

**Untersuchungen zur intrazellulären
Lokalisation und genetischen Variabilität
der humanen Xylosyltransferasen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Sylvia Schön

aus Bielefeld

Bielefeld / Bad Oeynhausen

November 2005

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

September 2002 bis November 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2006

Danksagung

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

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

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Dr. Christian Götting, dessen vielfältigen Anregungen und konstruktiven Ratschläge ebenso zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben, wie seine ständige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen.

Für die vielen anregenden und aufmunternden Diskussionen bin ich Veronika Schulz sehr dankbar.

Jens Dreier, Joachim Kuhn, Michael Schmidt, Martin Gastens, Christian Prante, Doris Hendig, Sandra Müller, Melanie Störmer, Elmar Thyzel, Manuela Schöttler, Sabine Siegling, Alexandra Adam und Marlen Ewald danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die Bereitstellung von Materialien, die zahlreichen Ratschläge und die nette Zusammenarbeit.

Meinen ehemaligen Diplomanden und Praktikanten Matthias Pühse, Gunnar Huep, Claudia Bahr und Oliver Jungmann danke ich für ihren Beitrag am Fortgang meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin möchte ich ein besonderes Dankeschön für die angenehme Arbeitsatmosphäre aussprechen.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und die hilfreichen Diskussionen möchte ich den nachfolgenden Kooperationspartnern danken:

- Frau Dr. Lise Tarnow, Steno Diabetes Zentrum, Gentofte, Dänemark;
- Herrn Prof. Dr. Frank-Wolfgang Hagena und Herrn Dr. Ralph Christ, Auguste Viktoria Klinik, Orthopädisches Krankenhaus, Bad Oeynhausen;
- Frau Prof. Dr. Christiane Slizska, PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik, Krankenhaus Bethesda, Freudenberg;
- Selbsthilfegruppe für PXE-Erkrankte Deutschlands 1999 e.V., Freudenberg, Vorsitzende: Ehepaar Peter und Maria Hof.

Ganz besonders möchte ich Marco danken. Auf seine nahezu unendliche Toleranz, sein Verständnis und seine geduldige Unterstützung bei der Realisierung meiner Ziele konnte ich mich stets verlassen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Proteoglykane	2
2.2	Glykosaminoglykane	3
2.3	Glykosyltransferasen	5
2.4	Xylosyltransferasen	6
2.5	Typ-1-Diabetes	8
2.6	Arthrose	10
2.7	Pseudoxanthoma elasticum (PXE)	12
2.8	Sequenzvariationen	13
2.9	Gegenstand der Arbeit	14
3	Patienten und Materialien	15
3.1	Patienten- und Kontrollkohorten	15
3.1.1	Typ-1-Diabetiker	15
3.1.2	Arthrosepatienten	16
3.1.3	PXE-Patienten	17
3.1.4	Kontrollpersonen	18
3.2	Material	18
3.2.1	Zelllinien	18
3.2.2	Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien	18
3.2.3	Bakterienstämme	19
3.2.4	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	19
3.2.5	Vektoren	19
3.2.6	Reagenzien, Enzyme, Antikörper	20
3.2.7	Reagenziensätze	22
3.2.8	Software	23
3.2.9	Sonstige Materialien	23
3.2.10	Puffer und Lösungen	23
3.2.11	Geräte	24
3.2.12	cDNA-Sequenzen der Xylosyltransferasen	25
3.2.13	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	25

4	Methoden	31
4.1	Molekularbiologische Methoden	31
4.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus EDTA-Blut	31
4.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
4.1.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
4.1.4	Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)	33
4.1.5	Agarosegel-Elektrophorese und Längenbestimmung von DNA-Fragmenten	33
4.1.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
4.1.7	Denaturierende Hochdruck-Flüssigchromatographie (DHPLC)	34
4.1.8	Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente	37
4.1.9	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	38
4.1.10	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	39
4.1.11	Generieren von Restriktionsschnittstellen durch PCR	40
4.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten	40
4.2	Zellkultur	41
4.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	41
4.2.2	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	41
4.2.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	41
4.2.4	Kultivierung von <i>High Five</i> -Insektenzellen	41
4.2.5	Bestimmung der Zellzahl von <i>High Five</i> -Insektenzellen	42
4.2.6	Liposomen-vermittelte Transfektion von <i>High Five</i> -Insektenzellen	42
4.2.7	Kultivierung humaner Zellen	43
4.2.8	Transfektion humaner Zellen	43
4.3	Proteinbiochemische Methoden	44
4.3.1	Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen	44
4.3.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	44
4.3.3	Western-Blot	45
4.3.4	<i>Dot</i> -Blot	45
4.3.5	Immundetektion immobilisierter Proteine	45
4.3.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	46
4.3.7	Behandlung transfizierter Zellen mit Inhibitoren	46
4.3.8	Bestimmung der XT-I-Aktivität	46
4.4	Statistik	47

5	Ergebnisse	48
5.1	Detektion von Sequenzvariationen in den XYLT-Genen	48
5.1.1	Amplifikation der XYLT-Exons	48
5.1.2	Identifizierung der Wildtyp-DNA der XYLT-Exons	49
5.1.3	Etablierung der DHPLC-Analyseparameter	49
5.1.4	Sequenzvariationen im XYLT-I-Gen	51
5.1.4.1	Sequenzvariationen in den Introns des XYLT-I-Gens	51
5.1.4.2	Sequenzvariationen in den Exons des XYLT-I-Gens	52
5.1.5	Sequenzvariationen im XYLT-II-Gen	54
5.1.5.1	Sequenzvariationen in den Introns des XYLT-II-Gens	54
5.1.5.2	Sequenzvariationen in den Exons des XYLT-II-Gens	54
5.1.6	Etablierung von Variationsnachweisen mittels RFLP und DHPLC	56
5.2	XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern	61
5.2.1	XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern und Blutspendern	61
5.2.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	62
5.2.3	<i>Follow up</i> -Studie von Typ-1-Diabetikern	64
5.2.3.1	Allel-Frequenzen ausgewählter XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern	64
5.2.3.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	65
5.3	XT-I-Aktivität und XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten	66
5.3.1	XT-I-Aktivitäten im Serum von Arthrosepatienten und Blutspendern	66
5.3.2	XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten und Blutspendern	67
5.3.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	68
5.4	XYLT-Variationen bei PXE-Patienten	69
5.4.1	XYLT-Variationen bei PXE-Patienten und Blutspendern	69
5.4.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen	70
5.5	Mutagenese und Enzymaktivität rekombinanter XT-I-Mutanten	72
5.5.1	Mutagenese	72
5.5.2	Transfektion von <i>High Five</i> -Insektenzellen	72
5.5.3	Enzymaktivitäten der rekombinanten XT-I-Mutanten	73
5.5.4	Enzymkinetik der rekombinanten XT-I-Mutanten	74
5.6	Expression und Lokalisation der humanen XT-I	75
5.6.1	Konstruktion der vollständigen XT-I cDNA	75
5.6.2	Transfektion und XT-I-Aktivität	75
5.6.3	Nachweis der intrazellulären Lokalisation der XT-I	76
5.7	Signalsequenzen zur intrazellulären Lokalisation von XT-I und XT-II	77
5.7.1	Konstruktion von GFP-markierten C-, T- und S-Varianten	77

5.7.2	Funktion der C-, T- und S-Regionen in der XT-I	79
5.7.3	Intrazelluläre Lokalisation der XT-II und die Rolle der C-, T- und S-Regionen	80
5.8	Untersuchungen zur Identifikation der Proteinase-Spaltstelle der XT-I	81
6	Diskussion	82
6.1	Mutationsdetektion in den XYLT-Genen	82
6.2	XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern	83
6.2.1	Initialstudie	83
6.2.2	<i>Follow up</i> -Studie	85
6.3	XT-I-Aktivität und XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten	87
6.4	XYLT-Variationen bei PXE-Patienten	89
6.5	Einfluss von Aminosäure-Substitutionen auf die XT-I-Aktivität	91
6.6	Expression der vollständigen GFP-markierten XT-I	92
6.7	Lokalisation der humanen Xylosyltransferasen	93
6.8	Untersuchungen zum Nachweis der Proteinase-Spaltstelle der XT-I	95
6.9	Ausblick	96
7	Abkürzungen	97
7.1	Abkürzungen für Aminosäuren	97
7.2	Abkürzungen für Basen	97
7.3	Sonstige Abkürzungen	97
8	Literatur	101
9	Publikationen und Präsentationen	113
9.1	Publikationen	113
9.2	Publizierte Kongressbeiträge und Posterpräsentationen	114
9.3	Kongressvorträge	119
9.4	Auszeichnungen	119
10	Anhang	120
10.1	Aminosäure-Substitutionen in der XT-I	120
10.2	Aminosäure-Substitutionen in der XT-II	121

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die genetische Variabilität und die intrazelluläre Lokalisation der humanen Xylosyltransferasen XT-I und XT-II untersucht. XT-I initiiert die posttranslationale Synthese von Glykosaminoglykan-Ketten in Proteoglykanen durch den Transfer von Xylose auf spezifische Serin-Reste im *Core*-Protein. Die physiologische Funktion der XT-II ist noch nicht bekannt.

Die erstmalige genetische Analyse der Exons und flankierenden Intronbereiche der Xylosyltransferase (XYLT)-Gene erfolgte bei insgesamt 210 Patienten mit Erkrankungen, die durch einen veränderten Proteoglykan-Metabolismus charakterisiert sind: Typ-1-Diabetiker mit und ohne Nephropathie, Arthrosepatienten und Pseudoxanthoma elasticum (PXE)-Patienten. Mit Hilfe der denaturierenden HPLC konnten insgesamt 23 Variationen im XYLT-I-Gen und 24 im XYLT-II-Gen detektiert werden.

In weiterführenden Untersuchungen konnten Zusammenhänge mit der Pathogenese der Erkrankungen und dem Auftreten bestimmter genetischer Veränderungen aufgedeckt werden. Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie besitzen mit einer signifikant höheren Frequenz die Aminosäure-Substitution p.A115S in der XT-I (4,3 % vs. 2,4 %, $p = 0,03$). Diese stellt somit einen Risikofaktor für die Entwicklung der Niereninsuffizienz dar. Dem Polymorphismus c.1989T>C im XYLT-I-Gen kann ein protektiver Effekt auf die Progression vaskulärer Komplikationen bei Typ-1-Diabetikern zugeschrieben werden, da er mit erniedrigten Blutdruck- und Serum-Kreatinin-Werten assoziiert ist. Bei Arthrosepatienten geht das T-Allel des SNPs c.1569C>T (XYLT-II) mit einer früheren Krankheitsmanifestation einher. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Serum-XT-I-Aktivität bei Arthrosepatienten mit zunehmender Krankheitsdauer ansteigt. Sie stellt somit einen potentiellen biochemischen Marker zur Stadieneinteilung und Verlaufskontrolle der Arthrose dar. PXE-Patienten mit der Substitution p.T801A in der XT-II leiden häufiger unter den charakteristischen Hautveränderungen, einem schwereren Krankheitsverlauf und einem früheren Diagnosealter. Eine deutlich höhere Serum-XT-I-Aktivität konnte bei PXE-Patienten mit dem SNP p.A115S (XT-I) im Vergleich zu den Wildtyp-Patienten nachgewiesen werden.

Ausgehend von dem Vektor pCG255Δ1-148-XT-I wurden durch gerichtete Mutagenese natürlich vorkommende XT-I-Aminosäure-Substitutionen generiert und ihr Einfluss auf die katalytische Aktivität nach der Expression in *High Five*-Insektenzellen analysiert. Die zwei Mutationen p.P385L und p.I552S resultieren in homozygoter Form in einer 16%igen bzw. 26%igen Aktivitätsminderung.

Die Konstruktion der vollständigen GFP-markierten XT-I und die rekombinante Expression in Säugerzellen resultierte in einer 44 - 68-fachen Erhöhung der XT-I-Aktivität im Zellkultur-Überstand. Die XT-I konnte somit erstmalig in aktiver, proteolytisch gespaltener Form dargestellt werden. Anhand der Fluoreszenz des GFP gelang es, den Golgi-Apparat als Ort der Initiation der Proteoglykan-Biosynthese zu identifizieren. Für eine verkürzte GFP-markierte XT-II-Variante konnte ebenfalls die Golgi-Lokalisation nachgewiesen werden. Mit Hilfe verschiedener XT-I- und XT-II-Mutanten konnten die für die intrazelluläre Zielsteuerung erforderlichen Signalsequenzen nachgewiesen werden. Diese bestehen bei beiden Xylosyltransferasen aus der cytoplasmatischen Domäne, der Transmembranregion und einem definierten Anteil der Stammregion. Interessanterweise benötigt die XT-II nur 13 Aminosäuren der Stammregion, um eine vollständige Golgi-Retention zu erreichen; die XT-I hingegen braucht 179 Aminosäuren der Stammregion. Zwischen den erforderlichen Bereichen existieren keine Sequenzhomologien.

2 Einleitung

2.1 Proteoglykane

Proteoglykane stellen eine heterogene Gruppe glykosylierter Makromoleküle dar, die von nahezu allen tierischen Zellen synthetisiert werden. Neben Kollagenfasern sind sie ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) und kommen weiterhin in intrazellulären Kompartimenten und auf Zelloberflächen vor. Sie bestehen aus einem *Core*-Protein, das kovalent mit einer variablen Anzahl Glykosaminoglykan-Ketten verknüpft ist (Kjellén und Lindahl, 1991). Der Kohlenhydratanteil der Proteoglykane kann bis zu 95 % ihres Gesamtgewichts ausmachen. Bisher wurden über 30 *Core*-Proteine identifiziert, deren Größen im Bereich von 10 - 500 kDa liegen (Prydz und Dalen, 2000). Neben der Eigenschaft, Glykosaminoglykane zu binden, verfügen die *Core*-Proteine über weitere funktionelle Domänen, die sie z. B. zu Interaktionen mit anderen Proteinen oder zur Fixierung auf Zelloberflächen befähigen (Iozzo, 1998).

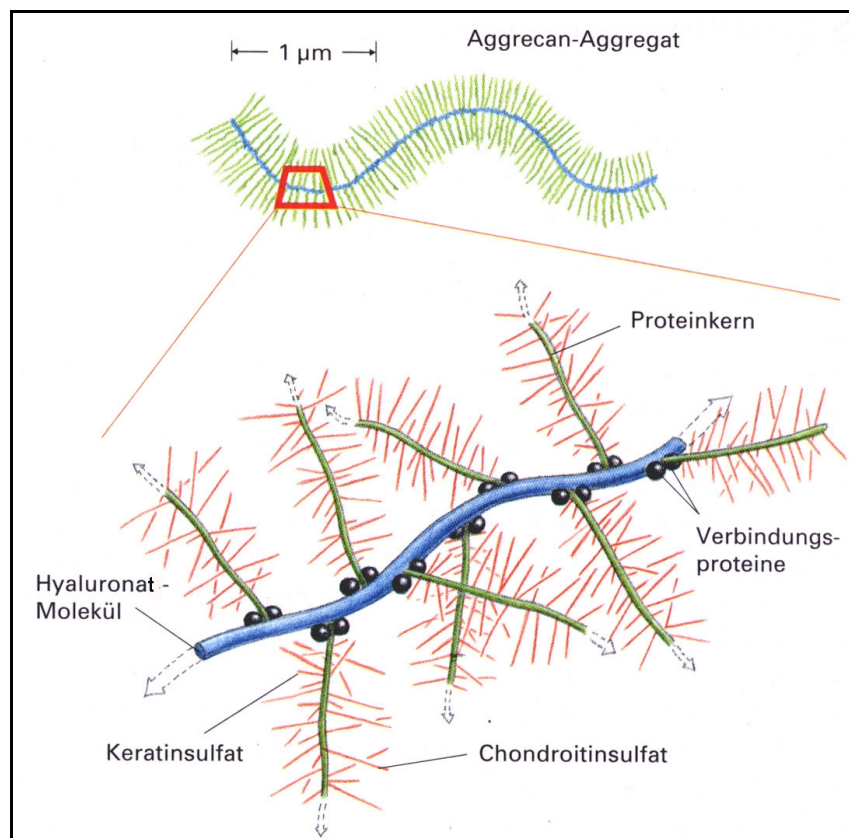


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines Aggrecan-Aggregats (Alberts *et al.*, 2004). Es besteht aus 100 Aggrecan-Monomeren, die nicht-kovalent durch Verbindungsproteine an Hyaluronat gebunden sind. An jedes *Core*-Protein sind kovalent ca. 100 Chondroitinsulfat- und 20 - 30 Keratansulfat-Ketten gebunden (Kjellén und Lindahl, 1991).

Die strukturelle Heterogenität der Proteoglykane ist durch die verschiedenen *Core*-Proteine, die variable Art und Anzahl an Glykosaminoglykanen und dem Grad der Sulfatierung und Epimerisierung gekennzeichnet. Ihre vielfältigen Funktionen werden vom *Core*-Protein oder den Glykosaminoglykanen vermittelt und reichen von rein mechanischen Stützfunktionen und der Strukturgebung bis zur Regulation zellulärer Prozesse wie der Proliferation und Differenzierung durch die Bindung von Wachstumsfaktoren (Kjellén und Lindahl, 1991).

Die posttranslationalen Modifikationen der *Core*-Proteine finden nach deren Synthese an membrangebundenen Ribosomen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und im Golgi-Apparat statt. Monosaccharide werden schrittweise von Glykosyltransferasen addiert und nachfolgend in einer Reihe von Sulfatierungs- und Epimerisierungsreaktionen modifiziert. Anschließend werden die neusynthetisierten Proteoglykane zu ihren Zielorten transportiert. Ihre Degradierung beginnt extrazellulär mit der Proteolyse der *Core*-Proteine und wird intrazellulär nach adsorptiver Pinocytose der entstandenen Fragmente mittels spezifischer Rezeptoren fortgesetzt (Greiling *et al.*, 1995). Glykosidasen und Proteinasen im lysosomalen System bauen diese zu niedermolekularen Produkten ab (Silbert und Sugumaran, 1995).

Strukturgebende Proteoglykane, wie z. B. Aggrecan aus dem Gelenk-Knorpel (Abb. 2.1), haben die Fähigkeit, komplexe Aggregate zu bilden. Dabei werden bis zu 100 Aggrecan-*Core*-Proteine, an die jeweils etwa 100 Chondroitin- und 20 - 30 Keratansulfat-Ketten gebunden sind, nicht-kovalent mit Hilfe stabilisierender *Link*-Proteine mit Hyaluronat verbunden (Kjellén und Lindahl, 1991; Hascall, 1997). Die starke Hydratisierung ihrer polyanionischen Glykosaminoglykane verleihen den Geweben mechanische Belastbarkeit und Elastizität (Hardingham und Bayliss, 1990).

2.2 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane sind unverzweigte, aus repetitiven Disaccharid-Einheiten zusammengesetzte Polysaccharide, die im Organismus in freier Form oder als Bestandteil der Proteoglykane vorkommen. Sie bestehen entweder aus sulfatiertem N-Acetylgalaktosamin (Chondroitinsulfat und Dermatansulfat) oder sulfatiertem N-Acetylglukosamin (Heparin, Heparansulfat und Keratansulfat) und einer Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) bzw. Galaktose (Abb. 2.2) (Greiling *et al.*, 1995).

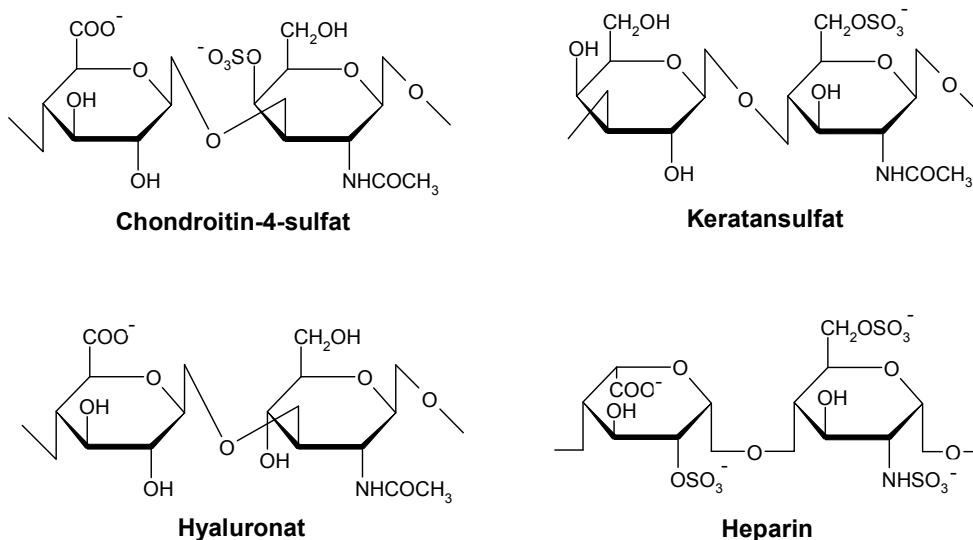


Abb. 2.2: Strukturformeln der Disaccharideinheiten wichtiger Glykosaminoglykane.

Die Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat, Heparin und Heparansulfat sind über den uniformen Tetrasaccharid-*Linker* (1→4)-β-D-Glukuronido-(1→3)-β-D-Galaktosido-(1→3)-β-D-Galaktosido-(1→4)-β-D-Xylosido-O-Serin an das *Core*-Protein gebunden (Abb. 2.3) (Kjellén und Lindahl, 1991). Der initiale Schritt der *Linker*-Synthese wird von der Xylosyltransferase I (XT-I) katalysiert. Der Xylosylierung des *Core*-Proteins folgt der enzymatische Transfer zweier Galaktose-Moleküle und einer Glukuronsäure.

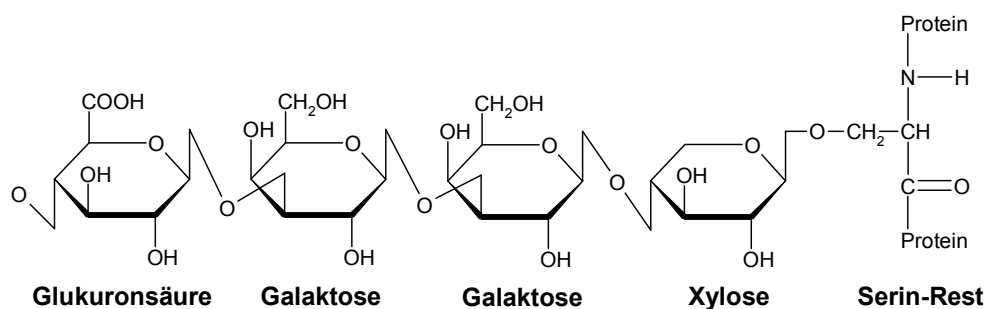


Abb. 2.3: Tetrasaccharid-*Linker*-Struktur der Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatan sulfat, Heparansulfat und Heparin.

Keratansulfat ist entweder N-glykosidisch über Asparaginreste oder O-glykosidisch über Serin- bzw. Threoninreste an die entsprechenden *Core*-Proteine gebunden (Silbert und Sugumarán, 1995).

Hyaluronat, das einfachste Glykosaminoglykan, besteht aus N-Acetylglukosamin und Glukuronsäure. Es ist im Unterschied zu den anderen Glykosaminoglykanen weder sulfatiert noch an ein *Core*-Protein gebunden. Die Biosynthese wird von dem membranständigen Enzymkomplex HA-Synthase an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran katalysiert (Klewes *et al.*, 1993; Itano und Kimata, 1996).

2.3 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen repräsentieren eine große Gruppe von Enzymen, die aktivierte Zuckerreste auf Protein-, Zucker- oder Lipid-Akzeptoren übertragen. Sie sind in der Reihenfolge entsprechend der von ihnen katalysierten Reaktionen im endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat lokalisiert und weisen eine hohe Substrat- und Akzeptorspezifität auf (Amado *et al.*, 1999). Bisher konnten die Aktivitäten von über 200 Transferasen oder deren Sequenzen identifiziert werden (Heinonen *et al.*, 2003). Die Analysen ihrer Strukturen und katalytischen Eigenschaften sind hochkomplex, da sie nur über geringe Sequenzhomologien verfügen (Breton *et al.*, 1998). Die meisten eukaryontischen Glykosyltransferasen sind Typ-II-Transmembranproteine (Paulson und Colley, 1989; Joziase, 1992). Sie bestehen aus einer kurzen aminoterminalen cytoplasmatischen Region (C), einer hydrophoben Transmembranregion (T), einer Stammregion (S) variabler Länge und einer großen globulären katalytischen Domäne am C-terminalen Ende (Abb. 2.4) (Paulson und Colley, 1989).

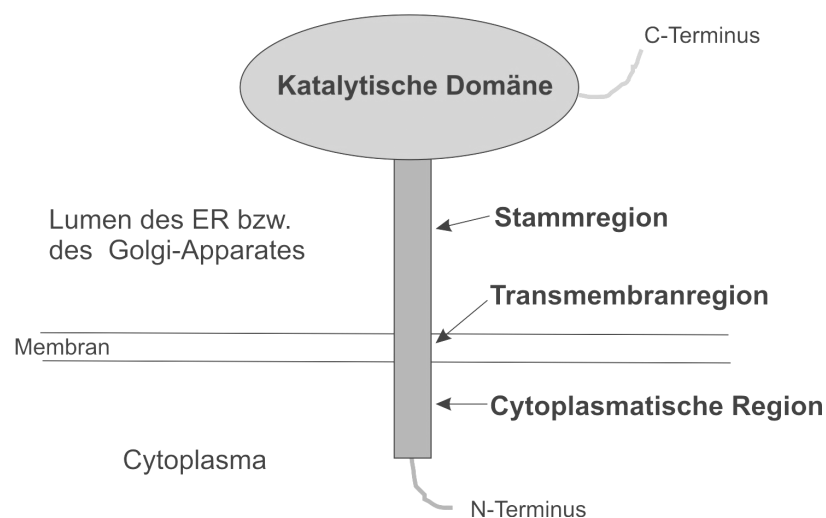


Abb. 2.4: Domänenstruktur der Glykosyltransferasen.

Im katalytischen Zentrum der Glykosyltransferasen findet man häufig ein konserviertes DXD-Motiv (X = beliebige Aminosäure). Es wird angenommen, dass es durch die Koordination zweiwertiger Kationen an der Bindung des aktivierten Zuckers beteiligt ist (Gastinel *et al.*, 1999; Unligil und Rini, 2000; Ramakrishnan und Qasba, 2001).

Die Stammregionen der bisher untersuchten Glykosyltransferasen sind nicht an der enzymatischen Aktivität beteiligt. Es wird angenommen, dass sie für die räumliche Anordnung der katalytischen Domäne verantwortlich sind (Breton *et al.*, 2001). Einige Glykosyltransferasen werden im Bereich der Stammregion proteolytisch gespalten und können in löslicher Form in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Gerber *et al.*, 1979; Weinstein *et al.*, 1987). Es wird diskutiert, ob die Freisetzung katalytischer Domänen zur Regulation der zellulären Aktivität dient (Grabenhorst und Conradt, 1999).

Der Mechanismus der intrazellulären Zielsteuerung der Glykosyltransferasen ist noch nicht vollständig geklärt; es werden die *bilayer thickness* und die *kin recognition* Hypothese diskutiert (Nilsson *et al.*, 1994; Munro, 1998). Das *bilayer thickness* Modell postuliert, dass die Golgi-Retention über die Länge der Transmembrandomäne vermittelt wird. Die *kin recognition* Hypothese schlägt vor, dass die Retention durch die Oligomerisierung der Enzyme induziert wird. Keine der beiden Hypothesen reicht zur vollständigen Erklärung des komplexen Retentionsmechanismus aus. Bei den bisher untersuchten Enzymen wurden keine Consensus-Sequenzen gefunden. Die Aufklärung der Retentionsmechanismen verschiedener Glykosyltransferasen veranschaulicht, dass unterschiedliche Protein-Regionen für die Retention verantwortlich sind. Bei einigen Glykosyltransferasen werden neben der Beteiligung der Transmembran- und der Stammregion auch ein Einfluss der cytoplasmatischen oder der katalytischen Domäne beschrieben (Colley, 1997; Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 1999; Milland *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2004).

2.4 Xylosyltransferasen

Die Glykosylierung der *Core*-Proteine in Proteoglykanen, die Heparin, Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat enthalten, wird von der Xylosyltransferase I (XT-I, EC 2.4.2.26) initialisiert. Sie katalysiert den Transfer von D-Xylose aus UDP-D-Xylose auf spezifische Serinreste im *Core*-Protein (Schwartz, 1977). Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese der Glykosaminoglykane dar (Kearns *et al.*, 1991). Die intrazelluläre Lokalisation der XT-I ist noch nicht genau bekannt;

es werden sowohl das endoplasmatische Retikulum (Kearns *et al.*, 1991; Vertel *et al.*, 1993) als auch der Golgi-Apparat als Ort der Xylosylierung vorgeschlagen (Nuwayhid *et al.*, 1986; Lohmander *et al.*, 1989).

Damit ein Serinrest als Xylose-Akzeptor fungieren kann, muss er in einer bestimmten Consensus-Sequenz lokalisiert sein. Durch kinetische Studien und Vergleiche von Glykosylierungsstellen in Chondroitinsulfat-Proteoglykanen konnte das Erkennungssignal a-a-a-a-G-S-G-a-b-a (mit a = E oder D und b = G, E oder D) für die XT-I vermittelte Xylosylierung identifiziert werden (Brinkmann *et al.*, 1997). Anhand dieser Consensus-Sequenz konnten Seidenfibroin von *Bombyx mori*, rekombinantes Bikunin und ein Fragment des *fibroblast growth factor* (bFGF) als geeignete Akzeptoren für den radiochemischen Enzymaktivitätstest zur Bestimmung der XT-I-Aktivität bereitgestellt werden (Campbell *et al.*, 1984; Weilke *et al.*, 1997; Kuhn *et al.*, 2005). Mit Hilfe des Aktivitätstests kann die lösliche Form der XT-I in Körperflüssigkeiten quantifiziert werden. Die Untersuchung der XT-I-Aktivität kann bei physiologischen und pathobiochemischen Prozessen, die durch Veränderungen im Proteoglykan-Stoffwechsel gekennzeichnet sind, von Bedeutung sein. Bei Patienten mit systemischer Sklerodermie und Pseudoxanthoma elasticum konnte eine erhöhte XT-I-Aktivität im Serum nachgewiesen werden (Weilke *et al.*, 1997; Götting *et al.*, 1999a; Götting *et al.*, 2005).

Zusätzlich zum XT-I-Gen (XYLT-I-Gen) besitzen höhere Organismen ein XYLT-II-Gen, das eine Isoform der XT-I, die XT-II, codiert. Die beiden Xylosyltransferasen weisen in ihrer C-terminalen, katalytischen Domäne Sequenzhomologien von über 80 % auf (Götting *et al.*, 2000). Aufgrund der Homologie ist zu vermuten, dass die XT-II ebenfalls eine Glykosyltransferase ist. Ihre physiologische Funktion und die katalytische Aktivität konnten bislang noch nicht ermittelt werden. Das aus 12 Exons bestehende XYLT-I-Gen ist auf Chromosom 16p13.1 lokalisiert und hat eine genomische Größe von über 300 kbp. Der offene Leserahmen der XYLT-I-mRNA umfasst 2877 bp und codiert ein Protein mit einer Masse von 108 kDa (Wilson, 2004). Als XYLT-II-Locus wurde 17q21.3-22 identifiziert. Das Gen umspannt nur 15 kbp und enthält 11 Exons. Die cDNA codiert für ein 865 Aminosäure großes Protein mit einer Masse von 97 kDa. Trotz der Größenunterschiede ist die Exon/Intron-Struktur der XYLT-Gene hochkonserviert, was die Vermutung zulässt, dass sie von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Götting *et al.*, 2000).

2.5 Typ-1-Diabetes

Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko, an mikro- und makrovaskulären Komplikationen zu erkranken. Zu den makrovaskulären Komplikationen zählen koronare Herzerkrankungen, periphere Gefäßerkrankungen und Schlaganfälle. Mikrovaskuläre Probleme beim Diabetes sind die diabetische Nephropathie (DN), die diabetische Retinopathie (DR) und die periphere Neuropathie (Williams, 2003). Koronare Herzerkrankungen und periphere Gefäßerkrankungen treten bei Diabetikern häufig gemeinsam auf, besonders im Zusammenhang mit Bluthochdruck (Kannel und McGee, 1979). Bluthochdruck spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung makrovaskulärer Komplikationen, ist aber ebenso in die Pathogenese der mikrovaskulären Erkrankungen verwickelt. Epidemiologische Studien haben eine signifikante Assoziation zwischen bestehender Hypertonie und der Entwicklung und Progredienz von DN und DR gezeigt (Parving *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1988; Teuscher *et al.*, 1988; Deckert *et al.*, 1989; Parving *et al.*, 1989).

Etwa ein Drittel aller Typ-1-Diabetiker entwickeln innerhalb von 10-20-jähriger Diabetesdauer eine Nephropathie, die damit häufigste Ursache für die terminale Niereninsuffizienz ist (Andersen *et al.*, 1983; Krolewski *et al.*, 1985). Die Pathogenese der DN wird durch verschiedene Ursachen hervorgerufen oder verstärkt, wobei die genauen molekularen Mechanismen bislang noch unklar sind. Die Dauer des Diabetes, die Einstellung des Blutzuckers, Bluthochdruck und genetische Ursachen werden im Zusammenhang mit der Entwicklung der DN diskutiert. Es wird davon ausgegangen, dass der genetische Einfluss auf die Ätiologie der DN multigenisch ist (Krolewski, 1999).

Die diabetische Mikroangiopathie geht mit funktionalen, strukturellen und chemischen Veränderungen an der kapillären Basalmembran (*capillary basement membrane*, CBM) einher. Die negativ geladenen Sulfatgruppen der Heparansulfat-, Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Proteoglykane verleihen der Membran eine ladungsabhängige Permeabilität. Die Verdickung der CBM ist das strukturelle Kennzeichen Diabetes-induzierter Gewebeschädigung (Johnson *et al.*, 1981; Hidayat *et al.*, 1985). Die Zunahme an Typ-IV-Kollagen und seinen Glykosylierungsprodukten und eine Abnahme an Heparansulfat-Proteoglykanen sowie dessen Sulfatierungsgrad konnten als chemische Veränderungen in der Zusammensetzung der CBM gezeigt werden (Williamson *et al.*, 1988). Daraus resultierende Folgen sind die Erhöhung der Kapillarpermeabilität und des Blutflusses.

Die stark negativ geladenen Heparansulfat-Proteoglykane sind wichtige strukturelle Bestandteile vaskulärer Basalmembranen; in der glomerulären Basalmembran (*glomerular basement membrane*, GBM) der Niere sind sie verantwortlich für die größen- und ladungsabhängige Filtration (Kanwar *et al.*, 1980; Raats *et al.*, 2000).

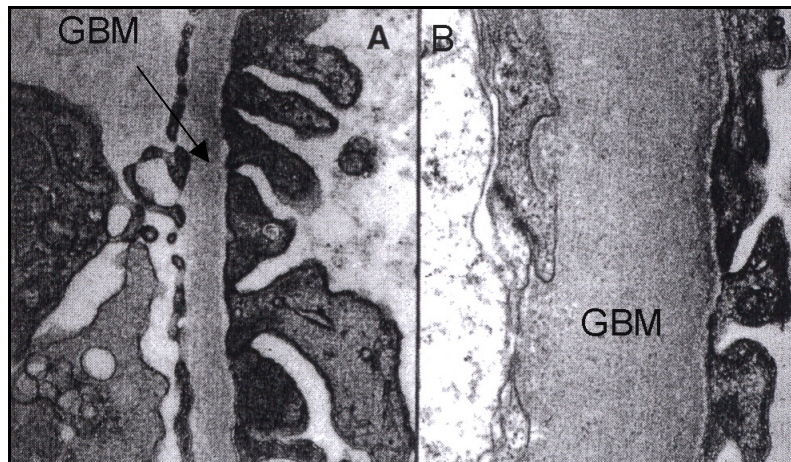


Abb. 2.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme der GBM einer gesunden Kontrollperson (A) und der verdickten GBM eines Patienten mit diabetischer Nephropathie (B) (Caramori und Mauer, 2003).

Die in der GBM nachgewiesenen *Core*-Proteine der Heparansulfat-Proteoglykane sind Agrin, Perlecan und Typ-XVIII-Kollagen, wobei der Anteil an Agrin mengenmäßig überwiegt (Iozzo, 1998; Halfter *et al.*, 1998; Raats *et al.*, 1998). Die Verdickung der GBM und die Abnahme an negativer Ladung führen letztendlich zu einer erhöhten Permeabilität für Albumin (Deckert *et al.*, 1989; Tamsma *et al.*, 1994). Ursachen für den Verlust negativer Ladung können eine verminderte Glykosaminoglykan-Ketten-Addition, Elongation oder Sulfatierung sein. Eine gesteigerte Degradierung der Glykosaminoglykane kann ebenfalls zu einem Ladungsverlust führen (Bernfield *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Heparansulfat-Proteoglykanen in der GBM reduziert ist, ohne dass der Gehalt an ihren *Core*-Proteinen verändert ist (van den Born *et al.*, 1992; Tamsma *et al.*, 1994).

2.6 Arthrose

Arthrose ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die durch den progressiven Abbau des Gelenkknorpels, den Umbau des subchondralen Knochens und der Entzündung der Synovia gekennzeichnet ist (Howell, 1986). Als weltweit häufigste Gelenkerkrankung betrifft sie Wirbelsäule, Hüfte, Knie, Sprunggelenk, Fuß- und Zehengelenke, Schulter, Handgelenk und Daumengrundgelenk von über 60 % der älteren Bevölkerung (Kerr, 2003).

Man unterscheidet klinisch die primäre (oder idiopathische) und die sekundäre Arthrose. Die Ursachen der idiopathischen Form sind multifaktoriell; neben genetischen Faktoren beeinflussen Übergewicht, hohe Knochendichte, Hormone und Alter ihre Entwicklung (Ghosh und Cheras, 2001), wobei die genetische Prädisposition mit 65 % als der Hauptrisikofaktor ermittelt wurde (MacGregor und Spector, 1999; Shin, 2001). In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde der Einfluss verschiedener Gene vorgeschlagen, die an der Homöostase des Knorpels beteiligt sind (Zhai *et al.*, 2004). Die sekundäre Arthrose kann als Folge von Fehlstellungen, Unfällen, Infektionen und Stoffwechselerkrankungen auftreten (Sharma, 2001).

Die zentralen Kennzeichen der Arthrose sind die Reduktion und Desorganisation des Knorpels in den betroffenen Gelenken. Gelenkknorpel bestehen zu über 98 % aus ECM, die zu 60 - 80 % aus Wasser, zu 15 - 20 % aus Kollagen (überwiegend Typ-II) und zu 3 - 10 % aus Proteoglykanen zusammensetzt ist (Sulzbacher, 2000; Volpi, 2004). Die zellulären Bestandteile, die Chondrozyten, sind für die Homöostase der ECM verantwortlich. Das geordnete Verhältnis von Kollagen zu Proteoglykanen stellt die Voraussetzung für die Knorpel elastizität dar, so dass unter Druckeinwirkung Wasser aus dem Fibrillennetzwerk entweichen und im Stadium der Entlastung wieder in den Knorpel zurückkehren kann (Mow *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2004). Den Hauptanteil an Proteoglykanen im Knorpel bildet Aggrecan, weiterhin kommen noch Biglycan und Decorin vor (Muir, 1983). Der Knorpel von Arthrosepatienten besitzt, bedingt durch einen teilweisen Verlust der Hyaluronat-Bindungsrezeptoren, eine verringerte Kapazität zur Bildung von Aggrecan-Aggregaten (Greiling *et al.*, 1995).

Es wird angenommen, dass Arthrose die Folge von mechanischen und biochemischen Ereignissen ist, die in einem Missverhältnis zwischen Synthese und Abbau der Knorpelmatrix resultieren (Malemud, 1999).

Die Degeneration des Knorpels verläuft in verschiedenen Phasen. Im initialen Stadium steigern die Chondrozyten ihre metabolische Aktivität, um dem Abbau entgegenzuwirken (Hardingham und Bayliss, 1991). In diesem Stadium konnte langkettigeres Chondroitinsulfat nachgewiesen werden (Caterson *et al.*, 1990). Weiterhin wurde eine Verschiebung der Ratio von Chondroitin-6-Sulfat zum Chondroitin-4-Sulfat (Bayliss *et al.*, 1995) und das Auftauchen eines neuen Chondroitinsulfat-Epitops 3B3 beschrieben (Slater *et al.*, 1995). Im weiteren Krankheitsverlauf führen der Verlust sämtlicher ECM-Bestandteile und die gestörte Vernetzung des Aggrecans mit Hyaluronsäure zur Erosion des Knorpels. Zuletzt kommt es zum vollständigen Verlust des Gelenkknorpels mit der Freilegung des subchondralen Knochens. Diese Ereignisse können die Folge einer gesteigerten Aktivität proteolytischer Enzyme sein, die von Chondrozyten synthetisiert werden. Weitere Ursachen können eine verminderte Biosynthese oder eine gestörte Retention der Proteoglykane sein (Knudson und Knudson, 2001).

Das reversible Frühstadium der Arthrose ist schwer zu diagnostizieren, da die Veränderungen schleichend und zunächst symptomlos verlaufen. Die Diagnosestellung erfolgt meist erst anhand von Röntgenaufnahmen der betroffenen Gelenke, wenn durch einen irreversiblen Knorpelschaden Schmerzen auftreten. Dadurch ist eine frühzeitige Behandlung, die dem weiteren Knorpelabbau entgegenwirken könnte, nicht möglich. Bisher ist noch kein sensitiver und spezifischer Marker etabliert, der mit den frühen Veränderungen im Knorpel assoziiert ist (Matyas *et al.*, 2004; Reijman *et al.*, 2004).

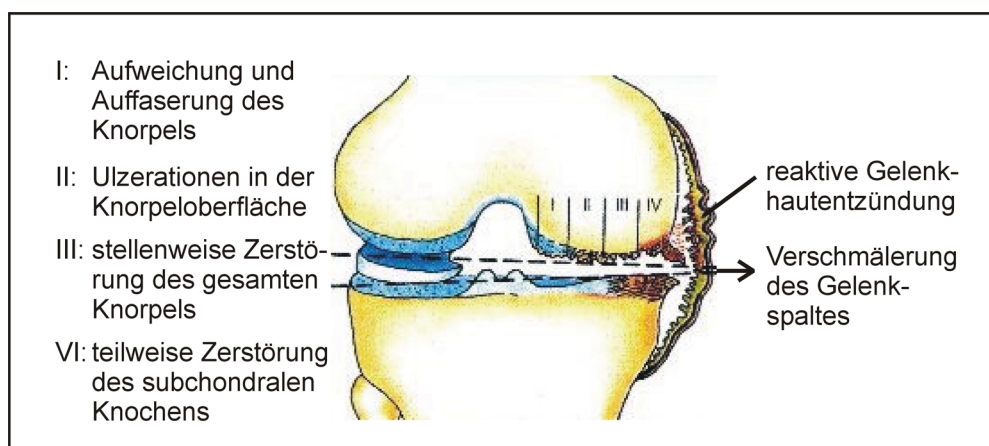


Abb 2.6: Stadien der Arthrose am Beispiel der Kniegelenkarthrose (Geiger, 1997; verändert).

2.7 Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

Pseudoxanthoma elasticum (PXE) ist eine systemische, degenerative Erkrankung des Bindegewebes, die charakterisiert ist durch eine progressive Mineralisierung und Fragmentierung elastischer Fasern und einer verstärkten Ablagerung von Proteoglykanen. Diese Veränderungen in der ECM führen letztendlich zum Elastizitätsverlust der Haut, der Augen und des kardiovaskulären Systems (Neldner, 1988).

PXE wird verursacht durch Mutationen im Gen *ATP-binding cassette transporter subfamily C member 6* (ABCC6), welches für das transmembrane Transporterprotein *multidrug resistance-associated protein 6* (MRP6) codiert (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Die physiologische Funktion von MRP6 ist bisher noch nicht bekannt. Unter *in vitro*-Bedingungen konnten die transmembrane Translokation des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten BQ-123 und von Glutathion-Konjugaten wie Leukotrien C4 nachgewiesen werden (Belinsky *et al.*, 2002; Ilias *et al.*, 2002). Bis heute sind über 120 PXE-verursachende Mutationen identifiziert worden, die mit Modifikationen oder dem Verlust des MRP6 einhergehen (Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000; Struk *et al.*, 2000; Götting *et al.*, 2004; Hendig *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2005; Miksch *et al.*, 2005). PXE ist eine seltene Erkrankung und kommt mit einer Prävalenz von 1:75.000 vor, wobei Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer betroffen sind. Die ersten klinischen Symptome treten meist in der zweiten Lebensdekade auf (Neldner und Struk, 2002).

Das zentrale Merkmal von PXE ist die degenerative Kalzifizierung und spätere Zerstörung von elastischen Fasern. Diese Veränderungen der ECM verursachen ein hochvariables Krankheitsbild. Nahezu alle Betroffenen leiden unter den charakteristischen Papeln und Plaques der Haut und den Veränderungen des Augenhintergrunds (Uitto *et al.*, 1998; Sherer *et al.*, 1999). Bei schweren Verlaufsformen kommt es aufgrund der Kalzifizierung zu einer Verengung der Blutgefäße. Dies kann bereits bei jungen PXE-Patienten zu Bluthochdruck, Arteriosklerose und Angina pectoris führen und geht mit einem erhöhten Myokardinfarkt-Risiko einher (Lebwohl *et al.*, 1993).

Neben der Kalzifizierung prägen Veränderungen der kollagenen Fasern und die Ansammlung von Proteoglykanen im extrazellulären Raum der befallenen Gewebe das Krankheitsbild (Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1981; Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1986). Es wird diskutiert, ob die

Beteiligung dieser Komponenten einen Einfluss auf das hochvariable Krankheitsbild besitzen (Lebwohl *et al.*, 1993).

Fibroblasten aus von PXE-betroffenen Hautregionen produzieren Proteoglykan-Varianten mit veränderten Eigenschaften (Longas *et al.*, 1986; Sakuraoka *et al.*, 1994). Sie besitzen stärker anionische Eigenschaften, erhöhte hydrodynamische Größen, veränderte hydrophobe Wechselwirkungen sowie Unterschiede in Gehalt und Verteilung von Heparansulfaten (Tiozzo-Coasta *et al.*, 1988; Passi *et al.*, 1996). Die Störungen im Proteoglykan-Metabolismus von PXE-Patienten gehen mit einer veränderten Urin-Zusammensetzung einher. Der Anteil an Chondroitinsulfat im Urin von PXE-Patienten ist reduziert und die Menge an Heparansulfat erhöht. Diese Verschiebung führt letztlich zu einer Verminderung des Gesamtanteils an Glykosaminoglykanen um 34 %. Darüber hinaus wurden signifikante Änderungen im Sulfatierungsgrad von Chondroitinsulfat und Heparansulfat nachgewiesen (Maccari *et al.*, 2003).

Bei PXE-Patienten, und insbesondere bei Patienten mit einem Hypertonus, konnte eine signifikant erhöhte XT-I-Aktivität im Serum nachgewiesen werden. Die Erhöhung spiegelt den veränderten Proteoglykan-Stoffwechsel wieder und wird als Parameter zur Bewertung von Umbauprozessen der ECM diskutiert (Götting *et al.*, 2005).

2.8 Sequenzvariationen

Zur Bezeichnung von Variationen in der Sequenz von Nukleinsäuren und Proteinen existieren verschiedene Begriffe. Der Begriff „Mutation“ wird verwendet, um einfache, aber auch krankheitsverursachende, Veränderungen darzustellen. Der Begriff „Polymorphismus“ beschreibt nicht-krankheitsverursachende Veränderungen oder Variationen, die mit einer Frequenz von über 1 % in der Population auftreten. Zur Vermeidung von Verwechslungen kann generell der Begriff „Sequenzvariation“ verwendet werden (den Dunnen und Antonarakis, 2001). In der vorliegenden Arbeit werden die von den Dunnen und Antonarakis (2001) empfohlenen Nomenklaturregeln befolgt.

2.9 Gegenstand der Arbeit

Die Xylosyltransferase I katalysiert den initialen Schritt der Biosynthese von Glykosaminoglykan-Ketten in Proteoglykanen. Sie stellt somit ein zentrales Enzym beim Aufbau der extrazellulären Matrix dar. Für die homologe XT-II, deren Sequenz vermuten lässt, dass es sich ebenfalls um eine Glykosyltransferase handelt, nimmt man an, dass sie auch an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt ist.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte erstmals die genetische Variabilität der humanen Xylosyltransferasen mittels DHPLC-Analyse untersucht werden. Der pathobiochemische Einfluss dieser Variationen sollte in verschiedenen, durch einen veränderten Proteoglykan-Metabolismus gekennzeichneten, Erkrankungen ermittelt werden und die pathologische Relevanz durch die Untersuchung einer Kontrollgruppe überprüft werden.

Statistische Auswertungen sollten durchgeführt werden, um Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu detektieren.

Zur gezielten Untersuchung der Auswirkung von natürlich vorkommenden Aminosäure-Substitutionen auf die XT-I-Aktivität, sollten entsprechende Mutanten generiert und in *High Five*-Insektenzellen exprimiert werden. Die katalytische Aktivität der rekombinanten Proteine sollte im radiochemischen XT-Test überprüft werden.

Da bislang für die vollständige XT-I noch kein Expressionssystem etabliert ist, sollte ein System für die Expression der GFP-markierten XT-I in Säugerzellen bereitgestellt werden. Zur Ermittlung der intrazellulären Lokalisation und der dafür erforderlichen Sequenzen sowie zum Vergleich dieser Sequenzen in den beiden Xylosyltransferasen sollten verschiedene verkürzte und deletierte GFP-markierte XT-I- und XT-II-Varianten hergestellt werden. Die Analyse sollte nach Behandlung mit spezifischen Inhibitoren und Immunfluoreszenzfärbung am Mikroskop erfolgen.

3 Patienten und Materialien

3.1 Patienten- und Kontrollkohorten

3.1.1 Typ-1-Diabetiker

Die initiale Analyse der genetischen Variabilität der XYLT-Gene wurde mit DNA-Proben von 96 Typ-1-Diabetikern mit und ohne DN durchgeführt (die klinischen Parameter sind in Tabelle 3.1 aufgeführt). Zur weiteren Aufklärung assoziierter Variationen wurden 912 weitere DNA-Proben von Typ-1-Diabetikern mit und ohne DN analysiert (Tab. 3.2). Die Bereitstellung der Proben erfolgte durch das Steno Diabetes Centre in Dänemark, an dem die Patienten 1993 untersucht wurden. Die Diagnose der DN erfolgte anhand der folgenden Kriterien: persistierende Albuminurie von ≥ 300 mg/24 h in mindestens 2 von 3 aufeinanderfolgenden 24-h Sammelurinproben, Vorhandensein von DR, und keinem klinischen oder labormedizinischen Beweis von anderen Nierenerkrankungen als der diabetischer Glomerulosklerose. Die lokale Ethikkommission genehmigte diese Studie und alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis an der Teilnahme dieser Studie.

Tab. 3.1: Klinische Parameter von Typ-1-Diabetikern der Initialstudie mit und ohne Nephropathie. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, Mediane (Bereiche) oder Anzahl an Probanden.

	Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie	Typ-1-Diabetiker ohne Nephropathie	P-Wert
Anzahl	48	48	-
Geschlecht [Männer/Frauen]	29 / 19	22 / 26	0,16
Alter [Jahre]	41,1 \pm 11,2	51,8 \pm 14,9	<0,01
Diabetesdauer [Jahre]	27 \pm 9	32 \pm 12	0,03
Retinopathie (keine/nichtproliferativ/proliferativ)	1 / 9 / 38	47 / 1 / 0	<0,01
Systolischer Blutdruck [mmHg]	141 \pm 17	130 \pm 17	<0,01
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	81 \pm 12	72 \pm 9	<0,01
HbA _{1c} [%]	9,0 \pm 1,3	8,1 \pm 1,1	<0,01
Albuminausscheidung [mg/24h]	849 (34 - 4965)	5 (2 - 23)	<0,01
Serum Kreatinin [μ mol/l]	109 (57 - 537)	80 (58 - 104)	<0,01

Tab. 3.2: Klinische Parameter von Typ-1-Diabetikern mit und ohne Nephropathie. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, Mediane (Bereiche) oder Anzahl an Probanden.

	Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie	Typ-1-Diabetiker ohne Nephropathie	P-Wert
Anzahl	453	459	-
Geschlecht [Männer/Frauen]	274 / 179	255 / 204	0,19
Alter [Jahre]	42,5 \pm 10,9	46,0 \pm 12,2	<0,01
Diabetesdauer [Jahre]	28,1 \pm 8,7	25,9 \pm 9,6	<0,01
Retinopathie (keine/nichtproliferativ/proliferativ)	9 / 131 / 313	172 / 183 / 104	<0,01
Gewicht [kg]	72,8 \pm 12,4	73,8 \pm 12,9	0,21
Größe [cm]	172,6 \pm 8,9	174,0 \pm 9,2	0,02
Systolischer Blutdruck [mmHg]	143 \pm 20	134 \pm 18	<0,01
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	81 \pm 12	77 \pm 10	<0,01
HbA _{1c} [%]	9,3 \pm 1,5	8,4 \pm 1,0	<0,01
Albuminausscheidung [mg/24h]	614 (3 - 7974)	7 (1 - 30)	<0,01
Serum Kreatinin [μ mol/l]	103 (54 - 706)	79 (40 - 134)	<0,01

3.1.2 Arthrosepatienten

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen EDTA-Blutproben und Serumproben von 49 Arthrosepatienten zur Verfügung. Die Blutabnahme und die Befragung der Probanden hinsichtlich ihrer Anamnese erfolgten durch die Auguste-Viktoria-Klinik Bad Oeynhausen. Die Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt und alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie.

Tab. 3.3: Klinische Parameter der Arthrosepatienten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung oder die Anzahl an Probanden.

	Männer	Frauen	P-Wert
Anzahl	21	28	-
Alter [Jahre]	71,6 \pm 7,1	65,8 \pm 9,8	0,03

	Männer	Frauen	P-Wert
Krankheitsdauer [Jahre]	3,9 ± 0,9	7,0 ± 8,8	0,22
Diagnosealter [Jahre]	67,7 ± 8,3	58,8 ± 14,2	0,01
betroffene Gelenke			
Anzahl	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,5	1,0
Hüfte	13 (62 %)	22 (79 %)	0,22
Knie	10 (48 %)	13 (46 %)	1,0
Finger	-	1 (4 %)	1,0
Wirbelsäule	5 (24 %)	-	0,01
XT-I-Aktivität [mU/L]	1,06 ± 0,17	1,02 ± 0,13	0,37

3.1.3 PXE-Patienten

Zur Analyse der genetischen Variabilität der XYLT-Gene standen EDTA-Blutproben und Serumproben von 65 PXE-Patienten zur Verfügung. Die Blutabnahme, die Erstellung der Diagnose, weitere Untersuchungen und die Anamnese der Patienten wurde in der PXE-Ambulanz der Dermatologischen Klinik im Krankenhaus Bethesda in Freudenberg durchgeführt. Wichtige Parameter der PXE-Patienten sind in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt und alle Patienten erklärten sich mit einer Teilnahme an dieser Studie einverstanden.

Tab. 3.4: Klinische Parameter der PXE-Patienten. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung oder die Anzahl an Probanden.

	Männer	Frauen	P-Wert
Anzahl	18	47	-
Alter [Jahre]	52,8 ± 13,3	46,0 ± 14,3	0,09
Diagnosealter [Jahre]	37,1 ± 16,2	30,0 ± 15,8	0,12
Raucher	3 (16,7 %)	10 (21,3 %)	1,0
Symptome			
Gesamtanzahl der beteiligten Organe	3,6 ± 1,6	3,0 ± 1,5	0,15
Augenbeteiligung	17 (94,4 %)	41 (87,2 %)	0,66

	Männer	Frauen	P-Wert
Hautläsionen	15 (83,3 %)	43 (91,5 %)	0,39
Herzerkrankungen	7 (38,9 %)	4 (8,5 %)	0,01
Gefäßveränderungen	8 (44,4 %)	13 (27,7 %)	0,24
Bluthochdruck	5 (27,8 %)	15 (31,9 %)	0,80
Harnableitendes System	4 (22,2 %)	3 (6,4 %)	0,09
Gastrointestinaltrakt	3 (16,7 %)	5 (10,6 %)	0,67
XT-I-Aktivität [mU/l]	0,98 ± 0,44	0,89 ± 0,37	0,39

3.1.4 Kontrollpersonen

Als gesunde Kontrollpersonen wurden EDTA-Blutproben anonymisierter Blutspender im Alter von 18 bis 68 Jahren eingesetzt.

3.2 Material

3.2.1 Zelllinien

<i>High Five</i> -Insektenzellen (<i>Trichoplusia ni</i> , Ovarzelllinie)	Invitrogen, Groningen, NL
HEK-293 (human, embryonale Niere)	ICN Biomedicals, Meckenheim
SAOS-2 (human, Osteosarkom)	DSMZ, Braunschweig
SW1353 (human, Chondrosarkom)	ATCC, Rockville, USA

3.2.2 Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien

Antibiotika-Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen
Amphotericin B (25 µg/mL)	
Penicillin (10 U/µL)	
Streptomycin (10 mg/mL)	
<i>Cellfectin</i> -Reagenz	Invitrogen, Groningen, NL
DMEM (1 x High Glukose)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DPBS (9,5 mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Fötale Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
<i>Fugene6</i> -Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Gentamycin (50 mg/mL)	Gibco BRL, Eggenstein

L-Glutamin (100 x) (29,3 mg/mL)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
<i>Insect-XPRESS Protein Free Medium</i>	Cambrex, Verviers, Belgien
RPMI 1640	Cambrex, Verviers, Belgien
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Cambrex, Verviers, Belgien

3.2.3 Bakterienstämme

Escherichia coli TOP10 Invitrogen, Groningen, NL
 Genotyp: *F*, *mcrA*, $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}rcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lac74$, *DeoR*,
recA1, *araD139*, $\Delta(ara, leu)7697$, *galU*, *galK λ* , *rpsL*, *endA1*, *nupG*
 Phänotyp: *amp*^s

Escherichia coli XL10-Gold Stratagene, La Jolla, CA
 Genotyp: *Tet*^R, $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*,
recA1, *gyrA96*, *relA1*, *lac Hte* [*F'* *proAB lac^gZ Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy*
Cam^RJ^a]
 Phänotyp: *amp*^s

3.2.4 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
SOC-Medium	2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose in dest. Wasser

3.2.5 Vektoren

pCR2.1-TOPO Invitrogen, Groningen, NL
 Der Vektor pCR2.1 wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet, die mit *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden oder denen mittels der *Taq*-Polymerase ein Adenin angehängt wurde. Der Vektor wird in linearisierter Form mit endständigen überhängenden T-Nukleotiden eingesetzt.

pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

Invitrogen, Groningen, NL

Der Vektor pcDNA3.1/CT-GFP wird zur Expression von C-terminal mit GFP-markierten Proteinen in Säugerzellen eingesetzt. Die Transkription wird durch den CMV-Promotor initiiert.

IMAGE-Klon: 2116905

Der Klon mit der *GenBank accession* Nummer AI524006 enthält die N-terminalen Nukleotide -85 bis 724 der humanen XT-I cDNA im Vektor pT7T3D-Pac (Pharmacia, Schweden). Zwischen den Positionen 40 und 41 fehlen die Nukleotide C und G.

pCG255Δ1-148 XT-I

Der rekombinante Vektor pCG255Δ1-148 XT-I besteht aus dem Expressionsvektor pMIB/V5-His-A ligiert mit einem cDNA-Fragment der XT-I (Nukleotide 444 - 2877). Bei der Expression entsteht ein XT-I-Fusionsprotein mit den beiden C-terminal lokalisierten Peptid-Epitopen V5 und 6xHis (Kuhn *et al.*, 2003).

3.2.6 Reagenzien, Enzyme, Antikörper

Acetonitril, HPLC-Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
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
Betain	Sigma, Taufkirchen
bFGF (1 - 24)	Bachem, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma, Taufkirchen
4-Chloro-1-naphtol	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
DAPI	Chemicon, Hampshire, UK
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard 1-kb-Leiter	Invitrogen, Groningen, NL
DNA-Marker pUC19/ <i>MspI</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
GFP Antiserum (polyklonal, Kaninchen)	Invitrogen, Groningen, NL
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hanks' gepufferte Salzlösung	Gibco, Karlsruhe
Hefeextrakt	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
Kaninchen-anti-Mannosidase II-Golgi Maker, polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
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
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt
Platinum- <i>Taq-DNA-Polymerase High Fidelity</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot; New England BioLabs, Beverly, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
<i>SeeBlue Plus 2 pre-stained Standard</i>	Invitrogen, Groningen, NL

Seide (unbehandelt)	Idee, Bielefeld
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (1 U/ μ L)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, CA, USA
T4-DNA Ligase	AGS, Heidelberg
<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-[¹⁴ 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 ₂ O ₂), 30%ig	Merck, Darmstadt
Ziege-anti-Kaninchen-TRITC; polyklonal	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-HRP; polyklonal	Dianova, Hamburg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.2.7 Reagenziensätze

<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>GFP Fusion TOPO TA Expression Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL
<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>QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, La Jolla, CA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>TOPO TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Groningen, NL

3.2.8 Software

<i>Chromas</i>	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
<i>NEBcutter</i>	http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html
<i>Oligo Primer Analysis, 5.0</i>	National Biosciences, Plymouth, USA
<i>Seqman, 3.03</i>	DNASStar Inc., Madison, USA
<i>Sequence Analysis 3.7</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
<i>Wavemaker 4.1.42</i>	Transgenomic, Omaha, USA
Prism 4.00	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

3.2.9 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> (5,000 MWCO PES)	Vivascience, Hannover

Es wurden sterile Einwegreaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen und Schalen, Zentrifugenröhrchen und Glasgeräte der Firmen ABgene, Becton Dickinson, Falcon, Sarstedt, Sartorius und Schott verwendet.

3.2.10 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer	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 ₂ O ₂ (30 %)
Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0	0,1 M Zitronensäure; 0,2 M Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
DHPLC-Puffer A	0,1 M TEAA in HPLC-Gradient Grade-Wasser
DHPLC-Puffer B	0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril in HPLC-Gradient Grade-Wasser
PBS, pH 7,2	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in dest. Wasser
PBST, pH 7,2	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20
Substratreagenz (XT-Test)	1 µM UDP-[¹⁴ C]Xylose; 0,6 % solvatisiertes Seidenfibroin; 50 mM KCl; 10 mM KF; 10 mM MnCl ₂ ; 10 mM MgCl ₂ ; 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-Antioxidant 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

3.2.11 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
Fluoreszenzplattenreader	Tecan, Crailsheim
Mikroskop, Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
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
Wavesystem	Transgenomic, Berlin
<i>XCell II-Blot Modul</i>	Invitrogen, Groningen, NL
Zentrifuge	Qualitron, Korea

3.2.12 c.DNA-Sequenzen der Xylosyltransferasen

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden cDNA-Sequenzen der XT-I und XT-II sind unter den folgenden *GenBank accession* Nummern veröffentlicht:

XT-I NM_022166 und XT-II NM_022167.

Es existieren Unterschiede zwischen der genannten XT-I cDNA-Sequenz und den veröffentlichten genomischen Sequenzen (*GenBank accession* Nummern: AC109446, AC099494, AC009152, AC109495). In allen analysierten Proben konnten an den folgenden Positionen nur die Nukleotide der genomischen Sequenzen detektiert werden: IVS1-14: G; c.489: C; c.2850: G und c.2853: A.

Die Nummerierung der Variationen bezieht sich auf die cDNA-Sequenzen und beginnt mit dem ersten Nukleotid des Startcodons (Base 86 in der veröffentlichten Sequenz der XT-I, Base 110 in der veröffentlichten Sequenz der XT-II).

3.2.13 Oligonukleotide (*Primer*)

Die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* wurden von den Firmen Invitrogen (Groningen, NL) und Biomers (Ulm) bezogen. Das *Primer*-Design erfolgte mit der Software *Oligo Primer Analysis, Version 5.0*.

Zur Amplifizierung der Exons 1 - 12 des humanen XYLT-I-Gens und der Exons 1 - 11 des humanen XYLT-II-Gens sowie zu deren Sequenzierung wurden die in Tabelle 3.5 und 3.6 aufgeführten *Primer* verwendet, die in den intronischen Bereichen der Gene lokalisiert sind.

Tab. 3.5: *Primer* zur Amplifizierung und Sequenzierung der Exons 1 - 12 des XYLT-I-Gens.

XYLT-I- Exon	<i>Primer-Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Annealing-Temp.</i> [°C]	PCR-Produkt [bp]
1	GGGTCCCCGCGCCTCG CCTCCCTCCCTCGCCGC	64	444
2	TGCATTTTCTCCTTTCATCCTA CACATCCAAATGGGACCAG	55	188
3.1	AGAAGGTGAGCAGAATGG GCAGGAGAAAGGAAAAGGACA	55	398
3.2	AGATGTCACACTTAGGGG CACTCTTCAAAGGCCAG	55	452
4	GGAGGGTATCAGGGAGGG TTCCCACCCCTGCAAAG	60	311
5	ACCAGCCAGAGCAGGACG GAGGGAAGACACAGAGAG	60	351
6	ACCTTTCTGTGGCTGCAT ATGATCAGAGAAGGTGCT	58	294
7	CCAAAAATTCAGCATCT AATAATTGCCATCATCGC	50	401
8	GGATTTCTGCAGAGGTTT TGCCACATTCTTTAAAC	50	368
9	GGAGGGTGGCGTTAGATG CAACCCCCAGCACTCG	55	471
10	GCACAGGGTTAGCTTATC GTGGGTGGGGAGCCTCA	58	402
11	CACCAAAGACCCTCAA ACTTCAGAATTCACTCCC	50	427
12	CTGCTTTCCCGTTGAGAT CCTATTGGTGGCTCTTCT	56	418

Tab. 3.6: *Primer* zur Amplifizierung und Sequenzierung der Exons 1 - 11 des XYLT-II-Gens.

XYLT-II- Exon	<i>Primer-Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Annealing-Temp.</i> [°C]	PCR-Produkt [bp]
1	GCCCCGCCCCGCCTCCCTA GCAGCCCCGCCAGGACC	64	316
2.1	CAAGGAACAGGAGGAGGT GTGAAGCCATTGTCCGTG	56	399
2.2	CAGGGAGCGTGGAGGGCG GGGGTGAGGATCCGGGCC	62	269
3	AGCATGGAGCTCCAAGTC CCTCTCCCCACCACAGTA	53	309
4	CCAGCGTTCCGACTACCT GGCGGATCCCAGAGTTAC	55	323

XYLT-II- Exon	Primer-Sequenz (5' - 3')	Annealing-Temp. [°C]	PCR-Produkt [bp]
5	AGAAAAGCCAGAAGGTCC GCTTTGAAACCCAGGGCT	60	257
6	AAAGAGCTTAGACCCAC GCAAGGGAGAGTGGAAGG	61	353
7	CTCTCCCTTGCTGCTTGC AACTTCCGGGCGAAGAA	55	481
8	GGTCTGGGGCTACAAC TATGTCAGAAGGGGTCT	55	413
9	AATGCAAATACCGAAAAG CTCCCTGGTGTCTGT	50	448
10	ACTGGCCTGAGATTACAC GGCGAGTCCTATTCTGT	55	480
11	CAGGGGGTGTGCTTACT ATTTCCCGGGTCCTCCAC	60	397

Aufgrund der Länge von über 500 Basenpaaren wurden das Exon 3 der XT-I und das Exon 2 der XT-II in zwei sich überlappende Amplifikate unterteilt, so dass die Analyse des gesamten Exons gewährleistet ist. Die Amplifikate von Exon 12 der XT-I und von Exon 11 der XT-II umfassen nicht den gesamten transkribierten sondern nur den translatierten Bereich.

Der Nachweis der XYLT-II-Mutation c.2402C>G in Exon 11 erfolgte mittels RFLP-Analyse. Um die *BtsI*-Schnittstelle zu generieren, wurde ein modifizierter *antisense-Primer* verwendet. Die Sequenzen der *Primer* sind in Tabelle 3.7 angegeben. Der Nukleotidaustausch, der zur Synthese der Restriktionsschnittstelle führt, ist unterstrichen und in Fettdruck dargestellt.

Tab. 3.7: *Primer* zur RFLP-Analyse der Variation c.2402C>G im XYLT-II-Gen.

XYLT-II- Exon	Primer-Sequenz (5' - 3')	Annealing- Temp. [°C]	PCR-Produkt [bp]
11	CAGGGGGTGTGCTTACT GCCTCGAGCGCAGGGCCTGTGAGC <u>AGT</u>	59	190

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für das Einführen der Aminosäure-Substitutionen in XT-I verwendet wurden, sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8: *Primer*, die eingesetzt wurden, um Aminosäure-Substitutionen in die XT-I einzuführen.

Mutagenese-Primer	Mutation	Primer-Sequenz (5' - 3')
XT-I c1154t XT-I anti c1154t	c.1154C>T p.P385L	TCCGCGTCACCC T CTGGAGGATGGCC GGCCATTCTCCAG A GGGTGACGCGGA
XT-I t1655g XT-I anti t1655g	c.1655T>G p.I552S	CAACAACCTGCGCA G CACCAACTGGAATCG CGATTCCAGTTGGTG C TGCGCAGGTTGTTG
XT-I g1883a XT-I anti g1883a	c.1883G>A p.R628H	CCCGGGCCTGC A CTCCTACTGGGA TCCCAGTAGGAG T GCAGGCCCGGG
XT-I c1994t XT-I anti c1994t	c.1994C>T p.T665M	GACGGGCTGAGA T GTCCCTGCACACG CGTGTGCAGGGAC A TCTCAGCCCGTC
XT-I g2675a XT-I anti g2675a	c.2675G>A p.R892Q	GTGGAACAGGCAC A GAGGAACGCAGCCT AGGCTGCGTTCCTC T GTGCCTGTTCCAC

Die veränderten Nukleotide sind fett und unterstrichen dargestellt.

Zum Ausschluss weiterer Veränderungen, die Einfluss auf die XT-I-Aktivität haben, wurden die generierten Mutanten, die einen Aktivitätsverminderung aufwiesen, wieder rückmutiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Tab. 3.9: *Primer*, die für die Rückumwandlung der XT-I-Mutanten verwendet wurden, die einen Aktivitätsverlust aufwiesen.

Mutagenese-Primer	Wildtyp	Primer-Sequenz (5' - 3')
XT-I t1154c XT-I anti t1154c	c.1154T>C p.L385P	TCCGCGTCACCC C CTGGAGGATGGCC GGCCATTCTCCAG G GGGTGACGCGGA
XT-I g1655t XT-I anti g1655t	c.1655G>T p.S552I	CAACAACCTGCGCA T CACCAACTGGAATCG CGATTCCAGTTGGTG A TGCGCAGGTTGTTG

Für die Amplifikation der N- und C-terminalen XT-I-Fragmente, die anschließend zur Konstruktion der kompletten cDNA der humanen XT-I verwendet wurden, erfolgte mit den in Tabelle 3.10 aufgeführten *Primern*.

Tab. 3.10: *Primer*, die zur Herstellung der kompletten XT-I-cDNA eingesetzt wurden.

Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')	Annealing-Temp. [°C]	PCR-Produkt [bp]
XT-I.1Up XT-I.1HindIII _{Lo}	GCGGGAGCTGCGGGGAG CAA AAGCTT TGGGGACAGAGTTC	61	560
XT-I.2HindIIIUp XT-I.2XbaI _{Lo}	AAGCTT TGAGAATGTGGACA T TCTAGA CCTGAGCCGGCCATC	52	2412

Die zur Erhaltung des korrekten Leserahmens erforderlichen Nukleotide sind fett und unterstrichen dargestellt; Basen, die für das Erzeugen von Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, sind kursiv und unterstrichen.

Die zur Analyse der intrazellulären Lokalisation erzeugten C-terminal verkürzten Varianten der Xylosyltransferasen wurden mit Hilfe der in Tabelle 3.11 aufgelisteten *Primer* hergestellt.

Tab. 3.11: *Primer* zur Synthese C-terminal verkürzter XT-I- und XT-II-Varianten.

<i>Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' - 3')</i>	<i>Annealing-Temp.</i> [°C]	<i>PCR-Produkt</i> [bp]
XT-I.1Up	GCGGGAGCTGCGGGGAG		
XT-I.1 <i>Xba</i> Lo	<u>C</u> <i>TCTAGA</i> ACCGGGGCCTTTCCCAG	61	728
XT-I.1 <i>Hind</i> III Lo	<u>CAA</u> <i>AAGCTT</i> TGGGGACAGAGTTC	61	560
XT-I.1_402Lo	<u>C</u> CTGAGTCTCCAGGGTGATG	63	482
XT-I.1_357Lo	<u>C</u> CCGGGCGGGCAGTGC	63	437
XT-I.1_312Lo	<u>C</u> TTCTCCGGGGCCGCCTC	63	392
XT-I.1_210Lo	<u>C</u> CAGGTCCCGGCGCTCCC	61	290
XT-I.1_105Lo	<u>C</u> GAAATTCACACGACCAGCG	63	185
XT-I.1_39Lo	<u>C</u> GCGCCGGGCCAGCCTCC	63	119
XT-IIUp	GCCCCGCCCGCCTCCCTA		
XT-II_135Lo	<u>C</u> CTCGCCCGCCTCGTCCT	59	251
XT-II_96Lo	<u>C</u> CACTACCAGGCCCTGCAGC	65	212
XT-II_45Lo	<u>C</u> CTTGTAGCGCCGCACCAGC	65	161

Die zur Erhaltung des korrekten Leserahmens erforderlichen Nukleotide sind fett und unterstrichen dargestellt; Basen, die für das Erzeugen von Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, sind kursiv und unterstrichen.

In Tabelle 3.12 sind die *Primer* aufgelistet, die zur Einführung fehlender Basen, zur Eliminierung zusätzlicher Nukleotide sowie zur Deletion der Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen Region eingesetzt wurden.

Tab. 3.12: Mutagenese-*Primer*, die zur Insertion fehlender Basen und zur Deletion der Transmembranregion, der cytoplasmatischen Domäne oder überzähliger Basen verwendet wurden.

<i>Mutagenese-Primer</i>	<i>Primer-Sequenz (5' - 3')</i>
XT-I_ins_cg_Up	CTGGCCCCGGCGCT <u>CG</u> CACTCGGCGCTGCTC
XT-I_ins_cg_Lo	GAGCAGCGCCGAGTG <u>CG</u> AGCGCCGGGCCAG

Mutagenese-Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')
XT-I_del_HindIII_Up	GA <u>ACT</u> CTGTCC <u>CCAAAG</u> <u>A</u> CTTTGAGAATGTGGAC
XT-I_del_HindIII_Lo	GTCCACATTCTCAAAG <u>T</u> CTTTGGGGACAGAGTTC
XT-I_S_Up	CCGCGCTCCGAAGATGAGCAGCCTCGACTCCGG
XT-I_S_Lo	CCGGAGTCGAGGCTGCTCATCTTCGGAGCGCGG
XT-I_T_Up	GGCCGCGCTCCGAAGATGTCGCACTCGGCGCTGCTC
XT-I_T_Lo	GAGCAGCGCCGAGTGCGACATCTTCGGAGCGCGGCC
XT-II_S_Up	GGGCAGGAAGATGTGGAGCTTCAGCG
XT-II_S_Lo	CGCTGAAGCTCCACATCTTCCTGCC
XT-II_T_Up	GGGCAGGAAGATGCTGGCGATTGCCAC
XT-II_T_Lo	GTGGCAATCGCCAGCATCTTCCTGCC

Die zu inserierenden Nukleotide sind kursiv und unterstrichen dargestellt, die zu deletierenden fett und unterstrichen.

Die zur Sequenzierung der kompletten XT-I-cDNA, der verkürzten und deletierten Mutanten sowie die zur Durchführung analytischer PCR eingesetzten *Primer* sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tab. 3.13: *Primer* für Sequenzierungen und für analytische PCRs.

Primer	Primer-Sequenz (5' - 3')
T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
T3-Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
GFP Reverse	GGGTAAGCTTTCCGTATGTAGC
OpIE2-Forward	CGCAACGATCTCCTAAACAC
OpIE2-Reverse	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAGA
XT-I_S310Up	TGCAGCCCGAGGAGGAG
XT-I_346Up	GAGACCAAGTATGACCAG
XT-I_S716Up	AAAGGCCCGGTGAGGT
XT-I_696Up	GAGACCAAGTATGACCAG
XT-I_1003Up	TCTTCCTGGAGTGCGAC
XT-I_1397Up	GCAAGTTTGAAGCCGTGG
XT-I_1805Up	TTGGGAGGCTTCAGTTTT
XT-I_2232Up	CCCCGTCCTCAGCCTGCC
XT-I_S2617Up	CTCGAACAGGCAGCCCA
XT-I_102Lo	AAGCTTTGAGAATGTGGACA
XT-I_400Lo	AGAACGGGACAGGGCAGA
XT-I_752Lo	CCATTCTCCAGGGGGTGA
XT-I_1072Lo	CCAGTCCGAACCGCC ATC
XT-I_1425Lo	TCCAGCTGCCCAATGATT
XT-I_1869Lo	CCCAGAAGACCCCAAAG
XT-I_2111Lo	GAGGCGCAACGAGGAATT

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus EDTA-Blut

Die Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut erfolgt mit Hilfe des *QIAamp DNA Blood Mini Kits* von Qiagen. Bei dieser Methode werden die Blutzellen zunächst lysiert und die DNA anschließend durch Ethanol gefällt. Das ethanolhaltige Lysat wird an eine Silikat-Säule gebunden, gewaschen und durch Zugabe von 200 µL Wasser eluiert. Die gewonnene DNA hat eine Konzentration von bis zu 30 ng/µL und wird bei -20 °C gelagert.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Das Verfahren zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Zellen mit NaOH und anschließender Fällung der genomischen DNA (Birnboim *et al.*, 1979). Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung und wird über die Bindung an eine Anionenaustauschermatrix isoliert (Vogelstein *et al.*, 1979). Zur Aufreinigung der Plasmide aus 5 mL Flüssigkulturen wird das *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen verwendet. Für die Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus 50 mL Kulturen werden das *HiSpeed Plasmid Midi Kit* von Qiagen sowie das *GenElute (HP) Plasmid Midiprep Kit* von Sigma eingesetzt. Man erhält auf diese Weise Plasmide mit Konzentrationen von 0,2 – 0,4 µg/µL.

4.1.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein effizientes Verfahren zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Bereiche (Mullis *et al.*, 1986). Die Methode besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Schritten, die 25 bis 40 mal durchgeführt werden:

- a) Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- b) *Annealing* der *Primer* an die einzelsträngige DNA-Matrize
- c) Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Ein typischer Reaktionsansatz zur Synthese von DNA-Fragmenten ist folgendermaßen zusammengesetzt:

<i>Template</i> -DNA	2,0 µL
10 x PCR-Puffer	5,0 µL
<i>Forward-Primer</i> (25 µM)	1,0 µL
<i>Reverse-Primer</i> (25 µM)	1,0 µL
dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µL
<i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,3 µL
Wasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	ad 50 µL.

Bei der Amplifikation der Exon 1-enthaltenden Fragmente, ist der Zusatz von 10 µL Betain (5 M) erforderlich.

Um erfolgreich transformierte Klone zu identifizieren und um die Orientierung der eingeführten DNA-Fragmente zu bestimmen, werden analytische PCRs durchgeführt, bei denen direkt etwas Zellmasse als *Template* eingesetzt wird.

Ein typisches Temperaturprofil sieht wie folgt aus:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	94 °C	35
<i>Annealing</i>	1 min	50 – 68 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Terminale Elongation	15 min	72 °C	1
Kühlen	10 min	4 °C	1

Die Spezifität der PCR wird durch die Verwendung von *HotStar-Taq*-Polymerasen erhöht, da diese erst durch einen initialen Denaturierungsschritt aktiviert werden. Dadurch werden unspezifische Anlagerung und Polymerisation der *Primer* vor Beginn der Temperaturzyklen verhindert. *Taq*-Polymerasen besitzen die Eigenschaft der „Nicht-Matrizenabhängigen Polymerisationsaktivität“ (Clark, 1988), durch die an das 3'-Ende des PCR-Produktes ein Adenin-Nukleotid angehängt wird. Diese Eigenschaft wird zur effizienten Klonierung von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren genutzt.

4.1.4 Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Zur Mutagenese des Ausgangsplasmids pCG255Δ1-148XT-I wird das *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet. Bei dieser Methode wird das zirkuläre Ausgangsplasmid durch zwei zueinander komplementäre Mutations-Primer unter Verwendung der *Pfu-Turbo*-DNA-Polymerase verändert. Die Abtrennung von parentaler DNA erfolgt durch das Restriktionsenzym *DpnI*, welches selektiv die methylierte Ausgangs-DNA spaltet. Die auf diese Weise gewonnenen doppelsträngigen Plasmide werden zur Transformation von XL10-Gold ultrakompetenten Zellen eingesetzt. Die Reaktionsansätze zur Synthese der veränderten Einzelstränge setzen sich wie folgt zusammen:

10 x <i>reaction buffer</i>	5 µL
Mutations-Primer 1 (200 ng/µL)	1 µL
Mutations-Primer 2 (200 ng/µL)	1 µL
dNTP Mix	1 µL
<i>Quick Solution</i>	3 µL
<i>Pfu-Turbo</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µL)	1 µL
Ausgangsplasmid	0,5 µL
Wasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	ad 50 µL.

Die Reaktionsbedingungen für die Synthese der mutierten Einzelstränge lauten wie folgt:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung der <i>Pfu-Turbo</i> -DNA-Polymerase	15 min	95 °C	1
Denaturierung	50 sec	95 °C	18
<i>Annealing</i>	50 sec	60 °C	
Elongation	7 min	68 °C	
Terminale Elongation	7 min	68 °C	1
Kühlen	∞	4 °C	1

Die Ansätze werden nach Zugabe von jeweils 1 µL *DpnI* (10 U/µL) für 1 – 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Transformation eingesetzt.

4.1.5 Agarosegel-Elektrophorese und Längenbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Agarosegel-Elektrophorese dient zur Auftrennung und Längenbestimmung von DNA-Fragmenten. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindig-

keit der negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Die Mobilität ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

In Abhängigkeit der Größe der zu trennenden Fragmente werden 1,0 – 2,5%ige Agarosegele in TBE-Puffer mit 0,1 µg Ethidiumbromid/mL hergestellt. Der Ansatz wird in eine horizontale Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach der Polymerisation der Gelmatrix wird der Probenkamm gezogen und die Gelkammer in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt. Die DNA-Proben werden mit etwa 30 % Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Längenbestimmung der aufgetragenen DNA-Fragmente werden zusätzlich Längenstandards (pUC19/*Msp*I oder 1-kb-Leiter) aufgetragen. Durch Vergleich der Laufstrecken der Proben und den Fragmenten des Längenstandards, kann die Länge der DNA-Probe näherungsweise bestimmt werden. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 120 bis 150 V für 25 bis 35 Minuten durchgeführt. In der Gelmatrix enthaltenes Ethidiumbromid interkaliert in die doppelhelikale Struktur der DNA und erzeugt auf einem UV-Transilluminator eine sichtbare Fluoreszenz (Extinktion: 302 nm, Emission 590 nm).

DNA-Standard	Fragmentgrößen [bp]
pUC19/ <i>Msp</i> I	501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67
1-kb-Leiter	12216, 11198, 10180, 9132, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

4.1.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur gezielten Klonierung oder Ligation werden PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel geschnitten. Mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen wird die DNA gereinigt.

4.1.7 Denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie (DHPLC)

Zur Detektion von DNA-Sequenzvariationen wird die denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (DHPLC, *Wavesystem*, Transgenomic) eingesetzt, die Homo- und Heteroduplex-DNA nach dem Prinzip der Ionenpaar-Umkehrphasen-HPLC (IP-RP-HPLC) trennt (Xiao und Oefner, 2001).

Zur DNA-Separation werden Kapillarsäulen (*DNA-SepCartridge*, Transgenomic) mit einer hydrophoben stationären Phase aus alkylierten Polystyrol-Divinylbenzol-Partikeln verwendet. Als mobile Phase dient eine Mischung aus Puffer A und B, die Triethylammoniumacetat

(TEAA) und eine vom Mischungsverhältnis abhängige Konzentration an Acetonitril enthält (A: 0,1 M TEAA in HPLC-Gradient-Grade-H₂O; Puffer B: 0,1 M TEAA, 25 % Acetonitril in HPLC-Gradient-Grade-H₂O). TEAA vermittelt die Interaktion zwischen dem negativ geladenen DNA-Rückgrat und der hydrophoben Säulenmatrix. Mit steigendem Acetonitrilgehalt in der mobilen Phase wird der TEAA-DNA-Komplex von der Säule verdrängt und die DNA eluiert. Heteroduplex-DNA besitzt aufgrund von Basenfehlpaarungen eine geringere Schmelztemperatur als Homoduplex-DNA und wird somit eher von der Säule eluiert. Um eine optimale Trennung von Homo- und Heteroduplexen zu erzielen, erfolgt die DHPLC-Analyse bei Temperaturen, bei der die DNA-Fragmente partiell denaturiert vorliegen (helikaler Anteil 50 - 80 %). Besitzt das DNA-Fragment verschiedene Schmelzdomänen, wird die Analyse bei mehreren Temperaturen durchgeführt. Die Detektion der eluierten DNA erfolgt mit Hilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Fließgeschwindigkeit des Puffergemisches beträgt bei 0,9 mL/min.

Heteroduplex-DNA wird durch Mischen (Verhältnis 1 : 1) des amplifizierten Wildtyp-DNA-Fragmentes mit einem analogen Patienten-Amplifikat erzeugt, wenn dieses mindestens eine Sequenzvariation aufweist. Zur Heteroduplex-Bildung wird der Reaktionsansatz für 5 min bei 94 °C denaturiert; die anschließende Renaturierung erfolgt durch langsames Abkühlen in 2 °C-Schritten innerhalb von 40 min auf 8 °C. Die optimalen Bedingungen (Temperatur, Acetonitril-Gradient) werden für jedes zu untersuchende DNA-Fragment mit Hilfe der *Wavemaker*-Software anhand der Wildtyp-DNA-Sequenz ermittelt.

Die für die Mutationsanalyse der Exons 1 – 12 der XT-I und der Exons 1 - 11 der XT-II ermittelten DHPLC-Analyse-Bedingungen sind den Tabellen 4.1 und 4.2 zu entnehmen. Der *Time Shift* ist ein in der *Wavemaker*-Software einstellbarer Parameter, mit dem man die Position der *Peaks* im Elutionsprofil verschieben kann.

Tab. 4.1: DHPLC-Analyse-Bedingungen für die Exons 1 - 12 der XT-I.

XYLT-I- Exon	Ofentemperatur [°C]	<i>Time Shift</i>	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
1	68,0	-1,0	60 / 68
	69,2	-1,0	60 / 68
	71,3	0,0	58 / 66
2	61,0	0,0	51 / 59
3.1	62,9	0,0	58 / 66
	63,5	0,0	58 / 66
	64,9	1,0	56 / 64

XYLT-I- Exon	Ofentemperatur [°C]	<i>Time Shift</i>	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
3.2	60,3	0,0	58 / 66
	60,7	0,0	58 / 66
4	61,7	0,0	56 / 64
	63,7	1,5	53 / 61
5	61,3	0,0	57 / 65
	63,0	1,0	55 / 63
	63,6	1,0	55 / 63
6	60,8	1,0	53 / 61
7	59,5	0,0	58 / 66
	62,0	1,5	55 / 63
	64,3	3,0	52 / 60
8	62,8	0,5	56 / 64
	63,3	0,5	56 / 64
9	61,0	0,0	59 / 67
	63,2	1,0	57 / 65
	65,5	4,0	51 / 59
10	60,5	0,5	57 / 65
	61,0	0,5	57 / 65
11	61,7	0,0	58 / 66
12	63,0	0,0	58 / 66
	64,9	1,0	56 / 64

Tab. 4.2: DHPLC-Analyse-Bedingungen für die Exons 1 - 11 der XT-II.

XYLT-II- Exon	Ofentemperatur [°C]	<i>Time Shift</i>	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
1	68,0	- 0,5	57 / 65
2.1	64,0	0,0	58 / 66
	65,5	0,0	58 / 66
	66,5	0,0	58 / 66
2.2	65,8	- 1,0	56 / 64
3	59,0	- 1,0	57 / 65
	64,3	0,5	54 / 62
	65,2	1,0	53 / 61
4	63,0	0,0	56 / 64
	64,2	0,0	56 / 64
	64,9	0,0	56 / 64
5	61,9	0,0	54 / 62
	62,7	0,0	54 / 62
	64,0	1,0	52 / 60
6	62,7	0,0	57 / 65
	63,3	0,0	57 / 65
	63,8	0,0	57 / 65

XYLT-II- Exon	Ofentemperatur [°C]	Time Shift	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
7	62,4	0,0	59 / 67
	63,0	0,0	59 / 67
	63,2	0,0	59 / 67
8	63,4	0,0	58 / 66
	64,2	0,0	58 / 66
9	62,7	0,0	58 / 66
	64,7	0,0	58 / 66
10	61,7	0,0	59 / 67
	62,7	0,0	59 / 67
	66,0	3,0	53 / 61
11	63,5	- 2,0	61 / 69
	64,2	- 1,0	59 / 67
	65,7	0,0	57 / 65

Die Elutionsprofile der Reaktionsansätze werden mit dem Chromatogramm einer reinen Wildtyp-Probe verglichen. Treten Abweichungen von diesem Profil auf, weist dies auf das Vorhandensein einer DNA-Variation hin. Zur genaueren Analyse wird das PCR-Amplifikat des betroffenen Probanden sequenziert.

4.1.8 Aufreinigung amplifizierter DNA-Fragmente

Die Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierreaktion erfolgt mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* von Qiagen. Mit dieser Methode werden Nukleotide, Enzyme und Salze aus den Reaktionsansätzen zu entfernen.

Alternativ dazu wird die *ExoSAP*-Methode als enzymatisches Aufreinigungsverfahren angewendet (*Exo*: *Exonuclease I*; *SAP*: *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Im PCR-Ansatz verbliebene Nukleotide werden durch *SAP* hydrolysiert und Einzelstrang-DNA-Fragmente werden von der *Exonuclease I* enzymatisch zu Nucleosiden und Phosphatresten abgebaut. Ein typischer Restriktionsansatz enthält folgende Komponenten:

PCR-Ansatz	5 µL
<i>Exo</i> (1 U/µL in TE-Puffer pH 7,5 und Glycerin 87 %)	1 µL
<i>SAP</i> (1 U/µL)	1 µL

Der Ansatz wird 30 min bei 37 °C und zur anschließenden Inaktivierung der Enzyme 15 min bei 80 °C inkubiert.

4.1.9 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung erfolgt gemäß der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) mit anschließender Auftrennung der Fragmente durch eine automatisierte Kapillarelektrophorese. Im Sequenzieransatz liegen neben 2'-Desoxynukleotiden auch 2',3'-Didesoxynukleotide vor, die einen Kettenabbruch im neusynthetisierten DNA-Strang induzieren. Die Didesoxynukleotide sind mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und können somit in einem einzigen Ansatz detektiert werden. Für die Sequenzierreaktion wird das *ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Perkin Elmer verwendet.

Der Standardansatz für die Sequenzierreaktion sieht folgendermaßen aus:

Aufgereinigtes PCR-Produkt	3,0 – 14,5 µL
<i>Forward-</i> oder <i>Reverse-Primer</i> (2,5 µM)	1,5 µL
<i>BigDye v1.1 Premix</i>	2,0 µL
<i>BigDye Sequencing Buffer</i> (5x)	2,0 µL
Wasser (Rotisolv HPLC-Gradient-Grade)	ad 20,0 µL.

Für die Sequenzierreaktion wird folgendes Temperaturprofil verwendet:

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Aktivierung	2 min	95 °C	1
Denaturierung	10 sec	96 °C	25
<i>Annealing</i>	10 sec	48 / 55 / 62 °C	
Elongation	4 min	60 °C	
Kühlen	∞	4 °C	1

Zur Abtrennung freier Didesoxynukleotide wird der Sequenzieransatz mit *MicroBio-Spin*-Gelfiltration-Säulen aufgereinigt. Nach der Resuspension des Gelmaterials wird die Säule zur Verdichtung des Gelbettes zentrifugiert. Der Sequenzieransatz wird auf die Gelmatrix aufgetragen und die Säule erneut zentrifugiert. Das Eluat wird mit 20 µL Wasser (Rotisolv HPLC-Gradient-Grade) verdünnt und 2 min bei 94 °C denaturiert.

Die kapillarelektrophoretische Sequenzierung und die Fluoreszenz-Detektion werden am Kapillarsequenziergerät *ABI Prism 310* der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Es werden die folgenden Parameter für die Elektrophorese gewählt:

Modul	Matrix	Injektionszeit	Injektions- spannung	Elektrophorese-		
				Spannung	Temperatur	Zeit
SeqPOP6 Rapid	E	20 sec	6 kV	15 kV	50 °C	36 – 45 min

Die Sequenzanalyse erfolgt mit den Programmen *Chromas*, *Sequence Analysis* und *Seqman*.

4.1.10 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen spalten. Zur gerichteten Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren werden diese zuvor mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten.

Weiterhin werden die Restriktionsendonukleasen zur RFLP-Analyse (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) eingesetzt, um das Vorliegen von Sequenzvariationen in DNA-Proben zu detektieren. Die Methode beruht darauf, dass durch genetische Variationen Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen im Vergleich zur Wildtyp-DNA entstehen beziehungsweise zerstört werden können. DNA-Änderungen können nach Inkubation der DNA mit einem geeigneten Enzym über abweichende Längen der Restriktionsfragmente im Agarosegel nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die RFLP-Analyse zur Bestimmung der Allel-Frequenzen von XYLT-Variationen eingesetzt. Die Suche nach passenden Restriktionsenzymen erfolgt mit dem Programm *NEBcutters*. Die Enzyme werden nach den Angaben der Hersteller verwendet.

Ein typischer Restriktionsansatz ist wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Produkt	5,0 µL
Reaktionspuffer (10x)	1,0 µL
Restriktionsenzym	1 U
Wasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	ad 10 µL.

Die Inkubation erfolgt für 2 – 16 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Im Anschluss an die Restriktion wird der Ansatz mit 3 µL Auftragspuffer gemischt und in einem 1,5 – 2,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

4.1.11 Generieren von Restriktionsschnittstellen durch PCR

Wenn eine DNA-Sequenzvariation nicht in einem Bereich liegt, der von Restriktionsendonukleasen erkannt und gespalten wird, kann in einigen Fällen über eine PCR-Reaktion mit geeigneten *Primern* eine Schnittstelle erzeugt werden. Dazu muss ein *Primer* nahe seinem 3'-Ende einen Basenaustausch aufweisen, der eine Restriktionsschnittstelle generiert. Im Anschluss an die PCR wird die RFLP-Analyse durchgeführt.

4.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verbindung von DNA-Fragmenten und zu ihrer gerichteten Ligation in den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Vektor werden der Vektor und die DNA-Fragmente mit den gleichen Restriktionsenzymen gespalten. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA.

Der Ligationsansatz ist wie unten aufgeführt zusammengesetzt :

Plasmid-DNA	10 - 100 ng
Insert-DNA	30 – 200 ng
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ L)	3 μ L
T4-DNA-Ligase-Puffer	4 μ L
Wasser (<i>Aqua ad iniectabilia</i>)	ad 20 μ L.

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 10 – 30 °C inkubiert.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Vermehrung von *E. coli*-Stämmen in Flüssigkultur werden 5 – 50 mL LB-Medium bzw. bei Ampicillin-resistenten Stämmen LB-Amp-Medium mit Zellen inokuliert und über Nacht bei 37 °C bei leichter Bewegung inkubiert. Bei der Anzucht auf LB- oder LB-Amp-Festmedien wird eine Zellsuspension gleichmäßig auf einer Agarplatte verteilt und für 16 - 48 h bei 37 °C inkubiert.

4.2.2 Kryokonservierung von *E. coli*

Bakterien können über einen langen Zeitraum revitalisierbar als Glycerinkultur gelagert werden. Dazu werden 800 µL einer Flüssigkultur mit 200 µL Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Transformation kompetenter *E. coli*

Transformations-kompetente Bakterien adsorbieren an ihrer Oberfläche bei niedriger Temperatur Plasmid-DNA, die durch einen Hitzeschock in die Zellen aufgenommen wird. Im Rahmen dieser Arbeit werden zur Transformation die kommerziell erhältlichen, chemisch kompetenten *E. coli*-Stämme TOP10 und XL10-Gold verwendet.

Zur Transformation werden TOP10-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µL Ligationsansatz bzw. 1 µL Plasmid-Lösung versetzt. Der Ansatz wird 30 min auf Eis, 30 sec bei 42 °C im Wasserbad und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden mit 250 µL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C im Rollinkubator inkubiert. Die Bakteriensuspension wird auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und für 12 – 18 h bei 37 °C inkubiert.

Die mittels *site-directed mutagenesis* erzeugten Plasmide werden nach dem *DpnI*-Verdau in XL10-Gold Zellen transformiert. Dazu werden 45 µL auf Eis aufgetaute Zellen mit 2 µL β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min auf Eis mit regelmäßiger Durchmischung inkubiert. Es werden 2 µL der *DpnI*-behandelten Plasmide zugegeben wie oben beschrieben inkubiert. Zur Analyse der Klone werden analytische PCRs durchgeführt, Flüssigkulturen angelegt, Plasmide isoliert und durch Restriktionsspaltung und DNA-Sequenzierung überprüft.

4.2.4 Kultivierung von *High Five*-Insektenzellen

Die *High Five*-Zellen werden in sterilen Zellkulturflaschen in *Insect-XPRESS* Medium mit 1 mg/mL Gentamycin bei einer Temperatur von 27 °C ohne Kohlendioxidanreicherung

kultiviert. Die Oberfläche der Flaschen begünstigt ein adhärenz Wachstum der Zellen. Die Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Einwegartikeln durchgeführt.

Das Zellkulturmedium wird alle 2 – 3 Tage gewechselt. Haben die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht, werden sie in neue Flasche passagiert. Hierzu werden 20 mL des Zellkulturmediums abgesaugt und die Zellen in den verbliebenen 10 mL resuspendiert. Von dieser Zellsuspension werden etwa 1,5 mL in eine neue Flasche mit 30 mL Medium gegeben.

4.2.5 Bestimmung der Zellzahl von *High Five*-Insektzellen

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen wird ein Volumenteil einer Zellsuspension mit neun Volumenteilen einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung gemischt. Lebende Zellen erscheinen bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop hell – tote Zellen und Zelltrümmer werden dunkel angefärbt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt in einer Neubauerzählkammer und ermöglicht die Aussaat definierter Zellzahlen.

4.2.6 Liposomen-vermittelte Transfektion von *High Five*-Insektzellen

Zur Transfektion von *High Five*-Zellen mit *Cellfectin* werden 2×10^6 Zellen, die sich in der Phase exponentiellen Wachstums befinden, mit 3 mL *Insect-XPRESS* Medium in einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät und 1 h bei RT inkubiert.

Ein Transfektionsansatz wird wie folgt vorbereitet:

Lösung A:	100 μ L <i>Insect-XPRESS</i> Medium (ohne Gentamycin)
	3 μ L Plasmid-DNA-Lösung
Lösung B:	100 μ L <i>Insect-XPRESS</i> Medium (ohne Gentamycin)
	3 μ L <i>Cellfectin</i> -Reagenz

Die beiden Lösungen werden vereint und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Ansätze mit 800 μ L *Insect-XPRESS* Medium (ohne Gentamycin) versetzt. Das Medium in den Zellkulturschalen wird abgezogen und der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach vierstündiger Inkubation bei RT, wobei die Schalen alle 15 min vorsichtig bewegt werden, werden 2 mL Gentamycin-haltiges Medium zugegeben. Die Proteinexpression wird nach 96-stündiger Inkubation bei 27 °C analysiert.

4.2.7 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgt in sterilen Zellkulturflaschen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % Kohlendioxid und 99 % Luftfeuchtigkeit. Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilem Einwegmaterial durchgeführt. Die Medien werden mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 0,25 mg/L Amphotericin B, 100.000 U/L Penicillin und 100 mg/L Streptomycin versetzt und alle 3 - 4 Tage gewechselt. Es werden folgende Zelllinien und Medien verwendet:

HEK-293 (human, embryonale Niere)	DMEM
SAOS-2 (human, Osteosarkom)	RPMI 1640
SW1353 (human, Chondrosarkom)	RPMI 1640

Wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht haben, werden sie zur Vermeidung von Kontaktinhibition und Nährstofflimitation in neue Zellkulturflaschen passagiert. Hierzu wird das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 mL Trypsin-EDTA-Lösung für 3 – 10 min bei RT oder 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in 5 mL Medium aufgenommen und zentrifugiert. Das Pellet wird in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension in einem geeigneten Verhältnis in neue Zellkulturschalen ausgesät.

4.2.8 Transfektion humaner Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA erfolgt in mit je 4 Deckgläschen ausgelegten *6-well-plates*. Hierzu werden $1 - 3 \times 10^5$ Zellen pro *well* ausgesät und 24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Für den Transfektionsansatz werden 97 μL zusatzfreies Zellkulturmedium mit 3 μL *Fugene6*-Transfektionsreagenz versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Es werden 5 μL Plasmid-DNA (0,2 – 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) zugegeben, für 25 min – 2 h bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Proteinexpression wird 48 – 96 h nach der Transfektion untersucht.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinisolierung aus eukaryontischen Zellen

Adhärenz wachsende Zellen werden durch Abkratzen von der Kulturschale in Suspension gebracht und mit PBS gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen in 50 µL Zelllyse-Puffer pro 1×10^6 Zellen resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei $10.000 \times g$ wird der Überstand für den *Dot*-Blot eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

4.3.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine durch die Bindung an hydrophobe Bereiche. Es entstehen Protein-SDS-Aggregate mit konstantem Ladungs/Masse-Verhältnis, so dass die Proteine im Gel aufgrund ihrer molaren Massen getrennt werden. Im Protein enthaltene Disulfidbrücken können durch Thiolverbindungen, wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol, reduziert werden.

Für die SDS-PAGE werden kommerzielle Gradientengele (8 - 16 % Polyacrylamid) in einem Tris-Glycin-SDS-Puffersystem eingesetzt. Das Gel wird in der Elektrophoresekammer befestigt und die innere Pufferkammer wird mit 200 mL 1 x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer und 500 µL *NuPAGE-Antioxidant* befüllt. In die äußere Kammer werden mit 800 mL 1 x Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer gegeben.

Die Zellkulturüberstände der transfizierten *High Five*-Zellen werden vor dem Auftragen auf das Gel mit *Vivaspin* 0,5 mL *Concentratoren* (5,000 MWCO PES) etwa 20-fach aufkonzentriert. Die Konzentrate werden mit 1/4 Volumen 4 x *NuPAGE-SDS-SampleBuffer* und 1/10 Volumen 10 x *NuPAGE-ReducingAgent* versetzt und 10 min bei 94 °C erhitzt. Anschließend werden 25 µL der Probenansätze und 10 µL des Protein-Größenstandards *SeeBlue Plus2* auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird für 90 min bei 120 V und 50 mA durchgeführt.

Der Protein-Größenstandards *SeeBlue* Plus2 enthält die folgenden Proteinbestandteile:

Marker-Protein	Gewicht [kDa]	Marker-Protein	Gewicht [kDa]
Myosin	250	Carboanhydrase	36
Phosphorylase B	148	Myoglobin Rot	22
BSA	98	Lysozym	16
Glutamat-Dehydrogenase	64	Aprotinin	6
Alkohol-Dehydrogenase	50	Insulin (B-Kette)	4

4.3.3 Western-Blot

Im Anschluss an die elektrophoretische Protein-Auftrennung im Polyacrylamidgel werden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen, um durch nachfolgende Immunofärbungen detektiert zu werden.

Der Transfer erfolgt mittels der *Semidry-Blot*-Technik (Kyhse-Andersen, 1984) mit dem *XCell II-Blot Modul*. Dazu werden in Transferpuffer getränkte *Blotting pads* und Filterpapiere mit dem Elektrophoresegel und der in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei auf der Kathode gestapelt. Durch Auflegen der Anode wird das Modul geschlossen, in die Blotkammer überführt und mit 1 x Transferpuffer aufgefüllt. Die äußere Pufferkammer wird mit Wasser gefüllt. Der Transfer erfolgt für 80 min bei 30 V und 170 mA.

4.3.4 Dot-Blot

Der *Dot-Blot* ist ein einfaches Verfahren um Proteine in Lösungen über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachzuweisen (Gültekin *et al.*, 1988). Die proteinhaltige Lösung (1 - 5 μ L) wird auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran aufgetragen und anschließend einer Immunfärbung unterzogen.

4.3.5 Immundetektion immobilisierter Proteine

Der Nachweis von Proteinen auf einer PVDF-Membran erfolgt durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern. Dazu werden zunächst die verbliebenen freien Bindungsstellen der Membran für 1 h bei RT mit Block-Puffer abgesättigt. Die Membran wird dreimal für je 5 min mit PBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem verdünnten Primärantikörper (1 : 1.000 - 1 : 2.000 in PBST) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wird die Membran, sofern der Primärantikörper nicht enzym- oder fluoreszenzkonjugiert ist, für 1 h bei RT mit einem

enzymgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1 : 1000 – 1 : 20.000 in PBST). Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBST entfernt. Anschließend wird die Membran in Citrat-Phosphat-Puffer äquilibriert und der Sekundärantikörper mit Chloronaphthol-Substratlösung für 20 – 120 min im Dunkeln detektiert.

4.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Proteine können mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Zellen markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Hierzu werden auf Deckgläschen kultivierte, transfizierte Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min mit -20 °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. Nach erneutem Waschen mit 0,1 % BSA in PBS erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (1 : 200 in 1 % BSA in PBS) für 1 h bei RT. Die Zellen werden dreimal für je 10 min mit 0,1 % BSA in PBS gewaschen 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. Im Anschluß daran werden die Zellen mit PBS gewaschen und zur Fixierung mit Fluoromount-G auf Objektträger gebracht. Die Auswertung und Dokumentation erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop.

4.3.7 Behandlung transfizierter Zellen mit Inhibitoren

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu ermitteln, werden die auf Deckgläschen adhärenenden, transfizierten Zellen vor der Immunfärbung mit spezifischen Inhibitoren oder einem Farbstoff behandelt. Für die Inhibitorbehandlung werden die Zellen für 90 min mit 100 µg/mL Cycloheximid und anschließend für 30 min mit 5 µg/mL Brefeldin A in Zellkulturmedium bei 37 °C inkubiert.

4.3.8 Bestimmung der XT-I-Aktivität

Zur Quantifizierung der XT-I-Aktivität wird die Xylosylierung eines Akzeptorproteins durch die XT-I radiochemisch detektiert. Die Menge der eingebauten, radioaktiv markierten [¹⁴C]Xylose ist hierbei proportional zur Enzymaktivität.

Für die Quantifizierung der XT-I-Aktivität in Patientenseren und in Zellkultur-Überständen wird Seidenfibroin des Seidenspinners (*Bombyx mori*) als Akzeptor eingesetzt. Es besitzt die repetitive Sequenz (GSGAGA)_n (Mita *et al.*, 1994). Die Seide wird in

Lithiumthiocyanatlösung solvatisiert (Campbell *et al.*, 1984). Im Anschluss daran wird die Lösung 72 h gegen Wasser dialysiert und danach mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 äquilibriert. Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten wird das bFGF-Peptid in verschiedenen Konzentrationen als Akzeptor verwendet (Kuhn *et al.*, 2005).

Zur Bestimmung der XT-I-Aktivität werden 50 µL Probe mit 50 µL Substratreagenz gemischt und für 75 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 90 µL des Ansatzes auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert und 2 h bei RT getrocknet. Die Membranen werden in Szintillationsgefäße überführt und wie folgt gewaschen:

- 10 min mit 3 mL 10%iger Trichloressigsäure
- 15 min mit 3 mL 1%iger Trichloressigsäure
- 10 min mit 4 mL 1%iger Trichloressigsäure
- 15 min mit 3 mL 1%iger Trichloressigsäure

Das Protein wird auf den Membranen durch 10%ige Trichloressigsäure präzipitiert und ungebundene UDP-[¹⁴C]Xylose durch Waschen mit 1%iger Trichloressigsäure entfernt. Die gewaschene Membran wird in 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit aufgelöst und die Radioaktivität nach mindestens 12 h Inkubation im Szintillationszähler gemessen.

4.4 Statistik

Die Verteilungen von Genotypen und Allel-Frequenzen zwischen Kontrollen und Probanden wurden mit dem *Fisher's exact* Test beurteilt. Klinische Parameter, die innerhalb der zu vergleichenden Gruppen der Gauß'schen Normalverteilung folgten, wurden mit dem *unpaired Student's t* Test ausgewertet, nicht normalverteilte Werte mit den *Mann-Whitney* Test. Der *Spearman* Test wurde angewendet für die nicht-parametrische Korrelation von Abhängigkeiten zwischen der XT-I-Aktivität und klinischen Parametern. Eine multiple logistische Regression wurde durchgeführt, um die Abhängigkeit der Aminosäure-Substitution p.A115S in der XT-I bezüglich des Geschlechts, Alters, HbA_{1c}, Diabetesdauer und dem *Body Mass Index* (BMI) zu beurteilen. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Detektion von Sequenzvariationen in den XYLT-Genen

Um zu untersuchen, ob genetische Variationen in den XYLT-Genen existieren und ob diese in die Pathogenese von Arthrose, PXE oder der Nephropathie von Typ-1-Diabetikern involviert sind, wurden alle 23 Exons, Exon-Intron-Grenzen und Teile der 5'- und 3'-UTR mit der DHPLC-Methode analysiert. Dazu wurden die Exons 1 - 12 des XYLT-I-Gens und die Exons 1 - 11 des XYLT-II-Gens mittels PCR amplifiziert. Zur möglichen Ausbildung von Heteroduplices wurden die Amplifikate der Patienten mit einem entsprechenden Wildtyp-DNA-Amplifikat gemischt, durch Erhitzen denaturiert und durch langsames Abkühlen renaturiert. Nach erfolgter DHPLC-Analyse wurden die Elutionsprofile der gemischten Patienten-Proben mit den Elutionsprofilen reiner Wildtyp-Amplifikate verglichen. Fragmente, die abweichende Chromatogramme aufwiesen, wurden zur Identifizierung von DNA-Veränderungen sequenziert. Erstmals detektierte Sequenzvariationen wurden durch erneute Amplifikation und Sequenzierung verifiziert. Um die Bedeutung von Variationen im Hinblick auf die Ätiologie der untersuchten Krankheiten zu analysieren, wurden die Allel-Frequenzen der Veränderungen in codierenden Bereichen und an Spleißstellen mittels RFLP- oder DHPLC-Analyse bei den Patienten und in einer Kontrollgruppe ermittelt.

5.1.1 Amplifikation der XYLT-Exons

Die zu analysierenden XYLT-Fragmente der Wildtypen, Kontrollen und der zu untersuchenden Patienten wurden mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Die gewählten *Primer* sind in den angrenzenden Intron-Regionen lokalisiert, damit der codierende Bereich der Gene vollständig analysiert werden konnte. Um die Amplifikate für die DHPLC-Analyse in ausreichend hoher Konzentration und ohne Nebenprodukte zu erhalten, wurden die optimalen PCR-Bedingungen für jedes Fragment experimentell ermittelt (Tab. 3.5 und Tab. 3.6). Die Kontrolle der Reinheit und Qualität der PCR-Produkte erfolgte im Agarosegel. Die Abbildungen 5.1 und 5.2 zeigen exemplarisch die Banden der XYLT-I- und XYLT-II-Amplifikate im Agarosegel.

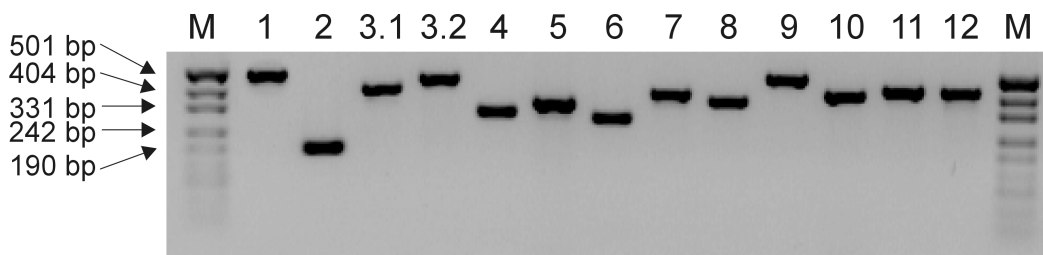


Abb. 5.1: Darstellung der XYLT-I-Amplifikate im Agarosegel. Exon 1 (444 bp), Exon 2 (188 bp), Exon 3.1 (398 bp), Exon 3.2 (452 bp), Exon 4 (311 bp), Exon 5 (351 bp), Exon 6 (294 bp), Exon 7 (401 bp), Exon 8 (368 bp), Exon 9 (471 bp), Exon 10 (402 bp), Exon 11 (427 bp), Exon 12 (418 bp), M: Marker pUC19/*Msp* I.

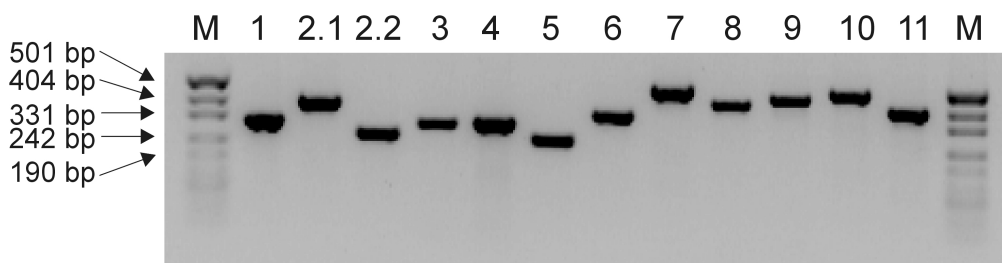


Abb. 5.2: Darstellung der XYLT-II-Amplifikate im Agarosegel. Exon 1 (316 bp), Exon 2.1 (399 bp), Exon 2.2 (269 bp), Exon 3 (309 bp), Exon 4 (323 bp), Exon 5 (257 bp), Exon 6 (353 bp), Exon 7 (481 bp), Exon 8 (413 bp), Exon 9 (448 bp), Exon 10 (480bp), Exon 11 (397 bp), M: Marker pUC19/*Msp* I.

5.1.2 Identifizierung der Wildtyp-DNA der XYLT-Exons

Zur Identifizierung der Wildtyp-DNA der XYLT-Exons wurden die zu untersuchenden XYLT-Fragmente aus genomischer DNA anonymisierter Blutspender amplifiziert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit den genomischen und den cDNA-Sequenzen verglichen. Für jedes Exon-Fragment konnte ein Blutspender mit homozygoter Wildtyp-DNA-Sequenz ermittelt werden.

5.1.3 Etablierung der DHPLC-Analyseparameter

Um für die DHPLC-Analyse eine optimale Auftrennung von Homo- und Heteroduplex-DNA zu gewährleisten, wurden für jedes zu untersuchende DNA-Fragment die Analyseparameter Temperatur und Acetonitril-Gradient mit Hilfe der *Wavemaker Software* ermittelt. Beim Vorliegen mehrerer Schmelzdomänen in einem Fragment wurde die Analyse bei 2 - 3 verschiedenen Säulentemperaturen durchgeführt. In Abbildung 5.3 ist exemplarisch die

Schmelzkurve des Amplifikates von Exon 9 der XYLT-II dargestellt, das zwei Schmelzdomänen aufweist.

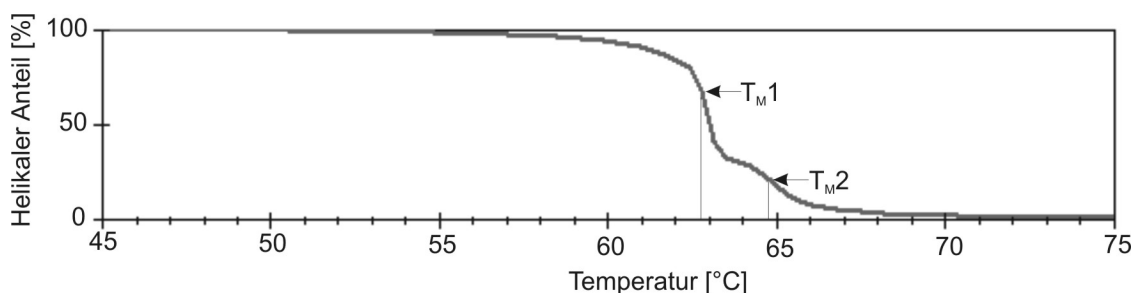


Abb. 5.3: Schmelzkurve des DNA-Fragmentes XYLT-II Exon 9. Das Fragment besitzt zwei Schmelzdomänen mit den Schmelztemperaturen T_{M1} (62,7 °C) und T_{M2} (64,7 °C).

Abbildung 5.4 zeigt den Anteil der helikalen Bereiche des Amplifikates von Exon 9 (XYLT-II) bei den gewählten Betriebstemperaturen 62,7 °C und 64,7 °C. Bei 62,7 °C liegen die Bereiche von 30 - 225 und 360 - 400 Basenpaaren partiell denaturiert vor, während der Bereich von 225 - 360 Basenpaaren nahezu vollständig helikal ist. Letzterer liegt erst bei einer Temperatur von 64,7 °C partiell denaturiert vor. Die Mutationsanalyse dieses Fragmentes erfolgte daher bei beiden Säulentemperaturen, um den kompletten Bereich von 30 bis 400 Basenpaaren abzudecken. Die äußeren Fragmentbereiche (0 - 30 bp und 400 - 450 bp) werden bei den gewählten Bedingungen nicht erfasst, da sie nahezu vollständig denaturiert vorliegen. Dies ist jedoch unerheblich, da diese Bereiche weit innerhalb der Introns vor und nach Exon 9 liegen. Das Exon wird bei den gewählten Temperaturen vollständig analysiert.

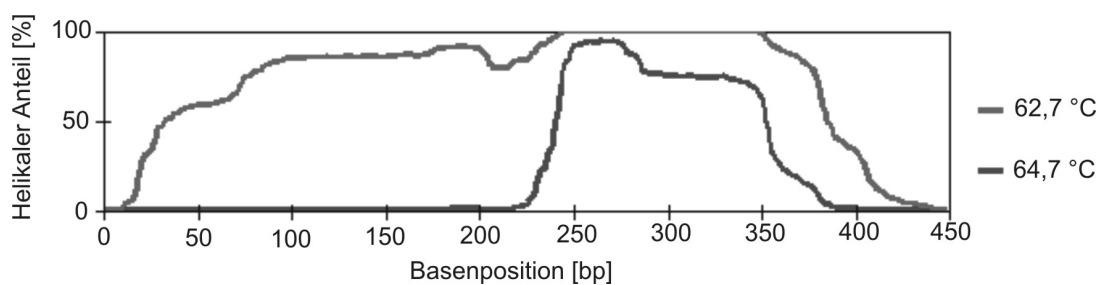


Abb. 5.4: Darstellung der helikalen Bereiche des XYLT-II-Fragmentes von Exon 9 bei den gewählten Analysetemperaturen.

Der Acetonitril-Gradient wurde für jedes XYLT-Fragment mit Hilfe des *Time Shifts* so eingestellt, dass die Elution der DNA nach einer Retentionszeit von 3 - 5 Minuten erfolgte. Dadurch wurde sichergestellt, dass der Proben-*Peak* weder vom *Wash-off-Peak* noch vom Injektions-*Peak* überlagert wurde (Abb. 5.5).

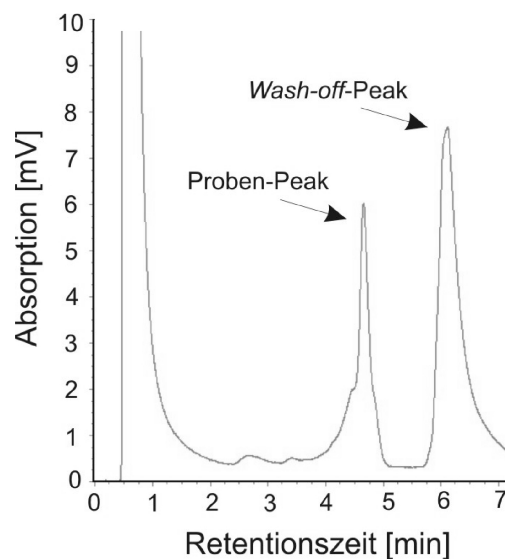


Abb. 5.5: Elutionsprofil für das XYLT-II-Fragment von Exon 9 bei einer Analysetemperatur von 62,7 °C. Die Elution des Fragmentes erfolgt bei einer Retentionszeit von etwa 4,7 min.

Die optimierten Betriebsparameter für die DHPLC-Analyse der XYLT-Exons sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgeführt.

5.1.4 Sequenzvariationen im XYLT-I-Gen

Die DHPLC-Analyse und anschließende Sequenzierung der DNA-Proben, die durch Abweichungen in den Chromatogrammen vom Wildtyp auffällig wurden, führte zur erstmaligen Identifizierung von 23 Sequenzvariationen im XYLT-I-Gen von 96 Typ-1-Diabetikern, 50 Arthrosepatienten, 65 PXE-Patienten und 20 Blutspendern. Abbildung 5.6 zeigt exemplarisch die Elutionsprofile eines Wildtyp-Fragmentes und eines Fragmentes mit einem Basenaustausch. Bei allen detektierten Veränderungen handelt es sich um den Austausch eines einzelnen Nukleotids; Deletionen oder Insertionen wurden nicht gefunden.

5.1.4.1 Sequenzvariationen in den Introns des XYLT-I-Gens

Die Sequenzanalyse von acht DNA-Proben, deren Elutionsverhalten sich in der DHPLC deutlich vom Wildtyp unterschied, resultierte im Nachweis von sieben Nukleotid-Substitutionen in den Intron-Regionen und einer in der 5'-UTR (Tab. 5.1). Der unmittelbar neben dem Spleißstellen-Erkennungsmotiv gelegene Polymorphismus IVS8-3G>A im Intron 7 wurde näher analysiert, die weiteren Intron-Variationen wurden unberücksichtigt gelassen, da sie nicht direkt die Spleißstellen betreffen.

Tab. 5.1: XYLT-I-Variationen in den untersuchten Intron-Regionen und in der 5'-UTR.

XYLT-I	Region
IVS1-5C>G	5'-UTR
IVS2+6T>C	Intron 2
IVS2+29A>G	Intron 2
IVS3+10C>T	Intron 3
IVS3+30G>C	Intron 3
IVS4+47A>G	Intron 4
IVS8-3G>A	Intron 7
IVS10+100A>G	Intron 10

5.1.4.2 Sequenzvariationen in den Exons des XYLT-I-Gens

Weiterhin konnten durch die Sequenzierung auffälliger Probanden-Amplifikate 15 Nukleotid-Substitutionen innerhalb der Exons nachgewiesen werden. Acht der identifizierten Variationen führen nicht zu Veränderungen der Aminosäure-Sequenz (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: XYLT-I-Variationen in den Exons, die die Aminosäure-Sequenz der XT-I nicht verändern.

XYLT-I	Region
c.1077C>T	Exon 4
c.1272G>A	Exon 5
c.1284C>G	Exon 5
c.1602G>A	Exon 8
c.1875G>A	Exon 9
c.1989T>C	Exon 9
c.2631C>T	Exon 12
c.2766G>C	Exon 12

Die sieben weiteren in den Exons lokalisierten Nukleotid-Substitutionen induzieren eine Aminosäure-Substitution in der XT-I (Tab. 5.3). Keiner der Nukleotid-Austausche verursacht eine *Nonsense*-Mutation, die zu einem verkürzten Protein führen würde.

Tab. 5.3: XYLT-I-Variationen, die zu Aminosäure-Veränderungen in der XT-I führen.

XYLT-I	XT-I	Region
c.343G>T	p.A115S	Exon 1
c.1154C>T	p.P385L	Exon 5
c.1216C>T	p.R406W	Exon 5
c.1655T>G	p.I552S	Exon 8
c.1883G>A	p.R628H	Exon 9
c.1994C>T	p.T665M	Exon 9
c.2675G>A	p.R892Q	Exon 12

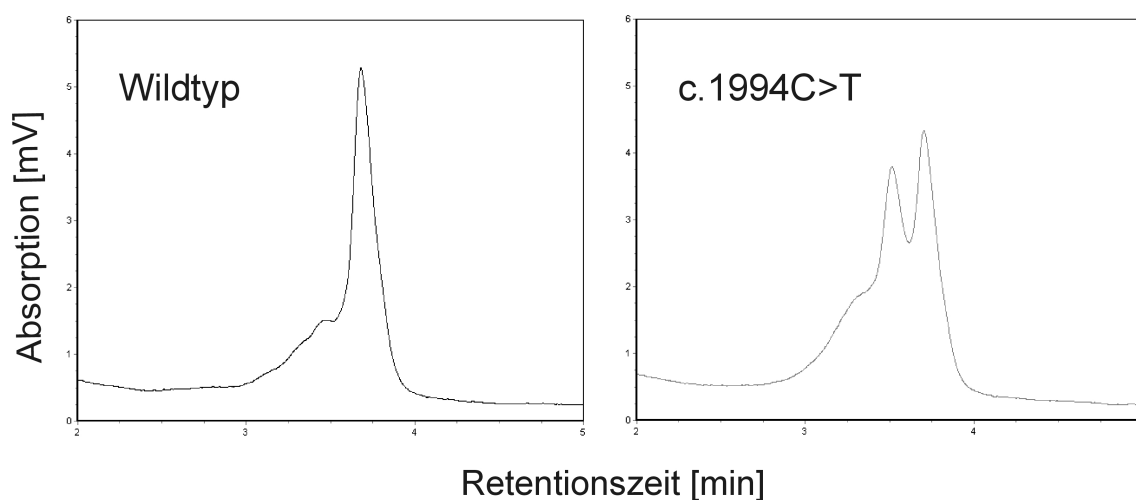


Abb. 5.6: DHPLC-Elutionsprofile des XYLT-I-Amplifikates von Exon 9. Dargestellt sind ein Wildtyp-Fragment und das Amplifikat eines heterozygoten c.1994C>T-Trägers bei einer Analysetemperatur von 63,3 °C.

In Abbildung 5.7 sind die genetischen Veränderungen im XYLT-I-Gen dargestellt, von denen nachfolgend die Allel-Frequenzen bestimmt wurden und die in den Assoziationsstudien der einzelnen Erkrankungen statistisch ausgewertet wurden.

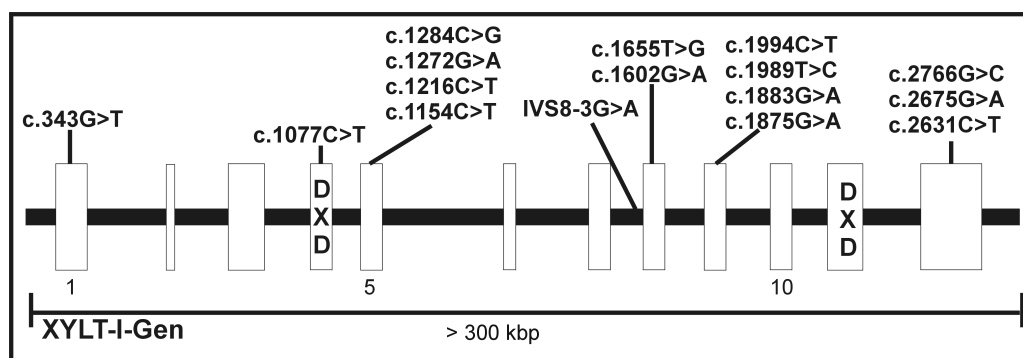


Abb. 5.7: Schematische Darstellung der Lokalisation wichtiger Veränderungen im XYLT-I-Gen. Die Exons sind als Rechtecke eingezeichnet und durch die darunter stehenden Zahlen nummeriert. Die beiden DXD-Motive befinden sich in den Exons 4 und 11. Oberhalb der Exons sind die Veränderungen aufgeführt, die nachfolgend weiter untersucht wurden.

5.1.5 Sequenzvariationen im XYLT-II-Gen

Die DHPLC-Untersuchung der elf XYLT-II-Exons von 96 Typ-1-Diabetikern, 50 Arthrose-Patienten, 65 PXE-Patienten und 20 Blutspendern führte zur Detektion von 24 unterschiedlichen Sequenzvariationen. Neben 22 Nukleotid-Substitutionen wurden auch eine Insertion und eine Deletion identifiziert.

5.1.5.1 Sequenzvariationen in den Introns des XYLT-II-Gens

Mit Hilfe der DHPLC-Methode und der anschließenden Sequenzanalyse konnten in den Intron-Bereichen und in der 5'-UTR des XYLT-II-Gens acht Alterationen nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um sechs SNPs, eine Insertion und eine Deletion (Tab. 5.4).

Tab. 5.4: XYLT-II-Variationen in den untersuchten Intron-Regionen und in der 5'-UTR.

XYLT-II	Region
IVS1-86delG	5'-UTR
IVS1-84G>A	5'-UTR
IVS1-72G>C	5'-UTR
IVS1-35G>C	5'-UTR
IVS6-9T>C	Intron 5
IVS6-14_IVS6-13insG	Intron 5
IVS7+81A>C	Intron 7
IVS9-84G>T	Intron 8

Die Variationen IVS6-9T>C und IVS6-14_IVS6-13insG im Intron 5 traten stets gemeinsam und ausschließlich in heterozygoter Form auf. Da die Insertion die Spleißstelle im Bereich der *Branch Site* verändert, wurden diese Intron-Änderungen näher untersucht.

5.1.5.2 Sequenzvariationen in den Exons des XYLT-II-Gens

Die Sequenzierung weiterer DNA-Proben, die durch ein vom Wildtyp abweichendes Elutionsprofil auffällig wurden, resultierte in der Identifizierung 16 weiterer SNPs in den Exons des XYLT-II-Gens. Acht dieser Veränderungen führen nicht zu einer veränderten Form der XT-II auf Aminosäure-Ebene (Tab. 5.5). Die Polymorphismen c.177A>G und c.342T>C im Exon 2 sind aneinander gekoppelt, sie kamen immer gemeinsam und im gleichen Status vor.

Tab. 5.5: XYLT-II-Variationen in den Exons, die keine Veränderungen der Aminosäure-Sequenz hervorrufen.

XYLT-II	Region
c.177A>G	Exon 2
c.342T>C	Exon 2
c.453C>T	Exon 2
c.693G>A	Exon 3
c.1239G>A	Exon 6
c.1569C>T	Exon 8
c.2379G>A	Exon 11
c.2391C>T	Exon 11

Bei den anderen acht in den Exons lokalisierten Nukleotid-Substitutionen handelt es sich um *Missense*-Variationen, die Aminosäure-Veränderungen in der XT-II hervorrufen (Tab. 5.6). Keine der detektierten Alterationen induziert als *Nonsense*-Mutation einen vorzeitigen Proteinabbruch.

Tab. 5.6: XYLT-II-Variationen, die Aminosäure-Änderungen in der XT-II hervorrufen.

XYLT-II	XT-II	Region
c.166G>A	p.D56N	Exon 2
c.344C>T	p.P115L	Exon 2
c.359G>A	p.R120H	Exon 2
c.556G>A	p.A186T	Exon 2
c.914C>G	p.T305R	Exon 4
c.1216C>T	p.R406C	Exon 6
c.1253C>T	p.P418L	Exon 6
c.2402C>G	p.T801R	Exon 11

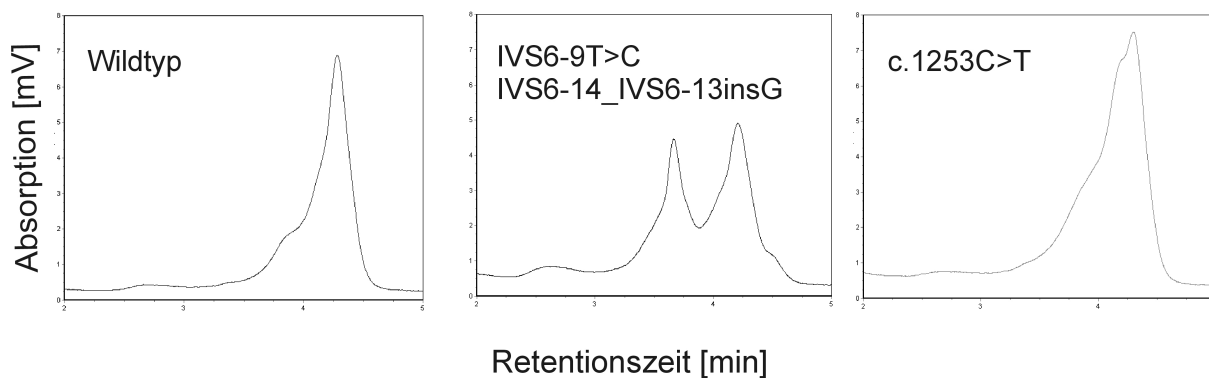


Abb. 5.8: DHPLC-Elutionsprofile der Amplifikate von Exon 6 des XYLT-II-Gens. Dargestellt sind das Wildtyp-Amplifikat und die Chromatogramme heterozygoter Träger der Variationen IVS6-9T>C + IVS6-14_IVS6-13insG und c.1253C>T bei einer Analysetemperatur von 63,9 °C.

Abbildung 5.9 zeigt die Variationen im XYLT-II-Gen, die zur statistischen Beurteilung im Zusammenhang mit den verschiedenen Erkrankungen genauer untersucht wurden.

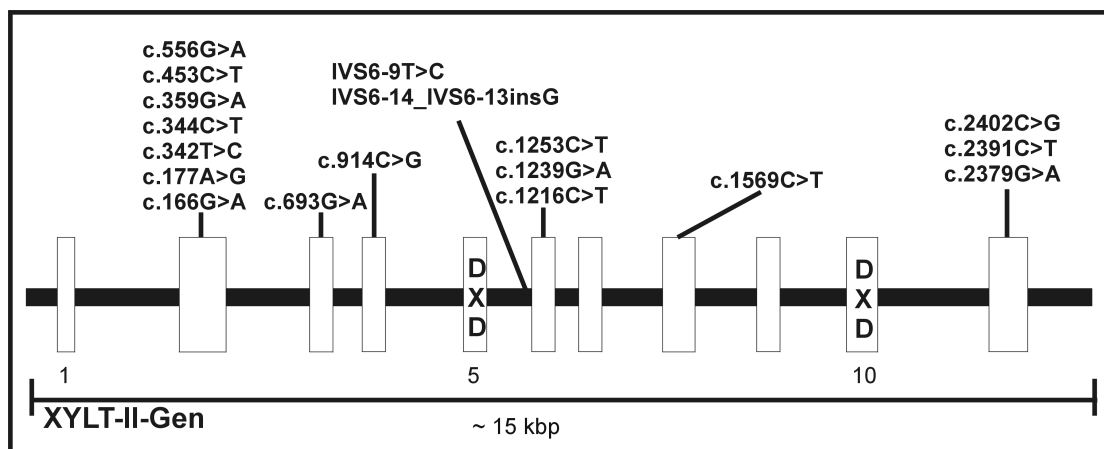


Abb. 5.9: Schematische Darstellung der Lokalisation wichtiger Veränderungen im XYLT-II-Gen. Die Exons sind als Rechtecke eingezeichnet und durch die Zahlen unterhalb nummeriert. Die beiden DXD-Motive befinden sich in den Exons 5 und 10. Die näher untersuchten Veränderungen sind oberhalb der Exons aufgeführt.

5.1.6 Etablierung von Variationsnachweisen mittels RFLP und DHPLC

Zur weiteren Beurteilung der detektierten Veränderungen wurden die Allel-Frequenzen in Exons lokalisierter Variationen und potentieller Spleißstellen-Alterationen bei den Patienten und in einer Kontrollgruppe bestimmt.

Die Frequenzen von DNA-Alterationen, die innerhalb der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymys lagen, wurden mittels RFLP bestimmt. Dazu wurden die PCR-Amplifikate von Patienten und Kontrollen mit geeigneten Restriktionsendonukleasen restringiert und im Agarosegel detektiert (Abb. 5.10, Tab. 5.7 - 5.9).

Tab. 5.7: RFLP-Verfahren zur Detektion von XYLT-I-Variationen.

Exon	Variation	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
			Wildtyp	heterozygot	homozygot
1	c.343G>T	<i>NmuCI</i>	444	444;378;61	378;61
4	c.1077C>T	<i>Eco72I</i>	230;80	310;230;80	310
8	c.1655T>G	<i>LweI</i>	198;125;37	327;198;125;37	327;37
9	c.1883G>A	<i>BsgI</i>	272;202	272;202;152;118	202;152;118
9	c.1989T>C	<i>BsuRI</i>	309;101;66	309;199;110;101;66	199;110;101;66
9	c.1994C>T	<i>AatII</i>	282;190	476;282;190	476

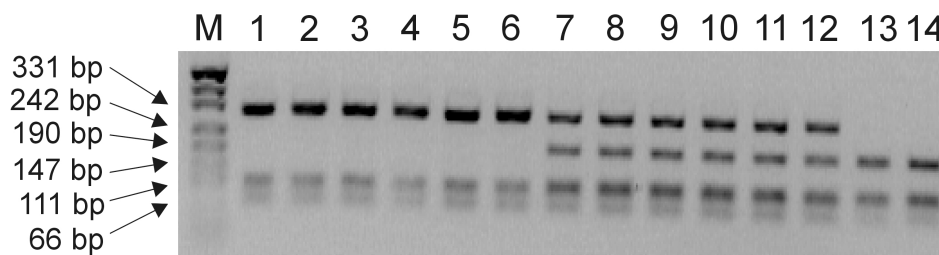


Abb. 5.10: *Bsu*RI-Restriktion zum Nachweis der Variation c.1989T>C im XYLT-I-Gen. Spuren 1 - 6: Wildtyp (309 bp, 101 bp, 66 bp), Spuren 7 - 12: heterozygot (309 bp, 199 bp, 110 bp, 101 bp, 66 bp), Spuren 13 - 14: homozygot (199 bp, 110 bp, 101 bp, 66 bp), M: Marker pUC19/*Msp* I.

Tab. 5.8: RFLP-Testsysteme zum Nachweis von Exon-lokalisierten XYLT-II-Variationen.

Exon	Variation	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
			Wildtyp	heterozygot	homozygot
2	c.166G>A	<i>Eco</i> 47I	156;109;88	247;156;109;88	247;109
2	c.342T>C	<i>Bsa</i> WI	265;13	399;265;13	399
3	c.693G>A	<i>Bsr</i> I	175;132	175;132;41	132;41
4	c.914C>G	<i>Bsu</i> 36I	323	323;210;110	210;110
6	c.1253C>T	<i>Bfu</i> AI	353	353;229;120	229;120
8	c.1569C>T	<i>Msp</i> II	413	413;212;201	212;201

Tab. 5.9: RFLP-Verfahren zum Nachweis der Insertion in Intron 5 des XYLT-II-Gens.

Intron	Variation	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
			Wildtyp	heterozygot	homozygot
5	IVS6-14_ IVS6-3insG	<i>Hpy</i> F10VI	286;64	286;242;64;43	242;64;43

Wenn die detektierten Alterationen nicht im Erkennungsbereich von Restriktionsendonukleasen lokalisiert waren oder wenn verschiedene Variationen innerhalb eines Fragmentes nachgewiesen werden sollten, wurden die DHPLC-Analysebedingungen optimiert, um die eindeutige Unterscheidung zwischen Wildtyp und den Veränderungen zu gewähren (Tab. 5.10 und Abb. 5.11). Zur Differenzierung zwischen der homozygoten und der heterozygoten Alteration wurden die auffälligen DNA-Amplifikate in unverdünnter Form, d. h. nicht mit einem Wildtyp-DNA-Amplifikat gemischt, mit der DHPLC-Methode analysiert.

Tab. 5.10: DHPLC-Analyseparameter zur Ermittlung der Allel-Frequenzen von XYLT-I- und XYLT-II-Variationen.

Amplifikat	Ofentemperatur [°C]	Time Shift	Puffer B: Anfangs- / Endkonzentration [%]
XYLT-I, Exon 5	63,4	1,0	55 / 63
XYLT-I, Exon 9	65,5	3,0	53 / 61
XYLT-I, Exon 12	64,9	1,0	56 / 64
XYLT-II, Exon 2.1	64,0	0,0	58 / 66
XYLT-II, Exon 2.2	65,8	- 1,0	56 / 64
XYLT-II, Exon 3	65,3	- 1,5	54 / 62
XYLT-II, Exon 11	64,3	- 1,0	59 / 67

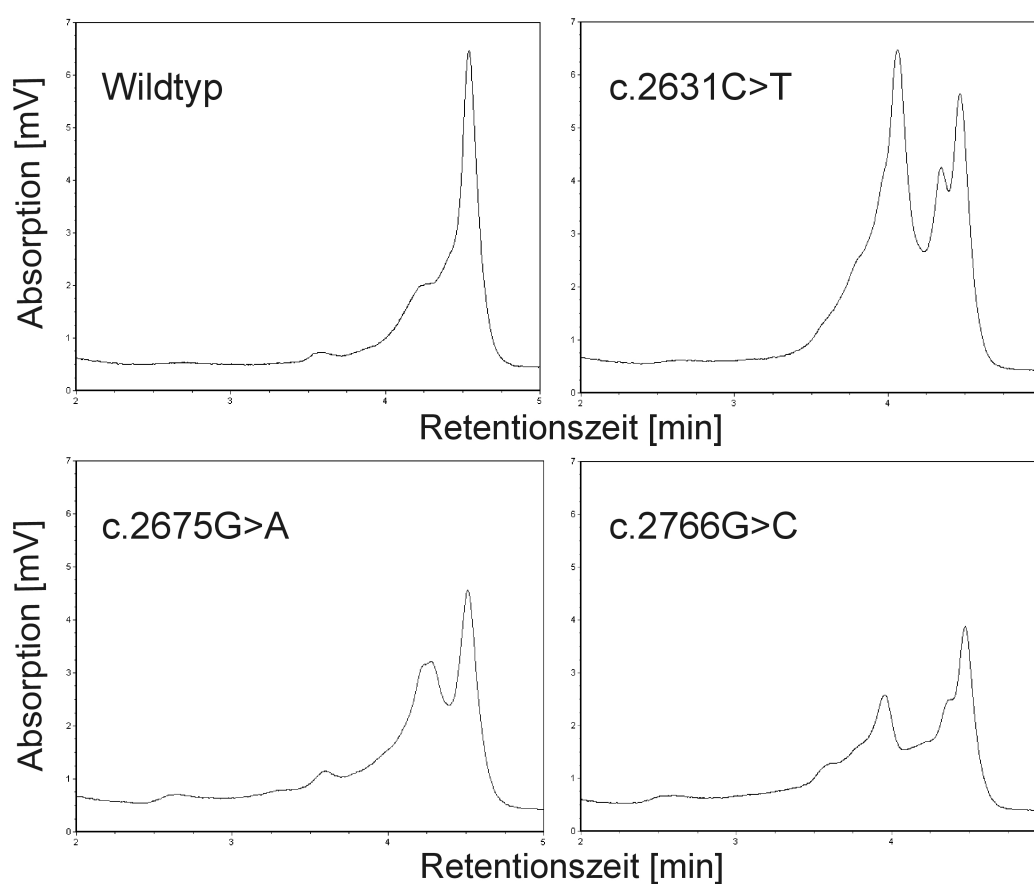


Abb. 5.11: DHPLC-Elutionsprofile der verschiedenen Variationen in Exon 12 des XYLT-I-Gens. Dargestellt sind der Wildtyp und die heterozygoten Alterationen c.2631C>T, c.2675G>A und c.2766G>C bei einer Analysetemperatur von 64,9 °C.

Der Polymorphismus c.2402C>G in Exon 11 des XYLT-II-Gens befand sich weder innerhalb der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym, noch konnte er eindeutig in der DHPLC von dem Wildtyp unterschieden werden. Mit Hilfe eines modifizierten *Primers* konnte eine

den Polymorphismus beinhaltende Restriktionsschnittstelle generiert werden. Somit konnte diese Variation nach der Amplifikation mit dem erwähnten *Primer* mittels RFLP-Analyse nachgewiesen werden (Tab. 5.11 und Abb. 5.12).

Tab. 5.11: RFLP-Verfahren zur Detektion des c.2404C>G-Austauschs im XYLT-II-Gen durch eine generierte Restriktionsschnittstelle.

Exon	Variation	Enzym	Restriktionsprodukte [bp]		
			Wildtyp	heterozygot	homozygot
11	c.2402C>G	<i>BtsI</i>	160;28	190;160;28	190

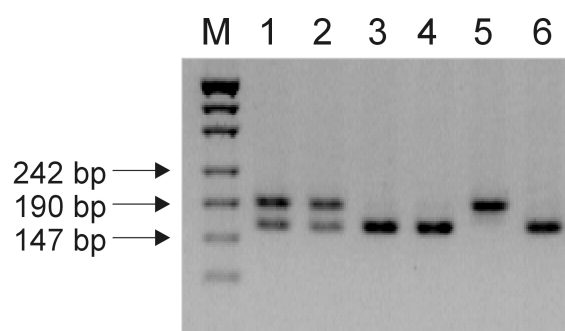


Abb. 5.12: *BtsI*-Restriktion des Amplifikates von Exon 11 des XYLT-II-Gens zum Nachweis der Variation c.2402C>G. Spuren 1 - 2: heterozygot (190 bp, 160 bp, 28 bp), Spuren 3, 4 und 6: Wildtyp (160 bp, 28 bp), Spur 5: homozygot (190 bp), M: Marker pUC19/*Msp* I.

Die ermittelten Allel-Frequenzen der untersuchten genetischen Variationen werden bei der Auswertung der verschiedenen Erkrankungen aufgelistet.

Insgesamt traten die Veränderungen im XYLT-I-Gen in den verschiedenen Kohorten mit einer Häufigkeit von 0,2 % - 38 % auf. Nur fünf der 16 Veränderungen, von denen die Frequenzen ermittelt wurden, kamen mit einer Häufigkeit von über 3 % vor (c.343, c.1077, c.1284, c.1989 und c.2631). Diese häufigen SNPs wurden sowohl in homo- als auch in heterozygoter Form nachgewiesen. Die elf seltenen Variationen traten nur 1 - 2 mal bei Patienten oder Blutspendern (Frequenzen ≤ 1 %) und ausschließlich in heterozygoter Form auf. Von den XYLT-I-Veränderungen, die eine Aminosäure-Substitution hervorrufen, kam lediglich der SNP c.343G>T (p.A115S) mit einer Frequenzen von bis zu 4,5 % und in homo- und heterozygoter Form vor.

Die Veränderungen im XYLT-II-Gen konnten mit Frequenzen von 0,5 % - 79 % nachgewiesen werden. Fünf Polymorphismen (c.177, c.342, c.914, c.1569 und c.2402), die mit Frequenzen von über 34 % vorkamen, konnten sowohl in heterozygoter als auch in homozygoter Form detektiert werden. Die anderen Variationen traten mit Frequenzen von unter 2,5 % auf und wurden ausschließlich in heterozygotem Status gefunden. Im Gegensatz zur XT-I kamen bei der XT-II zwei der acht Aminosäure-Substitutionen mit Frequenzen von über 34 % vor. Die Lokalisationen der detektierten Aminosäure-Substitutionen in den Xylosyltransferasen sind im Anhang aufgeführt (10.1 und 10.2).

5.2 XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern

5.2.1 XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern und Blutspendern

Die Mutationsanalyse von 96 Typ-1-Diabetikern (48 mit und 48 ohne diabetische Nephropathie) resultierte in der Identifikation von 33 DNA-Variationen, von denen 13 im XYLT-I-Gen und 20 im XYLT-II-Gen lokalisiert sind. Zu den detektierten Veränderungen zählen die Deletion eines Nukleotids in der 5'-UTR und eine Insertion im Intron 5 des XYLT-II-Gens. Alle anderen Variationen sind SNPs, von denen vier in der 5'-UTR, vier in den Introns und 23 in den Exons gefunden wurden. Zehn der Exon-Veränderungen verursachen eine Aminosäure-Substitution (vier in der XT-I und sechs in der XT-II). Von 27 der nachgewiesenen DNA-Alterationen wurden die Allel-Frequenzen der Patienten in Abhängigkeit ihrer Nierenfunktion und in einer Kontrollgruppe bestimmt (Tab. 5.12).

Tab. 5.12: Allel-Frequenzen der XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern mit und ohne Nephropathie und bei Blutspendern.

XYLT-I	XT-I	Region	Allel-Frequenzen bei Typ-1-Diabetikern		Allel-Frequenzen bei Blutspendern
			mit Nephropathie	ohne Nephropathie	
IVS1-5C>G		5'-UTR	11 / 96	14 / 96	n.u.
c.343G>T	p.A115S	Exon 1	3 / 96	3 / 96	7 / 208
c.1077C>T		Exon 4	4 / 96	3 / 96	10 / 224
IVS4+47A>G		Intron 4	n.u.	n.u.	n.u.
c.1154C>T	p.P385L	Exon 5	0 / 96	1 / 96	2 / 392
c.1284C>G		Exon 5	14 / 96	16 / 96	70 / 392
IVS8-3G>A		Intron 7	0 / 96	2 / 96	0 / 408
c.1875G>A		Exon 9	1 / 96	0 / 96	0 / 226
c.1883G>A	p.R628H	Exon 9	0 / 96	1 / 96	0 / 480
c.1989T>C		Exon 9	36 / 96	37 / 96	78 / 226
c.2631C>T		Exon 12	19 / 96	13 / 96	69 / 394
c.2675G>A	p.R892Q	Exon 12	1 / 96	0 / 96	1 / 394
c.2766G>C		Exon 12	0 / 96	1 / 96	0 / 394
XYLT-II	XT-II	Region	Allel-Frequenzen bei Typ-1-Diabetikern		Allel-Frequenzen bei Blutspendern
			mit Nephropathie	ohne Nephropathie	
IVS1-86delG		5'-UTR	n.u.	n.u.	n.u.
IVS1-84G>A		5'-UTR	n.u.	n.u.	n.u.
IVS1-72G>C		5'-UTR	n.u.	n.u.	n.u.
IVS1-35G>C		5'-UTR	n.u.	n.u.	n.u.
c.166G>A	p.D56N	Exon 2	2 / 96	1 / 96	9 / 442

XYLT-II	XT-II	Region	Allel-Frequenzen bei Typ-1-Diabetikern		Allel-Frequenzen bei Blutspendern
			mit Nephropathie	ohne Nephropathie	
c.177A>G+ c.342T>C		Exon 2	75 / 96	71 / 96	168 / 218
c.359G>A*	p.R120H	Exon 2	1 / 96	2 / 96	0 / 398
c.453C>T		Exon 2	0 / 96	1 / 96	0 / 394
c.556G>A	p.A186T	Exon 2	0 / 96	1 / 96	0 / 394
c.693G>A		Exon 3	1 / 96	0 / 96	0 / 220
c.914C>G	p.T305R	Exon 4	75 / 96	70 / 96	172 / 218
IVS6-9T>C+ IVS6-14_IVS6-13insG**		Intron 5	0 / 96	5 / 96	5 / 440
c.1253C>T	p.P418L	Exon 6	1 / 96	0 / 96	5 / 230
IVS7+81A>C		Intron 7	n.u.	n.u.	n.u.
c.1569C>T		Exon 8	59 / 96	49 / 96	117 / 222
c.2379G>A		Exon 11	1 / 96	0 / 96	0 / 386
c.2391C>T		Exon 11	1 / 96	0 / 96	0 / 386
c.2402C>G	p.T801R	Exon 11	41 / 96	36 / 96	155 / 386

* Typ-1-Diabetiker vs. Blutspender: $p = 0,03$;

** Patienten mit Nephropathie vs. Patienten ohne Nephropathie: $p = 0,06$;

n.u.: nicht untersucht.

Zur Beurteilung, ob die nachgewiesenen Veränderungen mit der Entstehung des Typ-1-Diabetes assoziiert sind, wurden die Allel-Frequenzen zwischen den Patienten und den Blutspendern verglichen. Die Aminosäure-Substitution von Arginin 120 zu Histidin in Exon 2 der XT-II kommt mit einer signifikant erhöhten Allel-Frequenz in der Gruppe der Typ-1-Diabetiker vor. Das Auftreten der anderen Veränderungen korreliert nicht mit der Erkrankung des Typ-1-Diabetes.

Die statistische Auswertung der ermittelten Allel-Frequenzen von Typ-1-Diabetikern mit und ohne Nephropathie zeigte für keine der 27 untersuchten Alterationen einen signifikanten Zusammenhang mit der Entstehung der Nephropathie. Lediglich die stets gemeinsam nachgewiesenen Intron-Variationen in Intron 5 des XYLT-II-Gens (IVS6-9T>C + IVS6-14_IVS6-13insG) geben einen Hinweis darauf, dass sie protektive Faktoren bei der Entstehung der Niereninsuffizienz sein könnten ($p = 0,06$).

5.2.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Weiterhin wurde untersucht, ob die genetischen Veränderungen Auswirkungen auf klinische Parameter bei Patienten mit oder ohne Nephropathie ausüben. Die Parameter von Wildtyp-

Patienten wurden dazu mit denen der SNP-Träger in homo- und heterozygoter Form verglichen (Tab. 5.13).

Tab. 5.13: Klinische Parameter von Typ-1-Diabetikern mit oder ohne Nephropathie, die in Abhängigkeit von XYLT-Variationen signifikante Unterschiede aufweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

XYLT-I		Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie		Typ-1-Diabetiker ohne Nephropathie	
	c.343G>T GG GT P-Wert			sRR [mmHg]	127,2 \pm 2,0 n=45 168,2 \pm 6,7 n=3 <0,01
	c.1077C>T CC CT P-Wert	Albumin [mg/24h]	928,3 \pm 120,5 n=44 2032,0 \pm 980,9 n=4 0,03		
	c.1989T>C TT TC+CC P-Wert	dRR [mmHg]	85,1 \pm 2,9 n=20 77,7 \pm 1,8 n=28 0,03	dRR [mmHg]	74,9 \pm 1,5 n=21 69,0 \pm 1,8 n=27 0,02
XYLT-II	c.177A>G+ c.342T>C AA/TT AG/TC+GG/CC P-Wert	dRR [mmHg]	101,5 \pm 8,5 n=2 79,9 \pm 1,6 n=46 0,01		
	c.914C>G CC CG+GG P-Wert	dRR [mmHg]	101,5 \pm 8,5 n=2 79,9 \pm 1,6 n=46 0,01	Kreatinin [μ mol/l]	62,0 \pm 4,0 n=2 81,2 \pm 1,5 n=46 0,01
	c.1569C>T CC CT+TT P-Wert			Albumin [mg/24h]	5,2 \pm 1,2 n=9 7,4 \pm 0,7 n=39 0,05
	c.2402C>G CC CG+GG P-Wert	HbA _{1c} [%]	8,4 \pm 0,2 n=16 9,2 \pm 0,2 n=32 0,04	sRR [mmHg]	123,1 \pm 3,3 n=18 133,7 \pm 3,1 n=30 0,03

Die Assoziations-Studie deckte signifikante Zusammenhänge für insgesamt acht genetische Veränderungen auf (c.343G>T, c.1077C>T und c.1989T>C im XYLT-I-Gen und c.177A>G + c.342T>C, c.914C>G, c.1569C>T und c.2402C>G im XYLT-II-Gen). Die DNA-Alterationen korrelierten innerhalb der Gruppe der Nephropathie-Patienten mit veränderten Werten für den diastolischen Blutdruck (dRR), für HbA_{1c} und für die Albuminausscheidung. Bei Typ-1-Diabetikern ohne Niereninsuffizienz konnten signifikante Änderungen für die

systolischen und diastolischen Blutdruckwerte (sRR und dRR), die Albuminausscheidung und die Serum-Kreatinin-Werte nachgewiesen werden.

5.2.3 Follow up-Studie von Typ-1-Diabetikern

Zwei Polymorphismen im XYLT-I-Gen (Exon 1: c.343G>T; p.A115S und Exon 9: c.1989T>C) und zwei im XYLT-II-Gen (Intron 5: IVS6-9T>C + IVS6-14_IVS6-13insG und Exon 11: c.2402C>G; p.T801R) sind in der Initialstudie durch signifikante Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bzw. der tendenziellen Assoziation zwischen dem Auftreten der Nephropathie auffällig geworden. Diese wurden daraufhin in einer Nachuntersuchung von 912 Typ-1-Diabetikern mittels RFLP-Analyse verifiziert.

5.2.3.1 Allel-Frequenzen ausgewählter XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern

Die Allel-Frequenzen der analysierten Polymorphismen bei Typ-1-Diabetikern sind in Tabelle 5.14 für Patienten mit ($n = 453$) und ohne ($n = 459$) Nephropathie zusammengefasst.

Tab. 5.14: Allel-Frequenzen ausgewählter XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern mit und ohne Nephropathie.

Gen	Variation	Protein	Region	Allel-Frequenzen bei Typ-1-Diabetikern	
				mit Nephropathie	ohne Nephropathie
XYLT-I	c.343G>T*	p.A115S	Exon 1	39 / 906	22 / 918
	c.1989T>C		Exon 9	347 / 906	324 / 918
XYLT-II	IVS6-9T>C+ IVS6-14_IVS6-13insG		Intron 5	18 / 906	15 / 918
	c.2402C>G	p.T801R	Exon 11	385 / 906	365 / 918

* signifikant; $p = 0,03$

Die Verteilung des Polymorphismus c.343G>T, der eine Aminosäure-Substitution von Alanin zu Serin an der Position 115 der XT-I induziert, ist signifikant verschieden bei Patienten mit und ohne Nephropathie ($p = 0,03$). Das T-Allel konnte mit einer höheren Frequenz bei Typ-1-Diabetikern mit Nephropathie nachgewiesen werden (4,3 % vs. 2,4 %). Das Vorkommen dieser Variation ist somit assoziiert mit dem Auftreten der Nephropathie (*odds ratio* 1,83 [95 % CI 1,08-3,12]). Nach der Anpassung für Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, HbA_{1c} und *body mass index* ergibt sich eine Signifikanz von 0,01 (*odds ratio* 2,2 [95 % CI 1,18-4,09]).

Die Genotyp-Verteilung der anderen Variationen unterscheidet sich nicht innerhalb der beiden Gruppen ($p > 1,0$).

5.2.3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Um zu untersuchen, ob die ausgewählten Variationen zu veränderten klinischen Parametern führen, wurden die Phänotypen von Patienten innerhalb der Gruppen mit und ohne Nephropathie in Abhängigkeit ihrer Genotypen verglichen. Diese Analyse zeigte signifikante Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus c.1989T>C in Exon 9 des XYLT-I-Gens und den Werten für Blutdruck und Serum-Kreatinin (Tab. 5.15).

Tab. 5.15: Blutdruck- und Serum-Kreatinin-Werte der Typ-1-Diabetiker mit und ohne Nephropathie in Abhängigkeit ihres XYLT-I-Genotyps an der Position c.1989. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

	Typ-1-Diabetiker mit Nephropathie		Typ-1-Diabetiker ohne Nephropathie	
	sRR [mmHg]	dRR [mmHg]	sRR [mmHg]	dRR [mmHg]
c.1989T>C				
TT	146 \pm 2 n=162	83 \pm 1 n=162	134 \pm 1 n=193	77 \pm 1 n=193
TC+CC	141 \pm 1 n=291	80 \pm 1 n=291	133 \pm 1 n=266	76 \pm 1 n=266
P-Wert	0,03	0,03	0.61	0.56
	Kreatinin [μ mol/l]		Kreatinin [μ mol/l]	
c.1989T>C				
TT	138 \pm 9 n=162		82 \pm 1 n=193	
TC+CC	126 \pm 5 n=291		79 \pm 1 n=266	
P-Wert	0,93		0,02	

Nephropathie-Patienten mit dem Austausch von Thymin 1989 zu Cytosin in homo- oder heterozygoter Form haben signifikant niedrigere systolische und diastolische Blutdruck-Werte ($p = 0,03$) verglichen mit den Nephropathie-Patienten, die das Wildtyp-Allel tragen. Weiterhin ist dieser Polymorphismus bei Typ-1-Diabetikern ohne Nephropathie mit einem signifikant niedrigeren Serum-Kreatinin-Spiegel ($p = 0,02$) verbunden. In der Gruppe der Nephropathie-Patienten konnte ebenfalls eine Assoziation dieser Variation mit reduzierten Serum-Kreatinin-Werten gezeigt werden. Alle anderen Korrelationen zwischen den klinischen Parametern und dem Auftreten von genetischen Alterationen wiesen keine Signifikanzen auf.

5.3 XT-I-Aktivität und XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten

5.3.1 XT-I-Aktivitäten im Serum von Arthrosepatienten und Blutspendern

Die Serum-XT-I-Aktivitäten der Arthrosepatienten (21 Männer, 28 Frauen) und einer Kontrollgruppe (203 Männer, 119 Frauen) wurden im XT-Aktivitätstest mit Seidenfibroin als Akzeptor bestimmt. Die XT-I-Aktivitäten (Mittelwerte \pm Standardabweichung und 90 %-Bereiche) der Kontrollgruppe (Männer 1,00 mU/L \pm 0,30; 0,48 - 1,52; Frauen 0,84 mU/L \pm 0,17; 0,61 - 1,14) und der Patienten (Männer 1,06 mU/L \pm 0,17; 0,85 - 1,39; Frauen 1,02 mU/L \pm 0,13; 0,82 - 1,24) sind normalverteilt (Abb. 5.13).

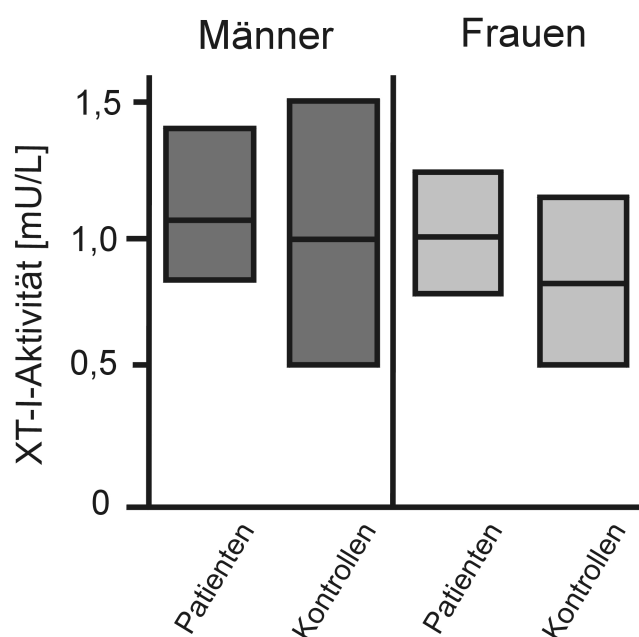


Abb. 5.13: Serum XT-I-Aktivitäten bei Arthrosepatienten im Vergleich zu den Aktivitäten einer Kontrollgruppe aus Blutspendern. Dargestellt sind die Mittelwerte und die 90 %-Bereiche.

Bei den Männern unterschieden sich die XT-I-Aktivitäten der Patienten und Kontrollpersonen nicht voneinander ($p = 0,37$). Die XT-I-Aktivitäten der weiblichen Patienten waren im Vergleich zu denen der Blutspenderinnen signifikant erhöht ($p < 0,0001$).

Die Untersuchung der XT-I-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Dauer der Erkrankung lieferte eine signifikant positive Korrelation ($p = 0,03$; $r = 0,31$).

5.3.2 XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten und Blutspendern

Mit Hilfe der DHPLC-Analyse konnten bei den 49 Arthrosepatienten 25 verschiedene DNA-Variationen nachgewiesen werden, zwölf im XYLT-I-Gen und 13 im XYLT-II-Gen. Zwölf der detektierten Variationen sind in den Introns und der 5'-UTR lokalisiert. Von den 13 exonischen Veränderungen gehen sieben mit einer Aminosäure-Substitution einher (zwei in der XT-I; fünf in der XT-II). Die ermittelten Allel-Frequenzen der Arthrosepatienten und der Blutspender sind in Tabelle 5.16 aufgelistet.

Tab. 5.16: Allel-Frequenzen der XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten und Blutspendern.

Gen	Variation	Protein	Region	Allel-Frequenzen bei	
				Arthrosepatienten	Blutspendern
XYLT-I	IVS1-5C>G		5'-UTR	n.u.	n.u.
	c.343G>T	p.A115S	Exon 1	4 / 98	7 / 208
	IVS2+6T>C		Intron 2	1 / 98	n.u.
	IVS2+29A>G		Intron 2	1 / 98	n.u.
	IVS3+10C>T		Intron 3	1 / 98	n.u.
	IVS3+30G>C		Intron 3	1 / 98	n.u.
	IVS4+47A>G		Intron 4	55 / 98	n.u.
	c.1154C>T	p.P385L	Exon 5	1 / 98	2 / 392
	c.1284C>G		Exon 5	12 / 98	70 / 392
	c.1989T>C		Exon 9	24 / 98	78 / 226
	IVS10+100A>G		Intron 10	n.u.	n.u.
	c.2631C>T		Exon 12	16 / 98	69 / 394
XYLT-II	IVS1-86delG		5'-UTR	37 / 98	n.u.
	IVS1-84G>A		5'-UTR	1 / 98	n.u.
	c.166G>A	p.D56N	Exon 2	2 / 98	9 / 442
	c.177A>G+c.342T>C		Exon 2	62 / 98	168 / 218
	c.914C>G	p.T305R	Exon 4	72 / 98	172 / 218
	IVS6-9T>C+ IVS6-14 IVS6-13insG		Intron 5	2 / 98	5 / 440
	c.1216C>T	p.R406C	Exon 6	1 / 98	0 / 182
	c.1253C>T	p.P418L	Exon 6	1 / 98	5 / 230
	IVS7+81A>C		Intron 7	1 / 98	n.u.
	c.1569C>T		Exon 8	47 / 98	117 / 222
	c.2402C>G	p.T801R	Exon 11	36 / 98	155 / 386

n.u.: nicht untersucht.

Die Genotyp-Verteilung der 15 Variationen, von denen die Frequenzen ermittelt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe.

5.3.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Die klinischen Parameter Anzahl betroffener Gelenke, XT-I-Aktivität und Beteiligung von Hüfte oder Knie von Patienten mit SNPs (Frequenz von über 15 %: vier in XYLT-I und fünf in XYLT-II) wurden mit denen der Wildtyp-Patienten verglichen. Für keinen Polymorphismus konnte eine signifikante Assoziation nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob das Auftreten genetischer Veränderungen mit einer früheren Krankheitsmanifestation einhergeht, wurden die Patienten in Abhängigkeit ihres Alters und ihres Diagnosealters unterteilt (Tab. 5.17). Das Durchschnittsalter in der Gruppe der jüngeren Patienten beträgt $55,9 \pm 5,7$ Jahre, das der älteren $72,3 \pm 5,7$ Jahre.

Tab. 5.17: Allel-Frequenzen des SNPs c.1569C>T im XYLT-II-Gen bei Arthrosepatienten ($n=49$) in Abhängigkeit ihres Alters und ihres Diagnosealters und in der Kontrollgruppen ($n=111$).

	<i>n</i>	c.1569C>T	P-Wert
Arthrosepatienten: Alter < 62 Jahre	12	19 / 24	< 0,001
Arthrosepatienten: Alter ≥ 63 Jahre	37	29 / 74	
Arthrosepatienten: Alter < 62 Jahre	12	19 / 24	0,02
Blutspender: Alter 18-68 Jahre	111	117 / 222	
Arthrosepatienten: Diagnosealter < 60 Jahre	17	23 / 34	0,01
Arthrosepatienten: Diagnosealter ≥ 60 Jahre	32	25 / 64	

Der Vergleich der Allel-Frequenzen zwischen den jüngeren und den älteren Patienten zeigte, dass der synonyme SNP c.1569C>T in Exon 8 des XYLT-II-Gens signifikant häufiger bei juvenilen Patienten vorkommt (79 % vs. 39 %; $p < 0,001$). Diese Signifikanz konnte auch zwischen den jungen Arthrosepatienten und der Kontrollgruppe beobachtet werden (79 % vs. 53 %; $p = 0,02$). Die Unterteilung der Patienten anhand des Diagnosealters ergab ebenfalls für den SNP c.1569C>T eine signifikant höhere Allel-Frequenz innerhalb der Patienten mit einem früheren Diagnosealter (68 % vs. 39 %; $p = 0,01$).

5.4 XYLT-Variationen bei PXE-Patienten

5.4.1 XYLT-Variationen bei PXE-Patienten und Blutspendern

Die Mutationsanalyse der DNA von 65 PXE-Patienten führte zu dem Nachweis von insgesamt 22 verschiedenen DNA-Alterationen, acht im XYLT-I- und 14 im XYLT-II-Gen. Von diesen Veränderungen sind sieben in den Introns oder der 5'-UTR lokalisiert. Von den 15 Exon-Veränderungen verursachen acht eine Aminosäure-Substitution (drei in XT-I; fünf in XT-II). Die ermittelten Allel-Frequenzen der PXE-Patienten und der Blutspender sind in Tabelle 5.18 aufgelistet.

Tab. 5.18: Allel-Frequenzen der XYLT-Variationen bei PXE-Patienten und Blutspendern.

Gen	Variation	Aminosäure	Region	Allel-Frequenzen bei	
				PXE-Patienten	Blutspendern
XYLT-I	IVS1-5C>G		5'-UTR	n.u.	n.u.
	c.343G>T	p.A115S	Exon 1	6 / 132	7 / 208
	c.1077C>T		Exon 4	10 / 132	10 / 224
	c.1216C>T	p.R406W	Exon 5	1 / 132	0 / 392
	c.1284C>G		Exon 5	21 / 132	70 / 392
	c.1989T>C		Exon 9	43 / 132	78 / 226
	c.1994C>T	p.T665M	Exon 9	1 / 132	0 / 476
	c.2631C>T		Exon 12	17 / 132	69 / 394
XYLT-II	IVS1-86delG		5'-UTR	n.u.	n.u.
	IVS1-84G>A		5'-UTR	n.u.	n.u.
	IVS1-72G>C		5'-UTR	n.u.	n.u.
	IVS1-35G>C		5'-UTR	n.u.	n.u.
	c.166G>A	p.D56N	Exon 2	3 / 132	9 / 442
	c.177A>G+c.342T>C		Exon 2	97 / 132	168 / 218
	c.344C>T	p.P115L	Exon 2	1 / 132	0 / 442
	c.914C>G	p.T305R	Exon 4	99 / 132	172 / 218
	IVS6-9T>C+ IVS6-14_IVS6-13insG		Intron 5	5 / 132	5 / 440
	c.1253C>T	p.P418L	Exon 6	3 / 132	5 / 230
	c.1569C>T		Exon 8	65 / 132	117 / 222
	c.2402C>G	p.T801R	Exon 11	45 / 132	155 / 386

n.u.: nicht untersucht.

Von 17 der 22 nachgewiesenen Variationen wurden die Allel-Frequenzen bei den Patienten und in der Kontrollgruppe bestimmt und miteinander verglichen. Die Verteilung der Genotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

5.4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Um zu untersuchen, ob Assoziationen zwischen den SNPs mit einer Frequenz von über 2 % (fünf in XYLT-I; neun in XYLT-II) und den klinischen Parametern XT-I-Aktivität und der Beteiligung der verschiedenen einzelnen Organe bestehen, wurden die Parameter der homo- und heterozygoten Variationsträger mit denen der Wildtypen verglichen. Auf diese Weise konnte für PXE-Patienten mit der Aminosäure-Substitution Alanin 115 zu Serin (XT-I; Exon 1) eine signifikant erhöhte XT-I-Aktivität im Serum nachgewiesen werden (Tab. 5.19).

Tab. 5.19: XT-I-Aktivitäten von PXE-Patienten in Abhängigkeit ihres XT-I-Genotyps an der Position c.343G>T. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

XT-I, p.A115S	XT-I-Aktivität [mU/L]
GG	0,87 \pm 0,048 n=60
GT+TT	1,37 \pm 0,163 n=5
P-Wert	0,005

Die statistische Auswertung in Bezug auf das Auftreten von genetischen Variationen und der Art der beteiligten Organe zeigt, dass Patienten mit dem Aminosäure-Austausch von Threonin 801 zu Arginin in der XT-II signifikant ($p = 0,002$) häufiger unter Hautproblemen leiden. Alle 37 Träger (100 %) dieser Variation in homo- oder heterozygoter Form weisen die PXE-typischen Hautläsionen auf, wohingegen von den 28 Wildtyp-Patienten nur 21 (75 %) darunter leiden.

Zur Beurteilung der genetischen Veränderungen im Zusammenhang mit dem Diagnosealter und der Verlaufsform wurden die Patienten in Subgruppen unterteilt und die Allelfrequenzen verglichen.

Der codierende SNP c.2402C>G (p.T801R) in Exon 11 des XYLT-II-Gens kommt signifikant häufiger (43 % vs. 26 %; $p = 0,04$) bei Patienten mit einem frühen Diagnosealter vor (7 - 28 Jahre: 30 Patienten vs. 30 - 65 Jahre: 33 Patienten).

Die Gruppierung der Patienten mit unterschiedlichem PXE-Schweregrad erfolgte anhand der Anzahl betroffener Organe. Bei 42 Patienten waren 1 - 3 Organe beteiligt, bei den anderen 23 Patienten waren 4 - 7 Organe betroffen. Für drei Polymorphismen im XYLT-II-Gen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und einer höheren Anzahl betroffener Organe nachgewiesen werden (Tab. 5.20).

Tab. 5.20: Allel-Frequenzen von XYLT-II-SNPs bei PXE-Patienten mit unterschiedlich schwerem Krankheitsverlauf.

XYLT-II-Variation	Aminosäure	Region	1 -3 Organe	4 - 7 Organe	P-Wert
c.166G>A	p.D56N	Exon 2	0 / 84	3 / 46	0,04
c.1569C>T		Exon 8	34 / 84	30 / 46	0,01
c.2402C>G	p.T801R	Exon 11	23 / 84	22 / 46	0,02

Die veränderten Allele treten mit einer signifikant höheren Frequenz bei Patienten mit einem schwereren Krankheitsverlauf auf.

5.5 Mutagenese und Enzymaktivität rekombinanter XT-I-Mutanten

Um die Auswirkung von fünf der nachgewiesenen Aminosäure-Substitutionen auf die enzymatische Aktivität der XT-I zu untersuchen, wurden die veränderten XT-I-Formen rekombinant in *High Five*-Insektenzellen exprimiert. Die Beurteilung der resultierenden XT-I-Aktivitäten der Mutanten erfolgte durch den Vergleich mit der Aktivität des unveränderten Enzyms.

5.5.1 Mutagenese

Ausgehend von dem Insekten-Expressions-Vektor pCG255Δ1-148-XT-I wurden fünf der zuvor mittels DHPLC detektierten Aminosäure-Sequenzvariationen in der XT-I mit der *site-directed mutagenesis* Methode generiert. Mit Hilfe der verwendeten *Primer*, bei denen jeweils ein Nukleotid ausgetauscht wurde (Tab. 3.8), konnten Expressionsvektoren hergestellt werden, in denen jeweils eine Aminosäure substituiert war. Die eingeführten Nukleotid-Änderungen und die daraus resultierenden Aminosäure-Substitutionen in den rekombinanten Proteinen sind in Tabelle 5.21 aufgeführt.

Tab. 5.21: Aminosäure-Substitutionen, die durch *site-directed mutagenesis* in die XT-I eingeführt wurden.

Exon	Sequenzvariation	Aminosäureaustausch
5	c.1154C>T	p.P385L
8	c.1655T>G	p.I552S
9	c.1883G>A	p.R628H
9	c.1994C>T	p.T665M
12	c.2675G>A	p.R892Q

Der Erfolg der Mutagenese konnte nach den Transformationen und Plasmidisolierungen für jede Variation mittels Sequenzanalyse mindestens zweier Klone bestätigt werden.

5.5.2 Transfektion von *High Five*-Insektenzellen

Die rekombinante Darstellung der XT-I-Mutanten und des Wildtyps erfolgte durch die transiente Transfektion von *High Five*-Zellen. Die XT-I-Expressionsrate wurde nach SDS-PAGE und *Electroblotting* im Western Blot mit Anti-V5-Antikörpern im 40-fach aufkonzentrierten Zellkultur-Überstand überprüft. Alle rekombinanten Proteine wurden mit ähnlicher Ausbeute exprimiert und wiesen eine Einzelbande bei ca. 90 kDa auf (Abb. 5.14).

5.5.3 Enzymaktivitäten der rekombinanten XT-I-Mutanten

Die Quantifizierung der XT-I-Aktivität im Zellkultur-Überstand zeigt, dass alle Aminosäure-Mutanten enzymatisch aktiv sind. Ein Vergleich der Aktivitäten zwischen dem Wildtyp und den Varianten ist in Abbildung 5.14 gezeigt. Die Mutationen p.R628H (Exon 9), p.T665M (Exon 9) und p.R892Q (Exon 12) haben keinen Einfluss auf die XT-I-Aktivität; ihre Aktivitäten entsprechen der des Wildtyps. XT-I-Varianten mit Aminosäure-Substitutionen in Exon 5 (p.P385L) und in Exon 8 (p.I552S) weisen signifikant erniedrigte Enzymaktivitäten auf. Der Austausch von Prolin zu Leucin führt zu einem Aktivitätsverlust von 16 %; die Substitution von Isoleucin zu Serin mindert die Enzymaktivität um 26 %.

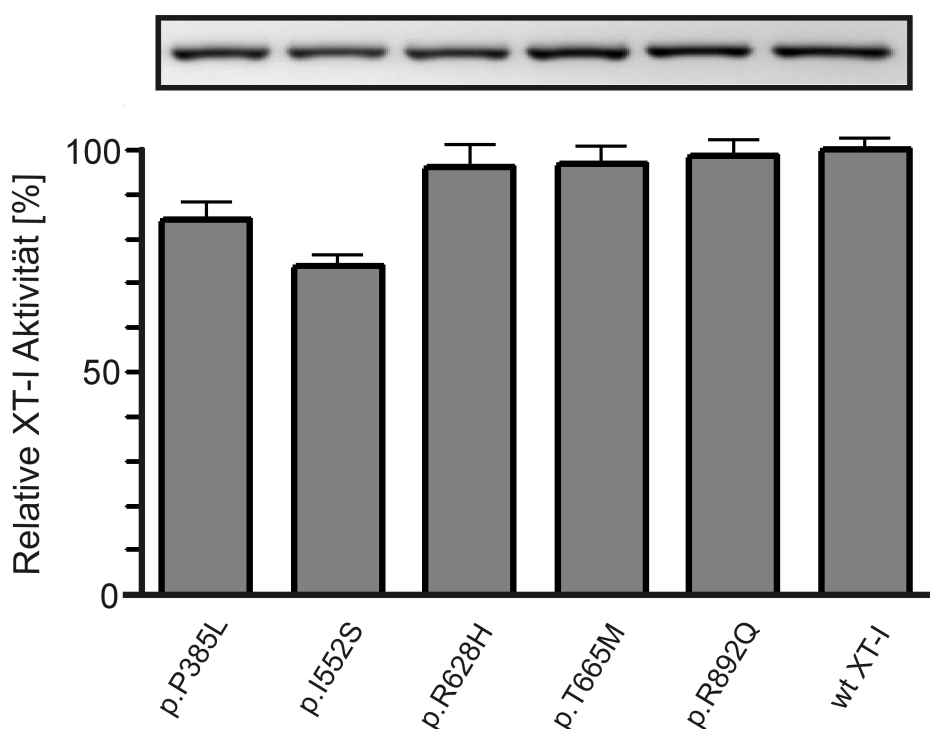


Abb. 5.14: Expression der XT-I-Varianten und ihre relativen XT-I-Aktivitäten. Die Expressionsrate der rekombinanten Aminosäure-Mutanten und des Wildtyps in *High Five*-Zellen wurde im Western-Blot mit Anti-V5-HRP-Antikörpern in 40-fach aufkonzentrierten Zellkultur-Überständen detektiert. Zur Darstellung der relativen XT-I-Aktivitäten wurde die Wildtyp-XT-I-Aktivität (wt XT-I) als 100 % definiert. Das Balkendiagramm zeigt die relative Aktivität der jeweiligen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Expressions-Experimenten mit jeweils zwei aus unabhängigen Klonen erhaltenen Plasmid-Vektoren.

Um unerwünschte Veränderungen im Ausgangsvektor der Varianten mit verringerter Enzymaktivität auszuschließen, wurden, ausgehend von den veränderten Plasmiden, Revertanten hergestellt und auf ihre Aktivität hin untersucht. In beiden Fällen konnte die

komplette enzymatische Aktivität wieder hergestellt werden. Dieses Ergebnis beweist, dass der Austausch jeweils einer Aminosäure die Reduktion der Aktivität hervorgerufen hat.

5.5.4 Enzymkinetik der rekombinanten XT-I-Mutanten

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten XT-I- und der XT-I-Mutanten, die eine verringerte Aktivität aufweisen (p.P385L und p.I552S), wurden bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen in einem Bereich von 256 $\mu\text{g/mL}$ bis 0,125 $\mu\text{g/mL}$ bFGF und konstanter Enzymmenge untersucht. Für die humane XT-I wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik angenommen. Mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstanten (K_{M}) bestimmt (Tab. 5.22).

Tab. 5.22: K_{M} - und V_{max} -Werte der rekombinanten Wildtyp-XT-I (wt XT-I) und der XT-I-Mutanten, die eine verringerte Aktivität besitzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

XT-I-Variante	K_{M} [μM]	V_{max} [pmol/h]	$V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$ [pmol/h· μM]
wt XT-I	18,10 \pm 0,96	3,58 \pm 0,18	0,20
p.P385L	41,16 \pm 2,15	7,24 \pm 0,08	0,18
p.I552S	38,25 \pm 0,56	4,06 \pm 0,11	0,14

Der K_{M} -Wert für die rekombinante humane XT-I ist in der Literatur mit 22,3 μM beschrieben (Kuhn *et al.*, 2005). Der experimentell ermittelte Wert liegt in guter Näherung zu dem beschriebenen Wert bei 18,1 μM . Die Michaelis-Menten-Konstanten der Aminosäure-Mutanten sind im Vergleich zum Wildtyp 2-fach erhöht. Dies ist ein Hinweis auf eine reduzierte Substratbindungsaffinität der veränderten Enzyme.

Als maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die wt XT-I wurde 3,58 pmol/h ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der p.P385L-Mutante ist 2-fach erhöht; die der p.I552S-Variante liegt im Bereich des Wildtyps.

Die Werte für $V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$, die ein Maß für die Affinität des Akzeptors darstellen, sind bei beiden Mutanten reduziert.

5.6 Expression und Lokalisation der humanen XT-I

Für die funktionelle und biochemische Charakterisierung der intrazellulären Signalsequenzen und der potentiellen Proteinase-Spaltstelle der humanen XT-I ist es notwendig, ihre vollständige cDNA in humanen Zelllinien zu exprimieren. Bisher war nur ein Expressionssystem für eine unvollständige XT-I-Variante ($\Delta 1 - 148$) in Insektenzellen etabliert.

5.6.1 Konstruktion der vollständigen XT-I cDNA

Ausgehend von dem IMAGE-Klon 2116905, der den N-terminalen Anteil der XT-I codiert (Nukleotide -85 bis 724), und pCG255 wurde ein cDNA-Konstrukt hergestellt, das die cDNA für die vollständige XT-I enthält.

Die fehlenden Nukleotide C und G an den Positionen 40 und 41 im IMAGE-Klon 2116905 konnten mittels *site-directed mutagenesis* erfolgreich eingefügt werden (pSS0). Die Amplifikation der beiden Teilsequenzen erfolgte mit *Primern*, die die zur Verbindung erforderlichen Restriktionsstellen generierten. Nach der Subklonierung der PCR-Produkte in pCR2.1TOPO-Vektoren und der Transformation wurden die isolierten Plasmide und der Expressionsvektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO zweifach restringiert (N-terminales Fragment: *BstXI* und *HindIII*; C-terminales Fragment: *XbaI* und *HindIII*; Vektor: *BstXI* und *XbaI*), die drei Fragmente ligiert und in TOP10-Zellen transformiert. Durch Sequenzierung konnte die Ligation erfolgreich nachgewiesen werden. Im letzten Schritt wurde die zur Verbindung der N- und C-terminalen XYLT-I-Fragmente generierte *HindIII* Restriktionsschnittstelle mit der *site-directed mutagenesis* Methode eliminiert. Die Sequenzierung einiger Klone (pSS1) bestätigte sowohl die Richtigkeit der XT-I-cDNA-Sequenz als auch die korrekte Orientierung in den Vektor und die Fusion mit dem Leserahmen des GFP.

5.6.2 Transfektion und XT-I-Aktivität

Die Plasmide pSS1 (rXT-I(1 - 959)GFP) wurden zur transienten Transfektion von HEK-293-, SAOS-2- und SW 1353-Zellen eingesetzt. Erfolgreich transformierte Zellen konnten 24 Stunden nach der Transfektion durch GFP-induzierte Fluoreszenz unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die rekombinante, GFP-markierte XT-I enzymatisch aktiv ist, wurde nach 48 Stunden ein XT-Aktivitätstest mit dem Zellkultur-Überstand durchgeführt (Abb. 5.15).

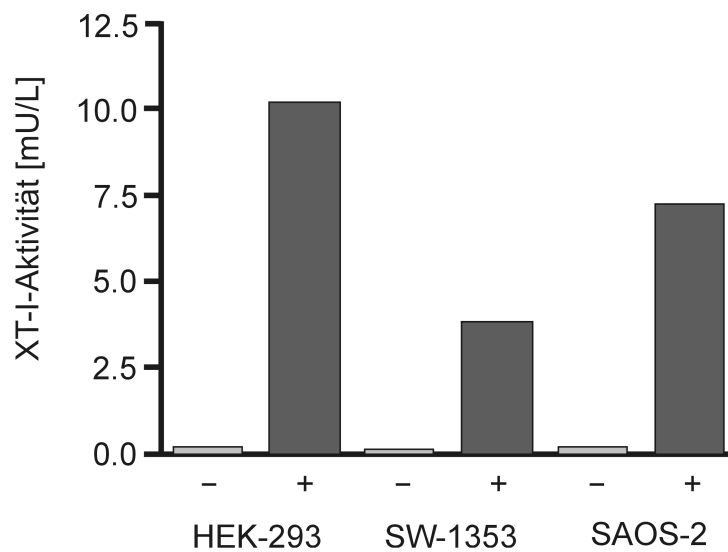


Abb. 5.15: XT-I-Aktivität humaner Zellen nach der Transfektion mit rXT-I(1 - 959)GFP (+) und dem Kontrollplasmid (-). Nach der Transfektion mit rXT-I(1-959)GFP besitzen die Zellen eine 44 - 68-fach erhöhte XT-I-Aktivität im Vergleich zu den mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen.

Das Auftreten der Fluoreszenz und die 44 - 68-fache Erhöhung der XT-I-Aktivität im Zellkultur-Überstand bestätigen, dass das rekombinante Enzym erfolgreich mit dem GFP fusioniert wurde, dass es von den zelleigenen Proteasen gespalten und sezerniert wurde und dass es in korrekt gefalteter, aktiver Form im Überstand vorliegt.

5.6.3 Nachweis der intrazellulären Lokalisation der XT-I

Auf Deckgläschen adhärierte HEK-293-, SAOS-2- und SW 1353-Zellen wurden zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der XT-I mit dem Plasmid pSS1 transfiziert. Nach 48 - 72-stündiger Kultivierung konnte die GFP-Fluoreszenz perinukleär nachgewiesen werden. Die Immunfärbung mit dem Golgi-Marker und dem TRITC-markierten Sekundäntikörper bestätigte durch die exakte Co-Lokalisierung dieses Resultat (Abb. 5.16 A und B). Zum weiteren Beweis der Lokalisation wurden die Zellen nach der Inkubation mit Cycloheximid und BFA erneut der Immunfärbung unterzogen (Abb. 5.16 C). Cycloheximid verhindert die Protein-Synthese und die neusynthetisierten Proteine werden in ihre jeweiligen Kompartimente gesteuert. BFA zerstört den Golgi-Apparat reversibel und Golgi-Proteine gelangen zurück ins ER (Driouich *et al.*, 1993). Nach dieser Behandlung veränderte sich das perinukleäre Fluoreszenz-Muster zu einer diffus verteilten Fluoreszenz im cytoplasmatischen Bereich, die kennzeichnend für das ER ist. Somit konnte erstmalig mit einer GFP-markierten XT-I-Form gezeigt werden, dass dieses Enzym im Golgi-Apparat lokalisiert ist.

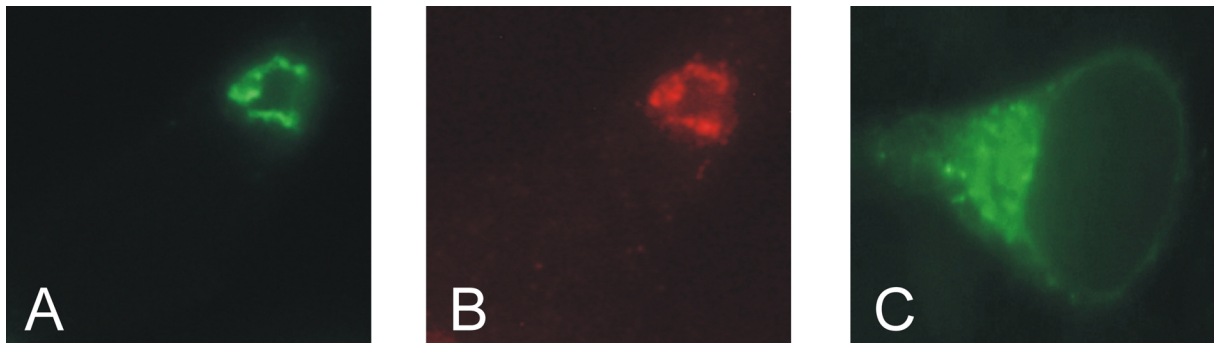


Abb. 5.16: Färbemuster von HEK-293-Zellen nach der Transfektion mit pSS1 (rXT-I(1 - 959)GFP). Fluoreszenz der GFP-markierten XT-I (A), Immunfärbung mit dem Golgi-Marker und TRITC-markiertem Sekundärantikörper (B) und Fluoreszenz der GFP-markierten XT-I nach der Behandlung mit Cycloheximid und BFA (C).

5.7 Signalsequenzen zur intrazellulären Lokalisation von XT-I und XT-II

5.7.1 Konstruktion von GFP-markierten C-, T- und S-Varianten

Um die Domänen zu identifizieren, die für die intrazelluläre Lokalisation der humanen XT-I und XT-II verantwortlich sind, wurden GFP-markierte, C-terminal verkürzte Mutanten und Deletions-Mutanten von beiden Enzymen hergestellt. Insgesamt wurden zehn verschiedene Varianten der XT-I und fünf der XT-II generiert (Tab. 5.23).

Tab. 5.23: Aus dem pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Vektor generierte Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmid	Eigenschaften	Aminosäuren	Regionen
pSS1	rXT-I(1 - 959)GFP	1 - 959	XT-I, gesamte cDNA
pSS2	rXT-I(CTS; 1 - 214)GFP	1 - 214	XT-I; CTS
pSS3	rXT-I(CTS; 1 - 158)GFP	1 - 158	XT-I; CTS
pSS4	rXT-I(CTS; 1 - 134)GFP	1 - 134	XT-I; CTS (Exon 2)
pSS5	rXT-I(CTS; 1 - 119)GFP	1 - 119	XT-I; CTS (Exon 1)
pSS6	rXT-I(CTS; 1 - 104)GFP	1 - 104	XT-I; CTS
pSS7	rXT-I(CTS; 1 - 70)GFP	1 - 70	XT-I; CTS
pSS8	rXT-I(CT; 1 - 35)GFP	1 - 35	XT-I; CT
pSS9	rXT-I(C; 1 - 13)GFP	1 - 13	XT-I; C
pSS10	rXT-I(T; 1; 14 - 35)GFP	1; 14 - 35	XT-I; T
pSS11	rXT-I(S; 1; 36 - 134)GFP	1; 36 - 134	XT-I; S (Exon 2)
pSS12	rXT-II(CTS; 1 - 45)GFP	1 - 45	XT-II; CTS (Exon 1)
pSS13	rXT-II(CT; 1 - 32)GFP	1 - 32	XT-II; CT
pSS14	rXT-II(C; 1 - 15)GFP	1 - 15	XT-II; C
pSS15	rXT-II(T; 1; 16 - 32)GFP	1; 16 - 32	XT-II; T
pSS16	rXT-II(S; 1; 33 - 45)GFP	1; 33 - 45	XT-II; S (Exon 1)

Die Fragmente für die verkürzten Formen wurden mittels PCR amplifiziert (Tab. 3.11) und in den pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Vektor kloniert. Als *Template* diente der Klon pSS0 (AI524006 nach Insertion von CG) für die XT-I und genomische DNA für die XT-II. Die PCR-Produkte wurden in der Agarosegel-Elektrophorese kontrolliert, aus dem Gel eluiert, in den Expressionsvektor kloniert und zur Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt. Plasmide aus erfolgreich transformierten Zellen wurden durch Sequenzanalysen auf ihre Richtigkeit untersucht. Es konnten für jede C-terminal verkürzte Mutante mindestens zwei korrekte Klone identifiziert werden. Die Deletions-Mutanten wurden mittels *site-directed mutagenesis* aus den entsprechenden, verkürzten Varianten generiert. Die Mutanten, die nur den für die S-Region codierenden Abschnitt enthalten, gingen aus pSS4 (XT-I) und pSS12 (XT-II) hervor. Die XT-I-Mutante, die nur die T-Domäne beinhaltet, wurde aus pSS8 hergestellt und die entsprechende XT-II-Mutante aus pSS13. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde nach Transformation und Plasmidisolierung mittels Sequenzanalyse mindestens zweier Klone bestätigt. Abbildung 5.17 zeigt schematisch die hergestellten Mutanten. Nicht gezeigte XT-I-Varianten (pSS3; pSS4; pSS5 und pSS7) unterscheiden sich nur in der Länge der S-Regionen.

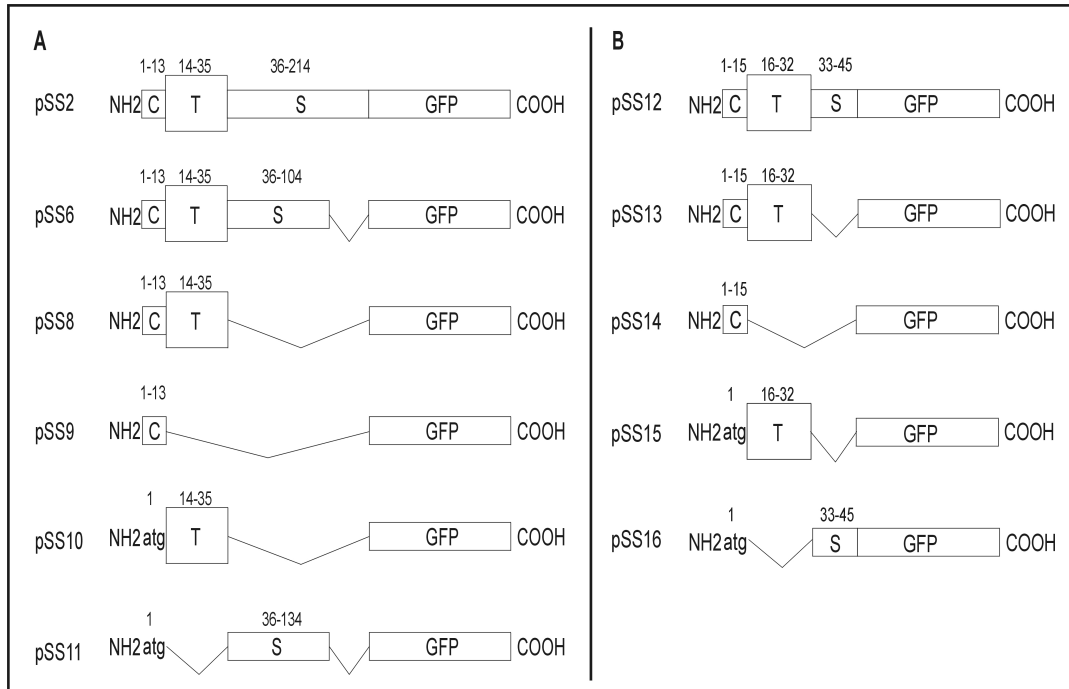


Abb. 5.17: Schematische Darstellung ausgewählter, zur Ermittlung der Lokalisation eingesetzter XT-I-Mutanten (A) und XT-II-Mutanten (B). Die Abkürzungen C, T und S stehen für die cytoplasmatische Domäne, die Transmembranregion und die Stammregion. Die oberhalb aufgelisteten Nummern geben die in der jeweiligen Region enthaltenen Aminosäuren an. Ein Strich anstelle eines Kästchens bedeutet, dass der entsprechende Bereich nicht enthalten ist; atg ist das Startcodon.

5.7.2 Funktion der C-, T- und S-Regionen in der XT-I

Die Identifikation der zur intrazellulären Zielsteuerung erforderlichen Domänen der XT-I erfolgte mit den cDNA-Konstrukten, die für die GFP-markierten C-, T-, CT-, S- oder CTS-Domänen mit unterschiedlichen Längen der S-Region codieren. Die Bereiche der C- und T-Regionen wurden anhand von Vorhersagen mittels Hydrophobizitäts-Analysen ermittelt. Die NH₂-terminale C-Region besteht aus den Aminosäuren 1 - 14; die T-Region wird von den Aminosäuren 15 - 35 gebildet (Götting *et al.*, 2004). In dieser Studie wurde die C-Region durch die Aminosäuren 1 - 13 und T-Region durch die Aminosäuren 14 - 35 definiert. Die Länge der S-Region ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht genau bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass die um 260 Aminosäuren verkürzte N-terminale XT-I-Variante eine 100%ige Aktivität aufweist (Müller *et al.*, 2005). Alle Konstrukte ließen sich erfolgreich in HEK-293, SAOS-2 und SW1353 exprimieren. 2 - 3 Tage nach der Transfektion erfolgte die Immunfärbung mit dem Golgi-Marker mit und ohne vorherige Cycloheximid- und BFA-Behandlung. Die Auswertung der resultierenden Färbemuster erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Das Fusionsprotein, das die Aminosäuren 1 - 214 der XT-I enthält (pSS2), ist die einzige XT-I-Variante, bei der eine vollständige Golgi-Lokalisation beobachtet werden konnte. Das Ergebnis wurde durch das typische Färbemuster, die Co-Lokalisierung mit dem Golgi-Marker und dem veränderten Muster nach der BFA-Behandlung bestätigt, wie es auch für die gesamte XT-I erhalten wurde (Abb. 5.16 A - C). Die Verkürzung der S-Region um 56 Aminosäuren (pSS3, Aminosäuren 1 - 160) resultierte in einem veränderten mikroskopischen Bild. Eine Golgi-Retention konnte nur noch bei wenigen Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Bei der auf 69 Aminosäuren verkürzte S-Region (pSS6, Aminosäuren 1 - 104) kam es zu einem vollständigen Verlust der Golgi-Lokalisation und die GFP-erzeugte Fluoreszenz erschien irregulär verteilt innerhalb der gesamten Zelle mit Ausnahme des Kernbereiches (Abb. 5.18 A). Der Vergleich mit dem Golgi-Marker zeigte keine Übereinstimmungen mit der GFP-Lokalisation (Abb. 5.18 B). Die Behandlung mit Cycloheximid und BFA führte nicht zu Veränderungen im mikroskopischen Bild (nicht gezeigt). Die Untersuchungen der CT- und T-Varianten lieferten das gleiche Färbemuster.

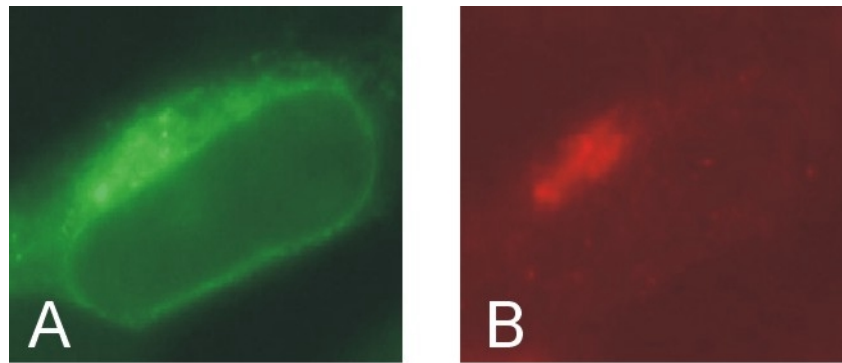


Abb. 5.18: Färbemuster von HEK-293-Zellen nach der Transfektion mit pSS6 (rXT-I(CTS; 1 - 104)GFP). Fluoreszenz der GFP-markierten, verkürzten XT-I (A) und Immunfärbung mit dem Golgi-Marker und TRITC-markiertem Sekundärantikörper (B).

Die Expression der S- und C-Konstrukte lieferte eine homogene GFP-Fluoreszenz, die über die gesamte Zelle gleichmäßig verteilt war (Abb. 5.19). Dieses Bild ist identisch mit dem Bild des Kontroll-Vektors, der keine Zielsequenz besitzt und das GFP demzufolge als cytoplasmatisches Protein exprimiert.

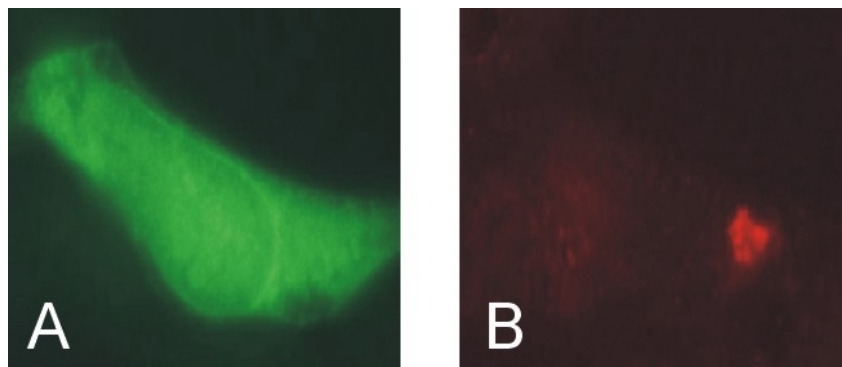


Abb. 5.19: Färbemuster von HEK-293-Zellen nach der Transfektion mit pSS11 (rXT-I(S; 1; 36 - 134)GFP). Fluoreszenz der GFP-markierten, verkürzten und deletierten XT-I (A) und Immunfärbung mit dem Golgi-Marker und TRITC-markiertem Sekundärantikörper (B).

5.7.3 Intrazelluläre Lokalisation der XT-II und die Rolle der C-, T- und S-Regionen

Um die subzelluläre Lokalisation und die dafür erforderlichen Signalsequenzen der XT-II zu bestimmen, wurden analog zur XT-I GFP-Fusionsproteine der N-terminalen Domänen (CTS-, CT-, C-, T- und S-Region) der XT-II hergestellt. Der cytoplasmatische Teil enthält laut der Vorhersagen der Hydrophobizitäts-Analyse die Aminosäuren 1 - 15 und die membrandurchspannende T-Region die Reste 16 - 32 (Götting *et al.*, 2000). Da die Länge der S-Region noch unbekannt ist und noch keine komplette cDNA der XT-II vorliegt, wurde nur der Bereich der

S-Region kloniert, der von Exon 1 codiert wird. Alle hergestellten Plasmide ließen sich erfolgreich in HEK-293, SAOS-2 und SW1353 Zellen exprimieren. Die Analyse der subzellulären Lokalisation erfolgte nach der Färbung mit dem Golgi-Marker mit und ohne Cycloheximid- und BFA-Behandlung. Die XT-II-Variante, die die Aminosäuren 1 - 45 enthielt, wies das gleiche Färbemuster auf, die in Abbildung 5.16 für die XT-I dargestellt ist. Die Lokalisation der GFP-Fluoreszenz ist identisch zur TRITC-Fluoreszenz und die Inhibitor-Behandlung zerstört dieses Bild. Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es sich bei der XT-II auch um ein Golgi-ständiges Protein handelt. Die Analysen der weiteren XT-II-Mutanten zeigten dasselbe Verhalten nach der Expression, Immunfärbung und Inhibitor-Behandlung wie die entsprechenden XT-I-Varianten. Diese Ergebnisse beweisen, dass der vom Exon 1 codierte kurze S-Anteil der XT-II in Kombination mit der C- und der T-Region für die Golgi-Retention ausreicht.

5.8 Untersuchungen zur Identifikation der Proteinase-Spaltstelle der XT-I

Die Identifikation der intrazellulären Proteinase-Spaltstelle zur Erzeugung der löslichen XT-I sollte aus den Zellkultur-Überständen der mit den XT-I-Varianten transfizierten Zellen erfolgen. Dazu wurden die Überstände auf das Vorkommen von GFP untersucht. Der mikroskopische Nachweis von GFP im Medium war nicht möglich. Die Fluoreszenz-Messungen der Zellkultur-Überstände aller XT-I-Varianten zeigte für keine der XT-I-Formen eine nachweisbare Fluoreszenz. Die Analyse der aufkonzentrierten Zellkultur-Überstände im *Dot-Blot* mit dem GFP-Antiserum lieferte ebenfalls keinen Nachweis für das Vorkommen von GFP im Überstand. Die eingesetzten Zelllysate der XT-I-Varianten hingegen zeigten deutliche Signale im *Dot-Blot*. Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass das GFP entweder nicht aus der Zelle transportiert wurde, oder dass der Transport zu Struktur-Änderungen führte, die zu einem Verlust der Fluoreszenz und der Antikörper-Erkennung führten.

6 Diskussion

Die Xylosyltransferase I katalysiert den initialen Schritt bei der Synthese der Glykosaminoglykan-Seitenketten in Proteoglykanen durch den Transfer von Xylose auf ausgewählte Serinreste im *Core*-Protein (Stoolmiller *et al.*, 1972, Schwartz, 1977). Die physiologische Funktion der XT-II konnte bislang noch nicht ermittelt werden. Sie hat möglicherweise eine andere Peptidsequenz-Spezifität als die XT-I oder benötigt ein bereits an anderer Stelle xylosyliertes Substrat (Wilson, 2004). Eine Beteiligung an der Biosynthese von Komponenten der extrazellulären Matrix wird jedoch angenommen.

6.1 Mutationsdetektion in den XYLT-Genen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob genetische Variationen in den XYLT-Genen existieren und ob diese die Entstehung und den Verlauf von Krankheiten beeinflussen. Dazu wurden Kohorten ausgewählt, deren Erkrankung durch einen veränderten Proteoglykan-Metabolismus charakterisiert ist. Insgesamt wurden 9,4 kbp von 210 Patienten und 20 Blutspendern mittels DHPLC analysiert. Die DHPLC-Methode zur Detektion von DNA-Sequenzvariationen zeichnet sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität aus. Weiterhin weist sie die Vorteile kurzer Analysezeiten und geringer Kosten auf (Xiao und Oefner, 2001). Es gelang somit erstmalig, insgesamt 47 genetische Veränderungen in den XYLT-Genen aufzuspüren. Im XYLT-I-Gen wurden acht intronische, acht synonyme und sieben *Missense*-Variationen nachgewiesen. Acht der XYLT-II-Alterationen sind in den Introns lokalisiert; von den 16 exonischen Veränderungen resultieren acht in Aminosäure-Substitutionen. Von den Variationen, die mit Aminosäure-Substitutionen einhergehen, kommen nur die Polymorphismen p.T305R und p.T801R in der XT-II mit einer Häufigkeit von über 5 % vor. Die Aminosäure-Austausche mit Frequenzen unter 5 % wurden mit Ausnahme von p.A115S in Exon 1 der XT-I nur in heterozygoter Form nachgewiesen. Der Polymorphismus p.A115S ist in der Stammregion lokalisiert und nicht an der katalytischen Aktivität der XT-I beteiligt (Müller *et al.*, 2005).

Diese Beobachtung und die Abwesenheit von *Nonsense*-Mutationen, Deletionen, Insertionen oder Spleißstellen-Variationen erlauben die Vermutung, dass die Funktion der Xylosyltransferasen aufgrund der Beteiligung der Proteoglykane an verschiedensten physiologischen Prozessen essentiell ist. Bis heute ist noch keine Erkrankung bekannt, die durch einen Funktionsverlust der Xylosyltransferasen hervorgerufen wird.

6.2 XYLT-Variationen bei Typ-1-Diabetikern

6.2.1 Initialstudie

Die Veränderungen der GBM im Rahmen einer diabetischen Nephropathie gehen mit einer Beeinträchtigung der glomerulären Filtration einher (Deckert *et al.*, 1989; van den Born *et al.*, 1992; Tamsma *et al.*, 1994). Die Abnahme der negativen Ladung von Heparansulfat-Proteoglykanen erlaubt die Vermutung, dass Enzyme, die an der Homöostase der GBM beteiligt sind, in die Pathogenese der diabetischen Nephropathie involviert sind. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die XYLT-Gene als mögliche Kandidatengene ausgewählt und auf das Vorhandensein genetischer Veränderungen analysiert. Die nachgewiesenen Variationen wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Entstehung der diabetischen Nephropathie oder des Typ-1-Diabetes untersucht. Weiterhin wurde verglichen, ob sie mit Veränderungen von klinischen Parametern assoziiert sind.

Der Frequenzvergleich von 26 der 33 detektierten Sequenzabweichungen zwischen Typ-1-Diabetikern und der Kontrollgruppe zeigt, dass die Aminosäure-Substitution Arginin 120 zu Histidin in der XT-II nur bei Typ-1-Diabetikern und nicht bei Kontrollpersonen vorkommt. Aufgrund der niedrigen Frequenz (1,6 %) ist diese signifikante Assoziation ($p = 0,03$) nicht geeignet, um eine genetische Prädisposition für die Entwicklung eines Typ-1-Diabetes zu diagnostizieren und somit nicht von klinischer Relevanz.

Der Vergleich der Allel-Frequenzen zwischen Typ-1-Diabetikern mit und ohne Nephropathie zeigt, dass die Intron-Veränderungen IVS6-9T>C und IVS6-14_IVS6-13insG im XYLT-II-Gen ausschließlich bei Probanden ohne Nephropathie detektiert wurden (Frequenz: 5,2 %). Da die statistische Analyse die Tendenz eines signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,06$) bestätigt, könnten diese Variationen vor der Entstehung der Nephropathie schützen. Die Substitution der Base Thymin zu Cytosin an der Position IVS6-9 ist im Bereich der 3'-Spleißstelle lokalisiert. Die Erkennungssequenz wird durch den Austausch nicht beeinflusst, da an dieser Position ein Pyrimidin konserviert ist (Lim *et al.*, 2001). Die Insertion des Nukleotids G verschiebt die nachfolgenden Basen und verändert dadurch das Spleißsignal in Bereich der *Branch Site* (Zhang, 1998). Die daraus resultierenden Folgen auf die Effizienz des RNA-Spleißens sind schwer vorherzusagen, da die Regeln für das Spleißen komplex sind und verschiedene degenerierte Motive in den Vorgang involviert sind (Zhang, 1998; Lim *et al.*, 2001; von Ahsen und Oellerich, 2004). Um zu bewerten, ob die

Intron-Substitution einen protektiven Effekt auf die Niere ausübt, wurde eine nachfolgende Studie mit einer größeren Kohorte vor Typ-1-Diabetikern durchgeführt (siehe 6.2.2).

Die Allel-Frequenzen der anderen Variationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Patienten mit und ohne Nephropathie. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass XYLT-Alterationen in den untersuchten Regionen keinen Risikofaktor für die Genese der diabetischen Nephropathie bei Typ-1-Diabetikern darstellen.

Die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen innerhalb der Gruppen mit und ohne Nephropathie zeigen für sieben Polymorphismen signifikante Einflüsse auf insgesamt zehn klinische Parameter. Eine sinnvolle Bewertung ist nur für die häufigen SNPs c.1989T>C im XYLT-I-Gen und c.2402C>G im XYLT-II-Gen möglich, da bei diesen beiden eine angemessene Anzahl an Patienten mit und ohne SNP existieren. Für die anderen Interaktionen ist die Anzahl an Patienten für eine valide Interpretation zu gering. Typ-1-Diabetiker mit und ohne Nephropathie mit dem C-Allel an Position 1989 im XYLT-I-Gen haben signifikant niedrigere diastolische Blutdruck-Werte im Vergleich zu den Patienten, die Träger des Wildtyp-T-Allels sind. Die Aminosäure-Substitution von Threonin an der Position 801 zu Arginin in der XT-II korreliert mit einem erhöhten systolischen Blutdruck bei Patienten ohne Nephropathie. Beide SNPs kamen mit Frequenzen von über 5 % vor und traten in homozygoter und heterozygoter Form auf. Da Heparansulfat-Proteoglykane ebenfalls Komponenten der kapillären Basalmembran sind, können Veränderungen im Proteoglykan-Metabolismus über die Struktur und Flexibilität von Blutgefäßen den Blutdruck beeinflussen. Zur detaillierten Analyse wurden die Frequenzen dieser SNPs ebenfalls in einer größeren Patientenkohorte bestimmt und mit den klinischen Parametern korreliert (siehe 6.2.2).

Die Ergebnisse dieser Studie schlagen Assoziationen zwischen einer XYLT-II-Intron-Insertion und dem Auftreten der diabetischen Nephropathie sowie einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von XYLT-Alterationen und veränderten klinischen Parametern bei Typ-1-Diabetikern vor. Die Frequenzen von unter 5 % von 17 der detektierten Variationen, von denen elf nur einmal in der gesamten Kohorte vorkamen, und die geringe Kohortengröße erschweren zuverlässige statistische Aussagen in Bezug auf die Beteiligung der XYLT-Gene an der Entstehung von Diabetes und der diabetischen Nephropathie. Einmalig nachgewiesene Variationen können aber als Hauptursache für die Entwicklung der Erkrankungen ausgeschlossen werden.

6.2.2 Follow up-Studie

Kennzeichen mikrovaskulärer Komplikationen bei Typ-1-Diabetikern sind die strukturellen und funktionalen Veränderungen der Basalmembranen (Parving *et al.*, 1983, Rayman *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass ein reduzierter Gehalt an Heparansulfat-Proteoglykanen die Funktion der glomerulären und kapillären Basalmembran beeinträchtigt.

In dieser Studie wurden 912 Typ-1-Diabetiker (453 mit und 459 ohne Nephropathie) mittels der RFLP-Methode auf vier der in der Initialstudie detektierten und potentiell assoziierten XYLT-Variationen untersucht. Die Intron-5-Variationen im XYLT-II-Gen (IVS6-9T>C und IVS6-14_IVS6-13insG) zeigen die Tendenz, protektiv auf die Entstehung der diabetischen Nephropathie zu wirken. Die drei anderen SNPs (c.343G>T; p.A115S und c.1989T>C in XYLT-I und c.2402C>G; p.T801R in XYLT-II) korrelieren mit veränderten Blutdruck-Werten.

Die Verteilung der Allel-Frequenzen der Intron-Veränderungen im XYLT-II-Gen IVS6-9T>C und IVS6-14_IVS6-13insG zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne Nephropathie (2,0 % vs. 1,6 %). Somit kann die Assoziation zwischen dieser Variationen und dem potentiellen Schutz vor einer Nephropathie nicht bestätigt werden.

Die seltene Aminosäure-Substitution Alanin 115 zu Serin in der XT-I kommt mit einer signifikant höheren Frequenz bei Typ-1-Diabetikern mit Nephropathie vor (4,3 % vs. 2,4 %, $p = 0,03$) und stellt somit einen Risikofaktor für die Entwicklung der Niereninsuffizienz dar. Dieser Austausch betrifft die Stammregion der XT-I, die nicht an der Katalyse beteiligt ist (Müller *et al.*, 2005). Die Stammregion beinhaltet die Signalsequenzen für die intrazelluläre Lokalisation und die potentielle Proteinase-Spaltstelle zur Generierung der löslichen XT-I-Form (Götting *et al.*, 1998). Die Aminosäure-Substitution kann die Signalsequenz direkt oder über die Entstehung einer potentiellen O-Glykosylierungsstelle indirekt beeinflussen. Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen an dieser Position mit denen der XT von *Mus musculus*, *Pan troglodytes*, *Canis familiaris* und *Xenopus laevis* ergab, dass Alanin bei allen Spezies konserviert ist. Um zu beurteilen, ob und wie der Austausch des unpolaren, aliphatischen Alanins zu der reaktiveren und hydrophilen Aminosäure Serin die Retention beeinflusst, sind *in vitro*-Studien der Proteinvariante notwendig. Da keine Serumproben zur Verfügung standen, konnte im Rahmen dieser Studie nicht untersucht werden, ob das Auftreten dieses SNPs, wie bei den PXE-Patienten (siehe 6.4), mit der Erhöhung der XT-I-

Aktivität einhergeht. Zukünftig sollte die XT-Aktivität im Serum in Abhängigkeit des c.343G>T-Genotyps quantifiziert werden, da eine erhöhte Serum-Aktivität eine unmittelbare Folge der verminderten Retention sein kann. Das wiederum könnte mit einer reduzierten intrazellulären Aktivität einhergehen und durch die gestörte Proteoglykan-Biosynthese die diabetischen Nephropathie begünstigen. In klinischen Studien sollte bewertet werden, ob die Variation c.343G>T als prognostischer Frühmarker geeignet ist, um Diabetiker mit einem erhöhten Gefährdungspotential frühzeitig zu identifizieren.

Die Nukleotid-Substitution von Thymin 1989 zu Cytosin im XYLT-I-Gen ist mit erniedrigten Blutdruck- und Serum-Kreatinin-Werten assoziiert. Nephropathie-Patienten, die das C-Allel tragen, haben signifikant niedrigere systolische und diastolische Blutdruck-Werte. Weiterhin korreliert die Substitution mit reduzierten Serum-Kreatinin-Werten. Hypertonie ist ein beschleunigender Faktor für die Progredienz der Niereninsuffizienz, die durch eine effektive Therapie zur Blutdruck-Senkung verzögert werden kann (Pickup und Williams, 1994; Strödter, 2002). Serum-Kreatinin ist ein Marker für die Nierenfunktion. Das gleichzeitige Auftreten von reduzierten Blutdruck- und Kreatinin-Werten in Verbindung mit dem SNP c.1989T>C bestätigt den Einfluss des Blutdrucks auf die Entwicklung der diabetischen Nephropathie. Somit kann dem Polymorphismus ein protektiver Effekt auf die Progression vaskulärer Komplikationen bei Typ-1-Diabetikern zugeschrieben werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist noch ungeklärt, wie der synonyme Polymorphismus einen positiven Einfluss auf den Blutdruck und die Nierenfunktion ausübt. Vermutlich handelt es sich hier nicht um die verursachende Veränderung, sondern um einen Marker-SNP, der in der Nähe des Verursachers liegt und mit ihm zusammen vererbt wird. Um die Initiation und Progression mikrovaskulärer Komplikationen bei Wildtyp-Allel-Trägern zu verzögern, könnte dieser SNP als prognostischer Marker bei Typ-1-Diabetikern eingesetzt werden.

Die in der Initialstudie aufgefallenen Assoziationen zwischen den Blutdruck-Werten und den Veränderungen p.A115S (XT-I) und p.T801R (XT-II) konnten nicht gefestigt werden.

In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob der SNP c.1989T>C auch bei Nicht-Diabetikern mit einer Verringerung des Blutdrucks assoziiert ist und ob er als Risikomarker zur Früherkennung potentieller Hochdruck-Patienten eingesetzt werden kann. Weiterhin ist die Identifikation von mit diesem SNP assoziierten Veränderungen notwendig, um die Ursache der Blutdruckerhöhung zu verstehen und diesen gezielter zu therapieren.

6.3 XT-I-Aktivität und XYLT-Variationen bei Arthrosepatienten

Arthrose ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung. Ihre Entstehung ist ein multifaktorielles Geschehen, wobei eine genetische Beteiligung nachgewiesen werden konnte (Shin, 2001; Sulzbacher, 2004). Das zentrale Kennzeichen ist die Degeneration des Gelenkknorpels und der Verlust von Proteoglykanen. Da die XT-I, und möglicherweise auch die XT-II, essentiell für die Synthese der Knorpel-Proteoglykane sind, ist ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Arthrose und einem veränderten Xylosyltransferasen-Metabolismus denkbar.

Durch die vollständige Mutationsanalyse der codierenden Bereiche der XYLT-Gene von 49 Arthrosepatienten konnten im Rahmen dieser Arbeit 25 Sequenzvariationen identifiziert werden. Um zu beurteilen, ob diese mit dem Krankheitsbild der Arthrose assoziiert sind, wurden die ermittelten Frequenzen von 13 Exon- und zwei Intron-Alterationen in verschiedenen Untergruppen und mit denen einer Kontrollgruppe verglichen.

Die signifikant höhere Frequenz des SNPs c.1569C>T in Exon 8 des XYLT-II-Gens innerhalb der juvenilen Patienten und bei den Patienten mit einem frühen Krankheitseintritt ist ein Hinweis auf eine genetische Prädisposition für Arthrose. In welcher Art und Weise dieser synonyme Polymorphismus die frühzeitige Entwicklung von Arthrose begünstigt, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Eine mögliche Hypothese ist, dass der SNP nicht unmittelbar Ursache der Erkrankung ist, sondern als Marker-SNP fungiert. Dieser könnte im Rahmen von Kopplungsgruppen (Haplotypen) mit weiteren genetischen Variationen assoziiert sein. Diese Alterationen können in den bisher noch nicht untersuchten Promotor- oder Intronregionen lokalisiert sein. Weiterhin ist es denkbar, dass er mit Polymorphismen assoziiert ist, die Funktionen von Verstärkern, Suppressoren oder Transkriptions-Faktor-Bindungsstellen besitzen.

XT-I ist das initiale Enzym in der Biosynthese der Glykosaminoglykanketten in Chondroitinsulfat-Proteoglykanen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der löslichen XT-I-Form im Serum die Rate der Proteoglykan-Biosynthese widerspiegelt und als potentieller biochemischer Marker des Proteoglykan-Metabolismus geeignet ist (Götting *et al.*, 1999a; Götting *et al.*, 2000; Kuhn *et al.*, 2001). Die Messung der XT-I-Aktivität im Serum der Arthrosepatienten zeigt, dass die Werte der weiblichen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht sind. Diese Erhöhung ist nicht assoziiert mit dem

Auftreten einer der gefundenen XT-I- oder XT-II-Variationen. Darüber hinaus konnte eine steigende Serum-XT-I-Aktivität mit zunehmender Krankheitsdauer beobachtet werden. Dieser Befund kann ein Indikator für eine inkomplette, intrazelluläre Retention des Enzyms sein, die durch einen veränderten Metabolismus im Golgi-Apparat verursacht werden kann und in einer gesteigerten Proteolyse membrangebundener XT-I mit erhöhter Freisetzung resultiert. In der Literatur wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Proteolyse und die Freisetzung der katalytischen Domäne von Glykosyltransferasen als ein Mechanismus zur Herab-Regulation verstanden werden kann (Garbenhorst und Conrad, 1999). Als weitere Ursache für die erhöhte Aktivität kann auch eine gesteigerte Expression des Enzyms durch die Chondrozyten angenommen werden, um dadurch der Gelenkknorpel-Zerstörung entgegenzuwirken (Sulzbacher, 2000). Die erhöhte XT-I-Aktivität der Arthrosepatientinnen kann durch ihre durchschnittlich längere Krankheitsdauer erklärt werden. Zur Klärung der Korrelation zwischen XT-I-Aktivität und der Krankheitsdauer sind die Identifizierung und Charakterisierung der Promotorregion, der Spaltstelle und der intrazellulären Proteinase erforderlich. Nach der Analyse der physiologischen Zusammenhänge kann beurteilt werden, ob die XT-I-Aktivität ein geeigneter biochemischer Marker zur Stadieneinteilung und Verlaufskontrolle der Arthrose ist.

Im Rahmen dieser Studie konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass ein XYLT-II-Polymorphismus mit einer früheren Krankheitsmanifestation einhergeht. Weiterhin konnte die XT-I-Aktivität im Serum als potentieller biochemischer Marker identifiziert werden. Die statistische Aussagekraft der ermittelten Ergebnisse ist aufgrund der geringen Patientenzahl limitierend. Die Validierung der initialen Resultate sollte durch multizentrische Studien mit einem großen Patientenkollektiv bestätigt werden. In zukünftigen Projekten könnten Mutationsanalysen anderer Enzyme, die ebenfalls am Proteoglykan-Metabolismus der Chondrozyten beteiligt sind, einen weiteren Beitrag zur Identifizierung genetischer Risikofaktoren für die Entstehung von Arthrose liefern.

6.4 XYLT-Variationen bei PXE-Patienten

PXE ist eine seltene, vererbare Erkrankung des Bindegewebes, die durch Mutationen im ABCC6-Gen verursacht wird (Bergen *et al.*, 2000; Le Saux *et al.*, 2000; Ringpfeil *et al.*, 2000). Da der Schweregrad der Erkrankung sehr heterogen ist, wird vermutet, dass neben den krankheitsverursachenden Mutationen weitere Faktoren an der Pathogenese beteiligt sind (Lebwohl *et al.*, 1993). Bei PXE-Patienten wurden Störungen im Proteoglykan-Metabolismus beschrieben, die zu einer erhöhten Ansammlung von Proteoglykanen im extrazellulären Raum der betroffenen Gewebe und zu veränderten Proteoglykan-Anteilen im Urin führten (Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1981; Pasquali-Ronchetti *et al.*, 1986, Maccari *et al.*, 2003). Weiterhin konnte bei PXE-Patienten eine erhöhte XT-I-Aktivität im Serum nachgewiesen werden (Götting *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen kann ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des Krankheitsverlaufs und dem Vorliegen von genetischen Veränderungen in den XYLT-Genen in Betracht gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch DHPLC-gestützte Mutationsanalytik 22 genetische Veränderungen der XYLT-Gene im Bereich der Exons und der flankierenden Introns von 65 PXE-Patienten detektiert werden. Der Vergleich der Allelfrequenzen von 17 Variationen zwischen Patienten und der Kontrollgruppe gibt keinen Hinweis dafür, dass diese Alterationen mit der Entstehung von PXE assoziiert sind.

Die Analyse der Polymorphismen im Hinblick auf die Beeinflussung der Phänotypen deckte eine signifikant erhöhte XT-I-Aktivität im Serum der Patienten auf, welche die Aminosäure-Substitution Alanin 115 zu Serin in der XT-I tragen. Der Zusammenhang dieser Variation mit einer veränderten XT-I-Retention und den möglichen Folgen für den Proteoglykan-Metabolismus wurde bereits im Kapitel 6.2.2 diskutiert. Weiterhin sollte zukünftig untersucht werden, ob dieser Polymorphismus auch bei Blutspendern mit einer erhöhten Enzymaktivität korreliert oder ob diese Beobachtung spezifisch für Erkrankungen der extrazellulären Matrix ist.

Der Aminosäure-Austausch von Threonin 801 zu Arginin in der XT-II ist bei PXE-Patienten signifikant assoziiert mit einem höheren Auftreten von Hautveränderungen, einem früheren Diagnosealter und einer vermehrten Organbeteiligung. Darüber hinaus ist auch das Auftreten der Variationen c.166G>A und c.2402C>G im XYLT-II-Gen mit einem schwereren Krankheitsverlauf verknüpft. Um die Auswirkungen dieser drei über das gesamte Gen

(Exon 2; 8; 11) verteilten Polymorphismen zu beurteilen, muss zunächst die physiologische Funktion und der Bereich der katalytischen Domäne der XT-II aufgeklärt werden. Es ist anzunehmen, dass die beiden Variationen, die eine Veränderung der Proteine im Bereich der N- und C-terminalen Enden verursachen, nicht unmittelbar an der Katalyse beteiligt sind, sondern Einfluss auf die Konformation ausüben.

Der Einsatz dieser SNPs als prognostische Marker erscheint sinnvoll, da bei den betroffenen Patienten die Gefahr der Beteiligung mehrerer Organe bekannt wäre und somit darauf reagiert werden könnte. Derzeitig ist nur eine symptomatische Therapie von PXE möglich; aber durch die Vermeidung potentieller Risikofaktoren, wie z.B. Rauchen und fettreiche Kost kann ein Fortschreiten der Erkrankung und besonders der kardiovaskulären Schädigung verlangsamt werden (Neldner und Stuk, 2002). Weitere Studien belegen, dass eine kalziumarme Ernährung den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen kann (Renie *et al.*, 1984).

Mit diesen Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Aminosäure-Substitution mit einer erhöhten Serum-XT-Aktivität bei PXE-Patienten korreliert. Mit dem Nachweis der XYLT-II-Alterationen, die einen Einfluss auf den Schweregrad der PXE-Erkrankung ausüben, konnten potentielle genetischen Marker identifiziert werden. Ob diese zur Risikobewertung und -minimierung geeignet sind, sollte in nachfolgenden klinischen Studien untersucht werden.

6.5 Einfluss von Aminosäure-Substitutionen auf die XT-I-Aktivität

Um den Einfluss von fünf XT-I-Aminosäure-Substitutionen auf die enzymatische Aktivität zu analysieren, wurden die Mutanten generiert und in *High Five*-Zellen exprimiert. Ein vergleichbares Expressionsniveau der rekombinanten Enzyme konnte immunologisch im Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden. Im XT-I-Aktivitätstest wiesen die Mutanten p.P385L und p.I552S einen Aktivitätsverlust von 16 % bzw. 26 % auf. Weiterhin resultierten die Substitutionen in einer 2-fachen Erhöhung ihrer Michaelis-Menten-Konstanten.

Zur Beurteilung der Veränderungen, die eine reduzierte Aktivität verursachen, wurden die entsprechenden Positionen der humanen XT-I verglichen mit denen von *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Anopheles gambiae*, *Fugu rubripes*, *Drosophila melanogaster*, und *Caenorhabditis elegans* sowie der XT-II von *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*. An den korrespondierenden Positionen zu 385 kommen bei den untersuchten Spezies neben Prolin auch neutrale oder geladene Aminosäuren vor. Der Austausch zum hydrophoben, aliphatischen Leucin resultiert in einer Verminderung der Polarität. Der Vergleich der Aminosäuren an Position 552 (p.I552S) innerhalb der genannten Spezies zeigt, dass hier eine hydrophobe, aliphatische Aminosäure konserviert ist. Die Substitution zu Serin geht mit einer Erhöhung der Polarität und Zunahme der Reaktivität einher. Die durch den Aminosäure-Austausch deutlich veränderten Polaritäten können die Tertiärstruktur beeinflussen und in einer reduzierten Substratbindung resultieren. Da beide Mutanten eine relativ hohe Restaktivität aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Aminosäuren zwar aufgrund von Konformations-Änderungen Einfluss auf die Effizienz der Katalyse nehmen, aber nicht unmittelbar an der Katalyse beteiligt sind.

Die mit einer Aktivitätsminderung einhergehenden Aminosäure-Substitutionen wurden in unseren Kohorten nur in heterozygoter Form gefunden. Die XT-Aktivitäten der betroffenen Probanden liegen im Normbereich (Arthrosepatientin, p.P385L: 1,0 mU/L; Kontrollperson, p.I552S; 0,91 mU/L). Dieser Befund weist darauf hin, dass die nachgewiesenen Aktivitätsminderungen der homozygoten Mutationen *in vitro* unter physiologischen Bedingungen in heterozygoter Form kompensiert werden können. Es ist möglich, dass *in vivo* homozygote Mutationen nicht kompensiert werden können und aufgrund der reduzierten XT-I-Aktivität zu schwerwiegenden Veränderungen im Proteoglykan-Metabolismus führen. Das wäre ein Grund, warum die Mutationen ausschließlich in heterozygoter Form detektiert wurden.

6.6 Expression der vollständigen GFP-markierten XT-I

Sequenz- und Hydrophobizitäts-Analysen der humanen Xylosyltransferasen sagen vorher, dass es sich, wie bei den meisten eukaryontischen Glykosyltransferasen, um Typ-II-Transmembranproteine handelt. Sie sind aufgebaut aus einem kurzen N-terminalen, cytoplasmatischen Teil, einer einzelnen Transmembrandomäne, der Stammregion variabler Länge und einer großen C-terminalen, globulären, katalytischen Domäne (Colley, 1997; Götting *et al.*, 2000). Die löslichen Formen einiger Glykosyltransferasen gehen aus den membrangebundenen Enzymen durch proteolytische Spaltung zwischen der katalytischen Domäne und der Transmembranregion hervor (Weinstein *et al.*, 1987). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die XT-I zusammen mit Proteoglykanen in den extrazellulären Raum sezerniert wird (Götting *et al.*, 1999b).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein Konstrukt aus GFP und der vollständigen cDNA der humanen XT-I hergestellt und rekombinant in Säugerzellen exprimiert werden. Die Transfektion mit dem Plasmid resultierte in einer 44 - 68-fach erhöhten XT-I-Aktivität im Medium, verglichen mit den Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Der Nachweis aktiver XT-I im Zellkultur-Überstand transfizierter Zellen bestätigt, dass die rekombinante, GFP-markierte XT-I in aktiver, korrekt gefalteter Form vorliegt und somit intrazellulär proteolytisch gespalten und in den extrazellulären Raum sezerniert wurde, unabhängig von der eingesetzten Zelllinie. Bisher lag lediglich ein Expressionssystem für die verkürzte, lösliche Form der XT-I in Insektenzellen vor. Diesem Protein fehlen die ersten 148 Aminosäuren, welche die cytoplasmatische und die transmembrane Region sowie Anteile der Stammregion enthalten (Kuhn *et al.*, 2003; Götting *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2005). Durch die Klonierung der vollständigen, GFP-markierten XT-I wurde die Grundlage für weiterführende Studien geschaffen. Die Bestimmung ihres intrazellulären Kompartiments, die Lokalisation der löslichen Form in der ECM und die Identifikation der Proteinase-Spaltstelle werden ermöglicht. Dieses XT-I-Fusionsprotein kann weiterhin dazu genutzt werden, mittels gerichteter Mutagenese die Aminosäure-Substitution p.A115S in Exon 1 zu generieren. Durch die Bestimmung der Enzym-Aktivität in Abhängigkeit von der sekretierten Enzymmenge kann untersucht werden, ob der Aminosäure-Austausch mit einer erhöhten Sekretion einhergeht. Damit kann die beobachtete erhöhte Serum-XT-I-Aktivität bei PXE-Patienten mit diesem Austausch näher charakterisiert und die Assoziation mit der Entstehung der diabetischen Nephropathie bei Typ-1-Diabetikern analysiert werden.

6.7 Lokalisation der humanen Xylosyltransferasen

Das intrazelluläre Kompartiment, an dem die Proteoglykan-Biosynthese durch die XT-I-katalysierte Xylosylierung initiiert wird, konnte bisher nicht genau ermittelt werden. Die Ergebnisse früherer Studien, die mittels proteinbiochemischer Methoden erhalten wurden, schlugen sowohl das endoplasmatische Retikulum (Kearns *et al.*, 1991; Vertel *et al.*, 1993) als auch den Golgi-Apparat vor (Nuwayhid *et al.*, 1986; Lohmander *et al.*, 1989).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig molekulargenetische Methoden eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisation der XT-I mit einer GFP-markierten Form nachzuweisen. Das charakteristische perinukleäre Färbemuster der GFP-markierten XT-I, die exakte Co-Lokalisierung mit dem Golgi-Marker und die Sensitivität gegenüber BFA sind beweisend für die Golgi-Lokalisation der humanen XT-I.

Informationen über die Mechanismen, die Glykosyltransferasen in ihre intrazellulären Kompartimente leiten, sind wichtig für das Verständnis der Regulation der Proteoglykan-Biosynthese. Bei den bisher untersuchten Enzymen konnte kein einheitliches Sequenzmotiv für die Lokalisation nachgewiesen werden. Durch die Transfektion von Säugerzellen mit C-terminal verkürzten und deletierten XT-I- und XT-II-GFP-Varianten wurden die zur Lokalisation der Xylosyltransferasen erforderlichen Zielsequenzen bestimmt. Dazu wurde die Lokalisation nach Inhibitorbehandlung und anschließender Immunfärbung mikroskopisch beurteilt.

Die XT-I-Variante, welche die cytoplasmatische Domäne, die Transmembranregion und 179 Aminosäuren der Stammregion enthält, zeigt als einzige der untersuchten XT-I-Varianten vollständige Golgi-Retention. Die isolierte Stammregion der XT-I, die durch gezielte Deletion der cytoplasmatischen Domäne und der Transmembranregion hergestellt wurde, verhält sich wie ein lösliches cytoplasmatisches Protein. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass die Stammregion allein nicht ausreicht, um die XT-I im Golgi-Apparat zu fixieren. Die Verkürzung der Stammregion in der CTS-Variante von 179 auf 123 Aminosäuren resultiert in einer beeinträchtigten Golgi-Retention. Die Tatsache, dass nur noch einige der mutierten Proteine Golgi-ständig sind, betont die Wichtigkeit der Stammregion für die Zielsteuerung. Die weitere Verkürzung der Stammregion auf weniger als 69 Aminosäuren führt ebenso wie die Expression der nur die CT-Domänen enthaltenden Varianten zu einer irregulären Verteilung der GFP-Fluoreszenz über die gesamte Zelle mit der Aussparung des

Kernbereiches. Dieses Muster unterscheidet sich deutlich von der einheitlichen Fluoreszenz über die gesamte Zelle, die aus der Expression der isolierten Stammregion und der cytoplasmatischen Domäne hervorgeht. Dieses Verhalten weist darauf hin, dass die Transmembrandomäne keine Hauptrolle bei der Zielsteuerung spielt, sondern allgemein die Proteine zu intrazellulären Membransystemen steuert. Diese Ergebnisse bestätigen weiterhin, dass es sich bei der XT-I um ein Transmembranprotein handelt und dass die Vorhersage für die Sequenzen der Transmembranregion mittels Hydrophobizitäts-Analysen korrekt sind.

Zum Vergleich der beiden Xylosyltransferasen wurden zusätzlich fünf N-terminale XT-II-Varianten untersucht. Im Gegensatz zur XT-I reichen bei der XT-II die cytoplasmatische Domäne, die Transmembranregion und 13 Aminosäuren der Stammregion aus, um eine vollständige Golgi-Retention zu erzielen.

Die Ergebnisse der *in vitro* Zielsteuerungs-Experimente beweisen, dass sowohl die Transmembrandomäne als auch Anteile der Stammregion der XT-I und der XT-II notwendig sind, um das normalerweise cytoplasmatische Reporterprotein GFP zum Golgi-Kompartiment zu dirigieren. Interessanterweise unterscheiden sich die dazu erforderlichen Längen der Stammregion der beiden Xylosyltransferasen deutlich voneinander. Die XT-II braucht nur die 13 Aminosäuren der Stammregion, die von Exon 1 codiert werden. Im Gegensatz dazu benötigt die XT-I 179 Aminosäuren der Stammregion, die von den Exons 1, 2 und einem Teil von 3 codiert werden.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass beide Xylosyltransferasen nicht dem *bilayer thickness* Modell folgen, bei dem ausschließlich über die Länge der Transmembranregion die Golgi-Retention vermittelt wird. Inwieweit die ermittelten Daten mit der *kin recognition* Theorie in Übereinstimmung gebracht werden können, sollte in weiterführenden Studien zur Oligomerisierung aufgeklärt werden. Die Untersuchungen einiger Glykosyltransferasen haben ergeben, dass die Oligomerisierung der Stammregion für die Golgi-Retention verantwortlich ist (Sasai *et al.*, 2001). Andererseits wird aber auch eine Golgi-Retention nach der Zerstörung der Protein-Protein-Interaktionen beobachtet (Nilsson *et al.*, 1996; de Graffenried und Bertozzi, 2004). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann nur vermutet werden, dass eine Verkürzung der XT-I-Stammregion zu einer verminderten Aggregat-Bildung führt und damit zu einer unvollständigen Golgi-Retention. Die Aufgabe der Transmembrandomäne scheint die eines generellen Transmembranankers zu sein, ohne spezielle Zielsteuerung für ein

intrazelluläres Kompartiment. Der Vergleich der beiden für die Retention der Enzyme verantwortlichen Sequenzen weisen keine Übereinstimmungen auf. Diese Beobachtung stimmt damit überein, dass keine konservierten Sequenzmotive zur Zielsteuerung der Glykosyltransferasen bekannt sind (Gleeson, 1998).

Die N-terminalen 214 Aminosäuren, die für die Lokalisation der XT-I verantwortlich sind, sind nicht notwendig für die katalytische Funktion, wie mit Hilfe rekombinanter, N-terminaler Deletionsmutanten (Δ 1 - 266) gezeigt werden konnte (Müller *et al.*, 2005). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für andere Glykosyltransferasen erhalten (Sasai *et al.*, 2001). Ob diese Resultate auch für die XT-II zutreffen, muss nach der Aufklärung ihrer enzymatischen Funktion untersucht werden.

6.8 Untersuchungen zum Nachweis der Proteinase-Spaltstelle der XT-I

Zur Identifikation der intrazellulären Proteinase-Spaltstelle der humanen XT-I wurde das Medium von Säugerzellen eingesetzt, die mit den verschiedenen XT-I-Konstrukten transfiziert wurden. Das GFP konnte im Zellkultur-Überstand weder anhand seiner Fluoreszenz noch mittels spezifischer Antikörper im *Dot*-Blot nachgewiesen. Es bleibt unklar, aus welchem Grund das GFP außerhalb der Zellen trotz quantifizierter XT-I-Aktivität nicht zu detektieren ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das GFP nicht aus der Zelle transportiert wird, oder dass es beim Transport in seiner Struktur so verändert wird, dass es keine Fluoreszenz mehr aufweist und auch nicht mehr vom spezifischen Antikörper erkannt wird.

In zukünftigen Studien zur Analyse der Proteinase-Spaltstelle sollte ausgehend von dem im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Expressionsvektor für die vollständige, aktive, GFP-markierte XT-I ausgegangen werden. Durch das gezielte Deletieren konservierter Bereiche innerhalb der Stammregion und die nachfolgende Messung der XT-I-Aktivität im Zellkultur-Überstand sollten Aufschluss über die Lage der Spaltstelle geben. Alternativ wäre auch die Sequenzanalyse der aufgereinigten GFP-gekoppelten XT-I denkbar.

6.9 Ausblick

Bei dem XYLT-I-Gen handelt es sich um einen evolutionär hochkonservierten DNA-Abschnitt. Krankheiten, die auf einer Mutation im XYLT-I-Gen beruhen, sind bisher nicht bekannt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass ein Funktionsverlust der XT-I, beruhend auf einer homozygoten Mutation im XYLT-Gen, generell letal ist (Wilson, 2004). Die Auswirkungen einer defekten XT-I können bislang nicht charakterisiert werden, da noch kein *knockout*-Säugetier existiert. Die Entwicklung einer *XT-I-knockout*-Maus könnte wichtige Hinweise auf die genaue Funktion der XT-I *in vivo* liefern und somit Aufschluss über potentiell assoziierte Erkrankungen geben.

Da alternativ eine Kompensation eines XT-I-Defektes durch die XT-II denkbar ist, ist die Aufklärung der physiologischen Funktion der XT-II von bedeutendem Forschungsinteresse. Die vollständige Klonierung, die rekombinante Expression und *in vitro*-Studien zur Funktion stehen derzeit im Vordergrund.

Die erstmals im Rahmen dieser Arbeit detektierten genetischen Veränderungen, die durch signifikante Assoziationen aufgefallen sind, sollten durch weitere Studien ergänzt werden und auf ihre klinische Tauglichkeit getestet werden.

Weiterhin von großem Interesse ist das Expressionsmuster der Xylosyltransferasen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten sowie ihr Zusammenwirken mit anderen Enzymen, die an der Homöostase der ECM beteiligt sind.

Nach der Identifizierung der Promotoren der XT-I und der XT-II ist eine Mutationsanalyse mittels DHPLC empfehlenswert, da sie sich als kostengünstige Methode zur Detektion genetischer Variationen bewährt hat.

Durch die erstmalige vollständige Klonierung der humanen XT-I ist die Grundlage für die Charakterisierung der intrazellulären Proteinase-Spaltstelle und der Analyse des SNPs p.A115S gelegt worden. Diese Untersuchungen und die Identifikation der erforderlichen Proteinase ist von großem Interesse, um Zusammenhänge zwischen Krankheiten mit veränderten Serum-XT-I-Aktivitäten besser zu verstehen und evtl. auch gezielter zu therapieren.

7 Abkürzungen

7.1 Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	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

7.2 Abkürzungen für Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin

7.3 Sonstige Abkürzungen

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration

c.	cDNA-Sequenz
C	Cytoplasmatisch-
CBM	kapilläre Basalmembran (<i>capillary basement membrane</i>)
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CI	Konfidez Intervall (<i>confidence interval</i>)
CMV	Cytomegalievirus
d	diastolisch
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
del	Deletion
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHPLC	denaturierende Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DR	diabetische Retinopathie
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GBM	glomeruläre Basalmembran (<i>glomerular basement membrane</i>)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescence protein</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
hm	homozygot
HRP	<i>horse-raddish peroxidase</i>

ht	heterozygot
Ig	Immunglobulin
ins	Insertion
IP-RP-HPLC	Ionenpaar-Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
k	Kilo
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Meter
m	Milli
M	mol/Liter
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl
min	Minute
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
μ	Mikro
n	Nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
p.	Proteinsequenz
p.A.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RR	Blutdruck
RT	Raumtemperatur
s	systolisch

S	Stamm-
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
T	Transmembran-
T	Temperatur
T4	Bakteriophage T4
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEAA	Triethylammoniumacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
U	<i>Unit</i> (Enzymmenge, die 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ Substrat umsetzt)
U	Umdrehungen
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vs.	<i>versus</i>
wt	wildtyp
XT	Xylosyltransferase (Enzym)
Xyl	Xylose
XYLT	Xylosyltransferase (Gen)

8 Literatur

- Aigner, T., McKenna, L. (2002) Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 5-18.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2004) Zellverbindungen, Zell/Zell-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage, Weinheim: Wiley-VCH, 1265-1286.
- Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T., Clausen, H. (1999) Identification and characterization of large galactosyltransferase gene families: galactosyltransferases for all functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 35-53.
- Andersen, A.R., Christiansen, J.S., Andersen, J.K., Kreiner, S., Deckert, T. (1983) Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* **25**, 496-501.
- Anderson, S., Brenner, B.M. (1988) Influence of antihypertensive therapy on development and progression of diabetic glomerulopathy. *Diabetes Care* **11**, 846-849.
- Bayliss, M.T., Davidson, C., Woodhouse, S.M., Osborne, D.J. (1995) Chondroitine sulphate in human joint varies with age, zone and topography. *Acta Orthop. Scand.* (Suppl.) **266**, 22-25.
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G.D. (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6; ABCC6). *Cancer Res.* **62**, 6172-6177.
- Bergen, A.A., Plomp, A.S., Schuurman, E.J., Terry, S., Breuning, M., Dauwerse, H., Swart, J., Kool, M., van Soest, S., Baas, F., ten Brink, J.B., de Jong, P.T.V.M. (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 228-231.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 729-777.
- Biernboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513.
- Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B., Ruoslahti, E. (1987) Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3194-3198.

- Breton, C., Bettler, E., Joziasse, D.H., Geremia, R.A., Imperty, A. (1998) JB review: sequence-function relationship of prokaryotic and eukaryotic Galactosyltransferases. *J. Biochem.* **123**, 1000-1009.
- Breton, C., Mucha, J., Jeanneau, C. (2001) Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie* **83**, 713-718.
- Brinkmann, T., Weilke, C., Kleesiek, K. (1997) Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein β -D-Xylosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **17**, 11171-11175.
- Campbell, P., Jacobsen, I., Benzing-Purdie, L., Roden, L., Fessler, J.H. (1984) Silk – a new substrate for UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Anal. Biochem.* **137**, 505-516.
- Caramori, M.L.A., Mauer, M. (2003) Pathophysiology of renal complications. In: Porte, D., Sherwin, R.S., Baron A. Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus, 6. edition, The McGraw-Hill Companies, 697-721.
- Caterson, B., Mahmoodian, F., Sorrell, J.M., Hardingham, T.E., Bayliss, M.T., Carney, S.L., Ratcliffe, A., Muir, H. Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. (1990) *J. Cell Sci.* **97**, 411-417.
- Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9677-9686.
- Colley, K.J. (1997) Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers. *Glycobiology* **7**, 1-13.
- Deckert, T., Feldt-Rasmussen, B., Borch-Johnsen, K., Jensen, T., Kofoed-Enevoldsen, A. (1989) Albuminuria reflects widespread vascular damage; The Steno hypothesis. *Diabetologia* **32**, 219-226.
- de Graffenried, C.L., Bertozzi, C.R. (2004) The stem region of the sulfotransferase GlcNAc6ST-1 is a determinant of substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **279**, 40035-40043.
- den Dunnen, J.T., Antonarakis, S.E. (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.* **109**, 121-124.
- Driouich, A., Zhang, G.F., Staehelin, L.A. (1993) Effect of Brefeldin A on the structure of the Golgi Apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cell. *Plant Physiol.* **101**, 1363-1373.

- Fisher, L. W., Termine, J.D., Young, M.F. (1989) 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.* **264**, 4571-4576.
- Gastinel, L.N., Cambillau, C., Bourne, Y. (1999) Crystal structures of the bovine β 4 galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J.* **18**, 3546-3557.
- Geiger, L. V. (1997) Arthrose des Kniegelenkes. In: Geiger, L. V. Überlastungsschäden im Sport. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München, 131.
- Gerber, A.C., Kozdrowski, I., Wyss, S.R., Berger, E.G. (1979) The charge heterogeneity of soluble human galactosyltransferases isolated from milk, amniotic fluid and malignant ascites. *Eur. J. Biochem.* **93**, 453-460.
- Ghosh, P., Cheras, P.A. (2001) Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **15**, 693-709.
- Gleeson, P.A. (1998) Targeting of proteins to the Golgi apparatus. *Histochem. Cell. Biol.* **109**, 517-532.
- Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (1998) Xylosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase. *J. Protein Chem.* **17**, 295-302.
- Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (1999a) Serum Xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 919-924.
- Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, K., Kleesiek, K. (1999b) Elevated serum Xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm. Venereol.* **80**, 60-61.
- Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2000) Molecular cloning and expression of human UDP-D-Xylose: Proteoglycan core protein β -D-Xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J. Mol. Biol.* **304**, 517-528.
- Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2004) Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 42566-42573.
- Götting, C., Schulz, V., Hendig, D., Grundt, A., Dreier, J., Szliska, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2004) Assessment of rapid-cycle PCR assay for the identification of the recurrent c.3421C>T mutation in the ABCC6 gene in pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab. Invest.* **84**, 122-130.

- Götting, C., Hendig, D., Adam, A., Schön, S., Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005) Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J. Mol. Med.* (im Druck, DOI: 10.1007/s00109-005-0693-x).
- Grabenhorst, E., Conradt, H.S. (1999) The cytoplasmatic, transmembrane, and stem regions of glycosyltransferases specify their in vivo functional sublocalization and stability in the Golgi. *J. Biol. Chem.* **274**, 36107-36116.
- Greiling, H., Gressner, A.M., Haubeck, H.D., Keller, R., Kleesiek, K. (1995) Bindegewebe. In: Greiling, H., Gressner, A. M. (Hrsg.) Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer, Stuttgart, New York, 1090-1131.
- Gültekin, H., Heermann, K.H. (1988) The use of polyvinylidendifluorid membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329.
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., Cole, G.J. (1998) Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **273**, 25404-25412.
- Hardingham, T.E., Bayliss, M.T. (1990) Proteoglycans of articular cartilage changes in aging and joint disease. *Semin. Arth. Rheum. Suppl.* **1**, 12-33.
- Hardingham, T., Fosang, A.J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* **6**, 861-870.
- Hascall, V.C. (1977) Interaction of cartilage proteoglycans with hyaluronic acid. *J. Supramol. Struct.* **7**, 101-120.
- Heinegard, D., Bayliss, M., Lorenzo, P. (1998) Biochemistry and metabolism of normal and arthritic cartilage. in: Brand K, Doherty M, Lohmander LS (eds.), Osteoarthritis, Oxford University Press, Oxford, UK, 74-84.
- Hendig, D., Schulz, V., Eichgrün, J., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) New ABCC6 gene mutations in German pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. *J. Mol. Med.* **83**, 140-147.
- Hidayat, A.A., Fine, B.S. (1985) Diabetic choroidopathy: light and electron microscopic observations of seven cases. *Ophthalmology* **92**, 512-522.
- Howell, D.S. (1986) Pathogenesis of osteoarthritis. *Am. J. Med.* **80**, 24-28.
- Ilias, A., Urban, Z., Seidl, T.L., Le Saux, O., Sinko, E., Boyd, C.D., Sarkadi, B., Varadi, A. (2002) Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J. Biol. Chem.* **277**, 16860-16867.

- Iozzo, R. (1998) Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609-652.
- Itano, N., Kimata, K. (1996) Expression, cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* **271**, 9875-9878.
- Johnson, P.C., Brendel, K., Meezan, E. (1981) Human diabetic perineurial cell basement membrane thickening. *Lab. Invest.* **44**, 265-270.
- Joziassse, D.H. (1992) Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure. *Glycobiology* **2**, 271-277.
- Kannel, W.B., McGee, D.L. (1979) Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease. The Framingham study. *Diabetes Care* **2**, 120-126.
- Kanwar, Y.S., Linker, A., Farquhar, M.G. (1980) Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell Biol.* **86**, 688-693.
- Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., Schwartz, N.B. (1991) Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: A kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase. *Biochemistry* **30**, 7477-7483.
- Kerr, L.D. (2003) Inflammatory arthritis in the elderly. *Mt. Sinai J. Med.* **70**, 23-26.
- Kitazume-Kawaguchi, S., Dohmae, N., Takio, K., Tsuji, S., Colley, K.J. (1999) The relationship between ST6Gal I Golgi retention and its cleavage-secretion. *Glycobiology* **9**, 1397-1406.
- Kjellén, L., Lindahl, U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
- Klewes, L., Turley, E.A., Prehm, P. (1993) The hyaluronate synthase from a eukaryotic cell line. *Biochem. J.* **290**, 791-795.
- Knudson, C.B., Knudson, W. (2001) Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **12**, 69-78.
- Krolewski, A.S., Warram, J.H., Christlieb, A.R., Busick, E.J., Kahn, C.R. (1985) The changing natural-history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am. J. Med.* **78**, 785-794.
- Krolewski, A.S. (1999) Genetics of diabetic nephropathy: evidence for major and minor gene effects. *Kidney Int.* **55**, 1582-1596.

- Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2001) Isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein β -D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 4940-4947.
- Kuhn, J., Müller, S., Schnölzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in *High Five* insect cells as biochemically active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 537-544.
- Kuhn, J., Schnölzer, M., Schön, S., Müller, S., Prante, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Xylosyltransferase I acceptor properties of fibroblast growth factor and its fragment bFGF (1-24). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 156-166.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *Biochem. Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lebwohl, M., Schwartz, E., Lemlich, G., Lovelace, O., Shaikh-Bahai, F., Fleischmajer, R. (1993) Abnormalities of connective tissue components in lesional and nonlesional tissue of patients with pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 121-126.
- Lebwohl, M., Halperin, J., Phelps, R.G. (1993) Brief report: occult pseudoxanthoma elasticum in patients with premature cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1237-1239.
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., Bercovitch, L., de Paepe, A., Boyd, C.D. (2000) Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 223-227.
- Lim, L.P., Burge, C.B. (2001) A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11193-11198.
- Liu, X., Noble, P.C., Luo, Z.P. (2004) Direct measurement of compressive properties of single proteoglycan aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 313-316.
- Lohmander, L.S., Shinomura, T., Hascall, V.C., Kimura, J.H. (1989) Xylosyl transfer to the core protein precursor of the rat chondrosarcoma proteoglycan. *J. Biol. Chem.* **264**, 18775-18780.

- Longas, M.O., Wisch, P., Lebwohl, M.G., Fleischmajer, R. (1986) Glycosaminoglycans of skin and urine in pseudoxanthoma elasticum: evidence for chondroitin 6-sulfate alteration. *Clin. Chim. Acta* **155**, 227-236.
- Maccari, F., Gheduzzi, D., Volpi, N. (2003) Anomalous structure of urinary glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Chem.* **49**, 380-388.
- MacGregor, A.J., Spector, T.D. (1999) Twins and the genetic architecture of osteoarthritis. *Rheumatology* **38**, 583-588.
- Malemud, C.J. (1999) Fundamental pathways in osteoarthritis: an overview. *Front. Biosci.* **4**, 659-661.
- Matyas, J.R., Atley, L., Ionescu, M., Eyre, D.R., Poole, A.R. (2004) Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **50**, 543-552.
- Miksch, S., Lumsden, A., Guenther, U.P., Foernzler, D., Christen-Zach, S., Daugherty, C., Ramesar, R.K., Lebwohl, M., Hohl, D., Neldner, K.H., Lindpaintner, K., Richards, R.I., Struk, B. (2005) Molecular genetics of pseudoxanthoma elasticum: type and frequency of mutations in ABCC6. *Hum. Mutat.* **5**, 235-248.
- Milland, J., Russell, S.M., Dodson, H.C., McKenzie, I.F.C. and Sandrin, M.S. (2002) The cytoplasmic tail of α 1,3-Galactosyltransferase inhibits Golgi localization of the full-length enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 10374-10378.
- Mita, K., Ichimura, S., James, T.C. (1994) Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* **38**, 583-592.
- Mow, V.C., Ratcliffe, A., Poole, A.R. (1992) Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**, 69-97.
- Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymatic activity. *Biochem. J.* **386**, 227-236.
- Müller, S., Disse, J., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme. *Biochem. J.* (im Druck, DOI: 10.1042/BJ20051606).
- Muir, H. (1983) Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 613-622.

- Munro, S. (1998) Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* **8**, 11-15.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **51**, 263.
- Nagai, N., Habuchi, H., Esko, J.D., Kimata, K. (2004) Stem domains of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase are required for Golgi localization, oligomer formation and enzyme activity. *J. Cell Sci.* **117**, 3331-3341.
- Neldner, K.H. (1988) Pseudoxanthoma elasticum. *Int. J. Dermatol.* **27**, 98-100.
- Neldner, K.H., Struk, B. (2002) Pseudoxanthoma elasticum. In: Royce, P., Steinmann, B. (eds.) *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*. 2nd ed. Wiley-Liss Inc., New York, USA, 561-583.
- Nilsson, T., Hoe, M.H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzele, G., Berger, E.G., Warren, G. (1994) Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J.* **13**, 562-574.
- Nilsson, T., Rabouille, C., Hui, N., Watson, R., Warren, G. (1996) The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells. *J. Cell Sci.* **109**, 1975-1989.
- Nuwayhid, N., Glaser, J.H., Johnson, J.C., Conrad, H.E., Hauser, S.C., Hirschberg, C.B. (1986) Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **261**, 12936-12941.
- Parving, H.H., Viberti, G.C., Keen, H., Christensen, J.S., Lassen, N.A. (1983) Hemodynamic factors in the genesis of diabetic microangiopathy. *Metabolism* **32**, 943-949.
- Parving, H.H., Anderson, A.R., Smidt, U.M., Hommel, E., Mathiesen, E.R., Svendsen, P.A. (1987) Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy. *Br. Med. J.* **294**, 1443-452.
- Parving, H.H., Hommel, E. (1989) Prognosis in diabetic nephropathy. *Br. Med. J.* **299**, 230-233.
- Pasquali-Ronchetti, I., Volpin, D., Baccarani-Contrì, M., Castellani, I., Peserico, A. (1981) Pseudoxanthoma elasticum. Biochemical and ultrastructural studies. *Dermatologica* **163**, 307-325.
- Pasquali-Ronchetti, I., Baccarani-Contrì, M., Pincelli, C., Bertazzoni, G.M. (1986) Effect of selective enzymatic digestions on skin biopsies from pseudoxanthoma elasticum: an ultrastructural study. *Arch. Dermatol. Res.* **278**, 386-392.

- Passi, A., Albertini, R., Baccarani-Contri, M., de Luca, G., de Paepe, A., Pallavicini, G., Pasquali-Ronchetti, I., Tiozzo, R. (1996) Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum. *Cell Biochem. Funct.* **14**, 111-120.
- Paulson, J. C., Colley, K. J. (1989) Glykosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* **264**, 17615-17618.
- Pickup, J.C., Williams, G. (1994) Aetiology and pathogenesis of diabetic nephropathy: clues from early functional abnormalities. In: Pickup, J.C. and Williams, G. (eds.), *Chronic complications of diabetes*. Blackwell Science, 146-171.
- Prydz, K., Dalen, T. (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *J. Cell Sci.* **113**, 193-205.
- Raats, C.J., Bakker, M.A., Hoch, W., Tamboer, W.P., Groffen, A.J., van den Heuvel, L.P., Berden, J.H., van den Born, J. (1998) Differential expression of agrin in renal basement membranes as revealed by domain-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **273**, 17832-17838.
- Raats, C.J., van den Born, J., Berden, J.H. (2000) Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* **57**, 385-400.
- Ramakrishnan, B., Qasba, P.K. (2001) Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the β 1,4-galactosyltransferase-1. *J. Mol. Biol.* **310**, 205-218.
- Rayman, G., Malik, R.A., Sharma, A.K., Day, J.L. (1995) Microvascular response to tissue injury and capillary ultrastructure in the foot skin of type 1 diabetic patients. *Clin. Sci.* **89**, 467-474.
- Reginato, A.M., Olsen, B.R. (2002) The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* **4**, 337-345.
- Renie, W.A., Pyeritz, R.E., Combs, J., Fine, S.L. (1984) Pseudoxanthoma elasticum: high calcium intake in early life correlates with severity. *Am. J. Med. Genet.* **19**, 235-244.
- Ringpfeil, F., Lebwohl, M.G., Christiano, A.M., Uitto, J. (2000) Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6001-6006.
- Sakuraoka, K., Tajima, S., Nishikawa, T., Seyama, Y. (1994) Biochemical analyses of macromolecular matrix components in patients with pseudoxanthoma elasticum. *J. Dermatol.* **21**, 98-101.

- Sanger, F., Nickler, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sasai, K., Ikeda, Y., Tsuda, T., Ihara, H., Korekane, H., Shiota, K., Taniguchi, N. (2001) The critical role of the stem region as a functional domain responsible for the oligomerization and Golgi localization of N-acetylglucosaminyltransferase V. The involvement of a domain homophilic interaction. *J. Biol. Chem.* **276**, 759-765.
- Schulz, V., Hendig, D., Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Novel mutations in the ABCC6 gene of German patients with Pseudoxanthoma elasticum. *Hum. Biol.* **77**, 367-384.
- Schwartz, N.B. (1977) Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of β -xylosidases of synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *J. Biol. Chem.* **252**, 6316-6321.
- Sharma, L. (2001) Epidemiology of osteoarthritis. In: Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Altman, M.D. (eds.), *Osteoarthritis; Diagnosis and Medical/Surgical Management*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders Company 3-27.
- Sherer, D.W., Sapadin, A., Lebwohl, M.G. (1999) Pseudoxanthoma elasticum: an update. *Dermatology* **199**, 3-7.
- Shin, H.D. (2001) Host genetic epidemiology by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *Exp. Mol. Med.* **33**, 51-69.
- Silbert, J.E., Sugumaran, G. (1995) Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 371-384.
- Silver, F.H., Bradica, G., Tria, A. (2001) Relationship among biomechanical, biochemical, and cellular changes associated with osteoarthritis. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **29**, 373-391.
- Slater, R.R., Bayliss, M.T., Lachiewicz, P.P., Visco, D.M., Caterson, B. (1995) Monoclonal antibodies that detect biochemical markers of arthritis in humans. *Arthritis Rheum.* **38**, 655-659.
- Stoolmiller, A.C., Horwitz, A.L., Dorfman, A. (1972) Biosynthesis of the chondroitin sulphate proteoglycan. Purification and properties of xylosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **247**, 3525-3532.
- Strödter, D. (2002) Antihypertensiva und Nephropathie (Retinopathie, Neuropathie). In: Strödter, D. (eds.), *Diabetes mellitus, eine kardiovaskuläre Erkrankung*. Uni-Med Bremen, 100-125.

- Struk, B., Cai, L., Zach, S., Ji, W., Chung, J., Lumsden, A., Stumm, M., Huber, M., Schaen, L., Kim, C.A., Goldsmith, L.A., Viljoen, D., Figuera, L.E., Fuchs, W., Munier, F., Ramesar, R., Hohl, D., Richards, R., Neldner, K.H., Lindpaintner, K. (2000) Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABC-C6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J. Mol. Med.* **78**, 282-286.
- Sulzbacher, I. (2000) Arthrose – Histologie und pathogenetische Ansätze. *Radiologe* **40**, 1126-1133.
- Tamsma, J.T., van den Born, J., Bruijn, J.A., Assmann, K.J., Weening, J.J., Berden, J.H., Wieslander, J., Schrama, E., Hermans, J., Verkamp, J.H., Lemkes, H.H.P.J., van der Woude, F.J. (1994) Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in glomerular basement membrane. *Diabetologia* **37**, 313-320.
- Teuscher, A., Schnell, H., Wilson, P.W.F. (1988) Incidence of diabetic retinopathy and relationship to baseline plasma glucose and blood pressure. *Diabetes Care* **11**, 246-251.
- Tiozzo-Costa, R., Baccarani-Contri, M., Cingi, M.R. Pasquali-Ronchetti, I., Salvini, R., Rindi, S., de Luca, G. (1988) Pseudoxanthoma elasticum (PXE): ultrastructural and biochemical study on proteoglycan and proteoglycan-associated material produced by skin fibroblasts in vitro. *Cell. Relat. Res.* **8**, 49-64.
- Uitto, J., Boyd, C.D., Lebwohl, M.G., Moshell, A.N., Rosenbloom, J., Terry, S. (1998) International Centennial Meeting on pseudoxanthoma elasticum: progress in PXE research. *J. Invest. Dermatol.* **110**, 840-842.
- Unligil, U.M., Rini, J.M. (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 510-517.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 615-619.
- van den Born, J., van den Heuvel, L.P., Bakker, M.A., Veerkamp, J.H., Assmann, K.J., Berden, J.H. (1992) A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. *Kidney Int.* **41**, 115-123.
- Vertel, B.M., Walters, L.M., Flay, N., Kearns, A.E., Schwartz, N.B. (1993) Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event. *J. Biol. Chem.* **268**, 11105-11112.
- Volpi, N. (2004) The pathobiology of osteoarthritis and the rationale for using the chondroitin sulfate for its treatment. *Curr. Drug Targets – Immune Endocr. Metabol. Disord.* **4**, 119-127.

- von Ahsen, N., Oellerich, M. (2004) The intronic prothrombin 1991A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood* **15**, 586-593.
- Weilke, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (1997) Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin.Chem.* **43**, 45-51.
- Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P.H., Paulson, J.C. (1987) Primary structure of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *J. Biol. Chem.* **262**, 17735-17743.
- Williams, B. (2003) Introduction: Diabetes is a cardiovascular disease. In Hypertension and Diabetes. Williams B (eds.), Taylor and Francis Group, MD Martin Dunitz, XIII.
- Williamson, J.R., Tilton, R.G., Chang, K., Kilo, C. (1988) Basement membrane abnormalities in diabetes mellitus: relationship to clinical microangiopathy. *Diabetes Metab. Rev.* **4**, 339-370.
- Wilson, I.B.H. (2004) The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 794-809.
- Xiao, W., Oefner, P.J. (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum. Mutat.* **17**, 439-474.
- Zhai, G., Rivadeneira, F, Houwing-Duistermaat, J.J., Meulenbelt, I., Bijkerk, C., Hofman, A., van Meurs, J.B.J., Uitterlinden, A.G., Pols, H.A.P., Slagboom, P.E., van Duijn, C.M. (2004) Insulin-like growth factor I gene promotor polymorphism, collagen type II alpha1 (COL2A1) gene, and the prevalence of radiographic osteoarthritis: the Rotterdam Study. *Ann. Rheum. Dis.* **63**, 544-548.
- Zhang, M.Q. (1998) Statistical features of human exons and their flanking regions. *Hum. Mol. Gen.* **7**, 919-932.

9 Publikationen und Präsentationen

9.1 Publikationen

1. Kuhn, J., Müller, S., Schnölzer, M., Kempf, T., **Schön, S.**, Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 537-544.
2. Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., **Schön, S.**, Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2004) Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 42566-42573.
3. Müller, S., Schöttler, M., **Schön, S.**, Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymatic activity. *Biochem. J.* **386**, 227-236.
4. Schöttler, M., Müller, S., **Schön, S.**, Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting C. (2005) Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency. *Clin. Biochem.* **38**, 486-488.
5. Kuhn, J., Schnölzer, M., **Schön, S.**, Müller, S., Prante, C., Götting, C., Kleesiek, K. (2005) Xylosyltransferase I acceptor properties of fibroblast growth factor and its fragment bFGF (1-24). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 156-166.
6. **Schön, S.**, Prante, C., Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Kidney Int.* **68**, 1483-1490.
7. Götting, C., Hendig, D., Adam, A., **Schön, S.**, Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005) Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J. Mol. Med.* (im Druck, DOI: 10.1007/s00109-005-0693-x).
8. **Schön, S.**, Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagen, F.W., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Mutational and functional analyses of xylosyltransferases exclude their implication in hypermetabolic repair response in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* (im Druck).
9. Müller, S., Disse, J., Schöttler, M., **Schön, S.**, Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme. *Biochem. J.* (im Druck, DOI: 10.1042/BJ20051606).

10. **Schön, S.**, Prante, C., Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Polymorphisms in the xylosyltransferase I (XYLT-I) gene are implicated in the initiation and progression of diabetic complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* (eingereicht).
11. **Schön, S.**, Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) 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.* (in Revision).
12. Bahr, C., **Schön, S.**, L., Kuhn, J., Groop, P.-H., Wessmann, M., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Novel sequence variations in the human xylosyltransferase I gene and their role in diabetic nephropathy. *Diabet. Med.* (im Druck).
13. Prante, C., Götting, C., Milting, H., Kassner, A., Farr, M., Müller, S., **Schön, S.**, Seidler, D. G., Banayosy, A. E., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K. (2005) Increased xylosyltransferase I in dilated cardiomyopathy and in mechanically stressed cardiac fibroblasts. *J. Mol. Med.* (eingereicht).
14. Prante, C., Bieback, K., Kern, S., **Schön, S.**, Müller, S., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) The formation of extracellular matrix during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells correlates with increased levels of xylosyltransferase I. *Stem Cells* (eingereicht).
15. **Schön, S.**, Schulz, V., Prante, C., Hendig, D., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2006) Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activities in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *J. Med. Genet.* (im Druck).

9.2 Publierte Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. Kuhn, J., Müller, S., Schöttler, M., **Schön, S.**, Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Heparin is a non-competitive inhibitor of xylosyltransferase I. Joint Annual Meeting of the German and Swiss Connective Tissue Society, Ulm, *Abstractband*, 67.
2. Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., **Schön, S.**, Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2003) Expression of xylosyltransferase I variants identifies essential cysteine residues critical for the enzymatic activity. 15th IFCC – FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Spanien, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, Special Suppl., 215.

3. Götting, C., Schöttler, M., Müller, S., **Schön, S.**, Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K. (2003) Characterization of the gene structure of the murine and human xylosyltransferases. 15th IFCC – FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Spanien, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, Special Suppl., 215.
4. Schöttler, M., Müller, S., **Schön, S.**, Kuhn, J., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Further insights into the exon/intron structure of the xylosyltransferase I gene. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A76.
5. **Schön, S.**, Müller, S., Schöttler, M., Kuhn, J., Schulz, V., Szliska, C., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Identification of polymorphisms and mutations in the human xylosyltransferase I (XT-I) gene by DHPLC in blood donors and pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A95.
6. Kuhn, J., Müller, S., **Schön, S.**, Schöttler, M., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) A fragment of the Basic Fibroblast Growth Factor is a good substrate for human xylosyltransferase I. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A116.
7. Müller, S., Schöttler, M., **Schön, S.**, Kuhn, J., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Aminoterminal truncated xylosyltransferase I variants: localization of a core enzyme needed for the enzymatic activity. Euregio Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Aachen, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, A117.
8. **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. 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.

10. 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.
11. Schöttler, M., Müller, S., **Schön, S.**, Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K. (2003) Characterization of the exon/intron structure of the Xylosyltransferase I gene and the identification of exons which are critical for the XT-I activity. 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*, 61.
12. 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.
13. 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.
14. **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.
15. 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.
16. **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.
17. **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.

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. **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.
24. 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.

25. 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.
26. **Schön, S.**, Huep, G., Prante, C., Hagen, 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.
27. 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.
28. 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.
29. **Schön, S.**, Huep, 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.
30. 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.
31. **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.

32. 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 Glycobiology“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Hannover, Deutschland, *Abstractband*, 72.
33. Bahr, C., **Schön, S.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C. (2005) Determination of the extracellular localisation of the human xylosyltransferase I in fibroblasts and chondrosarcoma cells. 16th Joint Meeting of the „Studiengruppe Glykobiologie der GBM“, the „Nederlandse Vereniging voor Glycobiology“, the „Group Lillois de Glycobiologie“ and the “Belgian Working Group for Glycosciences”, Hannover, Deutschland, *Abstractband*, 31.

9.3 Kongressvorträge

1. **Schön, S.** (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, November 2003.
2. **Schön, S.** (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, November 2004.

9.4 Auszeichnungen

1. 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.

Auszeichnung: 1. Posterpreis

10 Anhang

10.1 Aminosäure-Substitutionen in der XT-I

Nachfolgend sind die Aminosäuren der XT-I dargestellt. Die Nummerierung gibt die Positionen im Protein an. Die ausgetauschten Aminosäuren sind fett abgebildet, die Veränderung ist unterhalb aufgeführt.

```

1   MVAAPCARRL ARRSHSALLA ALTVLLLQTL VVWNFSSLDS GAGERRGGAA
51  VGGGEQPPPA PARRRERRDL PAEPAAARGG GGGGGGGGGG RGPQARARGG
101 GPGEPRGQQP ASRGALPARA LDPHPSPLIT LETQDGYFSH RPKEKVRTDS
      S
151 NNENSVPKDF ENVDNSNFAP RTQKQKHQPE LAKKPPSRQK ELLKRKLEQQ
201 EKGKGHTFPG KGPGEVLPPG DRAAANSSHG KDVSRRPPHAR KTGGSSPETK
251 YDQPPKCDIS GKEAISALS R AKSKHCRQEI GETYCRHKL G LLMPEKVTRF
301 CPLEGKANKN VQWDEDSVEY MPANPVRIAF VLVVHGRASR QLQRMFKAIY
351 HKDHFYYIHV DKRSNYLHRQ VLQVSRQYSN VRVTPWRMAT IWGGASLLST
      L
401 YLQSMRDLLE MTDWPWDFFI NLSAADYPIR TNDQLVAFLS RYRDMNFLKS
      W
451 HGRDNARFIR KQGLDRLFLE CDAHMWRLGD RRIPEGIAVD GGSDWFLLR
501 RFVEYVTFST DDLVTKMKQF YSYTLLPAES FFHTVLENSP HCDTMVDNNL
551 RITNWNRKL G CKCQYKHIVD WCGCSPNDFK PQDFHRFQQT ARPTFFARKF
      S
601 EAVVNQEII G QLDYYLYGNY PAGTPGLRSY WENVYDEPDG IHSLSDVTLT
      H
651 LYHSFARLGL RRAETSLHTD GENSCRYYPM GHPASVHLYF LADRFQGFLI
      M
701 KHHATNLAVS KLETLETWVM PKKVFKIASP PSDFGRLQFS EVGTDWDAKE
751 RLFNRFGGLL GPMDEPVGMQ KWGKGPNVTV TVIWVDPVNV IAATYDILIE
801 STAEFTHYKP PLNLPLRPGV WTVKILHHWV PVAETKFLVA PLTFSNRQPI
851 KPEEALKLHN GPLRNAYMEQ SFQSLNPVLS LPINPAQVEQ ARRNAASTGT
      Q
901 ALEGWLDL SV GGMWTAMDIC ATGPTACPVM QTCSQTAWSS FSPDPKSELG
951 AVKPDGRLR

```

10.2 Aminosäure-Substitutionen in der XT-II

Nachfolgend sind die Aminosäuren der XT-II dargestellt. Die Nummerierung gibt die Positionen im Protein an. Die ausgetauschten Aminosäuren sind fett abgebildet, die Veränderung ist unterhalb aufgeführt.

```

1  MVASARVQKL VRRYKLAIAI ALAILLLQGL VVWSFSGLEE DEAGEKGRQR
51  KPRPLDPGEG SKDTDSSAGR RGSTGRRHGR WRGRAESPGV PVAKVRAVT
    N
101 SRQRASRRVP PAPPPEAPGR QNLSGAAAGE ALVGAAGFPP HGDTGSVEGA
    L H
151 PQPTDNGFTP KCEIVGKDAL SALARASTKQ CQQEIANVVC LHQAGSLMPK
    T
201 AVPRHCQLTG KMSPGIQWDE SQAQQPMDGP PVRIAYMLVV HGRAIRQLKR
251 LLKAVYHEQH FFYIHVDKRS DYLHREVVEL AQGYDNVRVT PWRMVTIWGG
301 ASLLTMYLRS MRDLLEVPGW AWDFFINLSA TDYPTRTNEE LVAFLSKNRD
    R
351 KNFLKSHGRD NSRFIKKQGL DRLFHECDSH MWRLGERQIP AGIVVDGGSD
401 WFVLRSFVE YVVYTDDPLV AQLRQFYTYT LLPAESFFHT VLENSLACET
    C L
451 LVDNNLRVTN WNRKLGCKCQ YKHIVDWCGC SPNDFKPQDF LRLQQVSRPT
501 FFARKFESTV NQEVLEILDF HLYGSYPPGT PALKAYWENT YDAADGPSGL
551 SDVMLTAYTA FARLSLHHAA TAAPPMGTPL CRFEPRGLPS SVHLYFYDDH
601 FQGYLVTQAV QPSAQGPAET LEMWLMPQGS LKLLGRSDQA SRLQSLEVGT
651 DWDPKERLFR NFGLLGPLD EPVAVQRWAR GPNLTATVVW IDPTYVVATS
701 YDITVDTETE VTQYKPPLSR PLRPGPWTVR LLQFWEPLGE TRFLVLPLTF
751 NRKLPLRKDD ASWLHAGPPH NEYMEQSFQG LSSILNLPQP ELAEEAAQRH
801 TQLTGPALEA WTDRELSSFW SVAGLCAIGP SPCPSLEPCR LTSWSSLSPD
    R
851 PKSELGPVKA DGRLR

```