgt der Transfer für 90 min bei 25 V und 175 mA.

Transferpuffer:	100 ml	Methanol
	50 ml	NuPAGE Transferpuffer (20x)
	1 ml	NuPAGE Antioxidanz
	mit Wasser auf 1000 ml auffüllen	

#### 5.3.4 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Nachdem die Proteine elektrophoretisch getrennt und auf PVDF transferiert sind, erfolgt die immunologische Detektion. Zunächst werden freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit 3% (w/v) Magermilchpulver, 0,05% v/v Tween 20 in PBS abgesättigt und für 1 h bei RT kontinuierlich geschüttelt. Danach wird die Membran mit den in PBS-Puffer (3% (w/v) Magermilchpulver, 0,05% v/v Tween 20 in PBS) verdünnten Primärantikörpern ü/N bei 4°C inkubiert und anschließend für 3 x 10 Minuten mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit HRP-gekoppeltem sekundär Antikörper (1:10000) in PBS-Puffer (3% (w/v) Magermilchpulver, 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) erfolgt für 1 h bei RT. Nachdem die Membran erneut 3 x mit PBST gewaschen wurde, erfolgt die Detektion der markierten Proteine mittels der Chemilumineszenzlösung: SuperSignal West Pico der Firma Pierce analog zu den Anweisungen des Herstellers. Die Exponierung der Röntgenfilme in einer Autoradiographiekassette wird je nach Signalintensität zwischen 5 Sekunden und 20 min durchgeführt.

#### 5.3.5 Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität

Zur Quantifizierung der XT-Aktivität in biologischen Proben stehen zwei verschiedene Messsysteme zur Verfügung. Durch die Verwendung von Seidenfibroin als Substrat für den enzymatischen Transfer von UDP-Xylose auf Serin-Reste kann sehr spezifisch die katalytische Aktivität der XT-I determiniert werden. Das etablierte Messsystem zur Detektion der XT-I Aktivität beruht dabei auf der Detektion der transferierten, radioaktiv markierten UDP-[<sup>14</sup>C]Xylose auf die Serinreste des Seidenfibroins.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der XT-Aktivität stellt die Verwendung eines Bikunin-Derivates (K1-Peptid) als Akzeptor für den XT-katalysierten Xylosetransfer dar. Das



Abschließend wird zu jeder Nitrocellulose-Membran 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und die Radioaktivität nach 12 h Inkubation im  $\beta$ -Counter gemessen.

### 5.3.5.3 XT-Aktivitätstest mittels HPLC-Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (HPLC-ESI-MS)

Grundlage dieser Methode ist der gekoppelte Einsatz einer Auftrennung des Reaktionsproduktes mittels HPLC sowie eine anschließende Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion im ESI-MS-Gerät. Die Durchführung dieser Methode ist analog zu [128].

Für die Bestimmung der XT-Aktivität werden jeweils 50  $\mu$ l Zellkulturüberstand mit 50  $\mu$ l Substratreagenz vermischt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden für 15 min bei 99°C größere Proteine in der Lösung denaturiert und durch Zentrifugation bei 20000 g für 30 min aus der Lösung entfernt. Der Überstand wird abgenommen und kann für die HPLC-Auftrennung mit anschließender ESI-MS-Detektion verwendet werden.

Substratreagenz:                    20  $\mu$ l K1-Peptid-Lösung                    (Biotin-NH-QEEEGSGGGQKK(5'-Fluoreszein)-CONH<sub>2</sub>) (OD<sub>450</sub>=0,4)  
     20  $\mu$ l UDP-Xylose (80  $\mu$ g/ml)  
     5  $\mu$ l MES-Puffer (500 mM 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl, 100 mM KF, pH 6,5)  
     5  $\mu$ l Salzlösung (100 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl)

### 5.3.6 Bestimmung der Gesamt-Kalziumkonzentration

Die Bestimmung der Gesamt-Kalziumkonzentration von Zellkulturproben beruht auf der Grundlage, dass Kalzium in sauer Lösung mit dem Farbstoff Asenazo-III einen blau-violetten Komplex ausbildet. Dieser kann photometrisch bei  $\lambda = 660$  nm detektiert werden und ist direkt proportional zur eingesetzten Kalziumkonzentration.

Die kultivierten Zellen werden vom Medium befreit und zweimal mit 1 ml kalzium- und magnesiumfreien DPBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen als auch extrazellulär abgelagertem Kalzium werden 0,5 ml 0,5 N HCl in die Zellkulturschale pipettiert, danach adhärente Zellen als Matrix mechanisch von der Oberfläche entfernt und zusammen mit der HCl in ein Mikrozentrifugengefäß überführt. Nachdem Rückstände in der Zellkulturschale nochmals mit weiteren 0,5 ml 0,5 N HCl aufgenommen sind, wird zur Extraktion des Kalziums die Zellsuspension für 24 h bei 4°C invertiert und für 5 min bei 8000 g zentrifugiert.

Die Kalziumionenkonzentration im geklärten Überstand wird photometrisch mit dem klinisch-chemischen Analysegerät ARCHITECT c8000 detektiert.

### **5.3.7 Bestimmung der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand**

Die Quantifizierung der Phosphatkonzentration im Zellkulturüberstand basiert auf der Grundlage, dass anorganisches Phosphat mit Ammoniummolybdat einen Heteropolysäure-Komplex bildet, welcher bei  $\lambda = 340$  nm detektiert werden kann. Dabei ist die Extinktion des Komplexes direkt proportional zur Konzentration des anorganischen Phosphats in der Probe. Die photometrische Detektion des Farbkomplexes erfolgt mit dem klinisch-chemischen Analysegerät ARCHITECT c8000.

### **5.3.8 Quantifizierung des Glykosaminoglykangehaltes im Zellkulturüberstand**

Die Isolierung von GAG aus Zellkulturüberstand wird nach einem modifiziertem Protokoll von Vogel *et al.* durchgeführt [129]. Dabei werden 300  $\mu$ l Zellkulturüberstand mit 1,2 ml 100% Ethanol versetzt und Proteine, einschließlich der Proteoglykane, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ausgefällt. Das Präzipitat wird mit 10000 g für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei  $60^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Anschließend wird die Probe in 300  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) aufgenommen mit 6 U Protease K versetzt und danach zur Degradierung von Proteinbestandteilen für 2 h bei  $60^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach einer zweiten Ethanol-fällung mit 1,2 ml 100% Ethanol werden präzipitierte GAG ebenfalls mit 10000 g für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert und das Pellet in dem offenen Reaktionsgefäß bei  $60^{\circ}\text{C}$  vom Lösungsmittel befreit. Zur Entsalzung der Probe wird das Pellet in 300  $\mu$ l Wasser aufgenommen und für 10 – 15 min bei 10000 g ultrafiltriert (Vivascience 500 PES, Ausschlussgröße 3kDa). Die Filtrationssäule wird, mit anschließender Zentrifugation bei 10000 g, zweimal mit 450  $\mu$ l Wasser gespült und das Retentat in ein 200  $\mu$ l Reaktionsgefäß überführt. Die entsalzte Probe wird durch Trocknung eingeengt, anschließend in 50  $\mu$ l Ammoniumacetatpuffer (pH 8, 50 mM) gelöst und nach Zugabe von 100 mU/ml Chondroitinase ABC (in 0,01% wässriger BSA-Lösung gelöst) bei  $37^{\circ}\text{C}$  ü/N inkubiert. Nach erfolgtem Chondroitinase-Verdau wird die Probe zur Denaturierung der Enzymlösung für 5 min auf  $95^{\circ}\text{C}$  temperiert, im Vakuum eingeengt, und für 2 h bei  $99^{\circ}\text{C}$  im offenen Reaktionsgefäß, zur thermischen Zersetzung von Ammoniumacetat, inkubiert.

Die Derivatisierung der GAG mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMAC wurde nach dem folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

1. 5 µl einer 0,1 M AMAC-Lösung (15% Essigsäure in DMSO) werden auf das GAG-Pellet gegeben und für 10 min bei RT inkubiert.
2. 5 µl einer 1 M wässrigen Natriumcyanoborhydrid-Lösung wird mit der Probe vermischt und anschließend für 4 h bei 45°C inkubiert.
3. Die Reaktionslösung wird mit 100 µl einer 70 %-igen Ammoniumacetat-Lösung (pH 5, in DMSO) verdünnt und mittels reverse-Phase-HPLC analysiert.

## **5.4 Zellkultur**

### **5.4.1 Myokardiale Gewebeproben von DCM-Patienten**

Die Entnahme und Zusammenstellung der myokardialen Gewebeproben wurde mit der Zustimmung der lokalen Ethikkommission durchgeführt. Die Gewebeproben des linken und rechten Ventrikels wurden zum Zeitpunkt der Herztransplantation von 18 Patienten mit chronischer Linksherzinsuffizienz entnommen. Kontrollproben von pathologisch unauffälligem ventrikulärem Myokardgewebe wurden von 6 Spenderherzen, die aufgrund technischer Gründe nicht implantiert werden konnten, erhalten.

### **5.4.2 Isolierung und Kultivierung primärer kardialer Fibroblasten**

Für die Isolierung kardialer Fibroblasten werden sowohl Myokardproben von explantierten Herzen als auch von arteriellen Fortsätzen, die während der Kanulation einer Bypassoperation entnommen wurden, in kleine Stücke zerteilt und zur Abtrennung von Erythrozyten und Fettgewebe mit PBS gewaschen. Jeweils 500 mg Gewebestücke werden anschließend zur Auflösung des Zellverbandes für 2 h bei 37°C in 5 ml einer Enzymlösung (1000 U/ml Kollagenase und 5 U/ml Protease in serumfreien DMEM) inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension durch ein Zellsieb von größeren Gewebefragmenten befreit und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird von dem Zellpellet abgenommen, die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert und nochmals für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in FCS-haltigem DMEM aufgenommen und in 75 m<sup>2</sup>-Zellkulturschalen überführt. Zur Abtrennung von Erythrozyten und Zelltrümmern wird das Medium nach 12 h Inkubation, in denen die kardialen Fibroblasten adhärirt sind, abgenommen und gegen neues gewechselt.

### 5.4.3 Mechanische Expansion und Kontraktion kardialer Fibroblasten

Als Zellkulturmodell für die dilatative Kardiomyopathie, welche mit einer gesteigerten ventrikulären Wandspannung korreliert, wurden primäre kardiale Fibroblasten in Zellkulturschalen auf einem flexiblen Boden kultiviert und in zyklischen Intervallen mechanisch deformiert. Das verwendete FlexerCell-System der Firma Dunn basiert auf dem Prinzip, dass mit einer definierten Frequenz unter dem flexiblen Zellkulturboden ein Vakuum angelegt wird, welches den Boden der Zellkulturschale und somit die adhärennten Fibroblasten mechanisch expandiert und anschließend wieder relaxiert. Bei den durchgeführten Experimenten wurde eine maximale Expansion des Zellkulturbodens von 5% bei einer Frequenz von 1 Hz eingestellt. Die Fibroblasten wurden mit diesen Parametern für 24 h mechanisch gestresst und anschließend für die mRNA-Analytik lysiert.

### 5.4.4 Bestimmung der Halbwertszeit von XT-I mRNA bei mechanisch gestressten kardialen Fibroblasten

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der XT-I mRNA in mechanisch gestressten kardialen Fibroblasten wurden die Zellen analog zu 5.4.2. kultiviert. Nachdem sowohl die mechanisch gestressten kardialen Fibroblasten als auch nicht gestresste Kontrollen für 24 h kultiviert wurden, wurde zur Inhibition des zellulären Transkriptionsapparates Actinomycin D mit einer Konzentration von 5 µg/ml in das Zellkulturmedium gegeben. Der zeitliche Verlauf der mRNA-Degradierung wurde anschließend über *Real-Time* PCR determiniert.

### 5.4.5 Inkubation von kardialen Fibroblasten mit TGF-β<sub>1</sub> und dessen spezifischen Inhibitoren

Um den Einfluss von TGF-β<sub>1</sub> auf die XT-I Expression zu untersuchen, werden kardiale Fibroblasten gemäß dem Standardprotokoll kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70% wird das FCS-haltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen anschließend mit 1,5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> inkubiert.

Der p38-MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 wird für Zellkulturexperimente in DMSO gelöst und mit einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Neutralisierender anti-TGF-β<sub>1</sub>-Antikörper wird mit einer Konzentration von 50 ng/ml für die Zellkulturexperimente verwendet.

### 5.4.6 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark eines 19-jährigen wurden von der Firma Cambrex bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt analog zu 5.4.10 und 5.4.11.

Abweichend vom Standardprotokoll werden die Stammzellen mit MSCGM (*Mesenchymal stem cell growth medium*, Cambrex) kultiviert, welches alle drei bis vier Tage gewechselt wird. Bei einer Konfluenz von 80% werden die Stammzellen mit einer 10fach verdünnten Trypsinlösung (vgl. 5.4.11.) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^3$ -Zellen auf neue Zellkulturschalen ausgesät.

#### **5.4.7 Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen**

Für eine chondrogene Differenzierung werden die mesenchymalen Stammzellen wie unter 5.4.6 beschrieben expandiert, bis eine Zelldichte von 80% erreicht ist. Analog zu 5.4.6 werden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Anschließend werden jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml chondrogenem Differenzierungsmedium aufgenommen und in 15 ml Polypropylen-Röhrchen bei 150 g für 5 min abzentrifugiert. Ohne die Integrität des Pellets zu schädigen, werden die Zellen für 4 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten der chondrogenen Differenzierung werden Cyroschnitte der Zellaggregate angefertigt. Die Bildung der chondrogenen extrazellulären Matrix wird durch Alcianblau (5.2.3) und Siriusrot (5.2.4) Färbungen verifiziert.

#### **5.4.8 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen**

Für die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen werden die nach 5.4.6 kultivierten und expandierten Zellen in  $9,6 \text{ cm}^2$ -Zellkulturschalen mit einer Zelldichte von  $3,1 \times 10^3$  Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät. Die Zellen werden für 48 h auf MSCGM belassen und anschließend die Induktion der Osteogenese durch den Wechsel des Mediums auf osteogenes Differenzierungsmedium eingeleitet. Für einen Zeitraum von 24 Tagen werden die Zellen auf osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert, wobei ein Austausch des Mediums alle vier Tage erfolgt. Als Kontrollen werden hMSCs auf MSCGM kultiviert, die identisch zu den hMSCs auf Differenzierungsmedium behandelt wurden.

#### **5.4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Die Proteindetektion der XT-I in humanen Zellen erfolgt mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, welche mikroskopisch detektiert werden. Hierzu werden die mit XT-I-*Antisense*-Vektoren transfizierten Zellen auf *Chamberslide*-Objektträgern kultiviert, mit PBS gewaschen und für 15 min mit  $-20^\circ\text{C}$  kaltem Methanol fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Zum

Absättigen unspezifischer Bindungsstellen werden die fixierten Zellen mit 0,1% BSA in PBS gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper gegen XT-I (1:100 in 1% BSA in PBS) für 1 h bei RT inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal für je 10 min mit 0,1% BSA in PBS von der Antikörperlösung befreit und für 1 h bei RT mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (1 : 1000 in 1% BSA in PBS) im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit PBS werden die Zellen für die Kernfärbung für 40 min bei RT im Dunkeln in einer DAPI-Lösung (1 : 1000 in PBS) inkubiert. Überschüssige DAPI-Lösung wird mit PBS von den Zellen entfernt und die Zellen anschließend mit Fluoromount-G überschichtet. Die Auswertung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch.

#### **5.4.10 Kultivierung humaner Zelllinien**

Humane Zelllinien werden in sterilen Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) kultiviert, deren Oberfläche adhärentes Wachstum begünstigt. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-95%igen Luftatmosphäre und 99% Luftfeuchtigkeit. Als Zellkulturmedium wird RPMI 1640 mit 10% FCS sowie 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 250 ng/ml Amphotericin B verwendet.

Kultivierte Zelllinien:

SAOS-2 (Choriokarzinom-Zellen)

SW1353 (Chondrosarkom-Zellen)

#### **5.4.11 Passagieren von adhärenenten Zellen**

Adhärenent wachsende Zellen werden zur Vermeidung einer Kontaktinhibition bei einer 90%igen Konfluenz passagiert. Der Zellkulturüberstand wird mit einer Pasteurpipette abgezogen und abgestorbene Zellen werden mit 10 ml PBS entfernt. Vitale Zellen werden mit 5 ml EDTA/Trypsin-Lösung bei 37°C ca. 10 min inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium werden ca. 10 ml Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In einer Zellkulturfläche mit 13 ml Medium werden 100 µl Zellsuspension ausgesät.

#### **5.4.12 Kryokonservierung und Revitalisierung humaner Zellen**

Für eine Konservierung von Zellen über längere Zeiträume wird eine Zellsuspension mit 80% Konfluenz hergestellt. Jeweils 500 µl dieser Zellsuspension sowie 500 µl, bei 4°C vorgekühltem, Kryomedium (FCS mit 10% DMSO) werden vermischt und anschließend in

Aluminiumblöcken, verpackt in einer Styroporbox, über 24 h langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Im Anschluß können die Zellproben bis zur Revitalisierung in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

Die Revitalisierung der Zellen erfolgt durch schnelles Auftauen bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem temperierten Wasserbad. Danach wird die Zellsuspension in Zellkulturmedium verdünnt und in Zellkulturflaschen gegeben.

#### 5.4.13 Anzucht von *E. coli*-Zellen in Flüssigkultur

Für Plasmidisolierungen werden 5 ml bzw. 25 ml LB-Amp-Medium mit dem entsprechenden Klon angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

LB-Amp-Medium	1%	Trypton
	1%	NaCl
	0,5%	Hefeextrakt
	100 $\mu\text{g/l}$	Ampicillin

#### 5.4.14 Kryokonservierung von *E. coli*

Zur stabilen und revitalisierbaren Lagerung von *E. coli*-Kulturen werden 500  $\mu\text{l}$  Zellsuspension einer  $\bar{u}/\text{N}$ -Kultur mit 500  $\mu\text{l}$  Kryomedium (20% Glycerin in LB-Medium) gemischt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Revitalisierung eingefroren.

#### 5.4.15 Transfektion humaner Zellen

##### 5.4.15.1 Transfektion von shRNA-Plasmiden in humane Zellen

Für die Transfektion von shRNA-Plasmiden wurden psiRNA-hH1GFPzeo G2-Vektoren mit den folgenden, über die Restriktionsschnittstellen *BbsI* eingefügten, shRNA-Sequenzen verwendet:

Zielgen	shRNA	Sequenz	Ziel-Exon
XT-I	XT-I-shO1 sense	ACCTCGAAGAAGCCACCGAGTAGACATCA AGAGTGTCTACTCGGTGGCTTCTTCTT	Exon 3
	XT-I-shO1 antisense	CAAAAAGAAGAAGCCACCGAGTAGACACT CTTGATGTCTACTCGGTGGCTTCTTCCG	
XT-I	XT-I-shO2 sense	ACCTCGTTACCTGCATCGGCAAGTGTCAA GAGCACTTGCCGATGCAGGTAATT	Exon 5
	XT-I-shO2 antisense	CAAAAATTACCTGCATCGGCAAGTGCTCT TGACACTTGCCGATGCAGGTAACG	
XT-I	XT-I-shO3 sense	ACCTCGCAGTTGCAGCGCATGTTCAATCA AGAGTTGAACATGCGCTGCAACTGCTT	Exon 5
	XT-I-shO3 antisense	CAAAAAGCAGTTGCAGCGCATGTTCAACT CTTGATTGAACATGCGCTGCAACTGCG	
XT-I	XT-I-shO4 sense	ACCTCGCTGAGTCCTTCTTCCATACGTCA AGAGCGTATGGAAGAAGGACTCAGCTT	Exon 8
	XT-I-shO4 antisense	CAAAAAGCTGAGTCCTTCTTCCATACGCT CTTGACGTATGGAAGAAGGACTCAGCG	
XT-I	XT-I-sh65 sense	ACCTCGCATCATGCTACCAATCTGTCAAG AGCAGATTGGTAGCATGATGCTT	Exon 10
	XT-I-sh65 antisense	CAAAAAGCATCATGCTACCAATCTGCTCTT GACAGATTGGTAGCATGATGC	
XT-II	XT-II-shO1 sense	ACCTCGTTCCAAGGACACAGACAGTTTCA AGAGAACTGTCTGTGTCCTTGGAACTT	Exon 2
	XT-II-shO1 antisense	CAAAAAGTTCCAAGGACACAGACAGTTCT CTTGAAACTGTCTGTGTCCTTGGAAACG	
XT-II	XT-II-shO2 sense	ACCTCGGACAACCTCCAGGTTTCATCAATCA AGAGTTGATGAACCTGGAGTTGTCCCT	Exon 5, 6
	XT-II-shO2 antisense	CAAAAAGGACAACCTCCAGGTTTCATCAACT CTTGATTGATGAACCTGGAGTTGTCCG	
XT-II	XT-II-shO3 sense	ACCTCGTTTCGAGTCGACTGTGAACTCAAG AGGTTACAGTCGACTCGAACTT	Exon 8
	XT-II-shO3 antisense	CAAAAAGTTTCGAGTCGACTGTGAACTCT TGAGTTACAGTCGACTCGAAACG	
XT-II	XT-II-sh68 sense	ACCTCCCTGTATTTCTATGACGACTCAAGA GGTCGTCATAGAAATACAGGTT	Exon 9
	XT-II-sh68 antisense	CAAAAACCTGTATTTCTATGACGACTCCT GAGTCGTCATAGAAATACAGGG	

#### 5.4.15.2 Transfektion von shRNA-Vektoren mit Fugene6

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit shRNA-kodierender Plasmid-DNA werden in 6-well-plates  $1 \times 10^5$  Zellen pro well ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Als Transfektionsansatz werden 97  $\mu$ L FCS-freies Zellkulturmedium mit 3  $\mu$ L Fugene6-Transfektionsreagenz versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 5  $\mu$ L Plasmid-DNA (0,4  $\mu$ g/ $\mu$ L) zugegeben, für 25 min bei RT inkubiert und danach vorsichtig auf die Zellen getropft. Eine Selektion positiv transfizierter Zellen erfolgt über die Vektorvermittelte Zeocin-Resistenz.

### 5.4.15.3 Transfektion von siRNA in humane Zellen

Für die Transfektion von siRNA für einen spezifischen *Knock-down* der XT-I- als auch der XT-II-mRNA Expression wurden folgende synthetische Oligonukleotide verwendet:

Zielgen	siRNA	Sequenz	Ziel-Exon
XT-I	XT-IlsiO1 sense XT-IlsiO1 antisense	CCCGGUCAGAAUCGCCUUUtt AAAGGCGAUUCUGACCGGGtt	Exon 4
XT-I	XT-IlsiO2 sense XT-IlsiO2 antisense	GGACAAAUGACCAGUUGGUtt ACCAACUGGUCAUUUGUCctg	Exon 5, 6
XT-I	XT-Ilsi65 sense XT-Ilsi65 antisense	GCAUCAUGCUACCAAUCUGtt CAGAUUGGUAGCAUGAUGctt	Exon 10
XT-II	XT-IIlsiO1 sense XT-IIlsiO1 antisense	GGCCGUUUUAUCACGAGCAGtt CUGCUCGUGAUAAACGGCCtt	Exon 3
XT-II	XT-IIlsi68 sense XT-IIlsi68 antisense	CCUGUAUUUCUAUGACGACTt GUCGUCAUAGAAAUACAGGtg	Exon 9
XT-II	XT-IIlsiO3 sense XT-IIlsiO3 antisense	GCCAUCAAGAACCCACACAtt UGUGUGGGUUCUUGAUGGctg	Exon 11

### 5.4.15.4 siRNA-Transfektion mit Lipofectamin 2000

Die zu transfizierenden Zellen werden einen Tag vor der Transfektion, in 9,6 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen mit 0,2 ml/cm<sup>2</sup> FCS- und antibiotikahaltigem Zellkulturmedium mit einer Konfluenz von 30% ausgesät. Vier Stunden vor der Transfektion wird das Kultivierungsmedium gegen serumhaltiges antibiotikafreies Medium ausgetauscht, welches von diesem Zeitpunkt an auch bei einer längeren Kultivierungsdauer verwendet wird. Damit zum Einen die Verpackung der siRNA in Vesikel nicht inhibiert aber auch die Zellen nicht toxisiert werden, erfolgen sämtliche Verdünnungen der siRNA-Oligonukleotide und des Transfektionsreagenzes mit serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium.

Standardansatz für eine Transfektion:

Lösung A: 7,5-45 µl der siRNA-Oligonukleotidlösung (2,5 µM) werden mit 250 µl Medium verdünnt.

Lösung B: Zu 250 µl Medium wurden 5 µl Lipofectamin 2000 pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5-25 min bei RT inkubiert.

Lösung A und B werden vereint, für 20 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben.

#### 5.4.15.5 siRNA-Transfektion mit RiboJuice

Bei einer Transfektion mit dem Transfektionsreagenz RiboJuice werden die Zellen analog zu 5.4.13.2. kultiviert. Abweichend davon werden die Zellen mit einer etwa 20% höheren Zelldichte für die Transfektion ausgesät.

Standardansatz für eine Transfektion:

6  $\mu$ l RiboJuice werden mit 244  $\mu$ l Medium ohne Zusatz Serum und Antibiotika verdünnt. Der Ansatz wird durch mehrfaches Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 5 – 45  $\mu$ l der siRNA-Oligonukleotidlösung (2,5  $\mu$ M) zugegeben und der Ansatz bei RT für 15 min inkubiert. Danach wird die Lösung zu den Zellen gegeben und 12-16 h nach der Transfektion das Medium gewechselt.

#### 5.4.16 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation werden chemisch-kompetente *E. coli*-Top10-Zellen bzw. *E. coli*-GT116 verwendet. Kurz vor Ende der Ligationsreaktion werden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Zellen auf Eis aufgetaut. 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes werden zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis und 30 s bei  $42^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Zellen werden für ca. 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 250  $\mu$ l  $37^{\circ}\text{C}$  warmen SOC-Medium für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Von der Suspension werden 30  $\mu$ l auf eine LB-Zeocin-X-Gal-Platte bzw. eine LB-Amp-Platte gegeben, die restliche Zellsuspension wird auf einer zweiten Platte ausplattiert. Durch die erworbene Zeocinresistenz, welche auf dem Vektor psiRNA3-hH1GFPzeo G2 kodiert ist bzw. durch die Ampicillinresistenz, die auf dem pCR-2.1-TOPO Vektor kodiert ist, erfolgt die Selektion plasmidhaltiger Klone. Sowohl *E. coli* TOP10-Zellen als auch *E. coli* GT116-Zellen sind  $\text{LacZ}^{\alpha-}$  und können aus diesem Grund keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren und deshalb das Laktose-Indigofarbstoffderivat X-Gal nicht umsetzen. Das für die vollständige Funktion notwendige  $\alpha$ -Fragment ist auf beiden Vektoren innerhalb der MCS lokalisiert.

Durch eine Insertion kann das  $\alpha$ -Fragment nicht exprimiert werden und positive Klone sind zusätzlich durch eine Blau/Weiß-Selektion identifizierbar.

SOC-Medium:

2%	Trypton
0,5%	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgSO <sub>4</sub>
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
20 mM	Glukose

#### 5.4.17 Bestimmung der Zellzahl

Von einem definierten Volumen der Zellsuspension werden 50 µl mit 450 µl Tryptan-Blau-Lösung gemischt und davon 20 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die ermittelte Zellzahl ( $\times 10^4$ ) entspricht der Gesamtzellzahl in 1 ml Zellsuspension, wobei eventuelle Verdünnungen zu berücksichtigen sind.

#### 5.5 Statistik

Daten, die innerhalb der zu vergleichenden Gruppen der Gauß'schen Normalverteilung folgten, wurden mit dem Student's t Test ausgewertet. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde dabei als signifikant bewertet.

## 6 Material und Geräte

### 6.1 Zelllinien

SAOS-2 (human, Osteosarkom), DSMZ, ACC 243	DSMZ, Braunschweig
SW1353 (human, Chondrosarkom), ATCC, HTB-94	ATCC, Rockville, USA
Humane mesenchymale Stammzellen aus Knochenmarkaspirat	Cambrex Bio Science, Walkersville, USA

### 6.2 Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien

Antibiotika-Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen
Amphotericin B (25 µg/mL)	
Penicillin (10 U/µL)	
Streptomycin (10 mg/mL)	
Chondrogenes Differenzierungsmedium	Cambrex, Verviers, Belgien
DMEM (1 x High Glukose)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DPBS (9,5 mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Fast Media Zeo X-Gal	Invivogen, San Diego, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
<i>Fugene6</i> -Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
L-Glutamin (100 x) (29,3 mg/mL)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Mesenchymales Stammzell- Wachstums-Medium (MSCGM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Osteogenes Differenzierungsmedium	Cambrex, Verviers, Belgien
RPMI 1640	Cambrex, Verviers, Belgien
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Cambrex, Verviers, Belgien

### 6.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen, Groningen, NL
Genotyp: <i>F</i> <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS.rcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lac74</i> , <i>DeoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> $\lambda$ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	
<i>Escherichia coli</i> GT116	Invivogen, San Diego, USA
Genotyp: <i>F</i> <sup>-</sup> , <i>mrcA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> end A1 $\Delta$ <i>sbcC-sbcD</i>	

**6.4 Nährmedien für *Escherichia coli***

Ampicillin-Lösung	200 mg/mL Ampicillin in 70%igem Ethanol
LB-Medium	1% Pepton; 1% NaCl; 0,5% Hefeextrakt in dest. Wasser
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 50-100 µg/L Ampicillin
LB- oder LB-Amp-Agar	LB-Medium oder LB-Amp-Medium mit 2% Agar
LB <i>low salt</i>	LB-Medium mit 0,5% NaCl
SOC-Medium	2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glukose in dest. Wasser

**6.5 Vektoren**

pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Groningen, NL
psiRNA-hH1GFPzeo G2	Invivogen, San Diego, USA

**6.6 Reagenzien, Enzyme, Antikörper**

Agar	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Anti-V5-HRP-Antikörper (1,0 mg/mL)	Invitrogen, Groningen, NL
BSA, nicht acetyliert	Sigma, Taufkirchen
4-Chloro-1-naphtol	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Längenstandard 1-kb-Leiter	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Marker pUC19/ <i>Mspl</i>	MBLL, Bielefeld
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (500 µg/mL)	Sigma, Taufkirchen
<i>Exonuclease</i> I (20.000 U/mL)	New England BioLabs, Frankfurt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Haematoxylin	Sigma, Taufkirchen

Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Humanalbumin	Merck, Darmstadt
<i>HotFire-Taq-DNA-Polymerase</i>	Solis Biodyne, Tartu, Estland
<i>HotStar-Taq-DNA-Polymerase</i>	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Fluka, Steinheim
<i>NuPAGE-Antioxidant</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>NuPAGE-SDS-SampleBuffer</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<i>NuPAGE-ReducingAgent</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Oligo dT-Primer	Invitrogen, Groningen, NL
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen, Groningen, NL
Platinum- <i>Taq-DNA-Polymerase High Fidelity</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot; New England BioLabs, Beverly, USA
RNaseOUT (40 U/μl)	Invitrogen, Groningen, NL
Salzsäure	Merck, Darmstadt
<i>SeeBlue Plus 2 pre-stained Standard</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Seide (unbehandelt)	Idee, Bielefeld
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/μL)</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Superscript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen, Groningen, NL
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, CA, USA
T4-DNA Ligase	AGS, Heidelberg

T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Berlin
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
UDP-[ <sup>14</sup> C]Xylose	NEN / Perkin Elmer, Boston, USA
Wasser:	
Rotisolv HPLC- <i>Gradient-Grade</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen
Millipore-Wasser	Millipore, Eschborn
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30%ig	Merck, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Groningen, NL
Ziege-anti-Kaninchen-TRITC; polyklonal	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-HRP; polyklonal	Dianova, Hamburg

### 6.7 Reagenziensätze

<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>HiSpeed Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL

### 6.8 Software

<i>Chromas</i>	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
<i>NEBcutter</i>	<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
<i>Oligo Primer Analysis, 5.0</i>	National Biosciences, Plymouth, USA
<i>Seqman, 3.03</i>	DNASTar Inc., Madison, USA
<i>Sequence Analysis 3.7</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
<i>Prism 4.02</i>	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

**6.9 Sonstige Materialien**

<i>Blotting-Pads</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Deckgläschen (Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe
<i>DNA-SepCartridge</i>	Transgenomic, Berlin
Filterpapiere	Invitrogen, Groningen, NL
Fluoromount-G-Eindecklösung	Southern Biotech, Birmingham, UK
<i>MicroBio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrocellulosemembranen	Sartorius, Göttingen
PVDF-Membranen (Immobilon P)	Invitrogen, Groningen, NL
ProGel-Tris-Glycin-Gele 8 - 16%	Anamed, Darmstadt
Vivaspin 0,5 mL <i>Concentrator</i> (3,000 MWCO PES)	Vivascience, Hannover

**6.10 Puffer und Lösungen**

Auftragspuffer für Nukleinsäuren	0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau 60% Saccharose in dest. Wasser
Block-Puffer	PBS-T mit 5% BSA
Chloronaphtol-Substratlösung	5 mL Citrat-Phosphat-Puffer; 1 mL 4-Chloro-1-naphtol (3 mg/mL in Methanol); 2,5 µL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)
Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0	0,1 M Zitronensäure; 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
PBS, pH 7,2	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in dest. Wasser
PBST, pH 7,2	PBS mit 0,1% (v/v) Tween-20
Substratreagenz (XT-Test)	1 µM UDP-[ <sup>14</sup> C]Xylose; 0,6% solvatisiertes Seidenfibroin; 50 mM KCl; 10 mM KF; 10 mM MnCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 50 mM 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl (MES), pH 6,5
TE-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris, 1 mM EDTA in dest. Wasser
Transferpuffer (25 x)	Anamed, Darmstadt
Transferpuffer (1 x)	4% Transferpuffer (25%); 10-20% Methanol; 0,1% NuPAGE- <i>Antioxidant</i> in dest. Wasser
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10 x)	Invitrogen, Groningen, NL
Tris/HCl-Puffer, pH 7,2	0,1 M Tris in dest. Wasser

Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer (10 x)	Anamed, Darmstadt
Tris-Glycin-SDS-Probenpuffer (2 x)	Anamed, Darmstadt
Zellyse-Puffer, pH 7,8	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40

### 6.11 Geräte

ABI Prism 310 <i>Genetic Analyzer</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
ABI Prism 7200 <i>Sequence Detector</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg, AGS, Heidelberg
Elektrophoresesystem <i>Xcell II Mini-Cell</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Flexcell System	Dunn, Asbach
Fluoreszenzplattenreader	Tecan, Crailsheim
HPLC (Waters Alliance 2795)	Waters, Eschborn
ESI-MS	Waters, Eschborn
LightCycler	Roche, Mannheim
Mikroskop, Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgerät PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein
Spannungsgerät PS 500	Renner, Darmstadt
Sterilbank Variolab W 90 (Klasse II)	Waldner, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
Tgradient ThermoCycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
<i>XCell II-Blot Modul</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Zentrifuge	Qualitron, Korea

## 7 Abkürzungen

A	Ampère
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy-DNA
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray-Ionisation
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
Gal	Galactose
GFP	<i>Green fluoreszent protein</i>
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HCFs	humane kardiale Fibroblasten
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
IgG	Immunglobulin G

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m	Milli
mA	Milliampère
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M	Molar
MS	Massenspektrometrie
$\mu$	Mikro
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mU	<i>Mikrounit</i>
MES	2-(N-morpholin)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-morpholin)-propansulfonnsäure
n	Nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMGT	Nominelle Molekulargewichtstrenngrenze
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulphate</i> )
T4	Bakteriophage T4
Tab	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
U	Unit
U	Umdrehung
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
xGal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
ZKÜ	Zellkulturüberstand

#### Abkürzungen für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspariginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 8 Literatur

1. Schwartz, N., *Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans*. Front Biosci, 2000. **5**: p. 649-55.
2. Kjellen, L. and Lindahl, U., *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-75.
3. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 609-52.
4. Prydz, K. and Dalen, K.T., *Synthesis and sorting of proteoglycans*. J Cell Sci, 2000. **113**(2): p. 193-205.
5. Hascall, V.C., *Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid*. J Supramol Struct, 1977. **7**(1): p. 101-20.
6. Hardingham, T.E., Fosang, A.J., and Dudhia, J., *The structure, function and turnover of aggrecan, the large aggregating proteoglycan from cartilage*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32**(4): p. 249-57.
7. Hardingham, T.E. and Fosang, A.J., *Proteoglycans: many forms and many functions*. Faseb J, 1992. **6**(3): p. 861-70.
8. Hardingham, T. and Bayliss, M., *Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease*. Semin Arthritis Rheum, 1990. **20**(3 Suppl 1): p. 12-33.
9. Redini, F., *Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression*. Pathol Biol (Paris), 2001. **49**(4): p. 364-75.
10. Reed, C.C. and Iozzo, R.V., *The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis*. Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 249-55.
11. Shi, Y.F., Zhang, Q., Cheung, P.Y., Shi, L., Fong, C.C., Zhang, Y., Tzang, C.H., Chan, B.P., Fong, W.F., Chun, J., Kung, H.F., and Yang, M., *Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(11): p. 1587-95.
12. De Heer, E., Sijpkens, Y.W., Verkade, M., den Dulk, M., Langers, A., Schutrups, J., Buijij, J.A., and van Es, L.A., *Morphometry of interstitial fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(6): p. 72-3.
13. Markmann, A., Hausser, H., Schönherr, E., and Kresse, H., *Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 631-6.

14. Teicher, B.A., Ikebe, M., Ara, G., Keyes, S.R., and Herbst, R.S., *Transforming growth factor-beta 1 overexpression produces drug resistance in vivo: reversal by decorin*. In Vivo, 1997. **11**(6): p. 463-72.
15. Taipale, J. and Keski-Oja, J., *Growth factors in the extracellular matrix*. Faseb J, 1997. **11**(1): p. 51-9.
16. Lindahl, U. and Hook, M., *Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 385-417.
17. Gallagher, J.T., Turnbull, J.E., and Lyon, M., *Heparan sulphate proteoglycans*. Biochem Soc Trans, 1990. **18**(2): p. 207-9.
18. Negishi, M., Dong, J., Darden, T.A., Pedersen, L.G., and Pedersen, L.C., *Glucosaminylglycan biosynthesis: what we can learn from the X-ray crystal structures of glycosyltransferases GlcAT1 and EXTL2*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **303**(2): p. 393-8.
19. Silbert, J.E. and Sugumaran, G., *Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 177-86.
20. Sugahara, K. and Kitagawa, H., *Heparin and heparan sulfate biosynthesis*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 163-75.
21. Stringer, S.E. and Gallagher, J.T., *Heparan sulphate*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(5): p. 709-14.
22. Scott, J.E., *Keratan sulphate: a 'reserve' polysaccharide?* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1994. **32**(4): p. 217-23.
23. Lee, J.Y. and Spicer, A.P., *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 581-6.
24. O'Regan, M., Martini, I., Crescenzi, F., De Luca, C., and Lansing, M., *Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis*. Int J Biol Macromol, 1994. **16**(6): p. 283-6.
25. Laurent, T.C., *Biochemistry of hyaluronan*. Acta Otolaryngol Suppl, 1987. **442**: p. 7-24.
26. Paulson, J.C. and Colley, K.J., *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
27. Unligil, U.M. and Rini, J.M., *Glycosyltransferase structure and mechanism*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 510-7.

28. Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B., *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. J Mol Biol, 2003. **328**(2): p. 307-17.
29. Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B., *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. Biochem J, 1997. **326**(3): p. 929-39.
30. Breton, C., Bettler, E., Joziasse, D.H., Geremia, R.A., and Imberty, A., *Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases*. J Biochem (Tokyo), 1998. **123**(6): p. 1000-9.
31. Uyama, T., Kitagawa, H., Tanaka, J., Tamura, J., Ogawa, T., and Sugahara, K., *Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3072-8.
32. Sato, T., Gotoh, M., Kiyohara, K., Akashima, T., Iwasaki, H., Kameyama, A., Mochizuki, H., Yada, T., Inaba, N., Togayachi, A., Kudo, T., Asada, M., Watanabe, H., Imamura, T., Kimata, K., and Narimatsu, H., *Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3063-71.
33. Kitagawa, H., Izumikawa, T., Uyama, T., and Sugahara, K., *Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23666-71.
34. Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K., *The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13933-7.
35. Pedersen, L.C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J.M., Pedersen, L.G., Sugahara, K., and Negishi, M., *Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14420-8.
36. Wuyts, W. and Van Hul, W., *Characterization and genomic localization of the mouse Extl2 gene*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **89**(3-4): p. 185-8.
37. Schwartz, N.B., *Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein*. J Biol Chem, 1977. **252**(18): p. 6316-21.

38. Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., and Schwartz, N.B., *Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase*. *Biochemistry*, 1991. **30**(30): p. 7477-83.
39. Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *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*, 2006. **281**(20): p. 14224-31.
40. Brinkmann, T., Weilke, C., and Kleesiek, K., *Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): p. 11171-5.
41. Weilke, C., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor*. *Clin Chem*, 1997. **43**(1): p. 45-51.
42. Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *Xylosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase*. *J Protein Chem*, 1998. **17**(3): p. 295-302.
43. Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., *Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(6): p. 919-24.
44. Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., *Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis*. *Acta Derm Venereol*, 2000. **80**(1): p. 60-1.
45. Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men*. *Clin Chim Acta*, 2002. **317**(1-2): p. 199-202.
46. Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H.R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells*. *Mol Hum Reprod*, 2002. **8**(12): p. 1079-86.
47. Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., and Kleesiek, K., *Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42566-73.
48. Götting, C., Hendig, D., Adam, A., Schön, S., Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., and Kleesiek, K., *Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis*. *J Mol Med*, 2005. **83**(12): p. 984-92.

49. Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., and Kleesiek, K., *Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 2): p. 227-36.
50. Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency*. *Clin Biochem*, 2005. **38**(5): p. 486-8.
51. Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II*. *J Mol Biol*, 2000. **304**(4): p. 517-28.
52. Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T., and Kleesiek, K., *First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4940-7.
53. Kuhn, J., Molle, K., Brinkmann, T., Götting, C., and Kleesiek, K., *High-density tissue-like cultivation of JAR choriocarcinoma cells for the in vitro production of human xylosyltransferase*. *J Biotechnol*, 2003. **103**(2): p. 191-6.
54. Kuhn, J., Müller, S., Schnölzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., and Kleesiek, K., *High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **312**(3): p. 537-44.
55. Bonapace, S., Rossi, A., Cicoira, M., Golia, G., Zanolla, L., Franceschini, L., Conte, L., Marino, P., Zardini, P., and Vassanelli, C., *Aortic stiffness correlates with an increased extracellular matrix turnover in patients with dilated cardiomyopathy*. *Am Heart J*, 2006. **152**(1): p. 93 e1-6.
56. Maehashi, N., Yokota, Y., Takarada, A., Usuki, S., Maeda, S., Yoshida, H., Sugiyama, T., and Fukuzaki, H., *The role of myocarditis and myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy. Analysis of 28 necropsy cases*. *Jpn Heart J*, 1991. **32**(1): p. 1-15.
57. Yoshikane, H., Honda, M., Goto, Y., Morioka, S., Ooshima, A., and Moriyama, K., *Collagen in dilated cardiomyopathy: scanning electron microscopic and immunohistochemical observations*. *Jpn Circ J*, 1992. **56**(9): p. 899-910.
58. Adachi, K., Ogata, M., Tanaka, H., Yamashita, Y., Terasawa, M., Toshima, H., and Koga, Y., *Factors related to the pathogenesis and clinicopathological findings in dilated cardiomyopathy*. *J Cardiogr Suppl*, 1986(9): p. 3-17.
59. Herpel, E., Singer, S., Flechtenmacher, C., Pritsch, M., Sack, F.U., Hagl, S., Katus, H.A., Haass, M., Otto, H.F., and Schnabel, P.A., *Extracellular matrix proteins and*

- matrix metalloproteinases differ between various right and left ventricular sites in end-stage cardiomyopathies.* Virchows Arch, 2005. **446**(4): p. 369-78.
60. Picard, F., Brehm, M., Fassbach, M., Pelzer, B., Scheuring, S., Kury, P., Strauer, B.E., and Schwartzkopff, B., *Increased cardiac mRNA expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and its inhibitor (TIMP-1) in DCM patients.* Clin Res Cardiol, 2006. **95**(5): p. 261-269.
61. Ellinor, P.T., Sasse-Klaassen, S., Probst, S., Gerull, B., Shin, J.T., Toepfel, A., Heuser, A., Michely, B., Yoerger, D.M., Song, B.S., Pilz, B., Krings, G., Coplin, B., Lange, P.E., Dec, G.W., Hennies, H.C., Thierfelder, L., and MacRae, C.A., *A novel locus for dilated cardiomyopathy, diffuse myocardial fibrosis, and sudden death on chromosome 10q25-26.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(1): p. 106-11.
62. Ueno, H., Yokota, Y., Shiotani, H., Yokoyama, M., Itoh, H., Ishido, S., Maeda, S., Katayama, Y., and Hotta, H., *Significance of detection of enterovirus RNA in myocardial tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction.* Int J Cardiol, 1995. **51**(2): p. 157-64.
63. Koga, Y., Adachi, K., Toshima, H., Takamoto, T., and Yokoyama, M.M., *Dilated cardiomyopathy: clinical significance of possible related factors.* Jpn Circ J, 1987. **51**(6): p. 689-98.
64. Lijnen, P.J., Petrov, V.V., and Fagard, R.H., *Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).* Mol Genet Metab, 2000. **71**(1-2): p. 418-35.
65. Lijnen, P. and Petrov, V., *Transforming growth factor-beta 1-induced collagen production in cultures of cardiac fibroblasts is the result of the appearance of myofibroblasts.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2002. **24**(6): p. 333-44.
66. Lindahl, G.E., Chambers, R.C., Papakrivopoulou, J., Dawson, S.J., Jacobsen, M.C., Bishop, J.E., and Laurent, G.J., *Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter.* J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6153-61.
67. Bishop, J.E., Greenbaum, R., Gibson, D.G., Yacoub, M., and Laurent, G.J., *Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease.* J Mol Cell Cardiol, 1990. **22**(10): p. 1157-65.
68. Tyagi, S.C., Kumar, S., Voelker, D.J., Reddy, H.K., Janicki, J.S., and Curtis, J.J., *Differential gene expression of extracellular matrix components in dilated cardiomyopathy.* J Cell Biochem, 1996. **63**(2): p. 185-98.
69. Medeiros, D.M., Velleman, S.G., Jarrold, B.B., Shiry, L.J., Radin, M.J., and McCune, S.A., *Ontogeny of enhanced decorin levels and distribution within myocardium of failing hearts.* Connect Tissue Res, 2002. **43**(1): p. 32-43.

70. Ahmed, M.S., Oie, E., Vinge, L.E., Yndestad, A., Andersen, G.G., Andersson, Y., Attramadal, T., and Attramadal, H., *Induction of myocardial biglycan in heart failure in rats: an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 557-68.
71. Hwang, J.J., Allen, P.D., Tseng, G.C., Lam, C.W., Fananapazir, L., Dzau, V.J., and Liew, C.C., *Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure*. Physiol Genomics, 2002. **10**(1): p. 31-44.
72. Caplan, A.I. and Bruder, S.P., *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 259-64.
73. Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S., *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
74. Bianco, P. and Gehron Robey, P., *Marrow stromal stem cells*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1663-8.
75. Alhadlaq, A. and Mao, J.J., *Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics*. Stem Cells Dev, 2004. **13**(4): p. 436-48.
76. Heng, B.C., Cao, T., and Lee, E.H., *Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1152-67.
77. Jiang, T.X., Yi, J.R., Ying, S.Y., and Chuong, C.M., *Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of NCAM*. Dev Biol, 1993. **155**(2): p. 545-57.
78. Spiro, R.C., Liu, L., Heidaran, M.A., Thompson, A.Y., Ng, C.K., Pohl, J., and Poser, J.W., *Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(4): p. 362-8.
79. Massague, J. and Wotton, D., *Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system*. Embo J, 2000. **19**(8): p. 1745-54.
80. Tuli, R., Seghatoleslami, M.R., Tuli, S., Howard, M.S., Danielson, K.G., and Tuan, R.S., *p38 MAP kinase regulation of AP-2 binding in TGF-beta1-stimulated chondrogenesis of human trabecular bone-derived cells*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **961**: p. 172-7.
81. Zhou, S., Eid, K., and Glowacki, J., *Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(3): p. 463-70.

82. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
83. Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Bellido, T., Parfitt, A.M., and Manolagas, S.C., *Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(5): p. 793-802.
84. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
85. Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G., *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1501-4.
86. Ducy, P., *Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology*. Dev Dyn, 2000. **219**(4): p. 461-71.
87. Bhatnagar, R.S., Qian, J.J., and Gough, C.A., *The role in cell binding of a beta-bend within the triple helical region in collagen alpha 1 (I) chain: structural and biological evidence for conformational tautomerism on fiber surface*. J Biomol Struct Dyn, 1997. **14**(5): p. 547-60.
88. Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K., *RNA interference: biology, mechanism, and applications*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 657-85.
89. Bernstein, E., Denli, A.M., and Hannon, G.J., *The rest is silence*. Rna, 2001. **7**(11): p. 1509-21.
90. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. **101**(1): p. 25-33.
91. Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T., *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
92. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
93. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T., *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell, 2002. **110**(5): p. 563-74.
94. McManus, M.T. and Sharp, P.A., *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(10): p. 737-47.

95. Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., and Turner, D.L., *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6047-52.
96. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R., *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
97. Schön, S., Prante, C., Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type 1 diabetic patients with and without nephropathy*. Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1483-90.
98. Bahr, C., Schön, S., Kuhn, J., Groop, P.H., Parkkonen, M., Wessman, M., Kleesiek, K., and Götting, C., *Novel sequence variants in the human xylosyltransferase I gene and their role in diabetic nephropathy*. Diabet Med, 2006. **23**(6): p. 681-4.
99. Prante, C., Bieback, K., Funke, C., Schön, S., Kern, S., Kuhn, J., Gastens, M., Kleesiek, K., and Götting, C., *The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2252-61.
100. Schön, S., Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagena, F.W., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 442-8.
101. Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A125S) is a risk factor for diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(10): p. 2295-9.
102. Spinale, F.G., Coker, M.L., Bond, B.R., and Zellner, J.L., *Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 225-38.
103. van Wamel, A.J., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoorn, L.J., Schrier, P.I., and van der Laarse, A., *Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF-beta1 expression in cardiomyocytes*. Mol Cell Biochem, 2002. **236**(1-2): p. 147-53.
104. Scott, J.E., Orford, C.R., and Hughes, E.W., *Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation*. Biochem J, 1981. **195**(3): p. 573-81.
105. Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A., and Iozzo, R.V., *Decorin binds near the C terminus of type I collagen*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21801-4.

106. Pringle, G.A. and Dodd, C.M., *Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(10): p. 1405-11.
107. Fleischmajer, R., Fisher, L.W., MacDonald, E.D., Jacobs, L., Jr., Perlish, J.S., and Termine, J.D., *Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin*. J Struct Biol, 1991. **106**(1): p. 82-90.
108. Weber, K.T., Janicki, J.S., Shroff, S.G., Pick, R., Chen, R.M., and Bashey, R.I., *Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium*. Circ Res, 1988. **62**(4): p. 757-65.
109. Yamaguchi, Y., Mann, D.M., and Ruoslahti, E., *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 281-4.
110. Rodén, L. (1980) in *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (Lennarz, W. J., ed) pp. 269–314, Plenum Publishing Corp., New York.
111. Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., and Pittenger, M.F., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. **4**(4): p. 415-28.
112. Barry, F., Boynton, R.E., Liu, B., and Murphy, J.M., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Exp Cell Res, 2001. **268**(2): p. 189-200.
113. Tiedemann, K., Larsson, T., Heinegard, D., and Malmstrom, A., *The glucuronyl C5-epimerase activity is the limiting factor in the dermatan sulfate biosynthesis*. Arch Biochem Biophys, 2001. **391**(1): p. 65-71.
114. Kirn-Safran, C.B., Gomes, R.R., Brown, A.J., and Carson, D.D., *Heparan sulfate proteoglycans: coordinators of multiple signaling pathways during chondrogenesis*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2004. **72**(1): p. 69-88.
115. Gomes, R.R., Jr., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D., *Perlecan functions in chondrogenesis: insights from in vitro and in vivo models*. Cells Tissues Organs, 2004. **176**(1-3): p. 79-86.
116. Gomes, R., Kirn-Safran, C., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D., *Perlecan: an important component of the cartilage pericellular matrix*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2002. **2**(6): p. 511-6.
117. French, M.M., Gomes, R.R., Jr., Timpl, R., Hook, M., Czymmek, K., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D., *Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(1): p. 48-55.
118. French, M.M., Smith, S.E., Akanbi, K., Sanford, T., Hecht, J., Farach-Carson, M.C., and Carson, D.D., *Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during*

- mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro*. J Cell Biol, 1999. **145**(5): p. 1103-15.
119. Chen, C.W., Tsai, Y.H., Deng, W.P., Shih, S.N., Fang, C.L., Burch, J.G., Chen, W.H., and Lai, W.F., *Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 446-53.
120. Götting, C., Prante, C., Kuhn, J., and Kleesiek, K., *High xylosyltransferase I activity in juvenile patients and its impact for osteogenesis and bone formation*. Bone, 2006. Eingereicht.
121. Lecanda, F., Avioli, L.V., and Cheng, S.L., *Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2*. J Cell Biochem, 1997. **67**(3): p. 386-96.
122. Kamiya, N., Shigemasa, K., and Takagi, M., *Gene expression and immunohistochemical localization of decorin and biglycan in association with early bone formation in the developing mandible*. J Oral Sci, 2001. **43**(3): p. 179-88.
123. Fisher, L.W., Termine, J.D., and Young, M.F., *Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species*. J Biol Chem, 1989. **264**(8): p. 4571-6.
124. Bianco, P., Fisher, L.W., Young, M.F., Termine, J.D., and Robey, P.G., *Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(11): p. 1549-63.
125. Pilia, G., Hughes-Benzie, R.M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., and Schlessinger, D., *Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 241-7.
126. Cheng, S.L., Yang, J.W., Rifas, L., Zhang, S.F., and Avioli, L.V., *Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone*. Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 277-86.
127. Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., and Kleesiek, K., *Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(6): p. 919-24.
128. Kuhn, J., Prante, C., Schön, S., Götting, C., and Kleesiek, K., *Measurement of Fibrosis Marker Xylosyltransferase I Activity by HPLC Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Clin Chem, 2006.

129. Vogel, K., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *A novel ultra-sensitive method for the quantification of glycosaminoglycan disaccharides using an automated DNA sequencer*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(7): p. 1363-7.

## 9 Publikationen und Präsentationen

### 9.1 Publikationen

1. **Prante, C.**, Bieback, K., Funke, C., Schön, S., Kern, S., Kuhn, J., Gastens, M., Kleesiek, K., and Götting, C., *The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2252-61.
2. **Prante, C.**, Milting, H., Kassner, A., Farr, M., Ambrosius, M., Schön, S., Seidler, D., Banayoso, A., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek K. and C. Götting, *TGF- $\beta_1$  regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling*. J Biol Chem, 2006. eingereicht.
3. Schön, S., **Prante, C.**, Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *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, 2006. **281**(20): p. 14224-31.
4. Kuhn, J., **Prante, C.**, Schön, S., Götting, C., and Kleesiek, K., *Measurement of Fibrosis Marker Xylosyltransferase I Activity by HPLC Electro Spray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. Clin Chem, 2006.
5. Schön, S., **Prante, C.**, Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A125S) is a risk factor for diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(10): p. 2295-9.
6. Schön, S., **Prante, C.**, Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type 1 diabetic patients with and without nephropathy*. Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1483-90.
7. Thyzel, E., Kohli, S., Siegling, S., **Prante, C.**, Kleesiek, K., and Götting, C., *Relative quantification of glycosaminoglycan-induced upregulation of TFPI-mRNA expression in vitro*. Thromb Res, 2006.
8. Schön, S., Huep, G., **Prante, C.**, Muller, S., Christ, R., Hagen, F.W., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 442-8.
9. Schön, S., Schulz, V., **Prante, C.**, Hendig, D., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *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, 2006. **43**(9): p. 745-9.

10. Müller, S., Disse, J., Schöttler, M., Schön, S., **Prante, C.**, Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme*. *Biochem J*, 2006. **394**(Pt 1): p. 163-71.
11. Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., **Prante, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., and Götting, C., *Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency*. *Clin Biochem*, 2005. **38**(5): p. 486-8.
12. Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., **Prante, C.**, Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., and Kleesiek, K., *Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity*. *Biochem J*, 2005. **386**(Pt 2): p. 227-36.
13. Kuhn, J., Schnölzer, M., Schön, S., Müller, S., **Prante, C.**, Götting, C., and Kleesiek, K., *Xylosyltransferase I acceptor properties of fibroblast growth factor and its fragment bFGF (1-24)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(1): p. 156-66.
14. Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., **Prante, C.**, Brinkmann, T., Kuhn, J., and Kleesiek, K., *Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 42566-73.

## 9.2 Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. **Prante, C.**, Müller, B., Milting, H., Kassner, A. Bahr, C., Busch, S., Carrera, J., Ambrosius, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006) Impact of xylosyltransferase I for the remodeling of the ECM during cardiac fibrosis. 17th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Bruges, Belgien, *Abstractband*, 35.
2. **Prante, C.**, Müller, B., Milting, H., Kassner, A. Bahr, C., Busch, S., Carrera, J., Ambrosius, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006) Inhibition of xylosyltransferase I expression in human cardiac fibroblasts using specific inhibitors of TGF-beta1 signal transduction or small interfering RNA is a promising technique to study cardiac fibrosis. 3. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie, Mannheim, Deutschland, *Clin. Chem. Lab. Med.* 44, A161.
3. **Prante, C.**, Schön, S., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Mechanical stress and increased levels of TGF-beta1 induce xylosyltransferase I expression in human cardiac fibroblasts. 16th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Hannover, Deutschland, *Abstractband*, 72.
4. Schön, S., **Prante, C.**, Müller, S., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Xylosyltransferase I (XYLT-I) gene polymorphisms are implicated in vascular complications in type 1 diabetic patients. 16th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Hannover, Deutschland, *Abstractband*, 77.
5. **Prante, C.**, Bieback, K., Kern, S., Schön, S., Müller, S., Klüter, H., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005) Key enzymes of the glycosaminoglycan biosynthesis are differentially expressed during the chondrogenic maturation of mesenchymal stem cells. 2. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie, Jena, Deutschland, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, A131.
6. Schön, S., Huet, G., **Prante, C.**, Müller, S., Christ, R., Hagen, F.W., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting C. (2005) DHPLC analysis of the xylosyltransferase genes XYLT-I and XYLT-II in patients with osteoarthritis. 2. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie, Jena, Deutschland, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, A146.
7. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Transforming growth factor beta1 induces xylosyltransferase I expression in human cardiac fibroblasts. XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Firenze, Italy, *Glycoconj. J.* 22, 214.

8. Götting, C., Schön, S., **Prante, C.**, Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005) The c.1989T>C polymorphism in the human xylosyltransferase I gene is associated with an increased blood pressure in type 1 diabetic patients. XIX International Congress of Clinical Chemistry, AACC Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, *Clin. Chem.* 51, Suppl. A183.
9. Schön, S., Huep, G., **Prante, C.**, Hagena, F.W., Christ, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting C. (2005) Mutational analysis of the human xylosyltransferase genes XYLT-I and XYLT-II in patients with osteoarthritis. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, *Abstractband*, 103.
10. **Prante, C.**, Bieback, K., Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., Klüter, H., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Glycosyltransferases as potential markers for the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. First Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Köln, *Abstractband*, 87.
11. Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Heart transplantation and ventricular assist device implantation and their effect on xylosyltransferase I activity. 15th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie". Wageningen, Niederlande, *Glycoconj. J.* 21, 414.
12. Schön, S., **Prante, C.**, Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek K. (2004) Analysis of the association between diabetic nephropathy and genetic variations in the xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in type 1 diabetic patients. 15th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie". Wageningen, Niederlande, *Glycoconj. J.* 21, 414.
13. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2004) Xylosyltransferase I: a new marker for the fibrotic degeneration of the heart in dilated cardiomyopathy. 15th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie". Wageningen, Niederlande, *Glycoconj. J.* 21, 412.
14. **Prante, C.**, Bieback, K., Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Kuhn, J., Klüter, H., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Molecular characterisation of tissue-engineered human articular chondrocyte transplants. 15th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie". Wageningen, Niederlande, *Glycoconj. J.* 21, 412.
15. Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Characterisation of recombinant xylosyltransferase I and Cys mutant enzymes. 15th Joint Meeting of the "Netherlands Society for Glycobiology", the "Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie" and the "Groupe Lillois de Glycobiologie". Wageningen, Niederlande, *Glycoconj. J.* 21, 395.
16. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Mechanical stress regulates proteoglycan synthesis in failing human heart. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, A136.

17. Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Human xylosyltransferase I: effect of mutations on binding to UDP and heparin. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, A122.
18. Schön, S., **Prante, C.**, Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Analysis of genetic variations in the xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, A121.
19. Schön, S., **Prante, C.**, Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Polymorphisms in the xylosyltransferase genes XT-I and XT-II and the development of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. 4th International Symposium on Glycosyltransferases Glyco T2004, Le Touquet, Frankreich, *Abstractband*, 51.
20. Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Xylosyltransferase I activity monitored in patients after heart transplantation and patients after ventricular assist device implantation. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband*, 64.
21. Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., **Prante, C.**, Schulz, V., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Detection of genetic variations in the human xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in blood donors and pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband*, 63.
22. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Influence of left ventricular assist devices (LVAD) on the XT-I mRNA expression in patients with a dilated cardiomyopathy (DCM). Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband*, 57.
23. Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2004) Xylosyltransferase I, the key enzyme in the biosynthesis of the proteoglycans: analysis of XT-activity from extant jawed vertebrates, the shark *Prionace glauca*. Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, *Abstractband*, 52.
24. Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., **Prante, C.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Analysis of Xylosyltransferase activity from the shark *Prionace glauca*. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for Glycobiology“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Lille, Frankreich, *Abstractband*, 55.
25. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Dilated cardiomyopathy (DCM): Xylosyltransferase I and II mRNA quantification in heart tissues using a new real-time RT-PCR method. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for Glycobiology“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“ Lille, Frankreich, *Abstractband*, 27.
26. Schön, S., Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., **Prante, C.**, Schulz, V., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Detection of genetic variations in the human xylosyltransferase genes XT-I and XT-II in blood donors and pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for

Glycobiology“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Lille, Frankreich, *Abstractband*, 26.

### 9.3 Kongressvorträge

1. **Prante, C.**, Transforming growth factor beta1 induces xylosyltransferase I expression in human cardiac fibroblasts. XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Florenz, Italien, 2005.
2. **Prante, C.**, Decreased XT-I mRNA expression after left ventricular assist in patients with a dilated cardiomyopathy (DCM). Hj. Staudinger Symposium, Kloster Banz, 2004.
3. **Prante, C.**, Influence of left ventricular assist devices (LVAD) on the XT-I mRNA expression in patients with a dilated cardiomyopathy (DCM). Annual Meeting of the German Connective Tissue Society, Jena, 2004.
4. **Prante, C.**, Dilated cardiomyopathy (DCM): Xylosyltransferase I and II mRNA quantification in heart tissues using a new real-time RT-PCR method. 14th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, the „Netherlands Society for Glykobiologie“ and the „Groupe Lillois de Glycobiologie“, Villeneuve d’Ascq, Frankreich, 2003.

### 9.4 Auszeichnungen

1. **Prante, C.**, Müller, S., Schön, S., Schöttler, M., Milting, H., Körfer, R., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. Mechanical stress regulates proteoglycan synthesis in failing human heart. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Düsseldorf, Clin. Chem. Lab. Med. 42, A136; 2004  
**Auszeichnung: 1. Posterpreis**