

Akzeptorspezifitäten und Einfluss humaner Xylosyltransferasen auf fibrotische und mit Diabetes mellitus assoziierte Erkrankungen

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

**Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Christina Roch
aus Lage/Lippe

Bielefeld/Bad Oeynhausen
Februar 2012

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

November 2007 bis Februar 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Frey

So wie das Eisen außer Gebrauch rostet
und das stillstehende Wasser verdirbt oder bei Kälte gefriert,
so verkommt der Geist ohne Übung.

Leonardo da Vinci

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Jürgen Frey möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. Cornelius Knabbe danke ich für die Weiterführung der Forschungsthemen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

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

Meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen Michael Ambrosius, Javier Carrera Casanova, Mareike Dabisch-Ruthe, Dr. Jens Dreier, Marlen Ewald, Dennis Hinse, Dr. Joachim Kuhn, Christoph Lichtenberg, Patricia Kuzaj, Dr. Benjamin Müller, Claudia Pönighaus, Dr. Christian Prante, Anne-Kathrin Vollmer, Dr. Tanja Vollmer, Melanie Weinstock und Dr. Ralf Zarbock danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Masterstudenten Isabel Faust und Tim Take sowie bei meiner ehemaligen Forschungspraktikantin Kim-Kristin Prior.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich in jeglicher Hinsicht während meines Studiums unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Auch Sven möchte ich in besonderem Maße für seine moralische Unterstützung, seine Geduld und sein Verständnis danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
	Abstract	2
2	Einleitung	3
2.1	Extrazelluläre Matrix	3
2.2	Proteoglykane	3
2.3	Glykosaminoglykane	5
2.4	Glykosyltransferasen	9
2.5	Xylosyltransferasen	10
2.6	Fibrose	11
2.7	Diabetes und assoziierte Erkrankungen	12
2.8	Gegenstand der Arbeit	15
3	Ergebnisse	17
3.1	Untersuchungen der XT-Akzeptorspezifität	17
3.1.1	Ermittlung der Reaktionskinetiken eines XT-vermittelten Xylosetransfers auf GAG-Bindestellen aus <i>in vivo</i> Proteoglykanen	17
3.1.2	Auswirkungen von Mutationen des Bikunin-Fusionsproteins auf Reaktionskinetiken einer XT-vermittelten Katalyse	21
3.2	Mechanismen der Fibrose und Rolle der Xylosyltransferasen in fibrotischen Erkrankungen	25
3.2.1	Zwei- und dreidimensionale Kultivierung von dermalen Fibroblasten	25
3.2.2	Behandlung dermalen Fibroblasten mit TGF- β 1	26
3.2.2.1	Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach Induktion mit TGF- β 1	26
3.2.2.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Induktion mit TGF- β 1	28
3.2.2.3	Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit TGF- β 1	29
3.2.2.4	Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit TGF- β 1	31
3.2.3	Behandlung dermalen Fibroblasten mit Activin A	34

3.2.3.1	Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach Induktion mit Activin A.....	34
3.2.3.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Induktion mit Activin A.....	35
3.2.3.3	Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit Activin A.....	36
3.2.3.4	Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit Activin A.....	37
3.2.4	Reduktion der XT-I-Expression in dermalen Fibroblasten.....	38
3.2.4.1	Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-I- <i>Knockdown</i>	38
3.2.4.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I- <i>Knockdown</i>	40
3.2.4.3	Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I- <i>Knockdown</i>	40
3.2.4.4	Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I- <i>Knockdown</i>	42
3.2.5	Reduktion der XT-II-Expression in dermalen Fibroblasten.....	43
3.2.5.1	Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-II- <i>Knockdown</i>	43
3.2.5.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-II- <i>Knockdown</i>	45
3.2.5.3	Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-II- <i>Knockdown</i>	45
3.2.5.4	Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-II- <i>Knockdown</i>	46
3.2.6	Parallele Expressionsreduktion beider XT-Isoformen in dermalen Fibroblasten.....	48
3.2.6.1	Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-I/II-Doppel- <i>Knockdown</i>	48
3.2.6.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I/II-Doppel- <i>Knockdown</i>	50
3.2.6.3	Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I/II-Doppel- <i>Knockdown</i>	50
3.2.6.4	Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I/II-Doppel- <i>Knockdown</i>	51
3.2.7	Analyse der ECM-Zusammensetzung XT-I-überexprimierender M56D-Fibroblasten.....	53
3.2.7.1	Veränderungen der mRNA-Expression von XT-I-überexprimierenden Fibroblasten.....	53
3.2.7.2	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand XT-I-überexprimierender Fibroblasten.....	54
3.2.7.3	Untersuchung der intra- und extrazellulären GAG-Zusammensetzung XT-I-überexprimierender Fibroblasten.....	54

3.2.8	Analyse der ECM-Zusammensetzung XT-II-überexprimierender M56D-Fibroblasten.....	56
3.2.8.1	Konstruktion des pcDNA3.1(+)/XYLT2-Plasmids (pCR128.32).....	56
3.2.8.2	Veränderungen der mRNA-Expression von XT-II-überexprimierenden Fibroblasten.....	57
3.2.8.3	Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand XT-II-überexprimierender Fibroblasten.....	58
3.2.8.4	Untersuchung der intra- und extrazellulären GAG-Zusammensetzung XT-II-überexprimierender Fibroblasten.....	58
3.3	Diabetes-vermittelte Effekte auf glatte Muskelzellen und Hepatozyten.....	60
3.3.1	Expressionsanalyse von ECM-Komponenten glatter Muskelzellen	60
3.3.1.1	Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme	60
3.3.1.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme	61
3.3.2	Expressionsanalyse von ECM-Komponenten der Hepatozytzelllinie HepG2.....	63
3.3.2.1	Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme	63
3.3.2.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme	64
4	Diskussion	66
4.1	Untersuchungen zur Akzeptorspezifität humaner XT-Isoformen	66
4.1.1	Reaktionskinetiken des XT-vermittelten Xylosetransfers auf GAG-Bindestellen aus <i>in vivo</i> Proteoglykanen	67
4.1.2	Auswirkungen von Mutationen der Bikuninsequenz auf die Reaktionskinetiken der Xylosylierungsreaktionen	69
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Akzeptorspezifität humaner XT-Isoformen	70
4.2	Profibrotische Cytokine und Rolle der Xylosyltransferasen in fibrotischen Erkrankungen.....	71
4.2.1	Zwei- und dreidimensionale Kultivierung von dermalen Fibroblasten	71
4.2.2	Wirkungen von TGF- β 1 auf Xylosyltransferasen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix	72
4.2.3	Wirkungen von Activin A auf Xylosyltransferasen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix	74
4.2.4	Effekte einer reduzierten XT-I-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix	75

4.2.5	Effekte einer reduzierten XT-II-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix	77
4.2.6	Effekte einer parallel reduzierten Aktivität beider XT-Isoformen auf Komponenten der extrazellulären Matrix	78
4.2.7	Auswirkungen einer gesteigerten XT-I-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix	79
4.2.8	Auswirkungen einer gesteigerten XT-II-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix	81
4.2.9	Zusammenfassung	82
4.3	Diabetes-vermittelte Effekte auf glatte Muskelzellen und Hepatozyten.....	83
4.3.1	Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten glatter Muskelzellen.....	83
4.3.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten glatter Muskelzellen.....	85
4.3.3	Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten von Hepatozyten	86
4.3.4	Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten von Hepatozyten	87
4.3.5	Zusammenfassung	88
4.4	Ausblick.....	89
5	Methoden	90
5.1	Molekularbiologische Methoden	90
5.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen.....	90
5.1.2	Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen.....	90
5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	90
5.1.4	Quantifizierung von Nukleinsäure-Konzentrationen	91
5.1.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	91
5.1.6	DNA-Agarosegelelektrophorese	92
5.1.7	Aufkonzentration von Zellkulturüberständen	92
5.1.8	Restriktion des pGEX-6P-1-Plasmids.....	92
5.1.9	Ligation von restringiertem pGEX-6P-1-Plasmid und Zielsequenz	93
5.1.10	Konstruktion des Vektors pcDNA3.1(+)/XYLT2	94
5.1.11	Amplifikation von DNA durch Polymeraseketten-Reaktion.....	95
5.1.12	<i>Real-Time-PCR</i>	96

5.1.13	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	98
5.2	Zellbiologische Methoden.....	99
5.2.1	Zweidimensionale Kultivierung humaner Zelllinien	99
5.2.2	Dreidimensionale Kultivierung dermaler Fibroblasten.....	99
5.2.3	Passagieren von adhärennten Zellen	99
5.2.4	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zelllinien.....	99
5.2.5	Zellernte	100
5.2.6	Bestimmung der Zellzahl	100
5.2.7	Behandlung mit Cytokinen, Hormonen und Glukose	101
5.2.8	Transfektion humaner Dermalfibroblasten mit siRNA.....	101
5.2.9	Transfektionen von Dermalfibroblasten mittels Elektroporation	101
5.2.10	Herstellung kompetenter Zellen	102
5.2.11	Transformation von Bakterien.....	102
5.2.12	Glycerinkultur von Bakterien	102
5.2.13	Expression von Ligationsprodukten.....	102
5.2.14	Lyse von Bakterienzellen.....	103
5.3	Proteinchemische Methoden.....	103
5.3.1	Radiochemischer XT-Aktivitätstest	103
5.3.2	Bradford-Test.....	104
5.3.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	104
5.3.4	Dialyse von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen	105
5.4	Glykosaminoglykan-Analytik.....	105
5.4.1	Isolierung von Glykosaminoglykanen aus Lysaten und Zellkultur- überständen.....	105
5.4.2	Verdau von Proteoglykanen mit Natriumborhydrid.....	105
5.4.3	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	106
5.4.4	GAG-Fällung mit Kaliumacetat	106
5.4.5	Entsalzung.....	106
5.4.6	Enzymatischer Verdau von Glykosaminoglykanen	106
5.4.7	Aufreinigung von 2-Aminoacridon	107
5.4.8	Derivatisierung von Disaccharid-Fragmenten mit 2-Aminoacridon.....	107

5.4.9	HPLC-Analytik.....	107
6	Material und Geräte.....	109
6.1	Chemikalien und Reagenzien.....	109
6.2	Puffer und Lösungen.....	110
6.3	Zelllinien.....	112
6.4	Zellkulturmedien und Zusätze.....	113
6.5	Bakterienstämme.....	113
6.6	Nährmedien für <i>E. Coli</i>	113
6.7	Enzyme.....	114
6.8	Reaktionssysteme.....	114
6.9	Längen- und Größenstandards.....	115
6.10	Vektoren.....	115
6.11	Oligonukleotide.....	115
6.11.1	Vektorbindende Oligonukleotide.....	115
6.11.2	Oligonukleotide zur Synthese von GST-Fusionsproteinen.....	115
6.11.3	Oligonukleotide für die <i>Real-Time</i> -PCR.....	116
6.11.4	siRNA-Oligonukleotide.....	117
6.12	Rekombinante Wachstumsfaktoren.....	117
6.13	Sonstige Materialien.....	118
6.14	Software.....	118
6.15	Geräte.....	118
7	Abkürzungen.....	120
8	Literatur.....	122
9	Publikationen und Präsentationen.....	136
10	Lebenslauf.....	138
11	Erklärung.....	139
12	Anhang.....	140

1 Zusammenfassung

Die Xylosyltransferasen I und II (XT-I/XT-II) initiieren die posttranslationale Glykosaminoglykan-(GAG)-Biosynthese indem sie im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt den Transfer aktivierter Xylose auf spezifische Serinreste von Proteoglykan-*Core*-Proteinen katalysieren. Beide Isoenzyme nehmen daher eine zentrale Rolle in Aufbau und Remodellierung der extrazellulären Matrix (ECM) ein und sind des Weiteren an pathologischen Umstrukturierungen der ECM beteiligt. Die Expression der funktionell und strukturell homologen XT-Isoformen erfolgt durch unterschiedliche transkriptionelle Regulation gewebe- und zelllinienspezifisch. Zur Aufklärung möglicher Spezifitätsunterschiede humaner XT-Isoformen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Vielzahl möglicher Akzeptorproteine zur Bestimmung isoenzym-spezifischer Reaktionskinetiken generiert. Die 30 Fusionsproteine bestehend aus Glutathion-S-Transferase und einer C-terminalen 10 bis 13 Aminosäuren langen Sequenz umfassten den zentralen Serinrest bekannter oder putativer Xylosylierungsstellen. Es zeigte sich, dass die Isoformen ein ähnliches Akzeptorspektrum umsetzten, jedoch Unterschiede in den Reaktionskinetiken detektierbar waren. So wies die XT-I eine geringere Stringenz hinsichtlich der Akzeptorsequenz sowie einen schnelleren Substratumsatz auf. Die XT-II hingegen zeichnete sich durch höhere Affinitäten zu den Proteinen aus. Zur Untersuchung der Effekte von zufälligen Mutationen auf Akzeptorfunktion und Reaktionskinetik wurde des Weiteren die Bikuninsequenz gentechnisch verändert. Fusionsproteine mit Mutationen auf der N-terminalen Seite und im Bereich der GAG-Bindestelle resultierten häufiger in Funktionsverlusten als Mutationen im C-Terminus. Demzufolge hatten carboxyterminale Aminosäuren einen geringeren Einfluss auf die Akzeptorfunktion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Genexpressionsanalysen der fibrotische Einfluss von TGF- β 1, Activin A und einer Überexpression der XT-Isoformen auf Dermalfibroblasten untersucht. Beide Cytokine bewirkten eine Hochregulation der XT-I-Expression und der XT-Aktivität. Erstmals detektiert wurde eine TGF- β 1-abhängige Verdopplung der XT-II-Expression in dreidimensional kultivierten Fibroblasten. Es konnte des Weiteren erstmalig gezeigt werden, dass Activin A eine Erhöhung der XT-Aktivität bewirkte. Eine siRNA-vermittelte Verminderung der XT-II-Expression führte durch eine kompensatorische Hochregulation der XT-I-Expression zu erhöhten XT-Aktivitäten. Bei transfizierten Zellen waren des Weiteren eine verminderte Transkription von Decorin und Kollagen 3 α 1 sowie Veränderungen der GAG-Zusammensetzung detektierbar. Die vektorbasierte XT-I-Überexpression führte zu einer erhöhten Biglycanexpression und zu Herabregulationen der Expressionen von Betaglycan-, Decorin- und TGF- β 1. Eine erhöhte XT-II-Aktivität resultierte in Transkriptionssteigerungen von Biglycan, Kollagen 2 α 1, Kollagen 5 α 1 und TGF- β 1. Die GAG-Komposition wurde ebenfalls beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass selektive Inhibitionen bzw. Überexpressionen der humanen XT-Isoformen mit Alterationen der ECM einhergehen. Eine quantitative und qualitative Veränderung der Expression der Xylosyltransferasen trägt demzufolge zu pathologischen Veränderungen in fibrotischen Erkrankungen bei. Aufgrund der hohen Bedeutung für die Medizin gilt es nun die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weiter aufzuklären.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Effekte einer Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die XT-Expression glatte Muskelzellen und Hepatozyten. Diese mit Diabetes mellitus und Insulinresistenz assoziierten metabolischen Veränderungen erhöhen das Risiko an Atherosklerose oder Hepatopathien zu erkranken und führen teilweise zu Alterationen der ECM-Zusammensetzung. Es zeigte sich bei beiden Zelltypen, dass die Induktionen mit Glukose oder Insulin eine leichte Erhöhung der XT-Expressionen zur Folge hatten, jedoch keine Änderungen der XT-Aktivität verursachten. Es wurden vereinzelte, marginale Expressionsänderungen von ECM-Komponenten detektiert, so dass insgesamt von einem sehr geringen, direkten Einfluss erhöhter Glukose- und Insulinkonzentrationen auf die Expression von ECM-Komponenten glatter Muskelzellen und Hepatozyten ausgegangen werden kann. Bei Diabetikern auftretende ECM-Veränderungen in Arterien und Leber scheinen daher eher auf andere Faktoren zurückzuführen zu sein.

Abstract

Xylosyltransferases I and II (XT-I and XT-II) initiate the posttranslational glycosaminoglycan-(GAG)-biosynthesis by catalysing the transfer of activated xylose to specific serine moieties of proteoglycan core proteins in a rate-limiting step. Both isoenzymes have a central regulatory role in synthesis, remodelling and pathological reorganisation of the extracellular matrix. XT isoforms share a high degree of functional and structural homology and are transcriptionally regulated in a tissue and cell type specific manner.

For the first time 30 acceptor proteins were generated to determine putative differences in acceptor specificities of human xylosyltransferases. Peptides were expressed as glutathione-S-transferase fusion proteins containing putative or known GAG attachment sites of *in vivo* proteoglycans. For this purpose, a central serine residue was surrounded by 10 to 13 amino acids in the C-terminus. Determination of isoenzyme specific acceptor activities showed a similar pool of xylosylated peptides with differences in analysed reaction kinetics. XT-I showed a lesser stringency concerning the acceptor sequence and a faster reaction rate while XT-II had higher affinities to acceptor proteins. Additionally, genetically modified bikunin sequences were expressed and effects of amino acid exchanges on acceptor function and reaction kinetics were analysed. Mutations on the N-terminal side and the attachment site were found to be more susceptible to a loss of acceptor function than mutations in the C-terminus demonstrating a lower impact of carboxyterminal amino acids on acceptor function.

Furthermore, profibrotic effects of TGF- β 1, Activin A and overexpression of XT isoforms on gene expression of dermal fibroblasts were studied. XT-I expression and XT activity were upregulated by both cytokines. For the first time a TGF- β 1 induced doubling of XT-II transcription in three-dimensional cultivated fibroblasts was detected. As well, activin A was shown for the first time to increase XT activity. XT-II knockdown was mediated by siRNA and resulted in higher XT activity caused by a compensatory upregulation of XT-I expression. In addition, decorin and collagen 3 α 1 expression were reduced and GAG composition was altered in transfected fibroblasts. Overexpression of XT-I was performed by plasmid transfection. Quantification of mRNA showed elevated biglycan transcription and downregulation of betaglycan, decorin und TGF- β 1 expression. Higher XT-II activities increased transcription of biglycan, collagen 2 α 1, collagen 5 α 1 and TGF- β 1. GAG composition was altered as well. As a part of this doctoral thesis it was shown for the first time that selective inhibition or overexpression of human XT isoforms was accompanied by alterations of ECM composition. The results of this thesis gain convenient insights into the regulation of xylosyltransferases in fibrogenesis, however the underlying molecular mechanisms have to be elucidated.

At last, effects of hyperinsulinemia and hyperglycemia on XT expression of vascular smooth muscle cells and hepatocytes were analysed. The metabolic alterations associated with diabetes mellitus and insulin resistance increase the risk for developing hepatopathies or atherosclerosis and might induce alterations in composition of ECM. Glucose and insulin increased XT expression slightly but had no effects on XT activity in both cell types. Isolated and marginal changes in gene expression of extracellular matrix components were detected indicating a negligible direct influence of elevated glucose and insulin concentrations on matrix biosynthesis of smooth muscle cells and hepatocytes. Alterations in the extracellular matrix of arteries and liver therefore seem to be caused by other mediators.

2 Einleitung

2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist Bestandteil jedes Gewebes und wird als das azelluläre Kompartiment des Interzellularraums definiert. Sie setzt sich zusammen aus Wasser, Kollagenen, Proteoglykanen, Elastin und nicht-kollagenösen Glykoproteinen. Zusammensetzung, Topologie und Ausprägung der ECM variieren stark in gewebespezifischer Abhängigkeit [1], jedoch sind Aufbau und Struktur der ECM keineswegs statisch, sondern in hohem Maße einer dynamischen Remodellierung unterlegen, die durch eine Balance zwischen Synthese und Abbau der ECM-Komponenten kontrolliert wird. Wurde das dreidimensionale Netzwerk der ECM in der Vergangenheit hauptsächlich als strukturgebendes Gerüst für die umgebenden Zellen betrachtet, so ist heute bekannt, dass Funktionen und Aufgaben der ECM deutlich vielseitiger und komplexer sind [2]. So spielen neben den mechanisch vermittelten Eigenschaften wie Elastizität oder Druckfestigkeit auch biochemische Prozesse eine äußerst wichtige Rolle. Indem die ECM als Speicher für Enzyme, Wachstumsfaktoren, Cyto- und Chemokine dient, kann Einfluss auf zelluläre Funktionen genommen werden. Dies geschieht zum Teil durch Bindung der gespeicherten Substanzen an ECM-Proteine, wodurch Aktivität, Verteilung oder Bioverfügbarkeit kontrolliert, beziehungsweise die Substanzen den Zelloberflächenrezeptoren präsentiert werden können. Durch direkte Wechselwirkung von Matrixproteinen mit Zellrezeptoren können Zelladhäsion und -migration beeinflusst, aber auch Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden, in deren Folge die Expression von Genen für Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose reguliert werden [3].

2.2 Proteoglykane

Proteoglykane (PG) sind in Mammalia ubiquitär vorkommende, heterogene Makromoleküle, die aus einer Protein- und einer Saccharidkomponente zusammengesetzt sind. Sie sind intrazellulär, auf Zelloberflächen, als auch in der ECM lokalisiert. Bei der als Glykosaminoglykan (GAG) bezeichneten Disaccharideinheit handelt es sich um eine kovalent an spezifische Serinreste des *Core*-Proteins gebundene lange, lineare Kette [4]. Von den *Core*-Proteinen sind bis heute mehr als 30 verschiedene bekannt und charakterisiert worden, wobei eine sehr große Heterogenität festgestellt werden konnte [5]. So unterscheiden sie sich deutlich in der Länge der Peptidketten und somit im Molekulargewicht, das Werte von 10 bis über 500 kDa erreichen kann. Ebenfalls sehr

variabel ist die Anzahl der kovalent gebundenen GAG-Ketten pro *Core*-Protein, die von einer einzelnen bis auf über 100 variieren [6]. Bei manchen Proteinen, den sogenannten *part-time* Proteoglykanen wie Brevican oder Thrombomodulin, existieren zusätzlich unterschiedliche Varianten, bei denen die GAG-Kette vorhanden sein, aber auch fehlen kann [7, 8]. Eine weitere Steigerung der Variabilität wird erreicht, indem einige Bindungsstellen mit GAG-Typen unterschiedlichen Typs kovalent verknüpft werden.

Anhand der Lokalisation erfolgt die Klassifizierung der Proteoglykane in verschiedene Gruppen, wobei weitere Subklassifizierungen aufgrund von Strukturmerkmalen und Bindungseigenschaften vorgenommen werden [4, 9]. Bei der Lokalisation der PG wird unterschieden zwischen extrazellulär sekretierten (Decorin, Versican, etc.), membran-gebundenen (Betaglycan, Syndecan, etc.) und intrazellulären PG (Serglycin) [9, 10]. Die extrazellulär sekretierten PG werden weiter unterteilt in Basalmembran-PG, Hyalektine und *small leucine-rich proteoglycans* (SLRP). Hyalektine wie Aggrecan oder Versican binden Hyaluronsäure über eine N-terminale Domäne und SLRP wie Decorin oder Biglycan zeichnen sich durch eine zentrale Domäne im *Core*-Protein aus, in der eine Wiederholung aus Leucin-reichen Abschnitten von kleinen Cystein-*Clustern* flankiert wird [11]. Auch innerhalb einer Gruppe lassen sich weitere Subfamilien einteilen. So können die SLRP anhand unterschiedlicher Parameter wie Homologien der Proteinsequenz in weitere 5 Klassen unterteilt werden [12]. Bei den Zelloberflächen-PG wird unterschieden zwischen Proteinen, die eine Transmembrandomäne aufweisen und Glypican, das über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Plasmamembran verankert ist [10].

Tabelle 2.1: Klassifizierung einiger Proteoglykane [9-11].

Extrazellulär sekretiert			Zelloberfläche	Intrazellulär
Basalmembran	Hyalektin	SLRP		
Aggrin	Aggrecan	Biglycan	Betaglycan	Serglycin
Bamacan	Brevican	Decorin	CD44	
Kollagen XVIII	Neurocan	Epiphycan	Glypican	
Perlecan	Versican	Fibromodulin	Neuropilin-1	
		Keratocan	NG2	
		Lumican	Syndecan	
		Mimecan		
		Osteoadherin		
		PRELP		

Die vielfältigen Funktionen der Proteoglykane beruhen sowohl auf den GAG-Ketten, als auch auf funktionellen Domänen der *Core*-Proteine. Neben essentiellen Aufgaben bei der

Hydratation und der Gewährleistung von osmotischen Eigenschaften der ECM werden zelluläre Prozesse wie Zelladhäsion, Proliferation, Motilität, Differenzierung und Gewebemorphogenese maßgeblich von Proteoglykanen gesteuert und beeinflusst [3, 4]. Eine wichtige Stellung nehmen hierbei die Interaktionen der PG mit anderen Matrixkomponenten, Wachstumsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren ein [10].

2.3 Glykosaminoglykane

Bei den kovalent an *Core*-Proteine gebundenen GAG-Ketten handelt es sich um unverzweigte, komplexe Polysaccharide mit Molekulargewichten von 10 bis 100 kDa, die aus alternierenden Disaccharideinheiten bestehend aus Aminozuckern und Uronsäuren aufgebaut sind. Durch die Heterogenität der GAG-Ketten werden diese anhand ihrer Saccharidkomponenten und deren Modifikationen in verschiedene GAG-Typen eingeteilt. Hierbei hat sich die Klassifizierung in Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Heparansulfat (HS), Heparin, Hyaluronsäure (HA) sowie Keratansulfat (KS) ergeben [13]. Sind mehrere GAG-Ketten an unterschiedlichen Stellen eines PG gebunden, müssen diese nicht vom gleichen GAG-Typ sein, sondern können differieren [6]. Die posttranslationale GAG-Biosynthese – mit Ausnahme des Keratansulfats und der Hyaluronsäure – wird über die Bildung des uniformen Tetrasaccharid-Linkers GlcA- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 3)-Gal- β (1 \rightarrow 4)-Xyl- β -O-Serin im Golgi-Apparat initiiert [4]. Im ersten Schritt erfolgt in einer durch die Xylosyltransferasen I und II katalysierten Reaktion die Entstehung einer β -glykosidischen Bindung zwischen der Hydroxylgruppe eines spezifischen Serins und einem aktivierten Xyloserest (Abbildung 2.1).

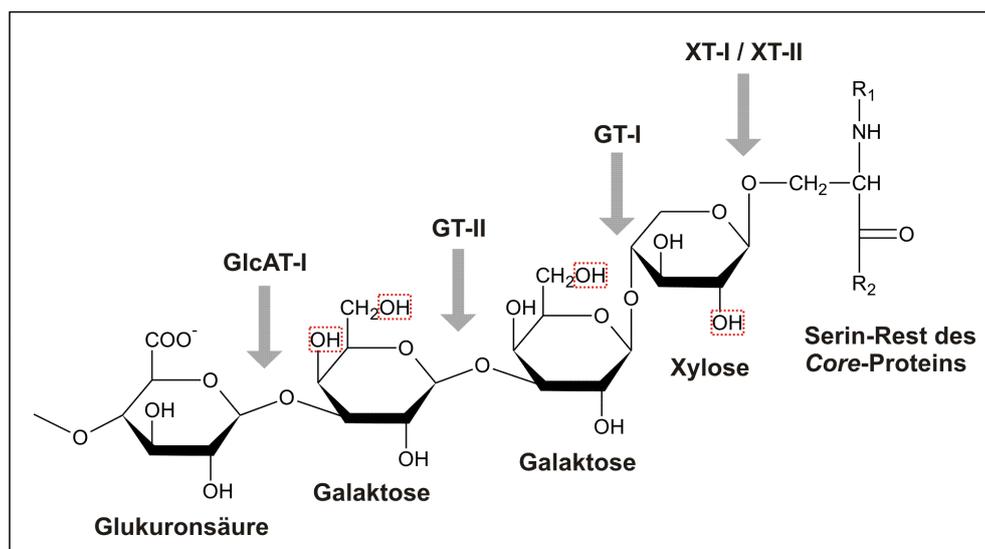


Abbildung 2.1: Struktur des uniformen Tetrasaccharid-Linkers über den GAG-Ketten kovalent an Core-Proteine gebunden werden. Die Xylosyltransferasen I oder II (XT-I/XT-II), Galaktosyltransferasen I und II (GT-I/GT-II) sowie die Glukuronyltransferase I (GlcAT-I) sind am Aufbau der Linkerstruktur beteiligt und katalysieren jeweils den Transfer eines spezifischen Saccharids. Die potentiellen Positionen, an denen Modifikationen auftreten können sind hervorgehoben [14-16].

In sequenziellen Reaktionen findet die Komplementierung des Linkers durch spezifische Glykosyltransferasen statt. Die Glykosyltransferasen I und II katalysieren den Transfer je eines Galaktosemoleküls (Gal) über eine $\beta(1\rightarrow4)$ - bzw. $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidische Bindung auf den vorangehenden Saccharidrest. Die finale Reaktion der Linkersynthese erfolgt durch eine Übertragung eines Glukuronsäurerests durch die Glukuronyltransferase I. Im folgenden Schritt wird als fünftes Saccharid ein Aminozucker transferiert [17]. Hierbei sind wahrscheinlich Modifizierungen wie Sulfatierungen oder Phosphorylierungen in der Linkerstruktur dafür entscheidend [14-16, 18], ob ein N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) unter Bildung einer GAG-Kette vom Typ CS/DS angefügt wird oder ob eine Addition von N-Acetylglukosamin (GlcNAc) zur Entstehung einer GAG-Kette vom HS/Heparin Typ führt. Die weitere Elongation erfolgt durch einen sukzessiven Transfer der alternierenden Saccharidmoleküle an das nicht reduzierende Ende der naszierenden Kette. Die in die GAG-Kette eingebaute Uronsäure Glukosamin (GlcA) kann anschließend durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion am C5-Atom in Iduronsäure (IdoA) epimerisiert werden [19].

Tabelle 2.2: Klassifizierung der GAG-Typen, deren Disaccharideinheiten und Modifikationen [20].

GAG-Typ	Disaccharideinheit	Modifikationen
CS	GlcA- $\beta(1\rightarrow3)$ -GalNAc- $\beta(1\rightarrow4)$	– O-Sulfatierung
DS	IdoA- $\beta(1\rightarrow3)$ -GalNAc- $\beta(1\rightarrow4)$	– O-Sulfatierung – Epimerisierung von GlcA zu IdoA – im Vergleich mit CS höherer Sulfatierungsgrad
HS	GlcA- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc- $\alpha(1\rightarrow4)$	– N-Deacetylierung, N-Sulfatierung – O-Sulfatierung – Epimerisierung von GlcA zu IdoA
Heparin	IdoA- $\alpha(1\rightarrow4)$ -GlcNAc- $\alpha(1\rightarrow4)$	– N-Deacetylierung, N-Sulfatierung – O-Sulfatierung – Epimerisierung von GlcA zu IdoA – stärker ausgeprägte Modifikationen als bei HS – höchste Sulfatierungsgrad unter den verschiedenen GAG-Typen
HA	GlcA- $\beta(1\rightarrow3)$ -GlcNAc- $\beta(1\rightarrow4)$	– keine Modifikationen – keine kovalente Bindung an Core-Proteine
KS	Gal- $\beta(1\rightarrow4)$ -GlcNAc- $\beta(1\rightarrow3)$	– O-Sulfatierung – im Vergleich mit anderen GAG niedrigster Sulfatierungsgrad

Bereits während der Polymerisation der GAG-Kette finden Modifikationsreaktionen des Saccharidrückgrats statt. Diese Sulfatierungen, Deacetylierungen und Epimerisierungen umfassenden enzymatisch katalysierten Reaktionen sind essentiell für die spezifische Aktivität der GAG-Kette und tragen durch die hohe Anzahl an möglichen Modifikationsmustern maßgeblich zur hohen Diversität der Glykosaminoglykane bei. Die Vielzahl an Carboxylgruppen der Uronsäure sowie Sulfatgruppen an verschiedenen Positionen verleihen den GAG eine stark negative Ladung, so dass diese als Polyanionen wirken [20]. Des Weiteren werden durch das entstehende einzigartige Muster an Modifikationen bestimmte Informationen in der GAG-Kette kodiert.

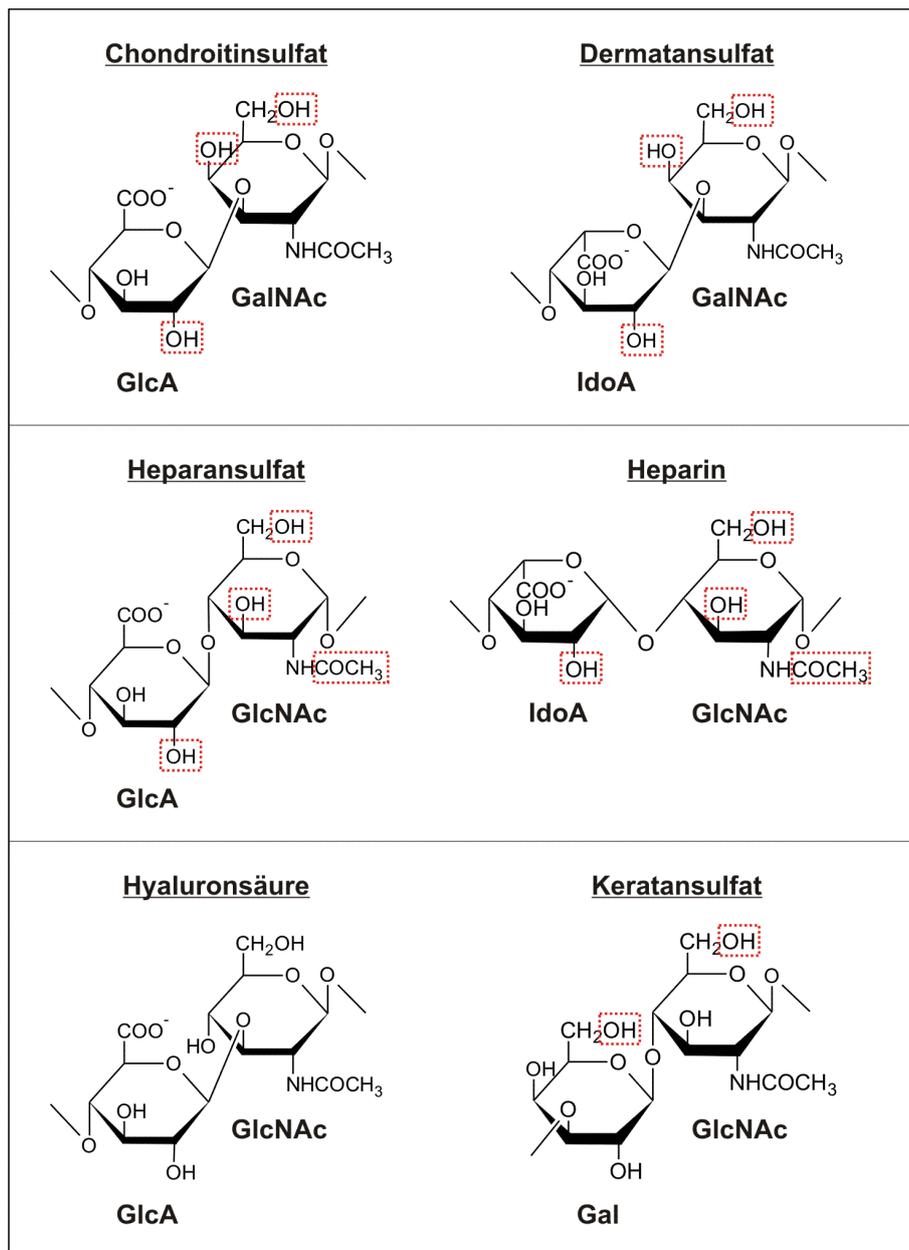


Abbildung 2.2: Strukturen der alternierenden Disaccharideinheiten der verschiedenen GAG-Typen. Die potentiellen Positionen, an denen Sulfatierungen auftreten können sind hervorgehoben [19, 20].

Chondroitin- und Dermatansulfat weisen als einzige unter den GAG-Typen das N-Acetylgalaktosamin als Baustein im Polysaccharidrückgrat auf. Die Übergänge zwischen CS und DS sind zum Teil fließend, jedoch hebt sich DS durch einen im Allgemeinen höheren Sulfatierungsgrad und dem partiellen Auftreten von IdoA ab. CS und DS sind *in vivo* relativ weit verbreitet, wobei CS besonders in Knorpeln und Knochen und DS in der Haut vorkommt [19, 21].

Der Aminozucker von HS und Heparin liegt im Gegensatz zu den Aminozuckern der anderen GAG-Typen in einer α -Konfiguration vor. Zwischen Heparin und HS besteht der Unterschied, dass Heparin deutlich ausgeprägtere Modifizierungen – darunter auch das Auftreten von IdoA – enthält und unter allen GAG-Typen das höchste Maß an Sulfatierungen besitzt. Heparin-ähnliche Strukturabschnitte können jedoch auch in Heparansulfaten auftreten. Heparin wird *in vivo* relativ selten synthetisiert und wird hauptsächlich in Mastzellen gebildet, die HS-Synthese hingegen findet nahezu in allen Zelltypen statt [19, 22].

Hyaluronsäure unterscheidet sich von den anderen GAG-Typen darin, dass keine Modifikationen der Saccharideinheiten auftreten und keine kovalente Bindung an *Core*-Proteine erfolgt. Durch das Eingehen von Wechselwirkungen mit vielen Bindungspartnern wie beispielsweise Aggrecan liegt die Hyaluronsäure in der ECM jedoch nicht vollständig frei vor. Die diversen Funktionen der HA sind durch das Fehlen von Modifikationen nur von der variablen Kettenlänge abhängig [20]. Hyaluronsäure wird besonders in Fibroblasten synthetisiert und ist neben der CS-Gruppe eine der GAG-Hauptkomponenten der ECM [19].

Keratansulfat ist das kleinste der Glykosaminoglykane und weist im Vergleich der sulfatierten GAG-Typen den geringsten Sulfatierungsgrad auf [19]. Neben einer kovalenten Bindung an einen spezifischen Serinrest kann KS auch N-glykosidisch über Asparagin oder O-glykosidisch über Threonin an die Peptidkette gebunden werden. Die Bindung erfolgt jedoch nicht über den uniformen Tetrasaccharid-Linker sondern über andere, lineare Saccharidstrukturen. KS ist das einzige unter den Glykosaminoglykanen, das keine Uronsäure als Bestandteil enthält und stattdessen Galaktose aufweist [23].

Glykosaminoglykane nehmen als Bestandteil der Proteoglykane an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Zell-Matrix-Interaktion, sowie Aktivierung von Chemokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren teil und spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vieler Krankheiten [20].

2.4 Glykosyltransferasen

Die Familie der Glykosyltransferasen umfasst eine große Gruppe an Enzymen, die den Transfer eines Zuckermoleküls von einem aktivierten Donor auf einen spezifischen Akzeptor und somit die Entstehung einer glykosidischen Bindung katalysieren. Die Glykosylakzeptoren sind häufig andere Oligosaccharide, aber auch Proteine, Lipide, Nucleinsäuren oder andere kleine Moleküle werden substituiert. Die Übertragung erfolgt meist auf das nukleophile Sauerstoffatom einer Hydroxylgruppe. Des Weiteren können die Saccharideinheiten an Stickstoff-, Schwefel- oder Kohlenstoffatome kovalent gebunden werden [24]. Die Donormoleküle sind hauptsächlich Hexosen, die durch eine bei der Reaktion abgespaltene Nucleosid-Diphosphat-Gruppe aktiviert sind [25]. Die Glykosyltransferasen weisen dementsprechend ein großes Maß an Diversität hinsichtlich Akzeptor und Donor auf und können somit eine sehr hohe Zahl an verschiedenen Produkten generieren.

Bei der Katalyse sind zwei stereochemische Reaktionswege bekannt. So kann es zum einen zu einer Inversion und zum anderen zu einer Retention des anomeren Kohlenstoffatoms des Donors kommen, so dass dieser Unterschied zu einer Klassifizierung der Glykosyltransferasen in invertierende oder Konfiguration beibehaltende Enzyme führt [24]. Nahezu alle bekannten Glykosyltransferasen können trotz ausgeprägter sequenzieller Diversitäten anhand zweier Motive, der GT-A und GT-B Faltung, weiter in zwei Superfamilien unterteilt werden. Dadurch, sowie über Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz, werden die ubiquitär vorkommenden Glykosyltransferasen zurzeit in 94 Familien unterteilt [26, 27]. In Eukaryonten sind die meisten Glykosyltransferasen membranständig und im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat lokalisiert. Die integralen Typ II Transmembranproteine werden aufgebaut durch eine kleine cytoplasmatische Domäne, die Transmembrandomäne (TMB), eine Stamm-Region und eine große katalytische Domäne (Abbildung 2.3) [28].

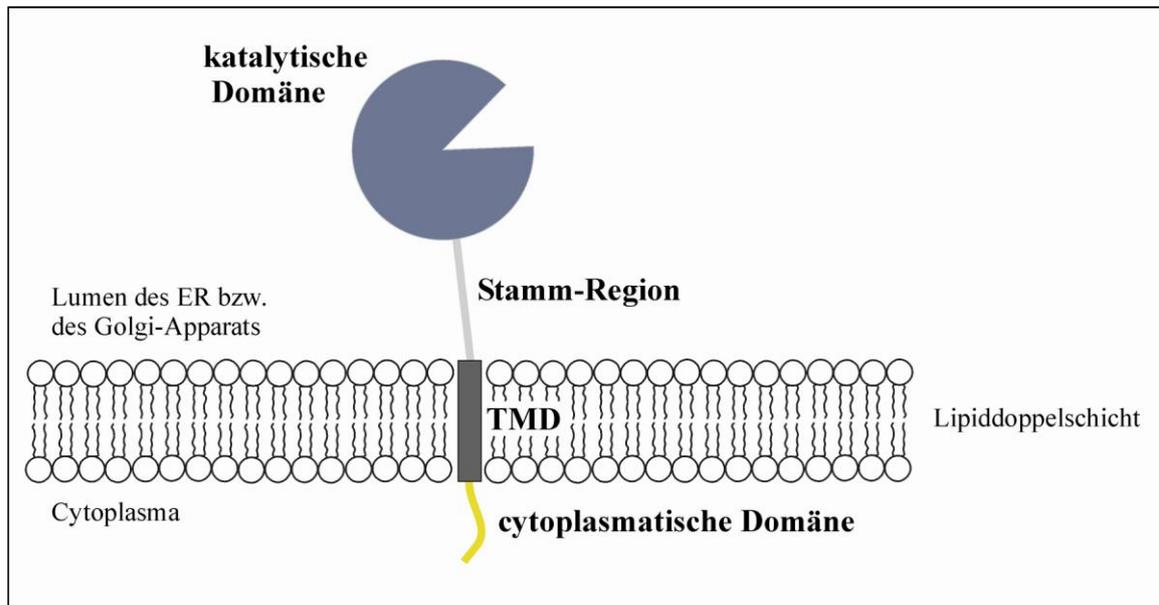


Abbildung 2.3: Schematischer, struktureller Aufbau der Glykosyltransferasen (nach [28]). Die Mehrzahl der Glykosyltransferasen sind Typ II Transmembranproteine, deren Struktur durch eine cytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne (TMD), eine Stamm-Region und eine große katalytische Domäne festgelegt wird.

2.5 Xylosyltransferasen

Xylosyltransferasen (XT, EC 2.4.2.26) katalysieren den Transfer von aktivierten Xylose-resten auf spezifische Serinreste von *Core*-Proteinen und gehören somit zur Gruppe der Glykosyltransferasen. Die Klassifizierung nach Coutinho [27] ordnet sie mit weiteren Enzymen der Glykosyltransferase-Familie 14 zu.

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind bei höheren Organismen die beiden Isoformen XT-I und XT-II nachgewiesen und bekannt. Beide Enzyme katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden, initialen Schritt bei der posttranslationalen Linkersynthese der Glykosaminoglykane [29-31]. Hierbei wird die Saccharideinheit der UDP-Xylose auf spezifische Serinreste des *Core*-Proteins übertragen. Die von der XT-I xylosylierten Serinreste lassen sich durch die Konsensussequenz a-a-a-a-Gly-Ser-Gly-a-b-a (a = Asp oder Glu, b = Asp, Glu oder Gly) definieren, die durch einen Vergleich von 51 Xylosylierungsstellen aus verschiedensten Proteoglykanen abgeleitet wurde [32]. Der als Akzeptor wirkende Serinrest wird von zwei Glycinresten flankiert und befindet sich in einer sauren Aminosäureumgebung. Die zuvor definierten Minimalmotive Gly-Ser-Gly und Ser-Gly-x-Gly (x = beliebige Aminosäure) stimmen hiermit überein [33, 34].

Die Isoenzyme weisen untereinander eine sehr hohe Ähnlichkeit auf [31]. So ist das pH- und Temperaturoptimum sowie eine Kationenabhängigkeit der Katalyse für beide Enzyme vergleichbar [35] und auch das bisher untersuchte Akzeptorspektrum zeigt

hinsichtlich der Spezifität keine deutlichen Unterschiede [31, 36, 37]. Die Lokalisation im Golgi-Apparat ist ebenfalls ein gemeinsames Merkmal [38]. Deutliche Unterschiede lassen sich in einer spezifischen Gewebeexpression nachweisen [29, 30, 39]. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der bisher untersuchten physikalisch-chemischen Eigenschaften bleibt die Begründung für das Auftreten zweier Isoenzyme in höheren Organismen bisher ungeklärt.

Das 12 Exons umfassende XYLT1-Gen kodiert ein 959 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 108 kDa und das XYLT2-Gen mit 11 Exons ein etwas kleineres Protein mit 865 Aminosäuren und 97 kDa [17]. Die Sequenzhomologie der Aminosäuren beträgt insgesamt etwa 52 %, jedoch sind Bereiche mit über 80 % in der potentiellen katalytischen Domäne nachgewiesen [40]. Beide Enzyme weisen die typische Domänenstruktur der Glykosyltransferasen auf (Abbildung 2.3) und sind somit Typ II Transmembranproteine. Aus einem unbekanntem Grund werden die XT-Isoformen durch einen aktiven Sekretionsprozess als aktive Enzyme zusammen mit Proteoglykanen in den Extrazellularraum sezerniert [41]. Dieser Prozess ermöglicht das Heranziehen der enzymatischen XT-Aktivität im Serum als Biomarker für verschiedene Krankheiten, die mit einer pathologischen Veränderung des PG-Metabolismus einhergehen [17, 41-47].

2.6 Fibrose

Eine Fibrose ist eine pathologische, progressive Veränderung des Bindegewebes die mit einer exzessiven, abnormen Akkumulation von ECM-Komponenten in den betroffenen Organen einhergeht und oftmals das Resultat einer chronischen Entzündung darstellt. Ursächlich ist eine Dysbalance zwischen erhöhter Synthese und reduzierter Degradation von ECM-Komponenten, insbesondere Kollagenen und Proteoglykanen, die dazu führt, dass die Homöostase des Gewebes aus dem Gleichgewicht gerät. Die Folge ist eine Substitution des funktionellen Gewebes durch nicht-elastisches, fibrotisches Gewebe. Durch diesen Prozess werden bei fortschreitender Progression die betroffenen Organe wie Lunge, Herz, Leber, Haut oder Niere in ihrer physiologischen Funktion stark eingeschränkt oder verlieren diese völlig [48].

Findet in einem Gewebe eine Verletzung statt, werden innerhalb kürzester Zeit verschiedene Signalwege aktiviert und die Wundheilung wird eingeleitet. Dabei geht das Gewebe vom ruhenden Zustand in einen aktivierten Zustand über und verschiedenste regulatorische Prozesse laufen ab, an deren Ende im adulten Organismus eine Narbenbildung steht [49]. Findet zu diesem Zeitpunkt keine Herunterregulation der Antwort auf die Verletzung statt, entsteht eine Fibrose, die als pathologische, chronische Form der Wundheilung betrachtet werden kann [50]. Im Mittelpunkt dieses Geschehens

steht der Myofibroblast, der durch Aktivierung von Fibroblasten und anderen Zelltypen entsteht und für die übermäßige Synthese von ECM-Komponenten verantwortlich ist [48]. Ebenfalls gestört ist die strenge Regulation von Enzymen wie Plasmin, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren den *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase* (TIMP) die unter physiologischen Bedingungen das Gleichgewicht zwischen ECM-Synthese und -Degradation aufrechterhalten [51]. Die auftretenden Änderungen in Core-Proteinexpressionen und Veränderungen in Zusammensetzung und Gehalt an Glykosaminoglykanen in fibrotischen Läsionen korrelieren des Weiteren mit der XT-Aktivität als biochemischen Marker für eine gesteigerte Proteoglykansynthese [52]. So konnten bisher erhöhte XT-Aktivitäten bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen wie der Leberfibrose, der systemischen Sklerodermie, fibrotischen Remodellierungen bei dilatativen Kardiomyopathien oder der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose nachgewiesen werden [41, 46, 53, 54]. Bei einer Fibrose kommt es weiterhin zur Sezernierung profibrotischer Cytokine wie Interleukinen oder TGF- β 1 (*transforming growth factor*), Chemokinen, angiogenen Faktoren, Wachstumsfaktoren und weiteren regulatorisch wirkenden Mediatoren [48]. Besonders TGF- β 1 besitzt eine Schlüsselfunktion. Durch seine stimulierende Wirkung auf die Produktion von ECM-Komponenten und seine inhibierenden Effekte auf deren Abbau trägt es maßgeblich zur Pathogenese der Fibrose bei. Die TGF- β 1-Expression ist speziell in den von der Fibrose betroffenen Organen erhöht [55] und bewirkt des Weiteren eine Erhöhung der XT-I-Expression [53]. Für Activin A, einem weiteren Mitglied der TGF- β -Superfamilie, konnte in letzter Zeit ebenfalls eine Bedeutung bei der Wundheilung, Inflammation und Entwicklung einer Fibrose nachgewiesen werden [56]. So gelang beispielsweise die Bestätigung einer erhöhten Konzentration von Activin A in Patienten mit systemischer Sklerodermie [57].

2.7 Diabetes und assoziierte Erkrankungen

Der Diabetes ist eine metabolische Stoffwechselerkrankung und wird klassifiziert in den Diabetes mellitus Typ 1 und den häufiger auftretenden Diabetes mellitus Typ 2. Beide Formen unterscheiden sich voneinander hauptsächlich durch das Alter des Patienten, in dem sich die Krankheit erstmals manifestiert und den zugrundeliegenden Pathomechanismus der Krankheit. So sind an Typ-1-Diabetes erkrankte Personen meist juvenilen Alters, Typ-2-Diabetiker hingegen adulte Personen. Beiden gemeinsam ist jedoch eine erhöhte Blutglukosekonzentration. Diese wird bei Typ-1-Diabetikern durch virus- oder autoimmunverursachte Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas verursacht, so dass ein absoluter Insulinmangel entsteht und die Blutglukosekonzentration durch mangelnde Aufnahme peripherer Zellen steigt. Bei Typ-2-Diabetikern tritt hingegen eine Insulinresistenz der Zellen auf, die zu steigenden Glukose-

konzentrationen im Blutkreislauf führt und zunächst durch die Pankreas durch steigende Insulinausschüttungen kompensiert werden kann. Der Typ-2-Diabetes geht oft einher mit Übergewicht, Hypertonie und Hyperlipidämie [58]. Durch die Diabeteserkrankung leiden viele der Patienten an Spätfolgen und Folgekrankheiten wie Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien, Hepatopathien und Atherosklerose [59].

Die mit Diabetes mellitus assoziierten Hepatopathien standen lange nicht im Fokus der Forschung, jedoch konnten in letzter Zeit Assoziationen zwischen Diabetes mellitus und der nicht-alkoholischen Fettleber (NAFLD), der Leberzirrhose und dem Hepatokarzinom nachgewiesen werden [60-62]. Über strukturelle Änderungen der Proteoglykane der Leber in Diabetes mellitus Erkrankungen ist bislang relativ wenig bekannt, jedoch gibt es vereinzelt Hinweise auf Verminderungen des HS-Sulfatierungsgrads und des HS-Gehalts in tierischen Modellen [63, 64]. Dies ist besonders aus dem Grund interessant, da HS-Proteoglykane an der Internalisierung von Lipoproteinen beteiligt sind [65, 66] und eine Änderung der Struktur die Clearance und Bindung von Lipoproteinen stark einschränkt [64, 67]. In Folge dessen akkumulieren Triglycerid-haltige Lipoproteine und tragen zur Ausbildung der Hyperlipidämie bei, die wiederum in engem Zusammenhang mit der Atherosklerose steht.

Die Atherosklerose ist eine in den Industrieländern weit verbreitete chronische Entzündung der Arterienwände, die einen progressiven Verlauf nimmt. Dabei auftretende Langzeitschäden können zu kardiovaskulären Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall führen. Diese akuten Komplikationen sind als Bestandteil der Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in den Industrienationen [68].

Die Progression der Atherosklerose verläuft über Jahre und wird nach der „*response-to-retention*“ Hypothese durch eine Retention von Lipoproteinen in der Arterienwand der großen und mittelgroßen Arterien initiiert. Zunächst diffundieren LDL (*low density lipoprotein*) oder andere apoB-enhaltende Lipoproteine durch die Endothelzellschicht und binden subendothelial vorwiegend an Proteoglykane der Intima. Die Wechselwirkungen zwischen positiven Ladungen des Lipoproteins (basische Aminosäuren) und negativen Ladungen der GAG-Kette des Proteoglykans (Sulfat- und Carboxylgruppen) sind hierbei ionischer Natur und stellen das kritische, initiale Ereignis der Atherosklerose dar [69, 70]. Besonderer Einfluss bei den Interaktionen wird den Glykosaminoglykanen zugewiesen, die durch Veränderungen der Länge, des Sulfatierungsgrads und -musters eine höhere Affinität zu LDL aufweisen und dieses stärker binden [71]. Während der Retention wird das LDL durch eine Reihe von Prozessen wie Oxidation, Lipolyse und Proteolyse modifiziert und erhält so seinen atherosklerose-auslösenden Charakter. Oxidierte LDL-Moleküle (oxLDL) akkumulieren und lösen eine inflammatorische Antwort aus, bei der T-Zellen und Monozyten rekrutiert werden [68, 69]. Es kommt zu einer erhöhten Expression der *Core-*

Proteine von Biglycan und Versican, wobei speziell das Biglycan mit Apolipoproteinen kolokalisiert vorliegt. Demzufolge wird für die Initiation der Atherosklerose eine wichtige Rolle des Biglycans vermutet [72].

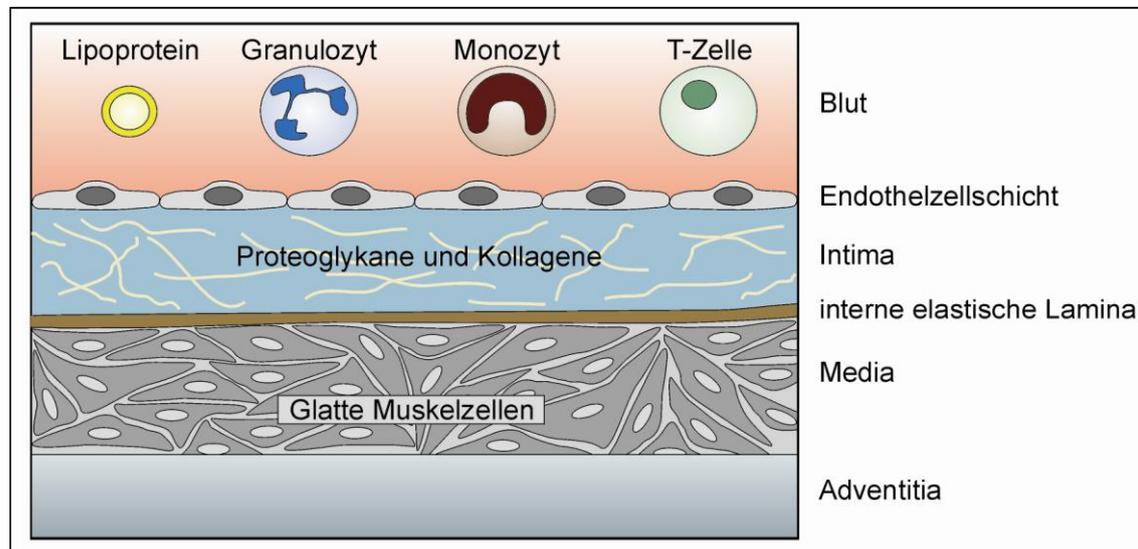


Abbildung 2.4: Struktur einer Arterie im physiologischen Zustand (nach [68]). Arterien sind durch eine Endothelzellschicht vom Blutstrom getrennt und werden aus drei Schichten aufgebaut: der Intima, Media und Adventitia. Die sehr dünne Media besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen und Kollagenen und wird auf der peripheren Seite durch die interne elastische Lamina von der Media abgegrenzt. Die Media wird von glatten Muskelzellen gebildet, während die Adventitia aus Bindegewebe mit vereinzelt Fibroblasten und glatten Muskelzellen besteht.

Die Monozyten differenzieren durch den Einfluss von Cytokinen in der Arterienwand zu Makrophagen, die oxLDL-Partikel über Scavenger-Rezeptoren aufnehmen und sogenannte Schaumzellen bilden, die kennzeichnend für Läsionen im frühen, sowie späten Stadium der Atherosklerose sind. Durch diesen Prozess entstehen zunächst Lipidstreifen („fatty streaks“). Das durch die Makrophagen in Form von oxLDL aufgenommene Cholesterol wird verestert und in Lipidtröpfchen gespeichert, so dass die Schaumzellen sehr hohe Konzentrationen an Cholesterolestern aufweisen. Ein weitaus geringerer Teil der überschüssigen Cholesterolmoleküle wird auf extrazelluläres HDL (*high density lipoprotein*) übertragen und abtransportiert [73]. Während des progressiven Verlaufs akkumulieren zunehmend mehr mit Lipoprotein überladene Schaumzellen und gleichzeitig migrieren glatte Muskelzellen (SMC, *smooth muscle cell*) von der Media in die Intima. Im Subendothel proliferieren die glatten Muskelzellen, akkumulieren und synthetisieren extrazelluläre Komponenten wie Proteoglykane und Kollagene, wodurch eine fibröse Kappe gebildet wird. Im weiteren Verlauf der immunologischen Antwort wächst die fibröse Plaque weiter und es kommt zum Absterben von Schaumzellen, so dass Zelldebris und gespeicherte Lipide freigesetzt werden und in der Läsion ein nekrotischer Kern entsteht [68]. Die Läsion wächst zunächst in Richtung Adventitia, bei erhöhtem Raumbedarf dann jedoch in Richtung Lumen, so dass die Arterie verengt. Diese

progressive Stenose des Gefäßlumens ist in der Regel jedoch nicht ursächlich für akute kardiovaskuläre Ereignisse, sondern vielmehr eine Plaqueruptur mit sich anschließender Thrombose. Durch die bei einer fortgeschrittenen Atherosklerose auftretende Plaqueruptur kommen Komponenten des Gewebes mit denen des Blutes in Kontakt, wodurch die Blutgerinnungskaskade ausgelöst wird, Blutplättchen adhären und eine Thrombose eintritt. Ein Grund für die Instabilität des Plaques sind zum einen eine Kalzifizierung und Neovaskularisation im Subendothel und zum anderen die erhöhte Konzentration von Matrix-Metalloproteinasen, die extrazelluläre Matrixkomponenten degradieren [68, 73].

Es existiert eine Reihe an genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren, die multifaktoriell zur Progression einer Atherosklerose beitragen. Hierzu zählen neben dem Diabetes unter anderem Hyperlipidämie (besonders Hypercholesterinämie), niedriger HDL-Cholesterinspiegel, hohe Lipoprotein(a)-Konzentrationen, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Stress, Übergewicht, mangelnde körperliche Aktivität, hochkalorische Ernährung und Infektionen. Die Therapie der Atherosklerose besteht darin, eine höchst mögliche Anzahl an Risikofaktoren abzubauen. Dazu werden auch verschiedene Medikamente zur Reduktion der Hypertonie oder Statine zur Verringerung der Konzentration von Lipoproteinen eingesetzt [73].

2.8 Gegenstand der Arbeit

Die Xylosyltransferasen I und II katalysieren den Xylostransfer auf spezifische Serinreste von Proteoglykanen und initiieren damit die Glykosaminoglykan-Biosynthese. Somit weisen sie eine zentrale Rolle in der Synthese von Proteoglykanen auf, die wiederum eine Schlüsselrolle in Aufbau und Funktionalität der extrazellulären Matrix einnehmen. Beide Isoformen besitzen eine hohe Strukturhomologie, sind im Golgi-Apparat lokalisiert und zeichnen sich durch gleiche Anforderungen an die Reaktionsbedingungen aus. Ein bisher nachgewiesener deutlicher Unterschied betrifft die Expressionsstärke in verschiedenen Geweben und Zelllinien.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten mögliche Divergenzen in den Akzeptorspezifitäten der XT-Isoformen erstmals an einer Vielzahl potentieller Akzeptorproteine herausgearbeitet werden. Hierzu sollten am Plasmid pGEX-6P-1 gentechnische Veränderungen vorgenommen werden, so dass bei einer späteren Expression ein Fusionsprotein bestehend aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und einer kurzen carboxyterminalen Aminosäuresequenz synthetisiert werden würde. Die inserierten Nukleotide sollten für bekannte oder putative GAG-Bindestellen aus *in vivo* Proteoglykanen kodieren und ein zentrales Kodon für einen Serinrest enthalten. Nach der Expression der Fusionsproteine sollten diese aufgereinigt und die Kinetik der Enzymreaktionen bestimmt werden. Des Weiteren sollte

durch zufällig eingeführte Mutationen in ein Bikunin-Fusionsprotein der Einfluss der sauren Aminosäuren auf die Akzeptorfunktion und die Reaktionskinetiken der XT-Isoformen untersucht werden.

Zur Aufklärung der Beteiligung der Xylosyltransferasen am pathologischen Geschehen einer fibrotischen Erkrankung sollte im Zellkulturmodell eine Induktion von Fibroblasten durch TGF- β 1 und Activin A erfolgen. Hier sollte der Fokus auf der Analyse möglicher Veränderungen in der Expression von ECM-Komponenten wie Xylosyltransferasen, Kollagenen und Proteoglykanen sowie der Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen liegen. In einem weiteren Schritt sollten durch die selektive Herabregulation der XT-Isoformen mittels Transfektion spezifischer siRNA-Oligonukleotide die Auswirkungen einer verminderten XT-Aktivität auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix analysiert werden. Als Schwerpunkt sollten hier potentielle Genexpressionsänderungen von Xylosyltransferasen, Kollagenen und Proteoglykanen sowie Änderungen in der GAG-Zusammensetzung untersucht werden. Im Gegenzug sollte in einem weiteren Experiment der Effekt einer gesteigerten XT-Aktivität unter den gleichen Aspekten näher charakterisiert werden. Hierfür sollten durch Plasmidtransfektion und stabile Selektion XT-überexprimierende Dermalfibroblasten generiert werden.

In einem letzten Projekt sollten die Effekte einer Diabetes-vermittelten Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die Expression von extrazellulären Matrixkomponenten wie Proteoglykane und Kollagene bei vaskulären glatten Muskelzellen und Hepatozyten erfolgen. Im Zellkulturmodell sollte nach Induktion mit Glukose und Insulin insbesondere der Einfluss von Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die Expression und Aktivität der Xylosyltransferasen überprüft werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der XT-Akzeptorspezifität

Um mögliche Divergenzen in den Akzeptorspezifitäten der beiden XT-Isoformen zu untersuchen, wurde eine Vielzahl diverser potentieller Akzeptorproteine hergestellt. Diese wurden exprimiert, aufgereinigt und als Substrate im radiochemischen XT-Aktivitätstest jeweils mit XT-I oder XT-II als katalysierendem Enzym eingesetzt. Die Stoffmengen der auf den Akzeptor transferierten, radioaktiv markierten Xylose wurden erfasst und daraus die Reaktionskinetiken der Katalyse bestimmt.

3.1.1 Ermittlung der Reaktionskinetiken eines XT-vermittelten Xylosetransfers auf GAG-Bindestellen aus *in vivo* Proteoglykanen

Zur Untersuchung der Akzeptorspezifitäten der XT-Isoformen wurde das Plasmid pGEX-6P-1 verwendet, das für die Glutathion-S-Transferase (GST) und β -Lactamase kodiert. Die *Multiple Cloning Site* (MCS) befindet sich am 3'-Ende der GST-Sequenz, so dass bei einer späteren Expression ein Fusionsprotein aus GST und C-terminal ligierter Sequenz exprimiert wird.

Das Ziel waren Klonierungen von Fusionsproteinen aus GST und bekannten oder putativen Xylosylierungsstellen. Nach Auswahl verschiedener Proteoglykansequenzen, die *in vivo* GAG-Ketten tragen und so zum Akzeptorspektrum der XT zählen, wurden komplementäre Oligonukleotide mit EcoRI- und XhoI-Überhängen synthetisiert. Diese kodierten für 10 bis 13 Aminosäuren mit einem zentralen Serinrest und enthielten am Sequenzende ein Stop-Codon. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert und in EcoRI/XhoI-restringiertes pGEX-6P-1-Plasmid ligiert. Nach einer Transformation von *E. coli* BL21DE3 wurden die Klone auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektioniert und mittels PCR (Verwendung der Oligonukleotide pGEX_5 und pGEX_3) und Auftrennung im Agarosegel die Größe der PCR-Produkte ermittelt. Entsprachen diese den berechneten Größen, erfolgte eine Sequenzierung zur Verifizierung der Produkte und ihrer Sequenz. Auf diese Weise konnten Plasmide für 30 potentielle Akzeptorproteine generiert werden (siehe auch [74]).

Zur Expression der Fusionsproteine wurden transformierte *E. coli* BL21DE3 Klone in der Wachstumsphase mit IPTG induziert und 4 h inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend gewaschen, lysiert und aus dem gewonnenen Lysat das Fusionsprotein durch

Affinitätschromatographie mit dem *GST-Bind Kit* von Novagen aufgereinigt. Nach einer Dialyse der Proteinlösung wurden die Konzentrationen der Fusionsproteine bestimmt.

Um die Kinetiken der Xylosylierungsreaktion isoenzymspezifisch ermitteln zu können, mussten die XT-Enzyme jeweils isoliert vorliegen. Dies gelang durch Verwendung von CHO pgsA-745-Zellen. Bei dieser Zelllinie liegt ein Defekt in der GAG-Biosynthese vor, der durch Mutationen in der genomischen DNA verursacht wird und in dessen Folge keine XT-Isoformen exprimiert werden können [75]. Die XT-Aktivität der Zellen konnte durch Komplementierung mit einem XT-I- bzw. XT-II-Plasmid wiederhergestellt werden [29]. Die Zellen wurden kultiviert und der Zellkulturüberstand mit den sekretierten XT-Isoformen 10-fach aufkonzentriert.

Zur Berechnung der Enzymkinetiken wurden die Fusionsproteinlösungen in je acht Konzentrationen in Dreifachbestimmungen mit rekombinanter XT-I oder XT-II für 4 h inkubiert. Die Menge der auf den Akzeptor transferierten, radioaktiv markierten Xylose wurde ermittelt und daraus die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Der Quotient aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit wurde in einem Hanes-Woolf-Diagramm gegen die Substratkonzentration aufgetragen.

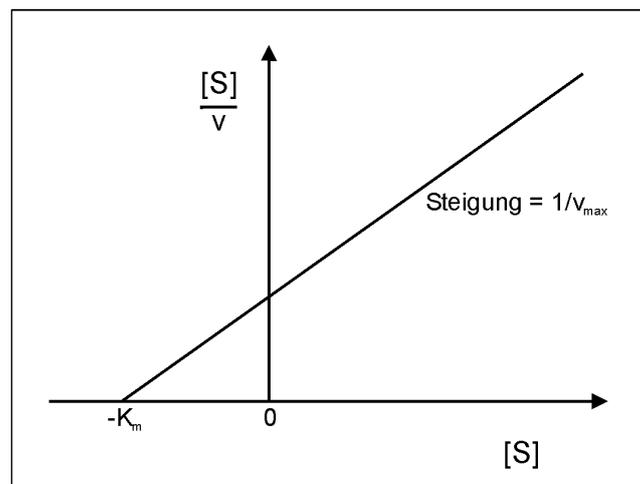


Abbildung 3.1: Hanes-Woolf-Diagramm zur Ermittlung von Enzymkinetiken. Der Quotient aus Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit ($[S]/v$) wird gegen die Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen. Der negative Wert des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse entspricht dem K_m -Wert und die Steigung der Geraden dem reziproken Wert für die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion (v_{\max}).

Der K_m -Wert ergibt sich aus dem negativen Wert des Schnittpunktes der Geraden mit der Abszisse und die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion v_{\max} aus dem reziproken Wert der Geradensteigung.

Die Akzeptorproteine wurden anhand ihrer Anzahl an GSG-Motiven in drei Gruppen eingeteilt (Tabelle 3.1). Proteoglykane der ersten Gruppe enthielten ein GSG-Motiv und waren gute Akzeptormoleküle für beide XT-Isoformen. Aggrecan und L-APP bildeten eine

Tabelle 3.1: Peptidsequenzen der GST-Fusionsproteine und Werte der Reaktionskinetiken.

Protein	Peptidsequenz, sowie Anzahl der AS konsistent mit der Konsensussequenz	K _m XT-I (95 % KI) [µM]	K _m XT-II (95 % KI) [µM]	v _{max} XT-I (95 % KI) [pmol/h]	v _{max} XT-II (95 % KI) [pmol/h]
Konsensussequenz	aaaa GS Gaba				
Syndecan-1	FSDNFS GS GAGAL	5 19,8 (16,1-24,6)	7,4 (5,6-9,6)	86,3 (75,6-100,4)	5,3 (4,7-6,0)
Aggrecan	EFGDFT GS GDVSG	5 18,8 (14,6-24,9)	sgx	17,1 (14,5-20,8)	<0,5
Syndecan-4	DDFELS GS GLDD	6 3,5 (1,8-5,7)	14,1 (10,0-20,4)	50,9 (44,1-60,2)	12,5 (10,2-16,1)
Neuroglycan C	FVTA EAGS GDAQA	5 23,6 (18,7-30,4)	3,2 (2,0-4,6)	57,8 (49,4-69,6)	2,5 (2,3-2,8)
Thrombomodulin	FDGGD SGS GEPP	5 18,2 (15,1-22,2)	2,9 (2,5-3,4)	209,0 (185,2-239,8)	24,7 (23,8-25,7)
Perlecan_3	PEFGDL SGS DFQ	5 18,7 (14,5-24,8)	9,4 (7,6-11,6)	132,2 (111,9-161,8)	23,0 (20,7-25,9)
Testican-2	FFSGDE SGS GVGWED	5 10,3 (8,0-13,3)	8,2 (5,0-13,0)	56,1 (49,7-64,4)	6,3 (5,2-8,0)
Versican-β	FIPIT EGS GEAEE	6 14,6 (12,6-16,9)	12,7 (10,2-15,9)	100,2 (91,7-110,3)	54,4 (48,0-62,8)
Serglycin	EEFDY SGS GFSGS	6 11,1 (9,4-13,1)	2,3 (1,9-2,8)	74,2 (68,1-81,6)	7,8 (7,5-8,1)
Syndecan (D. m.)	DDDS IEGS GGR	5 17,8 (15,4-20,7)	12,2 (9,8-15,1)	105,2 (95,8-116,7)	12,0 (10,7-13,7)
Perlecan_2	EFGDDL SGS DLG	6 14,5 (10,4-20,8)	10,2 (8,5-12,2)	105,5 (86,0-136,6)	43,1 (39,0-48,1)
bFGF	EFPE DGSG A'FP	5 13,7 (11,6-16,2)	9,3 (6,9-12,4)	114,7 (103,8-128,2)	13,1 (11,3-15,6)
L-APLP2	EFSE NEGS MAEQ	6 13,4 (10,7-17,0)	10,4 (8,9-12,3)	145,5 (128,3-168,0)	59,9 (55,2-65,5)
L-APP	EFT ENEGS GLTNI	5 13,1 (9,9-17,8)	sgx	14,6 (12,4-18,0)	<0,5
Bamacan	FQDE GEGS GESER	8 22,2 (18,6-27,0)	17,9 (14,3-22,6)	190,1 (168,5-218,1)	132,9 (115,8-156,0)
Bikunin	EFQ EEEGS GGQLV	7 27,4 (20,3-38,9)	46,3 (29,8-88,3)	297,2 (239,6-391,1)	405,8 (281,9-724,1)
SPACRCAN	DGGL SGSG QKVD	gx	>10.000	<0,5	<0,5
Agrin	FEC SGSGS GDG	gx	sgx	<0,5	<0,5
Glypican-1	EFDD SGSGS DGC	17,1 (14,6-20,1)	10,9 (8,5-14,1)	92,3 (83,6-102,8)	12,6 (11,0-14,6)
Kollagen α2(IX)	FIQ LEGS ADFLC	4 3,4 (0,2-12,0)	>10.000	2,0 (1,4-3,4)	<0,5
Epiphycan_2	FPRL DGSS PQEP	4 >10.000	>10.000	<0,5	<0,5
Brevican	FESE ETGSS R'CAP	5 sgx	>10.000	<0,5	<0,5
Perlecan_1	PEFAD SI SGDDL'G	5 13,3 (9,1-19,8)	>10.000	4,1 (3,3-5,3)	<0,5
Biglycan	EEAS GADT SGVLD	4 9,7 (7,2-13,2)	sgx	24,4 (20,9-29,5)	<0,5
Betaglycan_1	FPAL GDSS GWPDG	4 20,8 (15,6-28,3)	>10.000	5,4 (4,5-6,7)	<0,5
Phosphacan	EFGA EDSS GSSPAT	4 16,6 (9,8-30,3)	sgx	3,7 (2,7-5,6)	<0,5
CD44	FTDD DVSS GSSE	5 14,6 (10,9-19,9)	>10.000	11,8 (10,0-14,4)	<0,5
Betaglycan_2	FGY EDLES GDNGF	5 sgx	>10.000	<0,5	<0,5
Versican-α	FTE EEVFS G'MKLS	4 sgx	>10.000	<0,5	<0,5
Epiphycan_1	FIAT VMP SGNREL	3 >10.000	>10.000	<0,5	<0,5

Die Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen, Darstellungsweisen und Gruppeneinteilungen finden sich auf der nächsten Seite unten.

Ausnahme, da hier nur eine geringe Substratumsetzung mit XT-II als Enzym detektiert werden konnte. Die Reaktionskinetiken ergaben ähnliche K_m - und v_{max} -Werte für XT-I- und XT-II-katalysierte Reaktionen mit im Allgemeinen niedrigeren Werten bei einer XT-II-vermittelten Katalyse.

SPACRCAN, Agrin und Glypican-1 besitzen zwei oder drei kumulierte GSG-Motive und wurden in die zweite Gruppe an untersuchten PG-Sequenzen eingeordnet. Glypican-1 zeigte hier die besten Akzeptoreigenschaften mit K_m -Werten von 17,1 μM und 10,9 μM für XT-I- bzw. XT-II-katalysierte Xylosylierungen. Eine enzymatische Reaktion mit XT-II lieferte kein Produkt mit SPACRCAN und nur sehr geringe Mengen an xylosyliertem Agrin, mit XT-I hingegen konnten K_m -Werte zwischen 100 und 1000 μM detektiert werden.

Die 3. Gruppe an Proteoglykansequenzen zeichnete sich durch das Fehlen eines GSG-Motivs aus und wies stattdessen ein GSx- oder xSG-Motiv auf. Von den drei untersuchten Fusionsproteinen mit einem GSx-Motiv war Kollagen $\alpha 2(\text{IX})$ mit einem K_m -Wert von 3,4 μM für XT-I der beste Akzeptor. Für Brevican und Epiphycan_2 konnten nur geringe Mengen bzw. gar kein Produkt nachgewiesen werden. Bei einer XT-II-vermittelten Katalyse fand bei keinem der drei Proteine ein Substratumsatz statt.

Bei Fusionsproteinen mit einem xSG-Motiv konnten unterschiedliche Substrateigenschaften detektiert werden. K_m -Werte mit XT-I als katalysierendem Enzym lagen zwischen 9,7 und 20,8 μM . Betaglycan_2 und Versican- α wurden nur in sehr geringem Maße und Epiphycan_1 überhaupt nicht xylosyliert. Im Vergleich der Gruppen 1 und 3 waren die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der Substratumsetzung bei den Proteoglykansequenzen der Gruppe 3 deutlich kleiner. Bei einer Katalyse durch XT-II fand bei keinem der Substrate, außer bei Biglycan und Phosphacan, eine Xylosylierung statt. Obwohl einige Peptide gefunden wurden, die exklusive Substrate der XT-I waren, war hier die maximale Reaktionsgeschwindigkeit so gering, dass nur schwach radioaktive Signale im XT-Aktivitätstest detektiert werden konnten.

Erläuterungen zu Tabelle 3.1: AS-Sequenzen der PG der 1. Gruppe enthalten ein, die der 2. Gruppe zwei oder mehr und die der 3. Gruppe kein GSG-Motiv. Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen sind schwarz hervorgehoben und xylosylierbare Serinreste durch eine höhere Schriftstärke kenntlich gemacht. Grau hervorgehobene Aminosäuren sind vektorkodiert und kein Bestandteil des nativen PG. Die Fusionsproteine enden mit der letzten dargestellten Aminosäure. Für einige Peptide konnten durch zu geringe Mengen an xylosylierten Produkten keine K_m -Werte bestimmt werden. Hier wurde diskriminiert zwischen K_m -Werten im Bereich von 100-1000 μM (gx) und Peptiden mit einer sehr geringen Menge an Xylosylierungsprodukt (sgx). Für Peptide mit einem K_m -Wert über 10.000 μM konnte kein Produkt detektiert werden. (a = Asp/Glu, b = Asp/Glu/Gly, D. m. = Drosophila melanogaster; KI = Konfidenzintervall, gx = geringer Xylosylierungsgrad, sgx = sehr geringer Xylosylierungsgrad)

3.1.2 Auswirkungen von Mutationen des Bikunin-Fusionsproteins auf Reaktionskinetiken einer XT-vermittelten Katalyse

Zur weiteren Untersuchung der XT-Akzeptorspezifitäten in Abhängigkeit zur Sequenz wurden in der Bikuninsequenz des pGEX-6P-1-Fusionsplasmids an verschiedenen Positionen zufällige Mutationen eingefügt. Bikunin wurde ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt bekannt war, dass es von beiden XT-Isoformen sehr gut als Akzeptorprotein erkannt wird und im Bereich der Xylosylierungsstelle eine hohe Übereinstimmung mit der Konsensussequenz aufwies. Die Nukleotide wurden in einer vorigen Arbeit [74] durch Verwendung von *Wobble*-Basen enthaltenden Oligonukleotiden und dem *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) mutiert. Die Mutationen umfassten jeweils drei Codons im Bereich der Xylosylierungsstelle (2.) und amino- (1.) bzw. carboxyterminal (3.) zum Serinrest.

1. QEEEGSGGGQLV
2. QEEEGSGGGQLV
3. QEEEGSGGGQLV

Die Mutationen der generierten 54 Plasmide wurden durch Sequenzierung charakterisiert, exprimiert, die Expressionsprodukte aufgereinigt und die isoenzymspezifische Kinetik der Katalyse mittels Hanes-Woolf-Diagramm bestimmt (siehe 3.1.1).

Bei der Mutagenese aminoterminal zum spezifischen Serinrest konnten 12 Klone generiert werden (Tabelle 3.2, Gruppe 1). Die K_m - und v_{max} -Werte des Fusionsproteins von Klon 1.1 mit einer E(-4)K-Mutation waren vergleichbar mit den Werten der Wildtypsequenz (WT) des Bikunins. Bei einer Mutation aller sauren Aminosäuren zu nicht-basischen AS, wie bei den Peptiden 1.2 und 1.3, fand keine Xylosylierung durch XT-II mehr statt. Diese Peptide waren jedoch gute Substrate für die XT-I und wiesen vergleichbare K_m -Werte wie bei der WT-Sequenz auf, unterschieden sich jedoch deutlich durch geringere Maximalgeschwindigkeiten. Bei einem Austausch aller sauren Glutamatreste und gleichzeitigem Vorkommen einer basischen AS an der (-4)-, (-3)- oder (-2)-Position (Peptide 1.4-1.10) wurden diese von der XT-II nicht mehr und von der XT-I nur noch in sehr geringem Maße xylosyliert. Bei einer Erhöhung der Anzahl an basischen Aminosäuren (Peptide 1.11 und 1.12) ging die Akzeptorfunktion der Proteine vollständig verloren.

Weitere Mutationen wurden im GSGG-Motiv des Bikunins eingeführt (Gruppe 2). Die Reaktionskinetiken des enzymatischen Transfers von Xylose auf die Fusionsproteine der 34 Klone wurden ermittelt. Die G(-1)S-Mutation (Peptid 2.1) zeigte geringere Auswirkungen als die G(-1)R-Mutation des Peptids 2.2. Das Fusionsprotein 2.1 war ein Substrat für beide XT-Isoformen, Peptid 2.2 jedoch nur für die XT-I. Die K_m -Werte für eine XT-I-vermittelte Reaktion waren hierbei für beide Proteine gleich, aber der v_{max} -Wert

Tabelle 3.2: Peptidsequenzen der GST-Fusionsproteine und Werte der Reaktionskinetiken.

Protein	Peptidsequenz	Anzahl (Position) der basischen AS	K _m XT-I (95 % KI) [μM]	K _m XT-II (95 % KI) [μM]	v _{max} XT-I (95 % KI) [pmol/h]	v _{max} XT-II (95 % KI) [pmol/h]
WT	QEEEGSGGGQLV	-	27,4 (20,3-38,9)	46,2 (29,8-88,3)	297,2 (239,6-391,1)	405,8 (281,9-724,1)
1.1	QKEEGSGGGQLV	1 (-4)	20,0 (15,9-25,9)	35,6 (26,6-50,7)	134,2 (114,8-161,6)	179,2 (142,7-240,8)
1.2	QLTTGSGGGQLV	-	31,8 (25,1-41,6)	>10.000	12,6 (10,5-15,6)	<0,5
1.3	QPQIGSGGGQLV	-	65,6 (45,2-109,6)	>10.000	28,8 (21,0-45,6)	<0,5
1.4	QKLOGSGGGQLV	1 (-4)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.5	QTKQSGSGGGQLV	1 (-3)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.6	QPRI GSGGGQLV	1 (-3)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.7	QTRQSGSGGGQLV	1 (-3)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.8	QLRPGSGGGQLV	1 (-3)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.9	QIQRGSGGGQLV	1 (-2)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.10	QTIRGSGGGQLV	1 (-2)	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
1.11	QKIRGSGGGQLV	2 (-4, -2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
1.12	QRRKGSGGGQLV	3 (-4, -3, -2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.1	QEEESSGGGQLV	-	10,3 (8,3-12,9)	8,5 (6,6-11,1)	119,3 (106,7-135,3)	28,5 (25,3-32,7)
2.2	QEEERSGGGQLV	1 (-1)	9,9 (7,5-13,1)	>10.000	3,7 (3,2-4,3)	<0,5
2.3	QEE-GSSGGQLV	-	12,3 (9,7-15,7)	sgx	10,5 (9,3-12,2)	<0,5
2.4	QEEEGSSGGQLV	-	15,3 (11,8-19,9)	sgx	25,2 (21,7-30,0)	<0,5
2.5	QEEEGSCGGQLV	-	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
2.6	QEEEGSRGGQLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.7	QEEESSGRGQLV	1 (+2)	24,3 (18,9-32,1)	sgx	30,1 (25,4-36,9)	<0,5
2.8	QEE-GSGRGQLV	1 (+2)	20,5 (16,9-25,4)	6,4 (5,5-7,4)	79,1 (69,2-92,3)	27,4 (25,9-29,1)
2.9	QEEEGSSCGQLV	-	13,3 (10,4-17,1)	sgx	12,8 (11,2-15,0)	<0,5
2.10	QEEEGSTSLV	-	28,8 (23,8-35,5)	sgx	27,0 (23,5-31,7)	<0,5
2.11	QEEEGSIMLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.12	QEEEGSRCGQLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.13	QEEEGSRALV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.14	QEEEGSRLLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.15	QEE-GSRRGQLV	2 (+1, +2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.16	QEEECSCGGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.17	QEEERSSGGQLV	2 (-1, +1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.18	QEE-SSRGGQLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.19	QEEESSSGGQLV	-	sgx	>10.000	<0,5	<0,5
2.20	QEEECRSRSGQLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.21	QEEECSTFGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5

Tabelle 3.2: Peptidsequenzen der GST-Fusionsproteine und Werte der Reaktionskinetiken (Fortsetzung).

Protein	Peptidsequenz	Anzahl (Position) der basischen AS	K_m XT-I (95 % KI) [μ M]	K_m XT-II (95 % KI) [μ M]	v_{max} XT-I (95 % KI) [pmol/h]	v_{max} XT-II (95 % KI) [pmol/h]
WT	QEEEGSGGGQLV	-	27,4 (20,3-38,9)	46,2 (29,8-88,3)	297,2 (239,6-391,1)	405,8 (281,9-724,1)
2.22	QEEEC S NCGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.23	QEEEF S LLGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.24	QEEENS T PGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.25	QEEER S CRGQLV	2 (-1, +2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.26	QEEER S RCGQLV	2 (-1, +1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.27	QEEER S RS G QLV	2 (-1, +1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.28	QEEER S SRGQLV	2 (-1, +2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.29	QEEES S CRGQLV	1 (+2)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.30	QEEES S RS G QLV	1 (+1)	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.31	QEEET S PCGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.32	QEEET S ICGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.33	QEEEY S CCGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
2.34	QEEEG T GGGQLV	-	>10.000	>10.000	<0,5	<0,5
3.1	QEEEGSG C GQLV	-	15,1 (12,5-18,4)	22,7 (17,0-31,4)	81,4 (72,5-92,8)	123,0 (101,3-156,8)
3.2	QEEEGSGG R SVLV	1 (+3)	25,1 (20,9-30,8)	15,0 (13,3-17,1)	134,6 (118,1-156,4)	44,9 (41,7-48,6)
3.3	QEEEGSGH N MLV	-	12,5 (10,6-14,8)	7,7 (6,7-8,9)	120,0 (109,2-133,0)	68,9 (64,7-73,7)
3.4	QEEEGSG S LALV	-	19,9 (15,4-26,1)	9,3 (7,9-11,0)	224,3 (191,6-207,8)	89,7 (83,2-97,4)
3.5	QEEEGSG C YKLV	1 (+4)	30,1 (24,4-38,2)	21,5 (18,1-25,8)	154,4 (132,5-185,0)	94,8 (84,8-107,5)
3.6	QEEEGSG C RVLV	1 (+3)	54,3 (40,2-79,1)	50,8 (40,7-65,9)	191,8 (149,8-266,4)	194,4 (161,8-241,3)
3.7	QEEEGSG R HLLV	1 (+2)	57,2 (41,1-88,4)	24,2 (20,5-29,1)	140,9 (106,6-207,8)	17,0 (15,0-19,5)
3.8	QEEEGSG R RALV	2 (+2, +3)	58,6 (41,3-94,2)	13,7 (10,8-17,6)	82,7 (61,5-126,4)	15,8 (13,8-18,6)

Bei den AS-Sequenzen des Bikunins der 1. Gruppe wurden Mutationen aminoterminal zum spezifischen Serinrest eingeführt, in Gruppe 2 sind die Mutationen im Bereich der Xylosylierungsstelle und in Gruppe 3 wurden die Aminosäuren carboxyterminal zum spezifischen Serinrest mutiert. Durch Mutationen veränderte Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben und basische Aminosäuren durch eine höhere Schriftstärke kenntlich gemacht. Die Fusionsproteine enden mit der letzten dargestellten Aminosäure. Für einige Peptide konnten keine K_m -Werte bestimmt werden, da die Mengen an xylosyliertem Produkt zu gering waren (sgx). Für Peptide mit einem K_m -Wert über 10.000 μ M konnte kein Produkt detektiert werden. (KI = Konfidenzintervall, sgx = sehr geringer Xylosylierungsgrad)

war bei der G(-1)R-Mutation deutlich kleiner. Bei einzelnen Punktmutationen an der (+1)-Position konnten bei einem Austausch des Glycins gegen Serin gute Akzeptorfunktionen für XT-I, aber nicht für XT-II, detektiert werden (Peptid 2.4). Die Akzeptorfunktion reduzierte sich drastisch bei einem Austausch gegen Cystein (Peptid 2.5) und war bei der G(+1)R-Mutation des Proteins 2.6 nicht mehr nachweisbar. Der einzige Unterschied zwischen den Expressionsprodukten der Klone 2.3 und 2.4 lag in der Anzahl der Glutamatreste aminoterminal zum GSG-Motiv. Eine Reduktion dieser Anzahl an Resten von drei auf zwei bewirkte keine starke Änderung der Reaktionskinetiken, da nur ein leichter Abfall des v_{\max} -Wertes beobachtet werden konnte. Der K_m -Wert für eine XT-I-katalysierte Reaktion war bei den Peptiden 2.7 und 2.8 mit einem GG(-1,+2)SR und einem EG(-2,+2)del,R Austausch vergleichbar, allerdings war Peptid 2.8 das deutlich bessere Substrat bei der XT-II-katalysierten Reaktion. Traten die Mutationen an der (+1)- und der (+2)-Position auf (Proteine 2.9-2.15) ging die Akzeptorfunktion für beide Isoformen verloren. Ausnahmen waren die Peptide 2.9 und 2.10 mit einer GG(+1,+2)SC und einer GG(+1,+2)TS-Mutation, die von der XT-I, jedoch nicht der XT-II, als Akzeptoren erkannt wurden. Innerhalb der herbeigeführten Mutationen an der (-1)- und der (+1)-Position (Peptide 2.16-2.19) war das Expressionsprodukt des Klons 2.19 mit einer GG(-1,+1)SS-Mutation das Einzige, bei dem eine geringe Xylosylierung durch XT-I nachweisbar war. Keines dieser Fusionsproteine war ein Akzeptor für die XT-II. Wurden alle Glycinreste (Peptide 2.10-2.33) oder der Serin- gegen einen Threoninrest (Peptid 2.34) ausgetauscht, ging die Funktion als XT-Substrat verloren.

Alle Fusionsproteine der acht Klone zusammengefasst in Gruppe 3 mit Mutationen carboxyterminal zum GSG-Motiv waren Substrate beider XT-Isoformen. Die K_m -Werte variierten leicht, lagen jedoch in einem ähnlichen Bereich wie der K_m -Wert des WT-Bikunins. Die Werte für die Reaktionskinetiken der XT-II-vermittelten Katalyse waren im Allgemeinen etwas niedriger als die der XT-I.

3.2 Mechanismen der Fibrose und Rolle der Xylosyltransferasen in fibrotischen Erkrankungen

Bei fibrotischen Erkrankungen findet eine Akkumulation von ECM-Komponenten in den betroffenen Organen statt. Die vorwiegend abgelagerten Substanzen sind Kollagene und Proteoglykane, die zu einer Substitution des funktionellen durch fibrotisches Gewebe führen und letztendlich in einer Reduktion der Organfunktion resultieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von TGF- β 1 und Activin A auf die Remodellierung der ECM von Dermalfibroblasten mit unterschiedlichen Kultivierungsmethoden und verschiedenen Zeiträumen untersucht. Durch die Initiation der Proteoglykanbiosynthese durch Xylosyltransferasen, nehmen diese eine Schlüsselrolle in der Proteoglykansynthese ein, so dass des Weiteren der Einfluss einer gesteigerten sowie reduzierten XT-Aktivität auf die Zusammensetzung der ECM von Fibroblasten analysiert wurde.

3.2.1 Zwei- und dreidimensionale Kultivierung von dermalen Fibroblasten

Dermale Fibroblasten wurden konventionell als monozelluläre Schicht (2D-Kultivierung) und dreidimensional zur besseren Simulation des *in vivo* vorliegenden Zustands in einer Kollagenmatrix (3D-Kultivierung) kultiviert. Zwischen den beiden Kultivierungsmethoden waren eindeutige Unterschiede in der Morphologie der Zellen erkennbar (Abbildung 3.2).

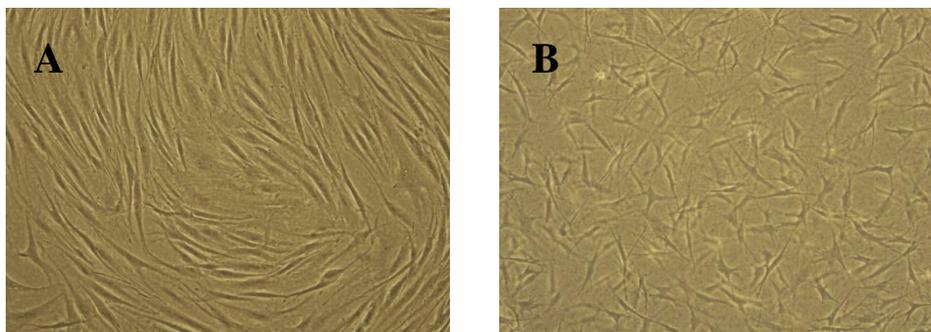


Abbildung 3.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von dermalen Fibroblasten. Die Zellen wurden konventionell als zweidimensionale monozelluläre Schicht (A) und in einer Kollagenmatrix dreidimensional kultiviert (B).

Bei einer konventionellen zweidimensionalen Kultivierung wuchsen die Zellen nahe beieinander und bildeten parallele Strukturen zueinander aus. In der dreidimensionalen Kultivierung waren die in einer Kollagenmatrix eingebetteten Fibroblasten zueinander deutlich diffuser angeordnet und zeigten eine ausgeprägte spindelförmige und verzweigtere Struktur. Die Zellen wuchsen in unterschiedlichen Ebenen und waren so dreidimensional von anderen Zellen umgeben.

3.2.2 Behandlung dermaler Fibroblasten mit TGF- β 1

TGF- β 1 ist eines der Schlüsselcytokine bei fibrotischen Erkrankungen, da es sowohl aktivierend auf die Synthese von ECM-Komponenten wirkt, als auch inhibitorische Eigenschaften auf deren Abbau aufweist und so maßgeblich die Pathogenese der Fibrose beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Untersuchung der Effekte von TGF- β 1 auf die Expression von Xylosyltransferasen und die Zusammensetzung der ECM von Dermalfibroblasten.

3.2.2.1 Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach Induktion mit TGF- β 1

Zur Analyse der relativen Expression von XT-Isoformen, Proteoglykanen und Kollagenen wurden 250.000 Zellen der Dermalfibroblastzelllinien M56D (männlicher Spender, siehe auch 6.3) und F42A (weibliche Spenderin) zweidimensional und 500.000 Zellen dreidimensional in 6-Kavitäten-Schalen ausgesät und über einen Zeitraum von 48 h mit 5 ng/mL TGF- β 1 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, die mRNA isoliert und revers transkribiert.

Bei konventionell kultivierten Zellen beeinflusste TGF- β 1 die relative Expression der Mehrzahl an untersuchten Genen (Abbildung 3.3).

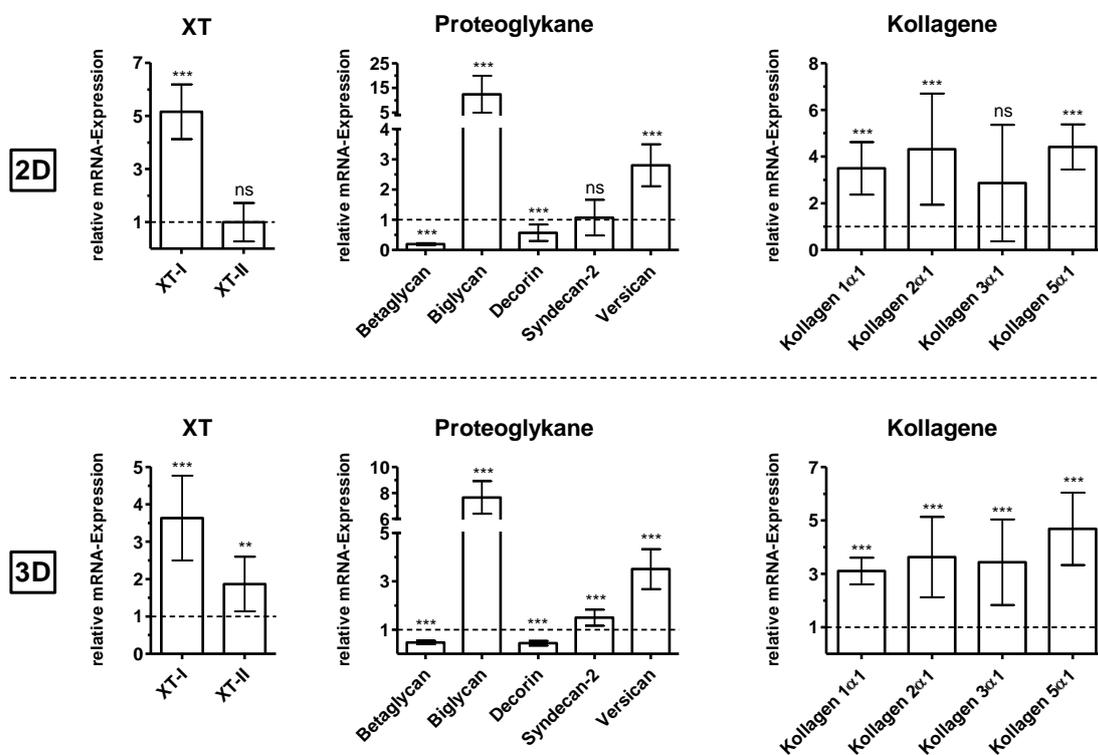


Abbildung 3.3: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über einen Zeitraum von 48 h. Die Genexpression nach Cytokinzugabe wurde relativ zur Expression un behandelter Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die XT-I-Expression stieg in der 2D-Kultur auf das 5,2-fache ($\pm 1,0$) und bei den untersuchten Proteoglykanen war ein Anstieg bei Biglycan um das 12,4-fache ($\pm 7,4$) sowie bei Versican um das 2,8-fache ($\pm 0,7$) zu verzeichnen. Die relative Expression sank bei Betaglycan um 80,7 % und bei Decorin um 42,9 % unter TGF- β 1-Einfluss. Eine zwischen dem 3,5- und 4,4-fach erhöhte Transkriptmenge war für die Kollagene 1 α 1, 2 α 1 und 5 α 1 nachweisbar. Keine Änderungen in der relativen Genexpression traten bei XT-II, Syndecan-2 und Kollagen 3 α 1 auf.

Die Veränderungen der Genexpression nach TGF- β 1-Zugabe verhielten sich in der zwei- und dreidimensionalen Kultivierung ähnlich, jedoch konnten signifikante Unterschiede in der relativen XT-II-, Syndecan-2- und Kollagen 3 α 1-Expression detektiert werden. Bei einem dreidimensionalen Wachstum der Zellen stieg die Expression der XT-II auf das $1,9 \pm 0,7$ -fache, bei Syndecan-2 auf das $1,5 \pm 0,3$ -fache und bei Kollagen 3 α 1 auf das $3,4 \pm 1,6$ -fache an. Bei einer 2D-Kultivierung traten hingegen keine signifikanten Änderungen auf.

Analog erfolgte eine Kultivierung von dermalen Fibroblasten mit 5 ng/mL TGF- β 1 über einen Zeitraum von 96 h. Die Effekte, die TGF- β 1 auf die relative Genexpression verschiedener ECM-Komponenten über den längeren Zeitraum hatte (Abbildung 3.4), waren äquivalent zu den Auswirkungen, die sich nach 48 h zeigten.

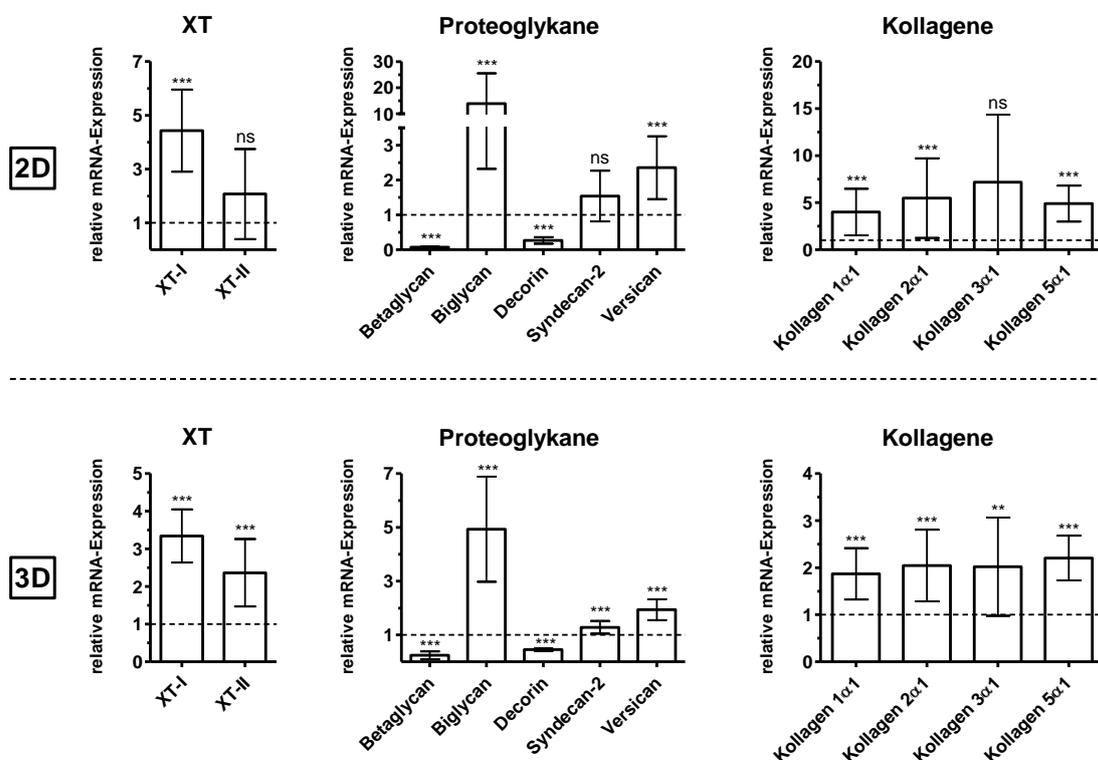


Abbildung 3.4: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über einen Zeitraum von 96 h. Die Genexpression nach Cytokinzugabe wurde relativ zur Expression un behandelter Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Bei der XT-II-, Syndecan-2- und Kollagen 3 α 1-mRNA-Menge waren in der konventionellen Kultivierung keine Veränderungen erkennbar. Die mRNA der XT-I wurde um das 4,4-fache ($\pm 1,5$), die mRNA von Biglycan um das 13,9-fache ($\pm 11,6$) und die mRNA von Versican um das 2,4-fache ($\pm 0,9$) stärker translatiert. Die ebenfalls untersuchten relativen Genexpressionen von Betaglycan und Decorin sanken auf $0,07 \pm 0,01$ beziehungsweise auf $0,3 \pm 0,1$. Bei den untersuchten Kollagenen 1 α 1, 2 α 1 und 5 α 1 wurde ein Anstieg um das 4,0- bis 5,5-fache nachgewiesen.

Die Inkubation der Fibroblasten mit TGF- β 1 über 96 h zeigte bei der Genexpressionsanalyse die gleichen Unterschiede zwischen zwei- und dreidimensionaler Kultivierung wie zuvor bei der 48-stündigen Inkubationszeit festgestellt. Auch hier waren Hochregulationen der XT-II-Expression um den Faktor $2,4 \pm 0,9$, der Syndecan-2-Expression um einen Faktor von $1,3 \pm 0,2$ und bei der Kollagen 3 α 1-Expression eine Verdopplung der mRNA-Menge ($2,0 \pm 1,0$) detektierbar.

3.2.2.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Induktion mit TGF- β 1

Durch den aktiven Sekretionsprozess der XT-Isoformen ist es möglich die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand von kultivierten Zellen unter Verwendung des radiochemischen XT-Aktivitätstest zu messen und damit zu prüfen, ob die gesteigerte XT-Transkriptmenge auch auf Translationsebene zu einer Steigerung der Enzymmenge führt. Die XT-Aktivität ist proportional zur Enzymkonzentration und demzufolge sollte eine gesteigerte XT-Expression mit einer gesteigerten XT-Aktivität korrelieren.

Die Enzymaktivität im Zellkulturüberstand stieg nach Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 über 48 h in der zweidimensionalen Kultivierung um das 3,8-fache auf $409,4 \pm 63,3$ dpm/ μ g_{DNA} an (Abbildung 3.5). Auch bei einer Kultivierung in einer Kollagenmatrix wurde ein Anstieg auf $235,4 \pm 45,5$ dpm/ μ g_{DNA} detektiert, jedoch fiel dieser mit einer Änderung um das 2,5-fache etwas geringer aus.

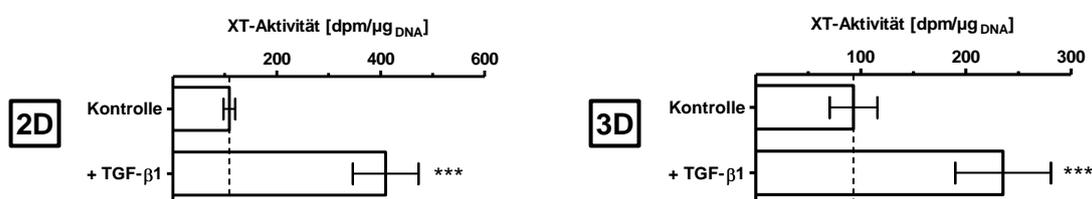


Abbildung 3.5: XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Behandlung von dermalen Fibroblasten mit 5 ng/mL TGF- β 1 über einen Zeitraum von 48 h. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (***) = $p < 0,001$.

Bei einer Kultivierung über 96 h ergab die Messung der XT-Aktivität im ZKÜ einen deutlich signifikanten Anstieg um das 4,9-fache von 107,5 auf 525,0 dpm/ μg_{DNA} ($\pm 32,7/\pm 114,0$) bei konventioneller Kultivierung und um das 1,8-fache von 220,9 auf 394,0 dpm/ μg_{DNA} ($\pm 50,7/\pm 34,0$) im 3D-Modell (Abbildung 3.6).

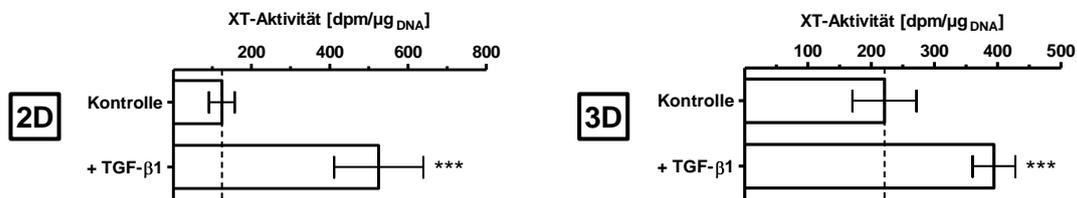


Abbildung 3.6: XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Behandlung von dermalen Fibroblasten mit 5 ng/mL TGF- β 1 über einen Zeitraum von 96 h. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (***) = $p < 0,001$).

3.2.2.3 Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit TGF- β 1

Um potentielle Änderungen der GAG-Komposition, als Endprodukte der posttranslationalen Proteoglykanbiosynthese, unter TGF- β 1-Einfluss zu untersuchen, wurden die Glykosaminoglykane des Zellysats isoliert, die Disaccharide verdaut, derivatisiert und nach chromatographischer Auftrennung mittels *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) quantifiziert.

In Abbildung 3.7 sind die dominant synthetisierten Disaccharide der HS- und CS-Klasse sowie Hyaluronsäure nach einer Inkubation mit 5 ng/mL TGF- β 1 für 48 h dargestellt. Eine Auflistung aller Disaccharide und deren statistische Auswertung der Veränderungen sind im Anhang (Tabelle 12.1) zu finden.

In der zwei- sowie dreidimensionalen Kultivierung humaner Dermalfibroblasten zeigte sich bei der Analyse der HS-Disaccharide ein signifikanter Anstieg des N-sulfatierten Heparansulfats (NOS) und des Heparan-0-sulfats (OS) nach TGF- β 1-Induktion. Ebenso stieg die Gesamtmenge an Heparansulfat (HS_{ges}). Die Menge an Disacchariden der Hyaluronsäure (HA) stieg ebenfalls tendenziell, wenn auch nicht immer signifikant. Bei der Zusammensetzung der CS-Disaccharide konnten für die Menge des Chondroitin-0-sulfats (OS) bei den in einer Kollagenmatrix gewachsenen Fibroblasten als auch bei konventionell kultivierten Zellen keine Änderungen detektiert werden. Es waren erhöhte Mengen an Chondroitin-4-sulfat (4S) und Chondroitin-6-sulfat (6S) nachweisbar, so dass sich insgesamt ein erhöhter Gehalt an CS-Disacchariden nach Cytokinzugabe darstellte.

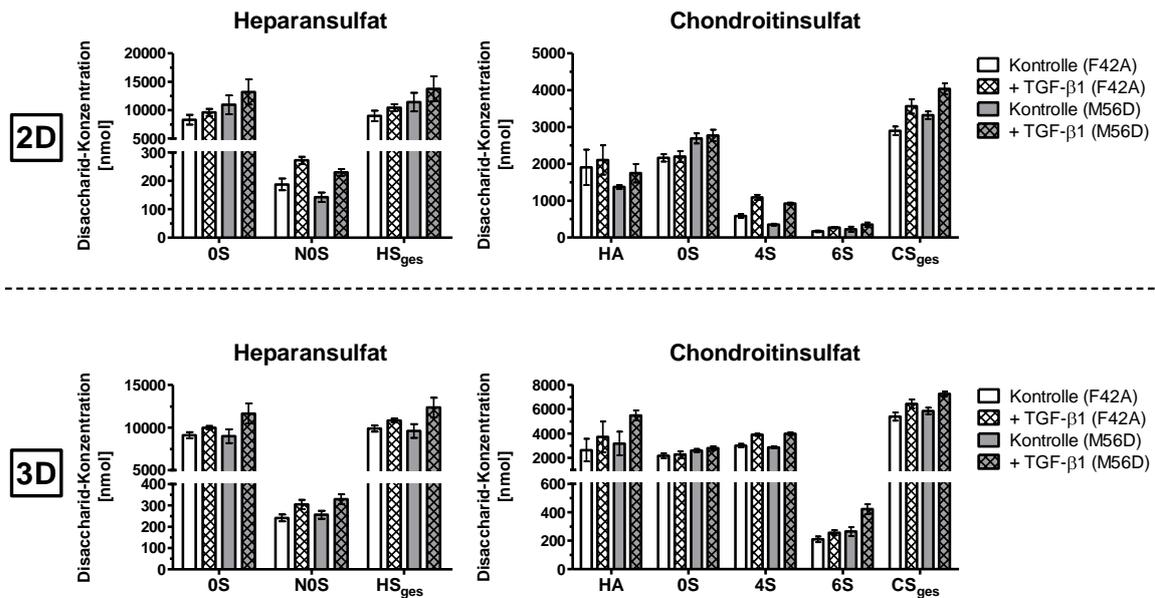


Abbildung 3.7: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zelllysate von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 48 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Die Auswertung der GAG-Zusammensetzung des Zelllysats nach einer Inkubation mit 5 ng/mL TGF- β 1 für 96 h ist in Abbildung 3.8 zusammengefasst. Die detailliertere, tabellarische Auflistung aller Disaccharide kann im Anhang unter der Tabelle 12.2 nachgeschlagen werden.

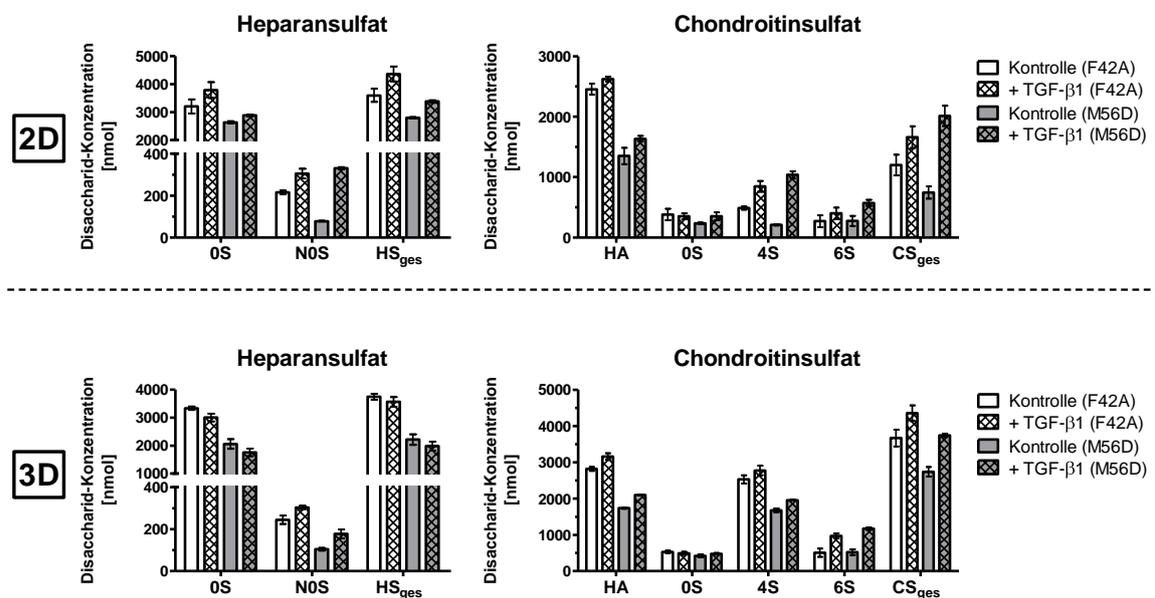


Abbildung 3.8: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zelllysate von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Die Analyse der zellulären GAG-Zusammensetzung zweidimensional kultivierter Dermal-fibroblasten nach TGF- β 1-Zugabe ergab für die einzelnen HS-Disaccharide und die HS-Gesamtmenge einen erhöhten Disaccharidgehalt. Bei dreidimensional kultivierten Zellen hingegen sank die Δ di-0S_{HS}-Menge, die Stoffmenge des Δ di-monoN0S_{HS}-Disaccharids erhöhte sich, wie in der 2D-Kultur gezeigt, und insgesamt konnte für die Gesamtmenge an Heparansulfaten ein konstanter Gehalt quantifiziert werden. Unabhängig von der Art der Kultivierung stiegen die Disaccharideinheiten der Hyaluronsäure, die Mengen des Δ di-mono4S_{CS}- und Δ di-mono6S_{CS}-Disaccharids sowie die Gesamtmenge an Chondroitinsulfat. Der Gehalt an unsulfatiertem Chondroitinsulfat blieb weitestgehend konstant, jedoch zeigte die Stoffmenge von M56D-Zellen in der 2D-Kultur eine leichte Hochregulation.

3.2.2.4 Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit TGF- β 1

Die ins Medium sezernierten Proteoglykane von unbehandelten und TGF- β 1-induzierten dermalen Fibroblasten wurden ebenfalls auf Unterschiede in der GAG-Zusammensetzung nach chromatographischer Auftrennung mittels HPLC untersucht. Die detaillierten Ergebnisse der Quantifizierung nach 48-stündiger Inkubation mit 5 ng/mL TGF- β 1 sind in Tabelle 12.3 im Anhang aufgelistet.

Bei der Auswertung der Konzentration der dominant synthetisierten HS-Disaccharide im ZKÜ konnten für Heparan-0-sulfat, N-sulfatiertes Heparansulfat und die Gesamtmenge an HS-Disacchariden von Zellen des männlichen Spenders sowohl in der 2D- als auch in der 3D-Kultivierung ein konstanter Gehalt nach Cytokinzugabe nachgewiesen werden (Abbildung 3.9). Auffällig waren die im Vergleich zu M56D-Zellen deutlich geringeren Stoffmengen bei allen isolierten HS-Disacchariden aus F42A-Zellen. Diese zeigten ebenfalls eine unveränderte Δ di-monoN0S_{HS}-Menge in beiden Kultivierungsmethoden. Die Stoffmengen des Δ di-0S_{HS}-Disaccharids und die Gesamtmenge an HS-Disacchariden hingegen sanken bei einer konventionellen Kultivierung und zeigten keine Änderungen in der 2D-Kultur. Der Gehalt an HA-Disacchariden zeigte nach Cytokinzugabe unabhängig vom Zelltyp eine meist signifikante Hochregulation. Eine Mengenanalyse der CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand ergab keine durch TGF- β 1 hervorgerufene signifikante Änderung des Δ di-0S_{CS}-Disaccharids. Die Stoffmengen des Δ di-mono4S_{CS} stiegen tendenziell und die des Δ di-mono6S_{CS} zeigten, bis auf eine Verminderung bei F42A-Zellen in der Kollagenmatrix, keine Änderungen. Es wurde ein Anstieg der Gesamtmenge an CS-Disacchariden bei Zellen der weiblichen Spenderin und konventioneller Kultivierung detektiert. Alle weiteren Änderungen waren, zum Teil auch wegen der hohen Fehlerabweichung bei M56D-Zellen, nicht signifikant.

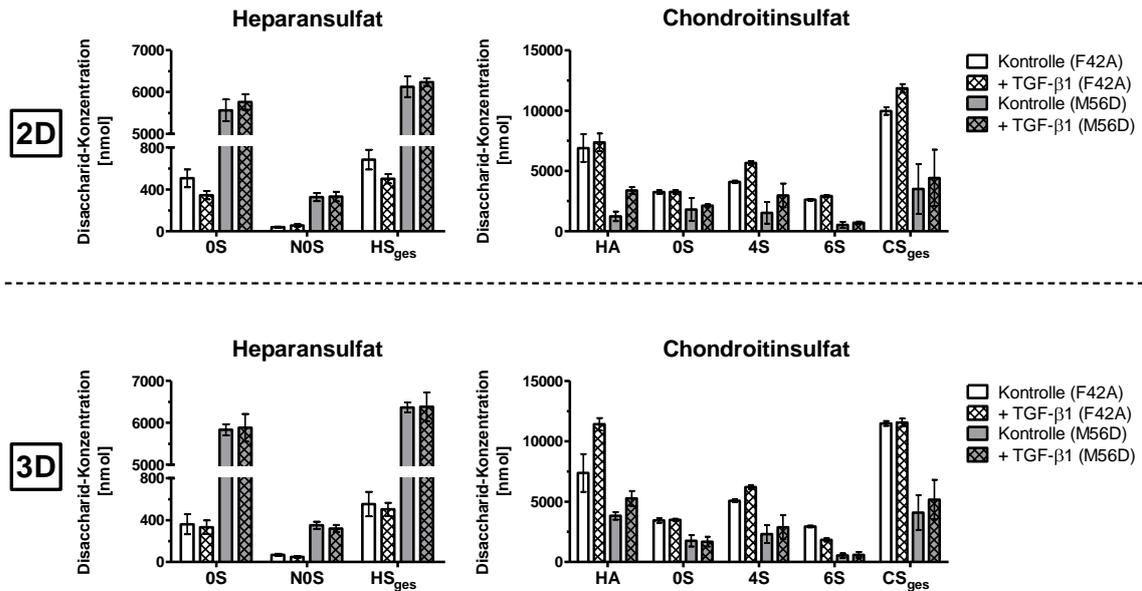


Abbildung 3.9: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF-β1 über 48 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Die graphische Zusammenfassung der dominant synthetisierten Disaccharide nach 96-stündiger TGF-β1-Inkubation ist Abbildung 3.10 zu entnehmen und die ausführlichen Ergebnisse der GAG-Quantifizierung sind in Tabelle 12.4 angehängt. HS-Disaccharide zeigten, bis auf einen Anstieg der Δ di-monoNOS_{HS}-Stoffmenge bei in einem *Monolayer* kultivierten M56D-Zellen, keine signifikanten Änderungen nach TGF-β1-Supplementierung.

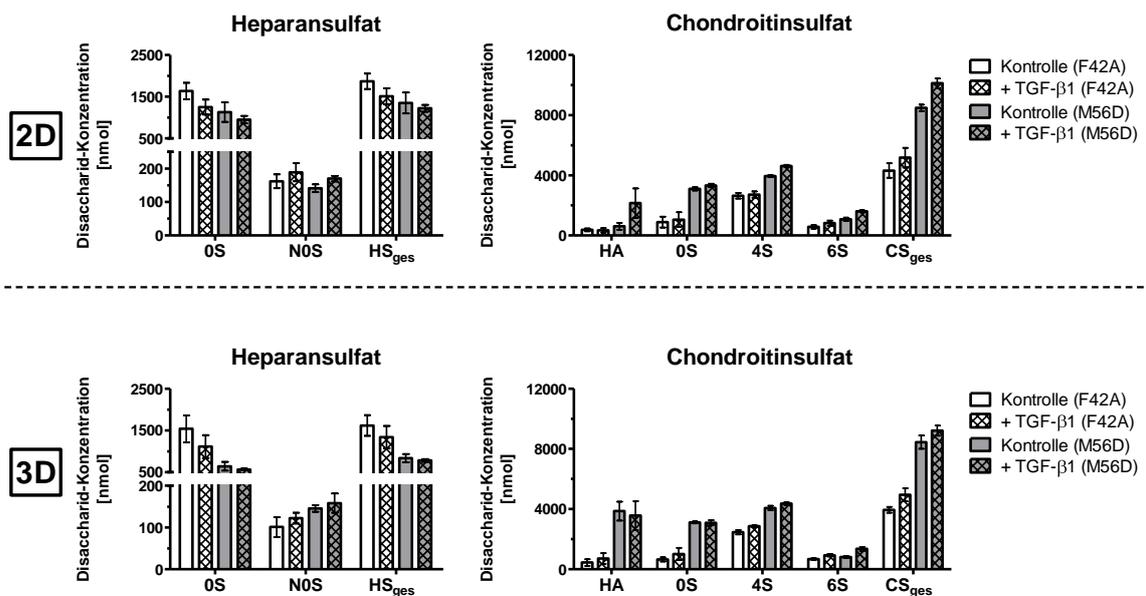


Abbildung 3.10: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF-β1 über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Bei der Stoffmenge des von der Hyaluronsäure abstammenden Disaccharids $\Delta\text{di-0S}_{\text{HA}}$ konnte nur ein Anstieg bei M56D-Zellen in der 2D-Kultur detektiert werden. Die Quantifizierung der CS-Disaccharide ergab einen Stoffmengenanstieg des $\Delta\text{di-mono4S}_{\text{CS}}$ - und $\Delta\text{di-mono6S}_{\text{CS}}$ -Disaccharids sowie der CS-Gesamtmenge. Das $\Delta\text{di-0S}_{\text{CS}}$ -Disaccharid zeigte nach TGF- β 1-Zugabe weitestgehend keine Änderungen, lediglich bei M56D-Zellen konnte bei konventioneller Kultivierung ein Anstieg nachgewiesen werden.

3.2.3 Behandlung dermalen Fibroblasten mit Activin A

Activin A ist wie TGF- β 1 ein weiteres Mitglied der TGF- β -Superfamilie. In den vergangenen Jahren konnte neben seiner bekannten Rolle in der Freisetzung des Follikelstimulierenden Hormons durch die Hypophyse eine Beteiligung an fibrotischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Durch die Analyse der Auswirkungen einer Induktion mit Activin A auf die Expression und Zusammensetzung der ECM dermalen Fibroblasten sollte der Einfluss dieses Cytokins auf fibrotische Remodellierungen und die Expression der XT-Isoformen in dieser Arbeit näher untersucht werden.

3.2.3.1 Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach Induktion mit Activin A

Die Kultivierung der Dermalfibroblasten F42A und M56D erfolgte analog zur Induktion mit TGF- β 1 (siehe 3.2.2.1) mit 250.000 Zellen in der 2D- und 500.000 Zellen in der 3D-Kultivierung in einer 6-Kavitäten-Schale. Es wurde über einen Zeitraum von 96 h mit 50 ng/mL Activin A inkubiert, bevor die Zellen geerntet wurden und eine reverse Transkription der isolierten mRNA erfolgte.

Die Änderungen, die der Einfluss von 50 ng/mL Activin A auf die Expression von ECM-Komponenten der Dermalfibroblasten hatte, waren vergleichbar mit den Effekten von TGF- β 1 (vergleiche Expressionsanalyse unter 3.2.2.1). Die Ergebnisse der relativen Genexpressionsanalyse nach Supplementierung mit Activin A sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Es konnte bei der Kultivierung einer monozellulären Schicht an Fibroblasten ein deutlich signifikanter Anstieg der XT-I-Expression auf einen $3,8 \pm 2,2$ -fach erhöhten Wert nach Supplementierung mit Activin A nachgewiesen werden. Die XT-II-Expression wurde im Gegensatz dazu nicht durch Activin A beeinflusst und blieb auf einem konstanten Niveau. Die untersuchten Proteoglykane zeigten zum einen eine Verringerung der Expression von Betaglycan und Decorin um etwa die Hälfte, sowie zum anderen einen Anstieg der mRNA-Transkripte bei Biglycan um das 15,4-fache ($\pm 10,1$), bei Syndecan-2 um das 2,4-fache ($\pm 0,7$) und bei Versican um das 3,2-fache ($\pm 2,4$). Die relativen Expressionen der untersuchten Kollagene waren alle in einem Bereich um das 4,8- bis 8,4-fache erhöht.

Zwischen den beiden Kultivierungsmethoden waren keine bedeutenden Unterschiede erkennbar und die Änderungen in den Genexpressionen entsprachen jeweils dem gleichen Muster.

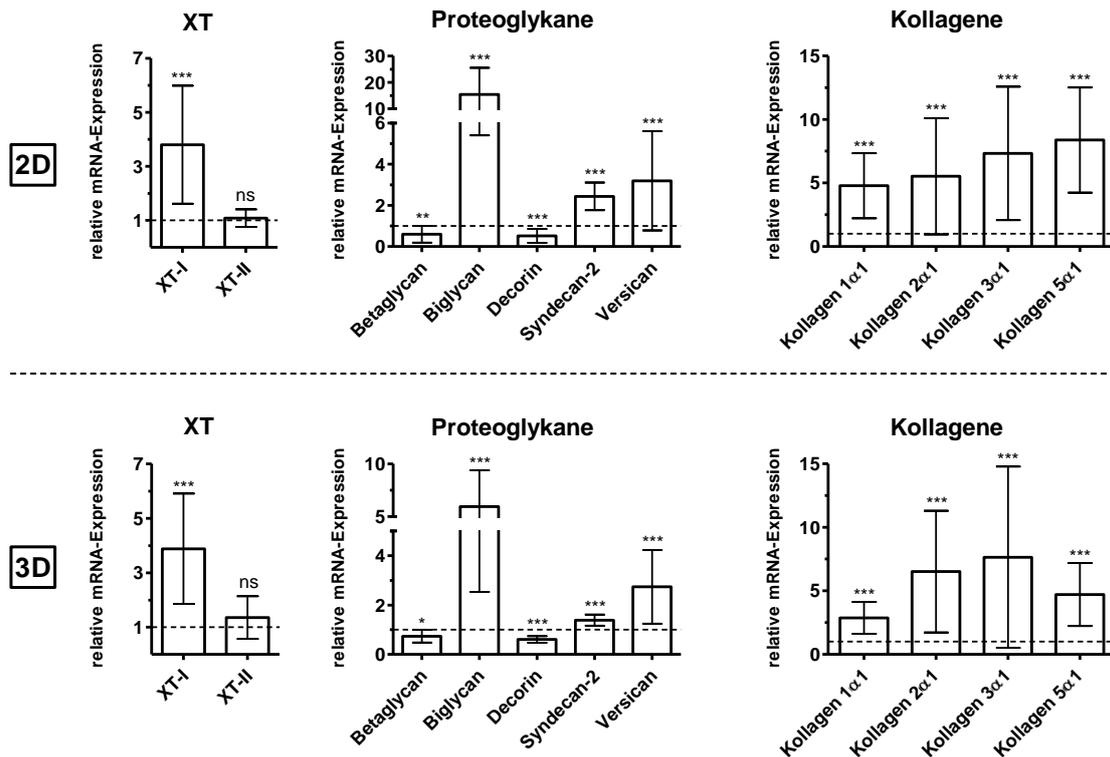


Abbildung 3.11: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach Zugabe von 50 ng/mL Activin A über einen Zeitraum von 96 h. Die Genexpression nach Cytokinzugabe wurde relativ zur Expression unbehandelter Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2.3.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Induktion mit Activin A

Um potentielle Änderungen in der Konzentration der Xylosyltransferasen auf Proteinebene zu untersuchen, wurde nach Induktion mit Activin A die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt.

Es zeigte sich bei einer zweidimensionalen Kultivierung ein Anstieg der XT-Aktivität um 23,6 % auf $227,5 \pm 30,0$ dpm/ μ g_{DNA} (Abbildung 3.12). Bei einer dreidimensionalen Kultivierung mit Activin A konnte eine Erhöhung der XT-Aktivität auf einen Wert von $217,4 \pm 35,5$ dpm/ μ g_{DNA} nachgewiesen werden, was fast einer Verdopplung entsprach.

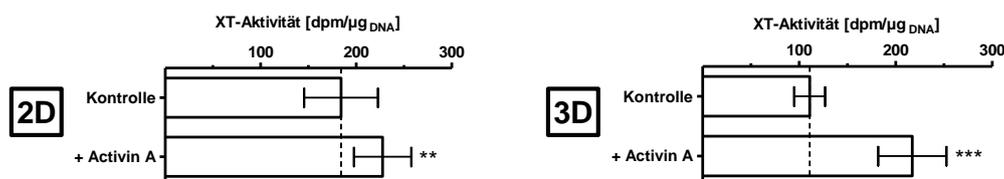


Abbildung 3.12: XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach Behandlung von dermalen Fibroblasten mit 50 ng/mL Activin A über einen Zeitraum von 96 h. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Doppelbestimmung (** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2.3.3 Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit Activin A

Nach Kultivierung der Dermalfibroblasten mit 50 ng/mL Activin A für 96 h erfolgte eine chromatographische Auftrennung und Quantifizierung der Disaccharideinheiten der GAG-Ketten als Endprodukte der PG-Biosynthese aus dem Zelllysate mittels HPLC. Die ausführlichen Ergebnisse sind im Anhang unter Tabelle 12.5 aufgelistet.

Bei der Zusammensetzung der dominant synthetisierten Heparansulfate zeigte sich nach Induktion mit Activin A kein einheitliches Quantifizierungsergebnis zwischen den verwendeten Zelltypen und den Kultivierungsmethoden (Abbildung 3.13). Bei konventioneller Kultivierung sanken die Δ di-0S_{HA}- und die HS_{ges}-Stoffmengen bei F42A-Zellen, zeigten jedoch keine Änderung bei M56D-Zellen. Beiden gemeinsam war eine Erhöhung der Δ di-monoNOS_{HS}-Stoffmenge. Wurde eine Kollagenmatrix verwendet, blieb der Gehalt der untersuchten Disaccharide im Einzelnen und in der Gesamtheit bei F42A-Zellen konstant und stieg bei M56D-Zellen teilweise signifikant an. Von der Hyaluronsäure stammende Δ di-0S_{HA}-Disaccharide ließen bei beiden Kultivierungsmethoden eine Zunahme der Konzentration erkennen. Eine Zugabe von 50 ng/mL Activin A zu Zellen der weiblichen Spenderin führte zu keinen Veränderungen der quantifizierten CS-Disaccharide. Bei M56D-Zellen hingegen zeigte sich im 3D-Modell bei allen Disacchariden sowie der CS-Gesamtmenge eine Stoffmengen Zunahme. Diese trat in der konventionellen Kultivierung in dieser Form nicht auf, da hier nur ein Anstieg des Δ di-mono4S_{CS}-Disaccharids detektiert wurde.

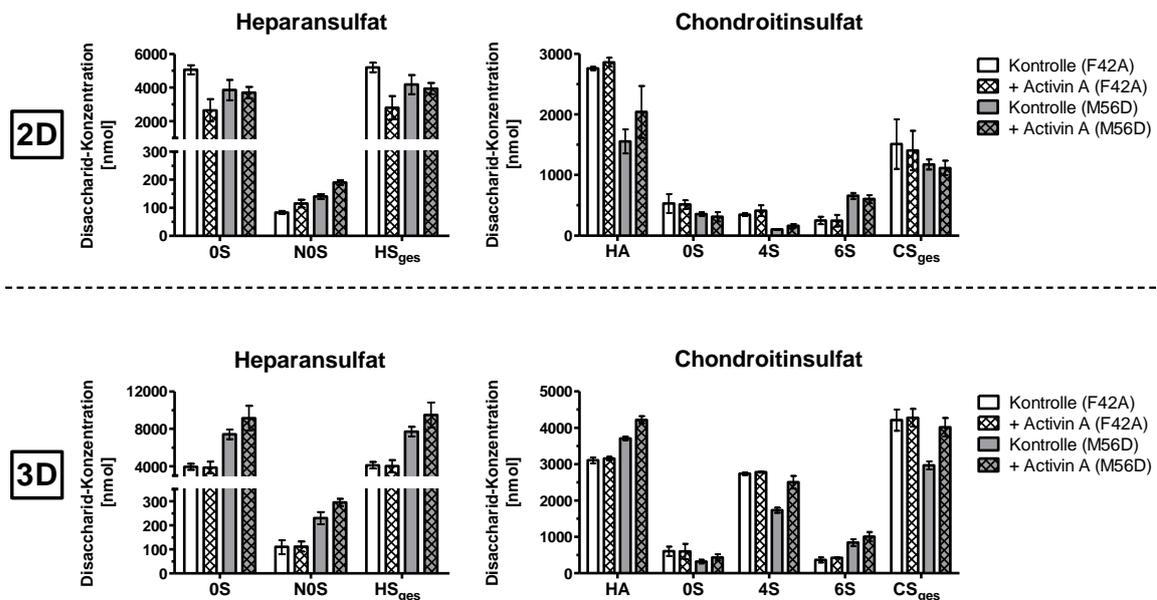


Abbildung 3.13: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zelllysate von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 50 ng/mL Activin A über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

3.2.3.4 Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach Induktion mit Activin A

Ebenfalls analysiert wurde die GAG-Zusammensetzung von Fibroblasten sekretierter Proteoglykane nach Induktion mit 50 ng/mL Activin A. Im Folgenden werden nur die am stärksten synthetisierten Disaccharideinheiten dargestellt. Weitere Quantifizierungsergebnisse und statistische Auswertungen sind in Tabelle 12.5 im Anhang zu finden.

Die Untersuchung der GAG-Zusammensetzung von sekretierten Proteoglykanen im 2D-Modell ergab für alle HS-Disaccharide und die Gesamtmenge an Heparansulfat eine konstante Konzentration nach Zugabe von Activin A (Abbildung 3.14). Die einzige Ausnahme bildete das Δ di-monoNOS_{HS}-Disaccharid bei F42A-Zellen mit einer Abnahme des Gehalts. Bei Verwendung einer Kollagenmatrix traten zelltypspezifische Unterschiede auf. Bei F42A-Zellen sanken die Δ di-0S_{HS}- und HS_{ges}-Stoffmengen bei gleichbleibendem Δ di-monoNOS_{HS}-Gehalt, bei M56D-Zellen hingegen stagnierte die Δ di-0S_{HS}- und HS_{ges}-Stoffmenge und der Δ di-monoNOS_{HS}-Gehalt sank nach Zugabe von Activin A. Bei Disacchariden der Hyaluronsäure konnte bei F42A-Zellen eine Abnahme und bei M56D-Zellen eine Zunahme bei zweidimensionaler Kultivierung festgestellt werden, die sich in der 3D-Kultur revers darstellte. Bei der Zusammensetzung der CS-GAG wurde für Δ di-0S_{CS} eine singuläre Erhöhung der Stoffmenge bei einer 3D-Kultivierung von F42A-Zellen und ein konstanter Δ di-mono4S_{CS}-Gehalt detektiert. Das Δ di-mono6S_{CS}-Disaccharid zeigte bei Zellen der weiblichen Spenderin keine Änderung, bei M56D-Zellen jedoch eine leichte Zunahme der Stoffmenge. Die Gesamtmenge an CS stieg bei F42A-Zellen nur im 3D-Modell, bei M56D-Zellen hingegen unabhängig von der Kultivierungsmethode.

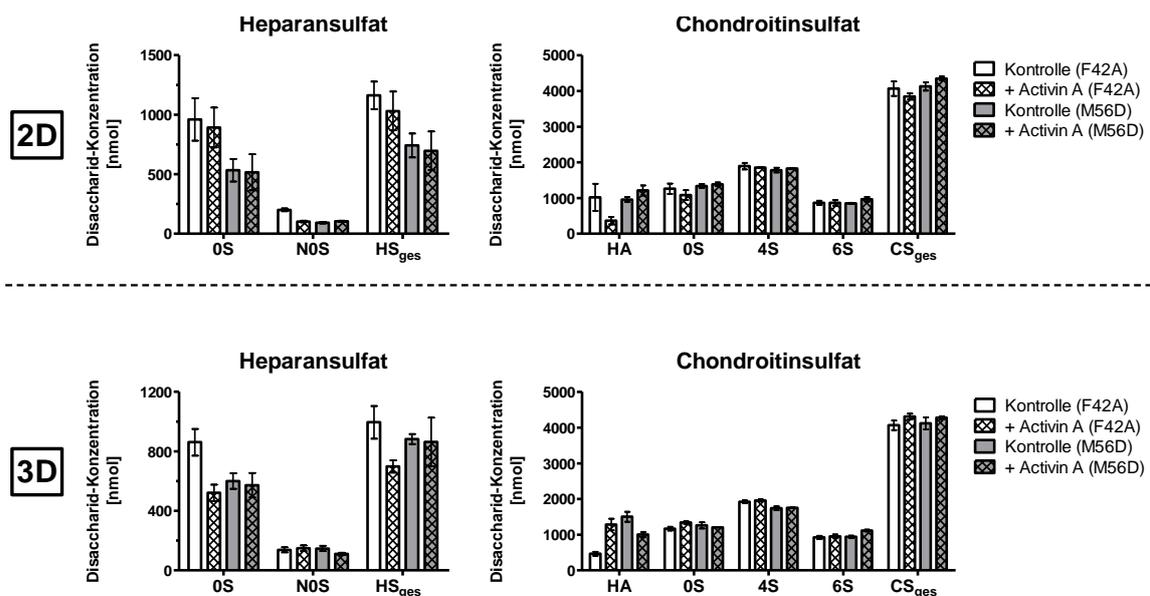


Abbildung 3.14: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 50 ng/mL Activin A über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

3.2.4 Reduktion der XT-I-Expression in dermalen Fibroblasten

Zur Untersuchung der Effekte einer reduzierten XT-Aktivität auf die Expression von Proteoglykanen und Kollagenen sowie den Gehalt an Glykosaminoglykanen, wurde die XT-I-Expression mittels siRNA-Oligonukleotiden herabreguliert.

3.2.4.1 Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-I-Knockdown

Zur Herabregulation der XT-I-Expression wurden 300.000 dermale Fibroblasten in einer 6-Kavitäten-Schale mit spezifisch an XYLT1-mRNA-bindender siRNA (siXT-I) transfiziert. Bei Kontrollzellen wurde eine Transfektion mit Kontroll-siRNA (siNK) zum Ausschluss unspezifischer Effekte durchgeführt. Es wurde 96 h inkubiert, wobei nach den ersten 24 h in das Medium einiger Kavitäten zusätzlich 5 ng/mL TGF- β 1 gegeben wurde.

Bei der anschließenden Analyse der relativen Expression konnte die spezifische Herunterregulation der XT-I-mRNA bestätigt werden (Abbildung 3.15). Diese sank bei gleichbleibender XT-II-Expression um 86,8% auf einen Wert von $0,13 \pm 0,1$. Die Untersuchung der Transkriptmengen aller weiteren Gene ergab nur bei Decorin ($33,6 \pm 25,4$ %) und Kollagen 3 α 1 ($61,1 \pm 36,0$ %) eine Reduktion der mRNA-Konzentration hervorgerufen durch eine verminderte XT-I-Expression. Die Mehrheit der analysierten Genexpressionen blieb unbeeinflusst.

Auch die Untersuchung der Auswirkungen einer TGF- β 1-Zugabe zeigte keine großen Unterschiede zwischen Dermalfibroblasten mit physiologischer und reduzierter XT-I-Expression. Die einzigen Unterschiede wurden bei den Genexpressionen von XT-I und Betaglycan nachgewiesen. Bei cytokininduzierten XT-I-Knockdown-Zellen stieg die relative XT-I-Expression auf das 1,3-fache ($\pm 1,2$) und erreichte damit etwa die physiologische XT-I-mRNA-Menge, die bei unbehandelten Kontrollzellen gemessen wurde, blieb jedoch unter der Transkriptmenge der induzierten Kontrollfibroblasten ($3,3 \pm 2,3$). Bei Betaglycan war der herunterregulierende Einfluss des Cytokins auf die Expression bei verminderter mRNA-Konzentration der XT-I ($0,4 \pm 0,08$) weniger effektiv als bei Kontrollzellen ($0,3 \pm 0,05$).

Auch nach Transfektion zeigten die Fibroblasten die typischen durch TGF- β 1-induzierten relativen Genexpressionsänderungen mit höheren XT-I-, Biglycan- und Kollagen-Transkriptmengen und verringerten Expressionen von Betaglycan und Decorin (siehe 3.2.2.1).

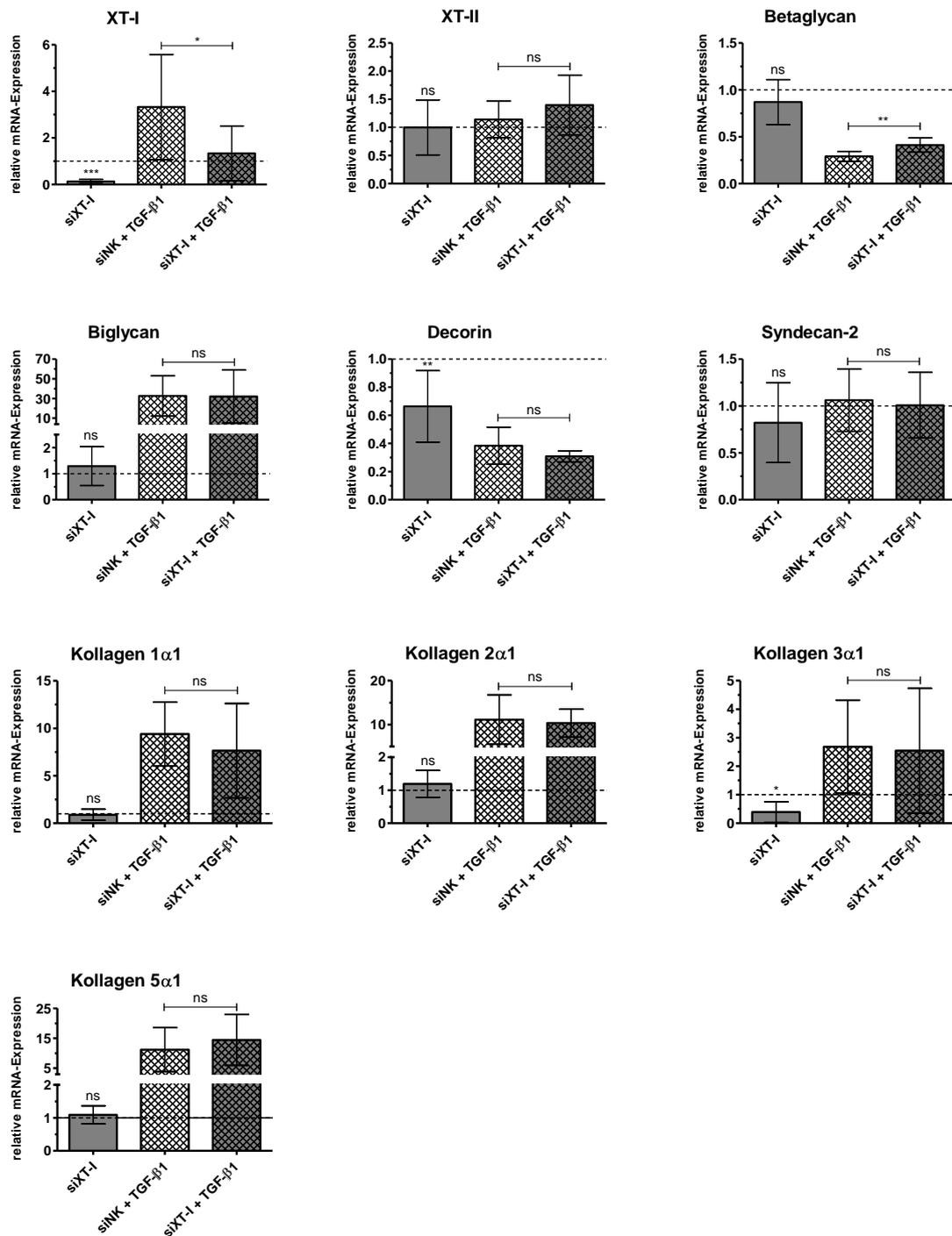


Abbildung 3.15: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression und TGF-β1-Induktion über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF-β1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von mit siNK-transfizierten, unbehandelten Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2.4.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I-Knockdown

Die Untersuchung der XT-Aktivität im ZKÜ der transfizierten Fibroblasten ergab eine Änderung von $82,5 \pm 18,6$ dpm/ μg_{DNA} bei unbehandelten Kontrollzellen auf $22,9 \pm 1,9$ dpm/ μg_{DNA} bei Zellen mit herunterregulierter XT-I-Expression (Abbildung 3.16). Dies entsprach einer Reduktion um 72,4 %. Die TGF- β 1-Induktion führte zu einer Steigerung der XT-Aktivität, jedoch wurde auch hier der Wert von $342,7 \pm 53,4$ dpm/ μg_{DNA} der induzierten Kontrollzellen mit $52,7 \pm 31,5$ dpm/ μg_{DNA} bei Fibroblasten nach *Knockdown* und TGF- β 1-Zugabe nicht erreicht und deutlich unterschritten.

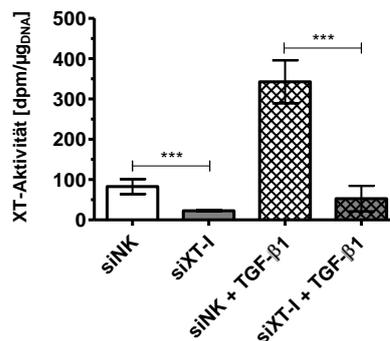


Abbildung 3.16: XT-Aktivität im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Doppelbestimmung (* = $p < 0,1$; *** = $p < 0,001$).

3.2.4.3 Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I-Knockdown

Die GAG-Zusammensetzung des Zelllysats von Fibroblasten mit erfolgreich herabregulierter XT-I-Enzymkonzentration wurde nach Isolierung und Derivatisierung der Disaccharideinheiten chromatographisch in der HPLC aufgetrennt und quantifiziert. Im Folgenden werden die am stärksten synthetisierten Disaccharide dargestellt. Alle weiteren GAG-Komponenten sind Tabelle 12.7 zu entnehmen.

Bei einem *Knockdown* der XT-I-Expression, stieg die Stoffmenge des Heparan-0-sulfats und die Gesamtmenge an Heparansulfat-Disacchariden tendenziell und teilweise auch signifikant an (Abbildung 3.17). Der Gehalt des N-sulfatierten Heparansulfats sank bei F42A- und stieg bei M56D-Zellen. Bei einer Induktion mit TGF- β 1 war derselbe Trend zwischen Kontroll- und siXT-I-transfizierten Zellen zu beobachten, nur dass hier die Stoffmenge des Δ di-monoNOS_{HS} bei XT-I-reduzierten F42A-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen höher und bei M56D-Zellen geringer war.

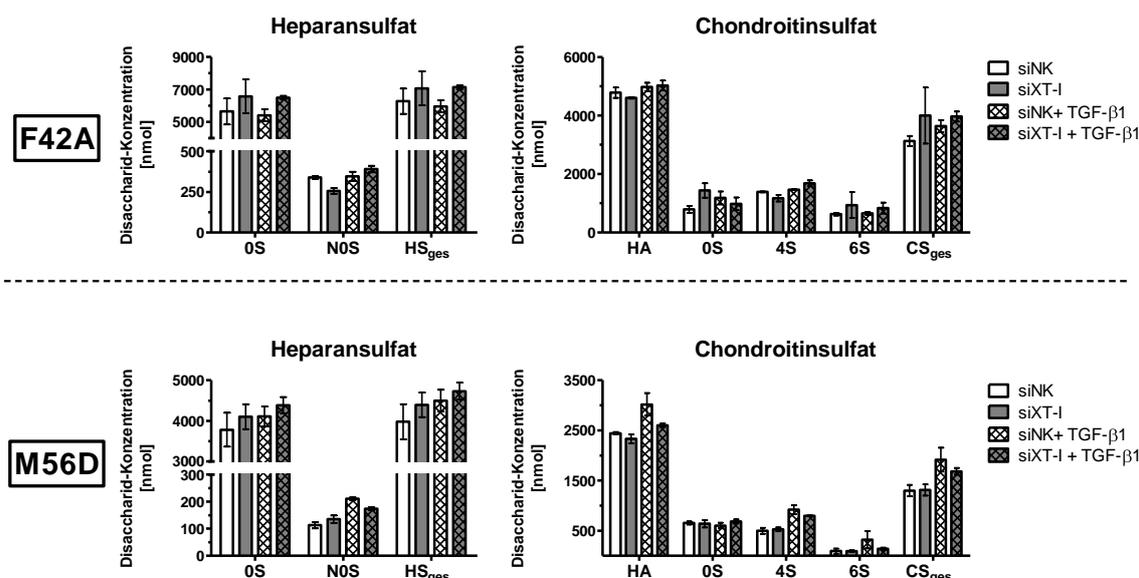


Abbildung 3.17: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zelllysate von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Bei HA-Disaccharideinheiten führte eine XT-I-Reduktion zu einer leichten Konzentrationsabnahme. Nach Transfektion und gleichzeitig erfolgreicher Cytokinzugabe nivellierte sich der Effekt bei Zellen der weiblichen Spenderin und wurde im Fall der M56D-Zellen noch größer. Bei der Auswertung der CS-Zusammensetzung waren die Ergebnisse zwischen F42A- und M56D-Zellen teilweise unterschiedlich. Das Δ di-0S_{CS}-Disaccharid siXT-I-transfizierter weiblicher Fibroblasten zeigte eine erhöhte Stoffmenge, das Δ di-mono4S_{CS}-Disaccharid derselben Zellen eine leichte Reduktion und für alle anderen Disaccharide sowie die CS-Gesamtmenge wurden keine signifikanten Änderungen detektiert. Auch zwischen TGF- β 1-induzierten Kontrollzellen und vermindert XT-I-exprimierenden Fibroblasten bestanden Unterschiede. Das Δ di-mono4S_{CS}-, das Δ di-mono6S_{CS}- und das CS_{ges}-Disaccharid wiesen bei induzierten F42A-Zellen mit verminderter XT-I-Aktivität erhöhte Stoffmengen im Vergleich zu Kontrollzellen auf, bei M56D-Zellen war der Effekt *vice versa* und dementsprechend waren die Konzentrationen vermindert. Die Menge an Chondroitin-0-sulfat zeigte keine Unterschiede zwischen induzierten siNK- und siXT-I-transfizierten Dermalfibroblasten.

3.2.4.4 Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I-Knockdown

Auch bei der GAG-Komposition sekretierter Proteoglykane zeigte sich teilweise eine Differenz zwischen den beiden Zelltypen (Abbildung 3.18). M56D-Zellen wiesen nach Reduktion der XT-I-Expression einen erniedrigten Δ di-0S_{HS}- und Δ di-HS_{ges}-Gehalt sowie eine erhöhte Konzentration an Δ di-monoN0S_{HS} auf. Im Gegensatz dazu war bei F42A-Zellen eine Erhöhung des Δ di-0S_{HS}- und Δ di-HS_{ges}-Gehalts feststellbar. Einzig die Konzentration an Δ di-monoN0S_{HS} blieb unverändert. Zwischen induzierten siNK- und siXT-I-Zellen war nur eine reduzierte Stoffmenge des Δ di-monoN0S_{HS}-Disaccharids bei XT-I-reprimierten M56D-Zellen detektierbar.

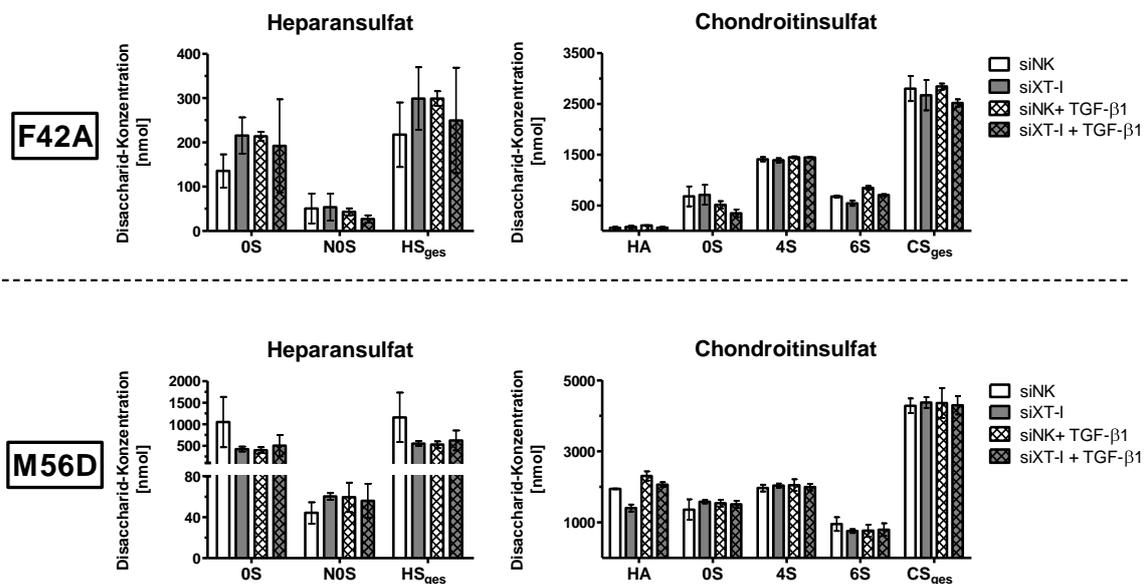


Abbildung 3.18: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung. Weitere Disaccharide sind in Tabelle 12.8 aufgelistet.

Die Konzentration der Δ di-0S_{HA}-Disaccharide sank nach XT-I-Knockdown bei M56D-Zellen und blieb bei F42A-Zellen konstant. Allerdings war hier der Gehalt deutlich geringer als bei Zellen des männlichen Spenders. Nach TGF- β 1-Zugabe waren die Δ di-0S_{HA}-Stoffmengen der siXT-I-transfizierten Zellen im Vergleich zu siNK-transfizierten Zellen reduziert. Bei der CS-Zusammensetzung zeigten sich bei verminderter XT-I-Expression eine unveränderte Menge an Δ di-0S_{CS}-, Δ di-mono4S_{CS}- und CS_{ges}-Disacchariden sowie eine Reduktion des Δ di-mono6S_{CS}-Gehalts. Nach Cytokinzugabe war bei M56D-Zellen zwischen siNK- und siXT-I-transfizierten Fibroblasten kein Unterschied detektierbar. Bei F42A-Fibroblasten hingegen zeigten siXT-I-transfizierte Zellen einen verminderten Δ di-0S_{CS}-, Δ di-mono6S_{CS}- und CS_{ges}-Gehalt bei gleicher Δ di-mono4S_{CS}-Stoffmenge im Vergleich zu Kontrollzellen.

3.2.5 Reduktion der XT-II-Expression in dermalen Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde des Weiteren der Effekt einer reduzierten XT-II-Aktivität auf die Expression von ECM-Komponenten sowie die GAG-Komposition untersucht. Hierzu wurde durch Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden die XT-II-Expression supprimiert.

3.2.5.1 Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-II-Knockdown

Der *Knockdown* der XT-II-Expression von Dermalfibroblasten mit XYLT2-mRNA-spezifisch bindenden siRNA-Oligonukleotiden erfolgte unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bereits unter 3.2.4.1 beschrieben.

Durch die siRNA-Transfektion konnte eine Reduktion der relativen XT-II-Expression um 92 % erzielt werden (Abbildung 3.20), während für die XT-I-Expression keine signifikanten Änderungen detektiert werden konnten und ein fast gleichbleibendes Expressionsniveau nachgewiesen wurde. Es konnten reduzierende Auswirkungen der verminderten XT-II-Expression auf die Decorin- ($0,43 \pm 0,04$), Syndecan-2- ($0,54 \pm 0,15$), Kollagen 1 α 1- ($0,68 \pm 0,28$) und Kollagen 3 α 1-mRNA-Menge ($0,48 \pm 0,28$) gezeigt werden. Die ebenfalls untersuchten relativen Genexpressionen von Biglycan, Betaglycan, Kollagen 2 α 1 und Kollagen 5 α 1 wurden nicht beeinflusst und blieben auf einem unveränderten Niveau.

Die Zugabe von TGF- β 1 machte den deutlichen Einfluss auf die XT-I-Expression sichtbar. Diese stieg bei Kontrollzellen auf das 2,7-fache ($\pm 0,4$), bei XT-II-reprimierten Zellen jedoch signifikant stärker auf das 4,8-fache ($\pm 1,1$). Bei allen weiteren untersuchten Genexpressionen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Fibroblasten mit reduzierter XT-II-mRNA-Menge nach TGF- β 1-Zugabe detektierbar.

Erneut bestätigt werden konnte, wie bereits unter 3.2.2.1 beschrieben, der aktivierende Einfluss des TGF- β 1 auf die Expression von XT-I, Biglycan und Kollagenen sowie der inhibitorische Effekt auf die Expression von Betaglycan und Decorin.

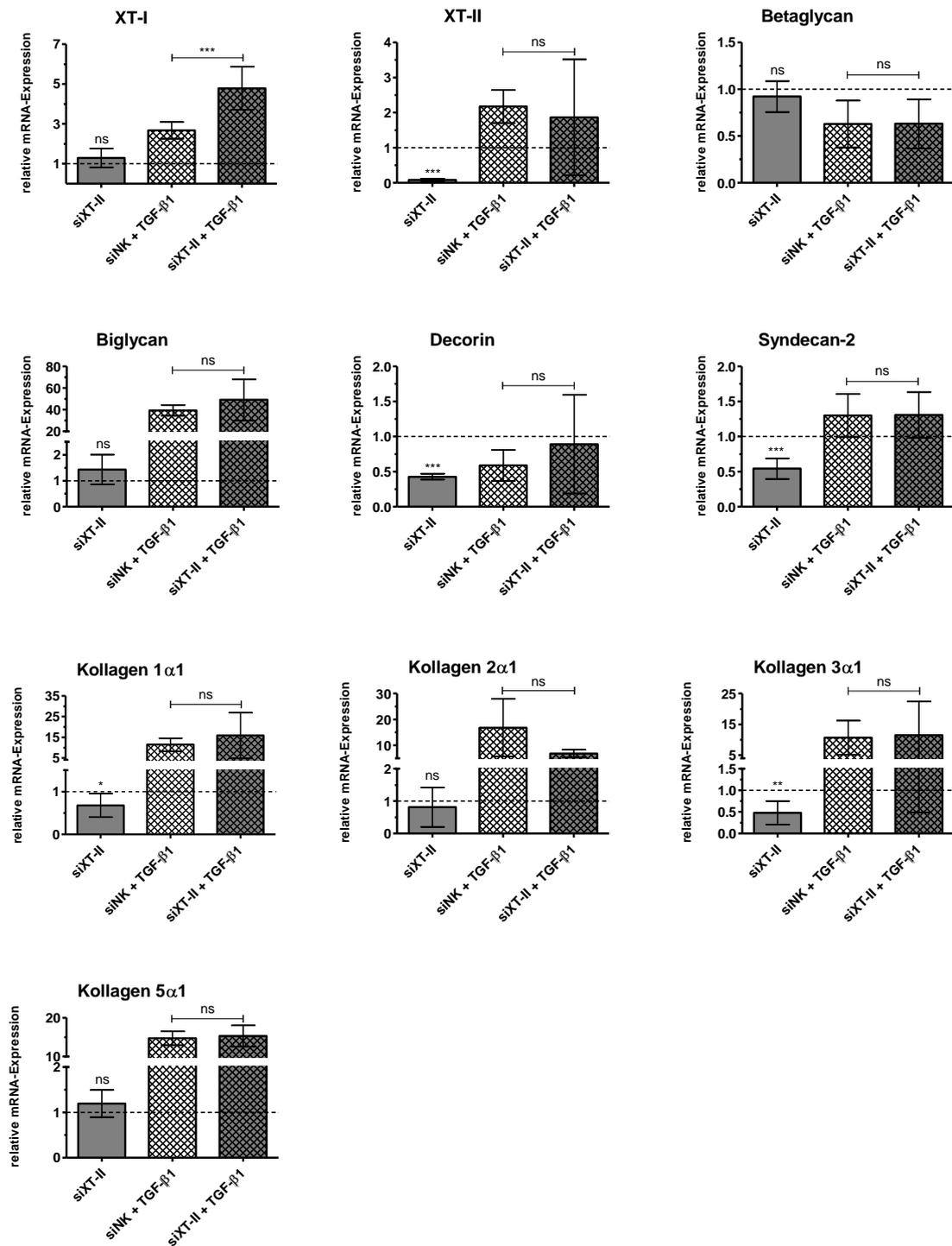


Abbildung 3.19: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression und TGF- β 1-Induktion über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion über 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von mit siNK-transfizierten, unbehandelten Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2.5.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-II-Knockdown

Im ebenfalls durchgeführten Aktivitätstest konnte trotz siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression eine um das 1,4-fache gesteigerte XT-Aktivität im ZKÜ nachgewiesen werden (Abbildung 3.20). Obwohl die XT-II-Expression vermindert wurde, stieg die enzymatische Aktivität um 38 % von $72,2 \pm 11,1$ dpm/ μg_{DNA} auf $99,9 \pm 11,9$ dpm/ μg_{DNA} . Dieser Effekt wurde noch weiter durch die TGF- β 1-Zugabe verstärkt, so dass sich ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten Kontrollzellen ($202,3 \pm 44,5$ dpm/ μg_{DNA}) und siXT-II-transfizierten, induzierten Fibroblasten ($355,9 \pm 44,1$ dpm/ μg_{DNA}) um einen Faktor von 1,8 ergab.

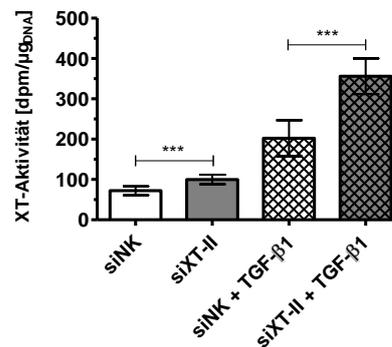


Abbildung 3.20: XT-Aktivität im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Doppelbestimmung (***) = $p < 0,001$).

3.2.5.3 Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-II-Knockdown

Die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane nach XT-II-Knockdown wurde ebenfalls mittels HPLC-Analyse bestimmt und kann detailliert in Tabelle 12.9 betrachtet werden.

Eine Herabregulation der XT-II-Expression führte zu einer Verminderung des Heparan-0-sulfats und der Gesamtmenge an Heparansulfat-Disacchariden bei F42A-Zellen und zu gleichbleibenden Konzentrationen dieser Disaccharide bei Fibroblasten des männlichen Spenders (Abbildung 3.21). Die Konzentration des N-sulfatierten Heparansulfats stieg bei beiden Zelltypen. Nach Zugabe von TGF- β 1 war die einzige Unterscheidung zwischen Kontroll- und siXT-II-transfizierten Zellen ein verminderter Gehalt an Δ di-monoNOS_{HS} bei XT-II-reprimierten Fibroblasten. Bei den von der Hyaluronsäure abstammenden Disacchariden konnte nach Knockdown bei weiblichen Spenderzellen ein Anstieg, bei M56D-Zellen hingegen eine Abnahme des Gehalts nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich auch bei TGF- β 1-induzierten M56D-Fibroblasten und nivellierte sich bei F42A-Zellen.

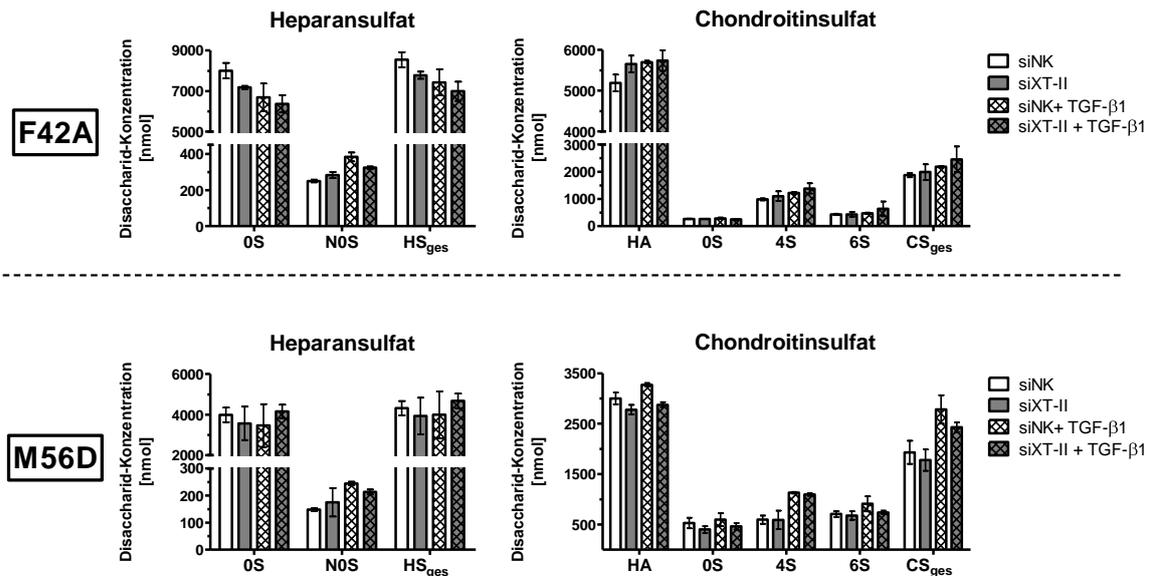


Abbildung 3.21: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellysate von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Die CS-Zusammensetzung blieb nach XT-II-Knockdown weitestgehend konstant. Der einzige Unterschied der detektiert wurde, war eine Reduktion des Chondroitin-0-sulfats bei M56D-Zellen. Nach TGF- β 1-Zugabe waren alle Disaccharidstoffmengen der XT-II-reprimierten M56D-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen erniedrigt. Bei F42A-Zellen konnte dieser Effekt nur bei dem Δ di-0S_{CS}-Disaccharid bestätigt werden, alle anderen Disaccharide zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Stoffmengen zwischen XT-II-reprimierten Fibroblasten und Kontrollzellen.

3.2.5.4 Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-II-Knockdown

Die weitere Untersuchung umfasste die Analyse der GAG-Zusammensetzung sekretierter Proteoglykane nach Herabregulation der XT-II-Transkriptmenge. Die Auswertung der am stärksten synthetisierten Disaccharide sind zum einen graphisch in Abbildung 3.22 und zum anderen mit weiteren Disacchariden tabellarisch im Anhang (Tabelle 12.10) abgebildet.

Eine Reduktion der XT-II-Expression führte bei F42A-Zellen zu einer Gehaltserhöhung des Heparan-0-sulfats und auch der HS-Gesamtmenge. Bei M56D-Zellen war der gegen- teilige Effekt einer Stoffmengenerniedrigung detektierbar. Der Gehalt des N-sulfatierten HS-Disaccharids sank bei F42A-Zellen signifikant und war bei M56D-Zellen unverändert. Nach TGF- β 1-Zugabe waren alle HS-Disaccharidmengen bei siXT-II-transfizierten F42A-Zellen im Vergleich zu siNK-transfizierten Zellen erniedrigt, bei M56D-Zellen trat hingegen kein Unterschied zwischen den verschiedenen transfizierten Fibroblasten auf.

Disaccharideinheiten der Hyaluronsäure zeigten nach *XT-II-Knockdown* eine verminderte bzw. gleichbleibende Konzentration bei F42A- und M56D-Zellen. Auch hier war, wie bereits bei sekretierten Proteoglykanen nach mRNA-Reduktion der *XT-I* (siehe 3.2.4.4) beobachtet, die Konzentration der Δ di-0S_{HA}-Disaccharide im Zellkulturüberstand der Zellen der weiblichen Spenderin erneut deutlich geringer als bei M56D-Fibroblasten. Nach Cytokinzugabe konnte bei beiden Zelltypen eine geringere Konzentration der HA-Disaccharide von *XT-II*-supprimierten Zellen im Vergleich zu kontrolltransfizierten Fibroblasten nachgewiesen werden.

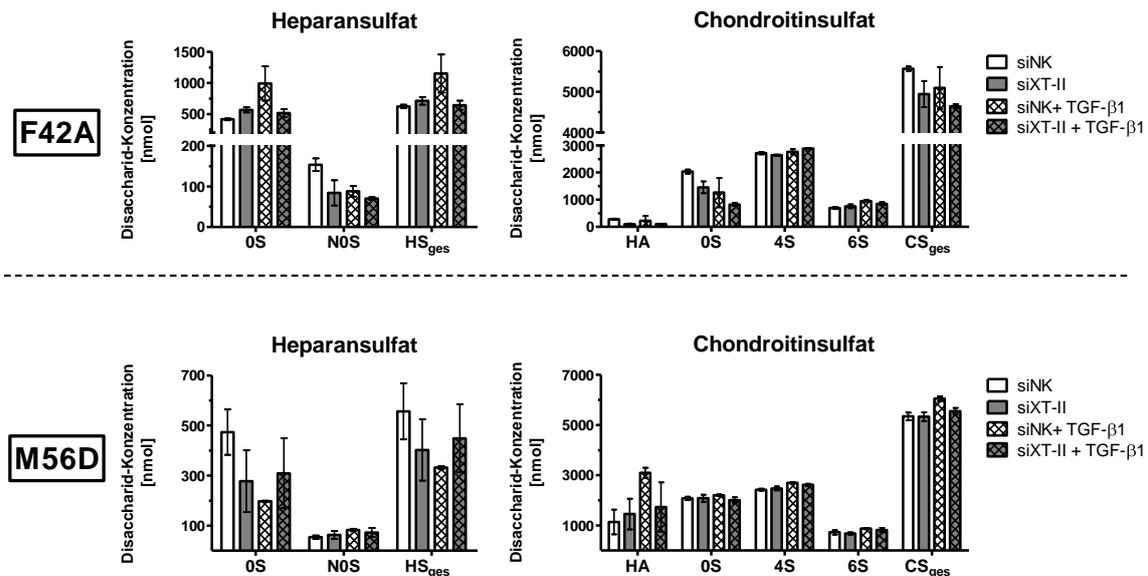


Abbildung 3.22: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der *XT-II*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (*siNK*) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL *TGF-β1* erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Die Analyse der CS-Zusammensetzung ergab verminderte Δ di-0S_{CS}- und Δ di-mono4S_{CS}- sowie erhöhte Δ di-mono6S_{CS}-Stoffmengen bei F42A-Zellen nach einer Reduktion der mRNA-Transkriptmenge der *XT-II*. Die Gesamtmenge an Chondroitinsulfat sank. Bei M56D-Zellen bewirkte die *XT-II*-Reduktion keinerlei Änderungen in der CS-Zusammensetzung. Nach *TGF-β1*-Zugabe zeigte sich bei *siXT-II*-transfizierten Zellen der weiblichen Spenderin ein höherer Δ di-mono4S_{CS}-Gehalt. Die Δ di-mono6S_{CS}- und CS_{ges}-Mengen waren hingegen im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert und das Δ di-0S_{CS} wies eine vergleichbare Stoffmenge auf. Bei sekretierten CS-Disacchariden von kultivierten M56D-Zellen nach Transfektion und Cytokinaddition konnte jeweils, außer beim Δ di-mono6S_{CS}-Disaccharid, eine verminderte Stoffmenge bei *XT-II*-reprimierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden.

3.2.6 Parallele Expressionsreduktion beider XT-Isoformen in dermalen Fibroblasten

Ebenfalls untersucht wurden die Auswirkungen einer parallel reduzierten XT-I- sowie XT-II-Aktivität auf die Expression von Proteoglykanen und Kollagenen sowie den Gehalt an Glykosaminoglykanen. Dermal Fibroblasten wurden hierzu mit siRNA-Oligonukleotiden zur Repression beider mRNA-Isoformen transfiziert, so dass beide Isoformen parallel herabreguliert wurden.

3.2.6.1 Analyse der mRNA-Expression von Xylosyltransferasen, Proteoglykanen und Kollagenen nach XT-I/II-Doppel-Knockdown

Unter Einbehaltung der zuvor durchgeführten Reaktionsbedingungen wurden 300.000 Dermalfibroblasten in einer 6-Kavitäten-Schale ausgesät und mit Kontroll-siRNA oder einer Kombination aus siXT-I- und siXT-II-Oligonukleotiden transfiziert. Nach 24 h wurde mit 5 ng/mL TGF- β 1 induziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die isolierte mRNA revers transkribiert.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass bei einer parallelen Herabregulation der XT-I- sowie XT-II-Expression durch siRNA-vermittelte Transfektion die XT-I- um 75 %, sowie die XT-II-Expression um 85 % sank (Abbildung 3.23). Bei den weiteren untersuchten Genen wurde durch den herbeigeführten Doppel-Knockdown eine veränderte relative mRNA-Menge bei Biglycan um das 1,7-fache ($\pm 0,4$), bei Decorin um das 0,7-fache ($\pm 0,2$), bei Kollagen 3 α 1 um das 0,6-fache ($\pm 0,3$) und bei Kollagen 5 α 1 um das 1,3-fache ($\pm 0,1$) detektiert. Alle weiteren Proteoglykane und Kollagene zeigten keine signifikanten Änderungen der Transkriptmengen.

Nach einer Induktion mit TGF- β 1 wurde ein Anstieg der XT-, der Biglycan- und der Kollagenexpression und eine Verminderung der Betaglycan- und Decorin-mRNA, wie bereits beschrieben (siehe 3.2.2.1), deutlich. Zwischen Kontrollzellen, die mit siNK-RNA transfiziert wurden, und Fibroblasten, bei denen eine Herunterregulation der XT-Isoformen durch XT-I- und XT-II-siRNA erfolgte, traten nach TGF- β 1-Addition wenige Unterschiede auf. Die deutlichste Differenz wurde bei der Expression der XT-Isoformen detektiert, die bei mit siXT-I/II- und cytokinbehandelten Fibroblasten stark unter der mRNA-Menge der siNK- und cytokinbehandelten Kontrollzellen und sogar unter der Expressionsstärke der unbehandelten Fibroblasten blieb. Bei Betaglycan wurde ein leicht signifikanter Unterschied festgestellt, der sich durch eine etwas geringere Herabregulation der Transkriptmenge, die bei TGF- β 1-behandelten Kontrollzellen ausgeprägter war, darstellte. Bei Kollagen 3 α 1 trat der gegenteilige Effekt auf. Die Erhöhung der relativen Expression war bei cytokinbehandelten Kontrollzellen signifikant stärker als bei XT-reprimierten Fibroblasten nach TGF- β 1-Induktion.

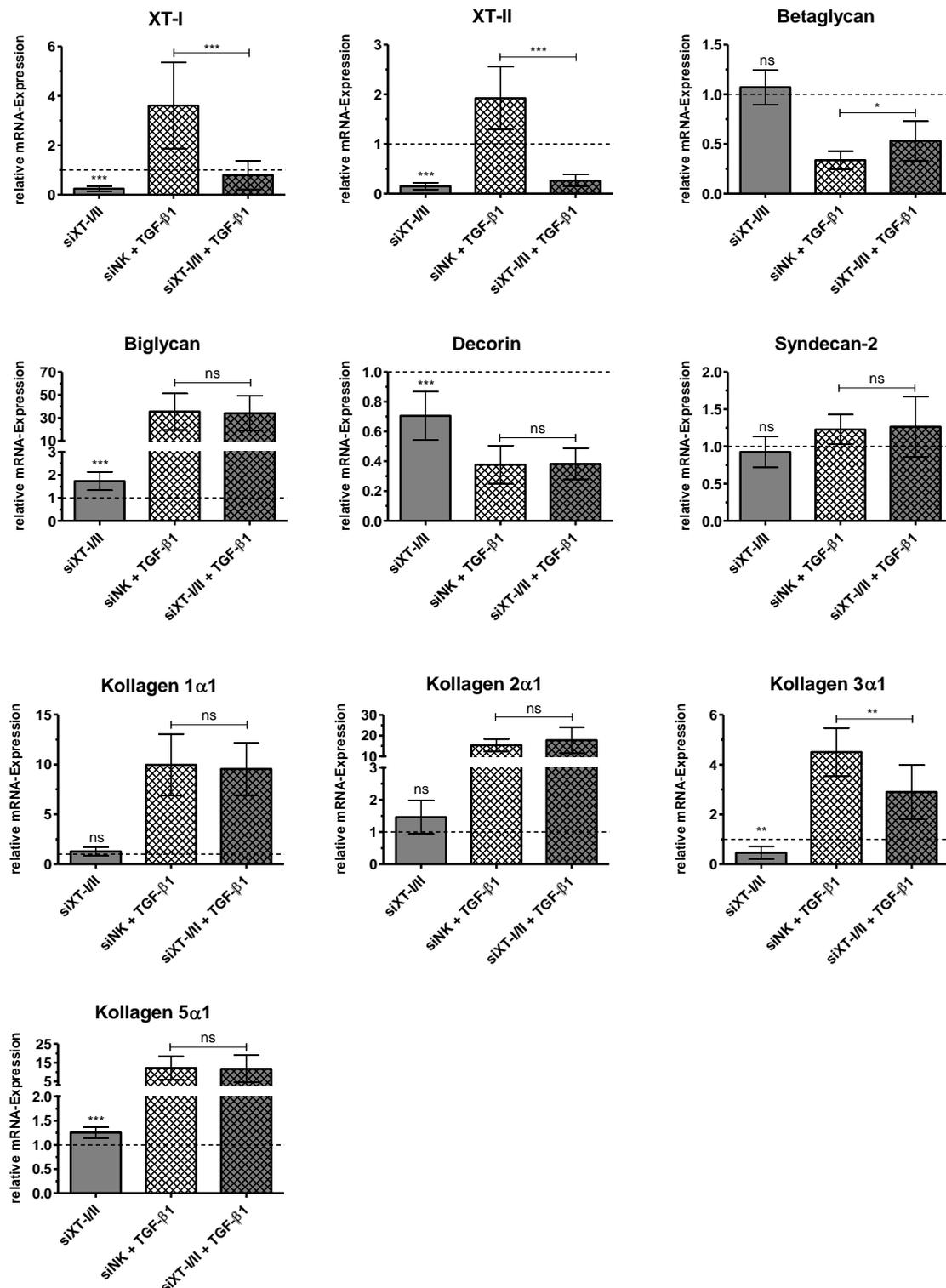


Abbildung 3.23: Relative Genexpressionen von humanen Dermalfibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression und TGF-β1-Induktion über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF-β1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Die Genexpressionen wurden relativ zur Expression von mit siNK-transfizierten, unbehandelten Kontrollzellen ermittelt (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.2.6.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand nach XT-I/II-Doppel-Knockdown

Die Messung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand zeigte, dass die Herabregulation der XT-Isoformen im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer um etwa 70 % reduzierten XT-Aktivität von $87,1 \pm 26,9$ dpm/ μg_{DNA} auf $26,5 \pm 3,7$ dpm/ μg_{DNA} führte (Abbildung 3.24). Bei Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 kam es bei den Kontrollzellen zu einem Anstieg der XT-Aktivität um das 4,4-fache auf $384,7 \pm 98,3$ dpm/ μg_{DNA} , der bei herabregulierter XT-Expression ebenfalls detektierbar war, aber nur um das 2,5-fache auf $66,4 \pm 17,5$ dpm/ μg_{DNA} stieg. Die XT-Aktivität war folglich durch den Doppel-Knockdown stark reduziert und auch eine TGF- β 1-Zugabe konnte die Enzymmenge nicht soweit steigern, dass ein Aktivitätsniveau wie bei den Kontrollzellen erreicht werden konnte.

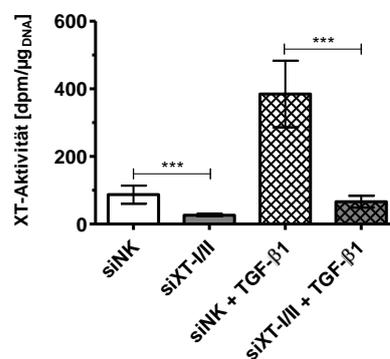


Abbildung 3.24: XT-Aktivität im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate der Zelllinien M56D und F42A in Doppelbestimmung (***) = $p < 0,001$).

3.2.6.3 Untersuchung der zellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I/II-Doppel-Knockdown

Die Analyse der GAG-Komposition des Zelllysats nach Expressionsreduktion beider XT-Isoformen zeigte nach chromatographischer Auftrennung mittels HPLC, wie in Abbildung 3.25 deutlich, keine signifikanten Änderungen der unsulfatierten HS-Disaccharide sowie der HS-Gesamtmenge bei beiden Zelltypen. Eine Aufschlüsselung aller Disaccharide sowie statistische Auswertungen der Stoffmengenänderungen finden sich im Anhang unter Tabelle 12.11. Das N-sulfatierte HS-Disaccharid sank bei F42A-Zellen und stieg bei M56D-Fibroblasten leicht an. Nach TGF- β 1-Zugabe war zwischen kontroll- und siXT-I/II-transfizierten Zellen nur ein Unterschied im höheren Gehalt des Δ di-monoNOS_{HS}-Disaccharid bei F42A-Zellen erkennbar.

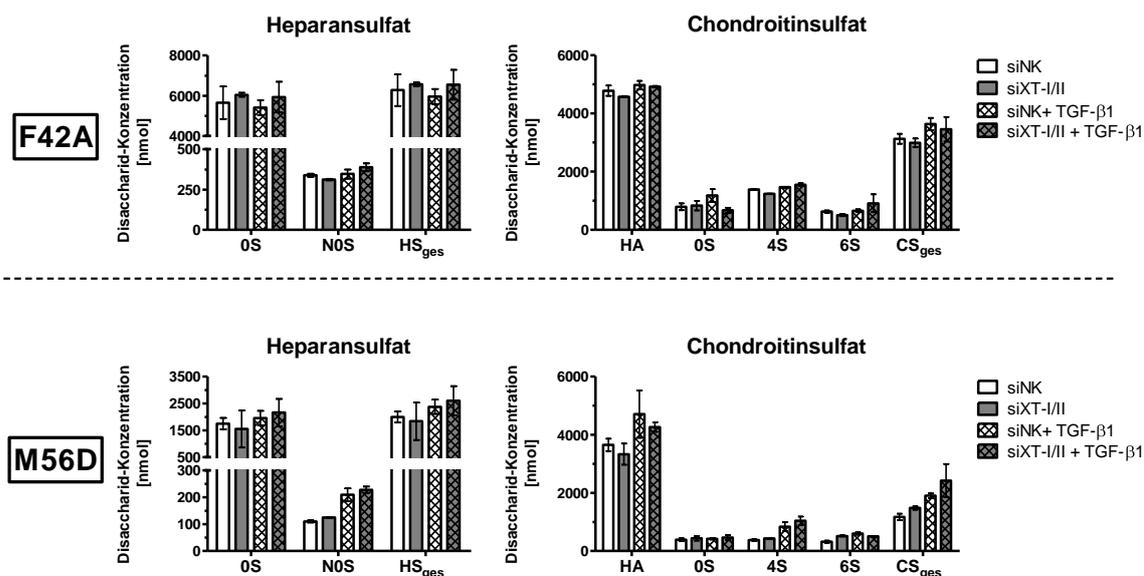


Abbildung 3.25: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellysate von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Der Δ di-0S_{HA}-Gehalt sank nach XT-Reduktion bei beiden Zelllinien leicht. Nach Zugabe des Cytokins war die Hyaluronsäurekonzentration zwischen siNK- und siXT-I/II-transfizierten Zellen ähnlich. Bei der CS-Zusammensetzung traten einige Diskrepanzen in der Änderung der Zusammensetzung auf. Der Δ di-0S_{CS}-Gehalt blieb zellunabhängig konstant, jedoch stieg bei M56D-Zellen nach *Knockdown* beider XT-Isoformen der Δ di-mono4S_{CS}-, der Δ di-mono6S_{CS}- und der CS_{ges}-Gehalt. Bei F42A-Zellen konnte eine Abnahme der Stoffmengen der Δ di-mono4S_{CS}- und Δ di-mono6S_{CS}-Disaccharide sowie eine konstante CS-Gesamtstoffmenge nachgewiesen werden. Nach Cytokininduktion traten ebenfalls signifikante Unterschiede auf (F42A: verminderter Gehalt an Δ di-0S_{CS}, erhöhter Gehalt an Δ di-mono4S_{CS}; M56D: erhöhte Stoffmengen der Δ di-mono4S_{CS}- und CS_{ges}-Disaccharide, verminderte Stoffmenge an Δ di-mono6S_{CS}).

3.2.6.4 Untersuchung der extrazellulären GAG-Zusammensetzung nach XT-I/II-Doppel-Knockdown

Die Analyse der in den Zellkulturüberstand sekretierten Proteoglykane ergab bei der Zusammensetzung der HS-Disaccharide nur eine verminderte Konzentration des N-sulfatierten Heparansulfats bei M56D-Zellen bei einer Herabregulation der Expression beider XT-Isoformen (Abbildung 3.26). Nach TGF- β 1-Zugabe lagen alle HS-Disaccharide der XT-reduzierten Zellen in vermindelter Konzentration vor als entsprechend induzierte Kontrollzellen. Derselbe Effekt konnte bei Disacchariden der Hyaluronsäure nachgewiesen werden. Hier fiel eine deutlich geringere Konzentration bei F42A- im Vergleich zu M56D-Zellen auf. Detailliertere Ergebnisse sind im Anhang unter Tabelle 12.12 aufgelistet.

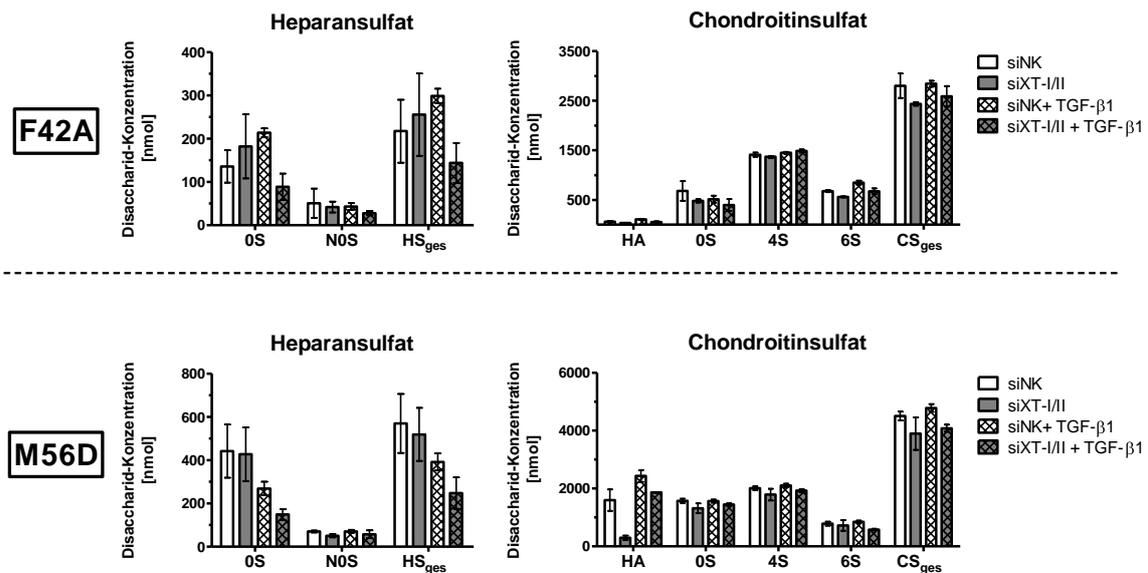


Abbildung 3.26: Stoffmengen ausgewählter HS- und CS-Disaccharide im Zellkulturüberstand von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siNK) über einen Zeitraum von 96 h. Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung.

Ebenfalls erniedrigt waren die Konzentrationen der CS-Disaccharide sowie die Gesamtmenge an Chondroitinsulfat, sowohl zwischen unbehandelten Kontrollzellen und siXT-I/II-transfizierten Fibroblasten als auch nach Induktion mit TGF- β 1. Eine Ausnahme stellte hier das von F42A-Zellen sekretierte Chondroitin-4-sulfat dar, dessen Gehalt nach siXT-I/II-Knockdown und nach TGF- β 1-Zugabe unverändert blieb.

3.2.7 Analyse der ECM-Zusammensetzung XT-I-überexprimierender M56D-Fibroblasten

Zur Untersuchung der Auswirkung einer gesteigerten XT-I-Aktivität auf die Zusammensetzung der ECM wurde die XT-I-mRNA-Menge in dermalen Fibroblasten durch eine vektorbasierte Überexpression erhöht. Das Plasmid pcDNA3.1/CT-GFP-XYLT1 (pSS1 [38]) und das ursprüngliche pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-Plasmid wurden für die Transfektion der Fibroblasten mittels Elektroporation verwendet. Der für die XT-I-cDNA-kodierende pSS1-Vektor lag bereits fertig kloniert vor.

3.2.7.1 Veränderungen der mRNA-Expression von XT-I-überexprimierenden Fibroblasten

Die dermalen Fibroblasten M56D wurden mittels Elektroporation mit dem pSS1-Plasmid oder dem Kontrollplasmid pcDNA/CT-GFP-TOPO und anschließender Selektion mit dem Antibiotikum G-418 stabil transfiziert. Es wurden 600.000 Zellen ausgesät, nach 4 Tagen geerntet und die Genexpression relativ quantifiziert (Abbildung 3.27).

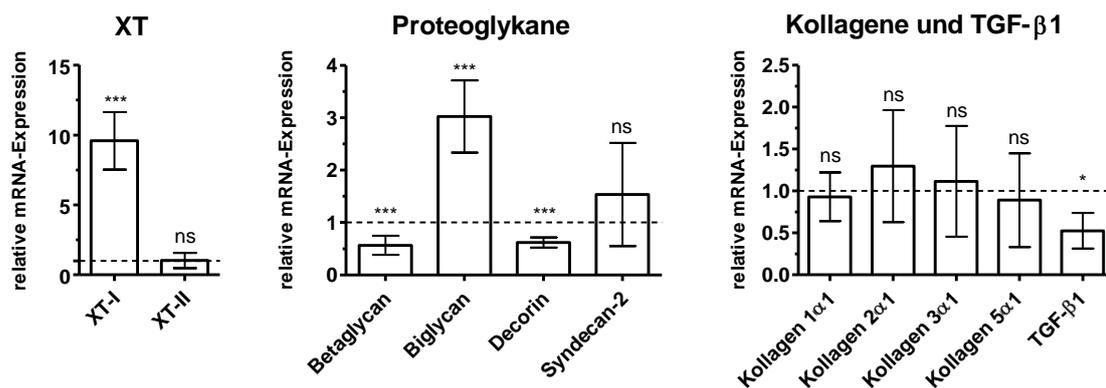


Abbildung 3.27: Relative Genexpressionen nach Transfektion von M56D-Zellen mit den Vektoren pcDNA/CT-GFP-TOPO und pSS1 nach einer Kultivierung über 4 Tage. Die Expression der mit dem pSS1-Plasmid transfizierten Zellen wurde relativ zur Expression Kontrollplasmid-transfizierter Zellen ermittelt (gestrichelte Linie). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$, *** = $p < 0,001$).

Bei pSS1-Plasmid-transfizierten Zellen stieg im Vergleich zu mit dem Kontrollplasmid-transfizierten Zellen die XT-I-mRNA bei unveränderter XT-II-Expression auf das 9,6-fache ($\pm 2,0$) an. Mögliche Amplifikationen der eventuell als Verunreinigung vorliegenden Plasmid-DNA wurden ausgeschlossen, da mit Oligonukleotiden, die in der *fl ori*-Region des Vektors binden, keine Produkte nachweisbar waren. Bei den Proteoglykanen zeigte sich eine deutliche Herabregulation um das 0,6-fache bei Decorin und Betaglycan sowie eine um das 3,0-fache ($\pm 0,7$) gesteigerte mRNA-Expression von Biglycan. Bei Syndecan-2 und den Kollagenen 1 α 1, 2 α 1, 3 α 1 und 5 α 1 traten keine signifikanten Änderungen auf. Die mRNA-Menge von TGF- β 1 sank um das 0,5-fache ($\pm 0,2$).

3.2.7.2 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand XT-I-überexprimierender Fibroblasten

Durch die Messung der XT-Enzymaktivität im Zellkulturüberstand wurde überprüft, ob die Erhöhung der Anzahl an XT-Transkripten zu einer Veränderung auf Proteinebene, also zu einer gesteigerten XT-Aktivität, führte.

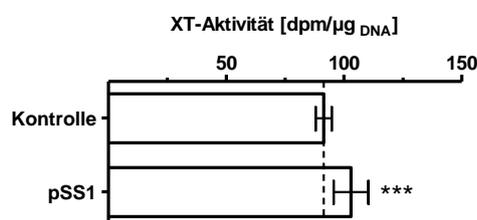


Abbildung 3.28: XT-Aktivität im ZKÜ nach Transfektion von M56D-Zellen mit den Vektoren pcDNA/CT-GFP-TOPO (Kontrolle) und pSS1. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Dreifachbestimmung (***) = $p < 0,001$.

Die XT-Aktivität stieg bei XT-I-überexprimierenden Zellen um 12,6 % auf $103,0 \pm 7,4$ dpm/µg_{DNA} (Abbildung 3.28).

3.2.7.3 Untersuchung der intra- und extrazellulären GAG-Zusammensetzung XT-I-überexprimierender Fibroblasten

Die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane des Lysats und des Zellkulturüberstandes wurden mittels Separation und Detektion mit einer HPLC-Analyse untersucht, indem die Disaccharide zunächst durch Verdau der GAG-Kette gewonnen, dann isoliert und abschließend derivatisiert wurden.

Tabelle 3.3: Stoffmengen der HS-Disaccharide bei XT-I-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen im Lysat und ZKÜ.

Δ-Disaccharid	Lysat [nmol]		ZKÜ [nmol]	
	Kontrolle	pSS1	Kontrolle	pSS1
Δdi-0S _{HS}	4650±140,9	5078±456,6 ^{ns}	557,0±61,7	631,9±78,8 ^{ns}
Δdi-monoN0S _{HS}	198,9±16,6	164,5±13,7 ^{**}	209,7±34,3	136,5±49,6 [*]
Δdi-mono2S _{HS}	80,0±14,4	81,3±12,6 ^{ns}	15,40±1,5	13,41±1,8 ^{ns}
Δdi-mono6S _{HS}	100,9±9,5	88,9±10,0 ^{ns}	58,2±3,5	68,8±19,3 ^{ns}
Δdi-diN6S _{HS}	16,4±2,2	17,3±2,3 ^{ns}	nd	nd
Δdi-di(2,6)S _{HS}	18,6±3,0	16,7±3,9 ^{ns}	nd	nd
Σ Δdi _{HS}	5065±168,2	5447±445,5 ^{ns}	840,3±66,8	846,3±122,6 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Eine Analyse der Zusammensetzung der HS-Disaccharide ergab eine signifikante Verminderung des Gehalts an Δ di-monoNOS_{HS}, die im Lysat und im ZKÜ detektiert werden konnte (Tabelle 3.3). Die Stoffmengen aller anderen untersuchten Disaccharide und die Gesamtmenge an HS-Disacchariden blieben bei einer Überexpression der XT-I konstant.

Tabelle 3.4: Stoffmengen der CS-Disaccharide bei XT-I-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen im Lysat und ZKÜ.

Δ -Disaccharid	Lysat [nmol]		ZKÜ [nmol]	
	Kontrolle	pSS1	Kontrolle	pSS1
Δ di-0S _{HA}	2768±71,3	2688±93,8 ^{ns}	4892±49,3	5029±151,7 ^{ns}
Δ di-0S _{CS}	243,4±19,5	261,5±54,9 ^{ns}	4602±57,6	4632±93,5 ^{ns}
Δ di-mono4S _{CS}	902,4±66,0	1103±108,8 ^{**}	5250±74,6	5302±77,8 ^{ns}
Δ di-mono6S _{CS}	194,3±10,8	224,1±15,2 [*]	1526±60,8	1644±93,8 [*]
Δ di-di(2,6)S _{CS}	135,6±17,2	122,1±33,6 ^{ns}	238,4±23,5	228,7±30,5 ^{ns}
Δ di-di(4,6)S _{CS}	133,4±39,8	102,5±27,4 ^{ns}	238,4±17,6	263,0±38,1 ^{ns}
$\Sigma \Delta$ di _{CS}	1609±129,3	1813±74,4 [*]	11855±223,9	12070±328,9 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Die Untersuchung der Zusammensetzung der Chondroitinsulfate und Hyaluronsäure ergab einen signifikanten Anstieg im Gehalt des Chondroitin-6-sulfats sowohl im Lysat als auch im ZKÜ (Tabelle 3.4) bei einer XT-I-Überexpression. Im Lysat wurden ebenfalls ein höherer Gehalt an Chondroitin-4-sulfat und ein Anstieg der Gesamtmenge an CS-Disacchariden detektiert. Die Mengen aller weiteren Disaccharideinheiten blieben unverändert.

3.2.8 Analyse der ECM-Zusammensetzung XT-II-überexprimierender M56D-Fibroblasten

Die XT-II-Transkriptmenge in dermalen Fibroblasten wurde ebenfalls durch eine vektorbasierte Überexpression erhöht und die Folgen der erhöhten XT-II-Aktivität auf die Zusammensetzung der ECM analysiert. Das für die XT-II-cDNA-kodierende Plasmid pcDNA3.1(+)/XYLT2 (pCR128.32) musste zunächst durch Umklonierung hergestellt werden, bevor es mit dem ursprünglichen Vektor pcDNA3.1(+) bei der Elektroporation der Fibroblasten eingesetzt werden konnte.

3.2.8.1 Konstruktion des pcDNA3.1(+)/XYLT2-Plasmids (pCR128.32)

Die für die XT-II-kodierende cDNA-Sequenz wurde von der Firma Origene in das pCMV6-XL6-Plasmid kloniert. Dieser Vektor besitzt nur ein Resistenzgen zur Selektion mit Ampicillin und eignet sich daher nicht für eine Selektion auf Neomycin-Resistenzen in Eukaryonten, so dass nach Erwerb des Vektors eine Umklonierung in das pcDNA3.1(+)-Plasmid von Invitrogen erfolgte.

Beide Plasmide wiesen in der MCS eine Restriktionsschnittstelle für EcoRI und XbaI auf, so dass die Restriktion der Vektoren mit diesen Enzymen durchgeführt wurde. Der Vektor pCMV6-XL6 wurde in 2 Fragmente restringiert, wobei im kleineren 3.537 kb-Fragment die kodierende Sequenz der XT-II enthalten war. Die Restriktionsprodukte dieses Plasmids wurden dephosphoryliert, um eine Religation mit dem ursprünglichen Vektor zu vermeiden, und in das geschnittene pcDNA3.1(+)-Plasmid ligiert. Nach der Ligation wurden kompetente *E. coli* BL21 DE3 Zellen transformiert, mit Ampicillin selektioniert und in einer PCR mit dem *Primer*-Paar XT-II/E10/2258U18 und XT-II/E11/2352L18 und anschließender Auftrennung im Agarosegel überprüft, ob das XYLT2-Fragment aufgenommen wurde. Die Plasmide der XT-II-positiven Klone wurden isoliert und nach EcoRI/XbaI-Spaltung die Bandenmuster mit den Fragmentgrößen der Ausgangsplasmide nach EcoRI/XbaI-Spaltung verglichen. Entsprachen das XYLT2- und das pcDNA3.1(+)-Fragment den ursprünglichen Größen erfolgte eine Ansequenzierung der Basenabfolge des Vektors (*Primer* BGH Reverse oder T7 Promotor). Nach Transfektion der XT-defizienten Zelllinie CHO pgsA-745 mit den Plasmiden wurde die XT-Aktivität im ZKÜ bestimmt, so dass die Funktionalität des Vektors sichergestellt werden konnte. Das hergestellte Plasmid wurde pCR128.32 genannt.

3.2.8.2 Veränderungen der mRNA-Expression von XT-II-überexprimierenden Fibroblasten

Analog zu XT-I-überexprimierenden Zellen wurden M56D-Fibroblasten mit pCR128.32- und pcDNA3.1(+)-Plasmiden stabil transfiziert, kultiviert und nach 4 Tagen geerntet. Die mRNA wurde isoliert und eine reverse Transkription durchgeführt.

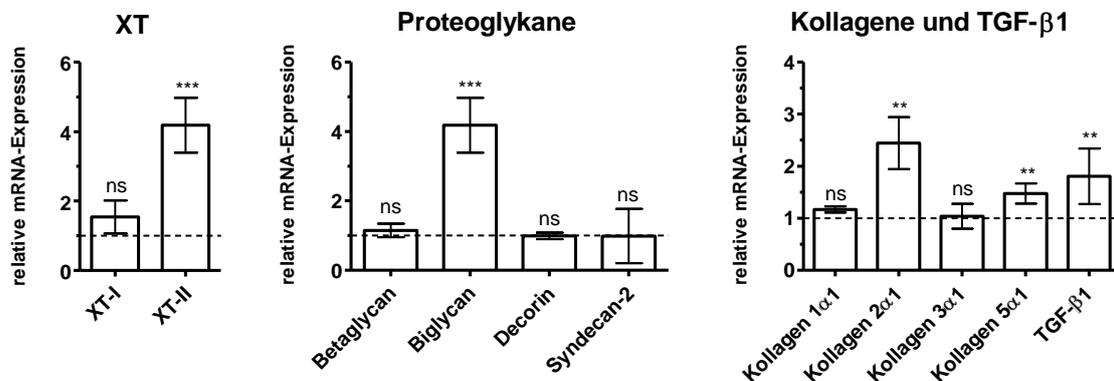


Abbildung 3.29: Relative Genexpressionen nach Transfektion von M56D-Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1(+) und pCR128.32 nach einer Kultivierung über 4 Tage. Die Expression der mit dem pCR128.32-Plasmid transfizierten Zellen wurde relativ zur Expression Kontrollplasmid-transfizierter Zellen ermittelt (gestrichelte Linie). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Bei den überexprimierenden Zellen konnte bei konstanter XT-I-Expression eine um das 4,2-fache ($\pm 0,8$) gesteigerte XT-II-Transkriptmenge nachgewiesen werden (Abbildung 3.29). Eine Amplifikation plasmidischer DNA konnte durch das fehlende Produkt der PCR mit vektorbindenden *fl ori*-Oligonukleotiden ausgeschlossen werden. Weitere signifikante Hochregulationen wurden bei Biglycan ($2,0 \pm 0,4$), Kollagen 2 α 1 ($2,4 \pm 0,5$) und Kollagen 5 α 1 ($1,5 \pm 0,2$) detektiert. Die Expression von Betaglycan, Decorin, Syndecan-2 und den Kollagenen 1 α 1 und 3 α 1 blieb konstant. Für die Genexpression des TGF- β 1 wurde eine Erhöhung der Transkriptmenge auf das 1,8-fache ($\pm 0,5$) detektiert.

3.2.8.3 Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand XT-II-überexprimierender Fibroblasten

Nach dem Nachweis der Erhöhung der XT-II auf Transkriptionsebene wurde mittels radiochemischen Aktivitätstests überprüft, ob sich die Änderungen auch auf Translations-ebene nachweisen ließen. Es zeigte sich, dass die XT-Aktivität im ZKÜ bei einer XT-II-Überexpression um 33 % auf einen Wert von $143,9 \pm 22,7$ dpm/ μg_{DNA} stieg (Abbildung 3.30).

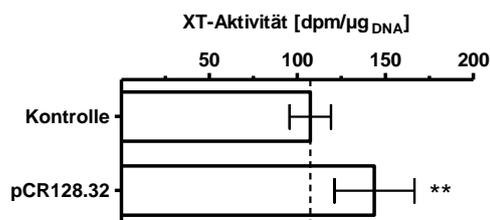


Abbildung 3.30: XT-Aktivität im ZKÜ nach Transfektion von M56D-Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1(+) (Kontrolle) und pCR128.32. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Dreifachbestimmung (** = $p < 0,01$).

3.2.8.4 Untersuchung der intra- und extrazellulären GAG-Zusammensetzung XT-II-überexprimierender Fibroblasten

Die GAG-Komponenten des Lysats und des ZKÜ wurden ebenfalls aufgearbeitet und die Zusammensetzungen und Konzentrationen der einzelnen Disaccharide nach chromatographischer Auftrennung mittels HPLC analysiert.

Tabelle 3.5: Stoffmengen der HS-Disaccharide bei XT-II-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen im Lysat und ZKÜ.

Δ -Disaccharid	Lysat [nmol]		ZKÜ [nmol]	
	Kontrolle	pCR128.32	Kontrolle	pCR128.32
Δ di-0S _{HS}	4153 \pm 339,1	3946 \pm 211,0 ^{ns}	61,1 \pm 20,5	54,4 \pm 10,2 ^{ns}
Δ di-monoN0S _{HS}	169,0 \pm 11,2	135,4 \pm 3,7 ^{**}	171,2 \pm 26,6	151,0 \pm 32,1 ^{ns}
Δ di-mono2S _{HS}	113,3 \pm 14,7	100,4 \pm 23,9 ^{ns}	41,3 \pm 9,9	43,5 \pm 8,3 ^{ns}
Δ di-mono6S _{HS}	83,7 \pm 12,2	69,9 \pm 11,3 ^{ns}	nd	nd
Δ di-diN6S _{HS}	19,1 \pm 2,8	17,5 \pm 1,5 ^{ns}	nd	nd
Δ di-di(2,6)S _{HS}	16,8 \pm 1,43	15,0 \pm 2,1 ^{ns}	106,4 \pm 13,1	105,7 \pm 13,0 ^{ns}
$\Sigma \Delta$ i _{HS}	4556 \pm 365,0	4284 \pm 242,4 ^{ns}	855,9 \pm 214,1	758,8 \pm 130,7 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$).

Der einzige Unterschied bei einer XT-II-Überexpression im Gehalt der HS-Disaccharide war beim Disaccharid Δ di-monoN0S_{HS} im Lysat der Zellen erkennbar (Tabelle 3.5). Die

Stoffmenge sank hier von $169,0 \pm 11,2$ nmol bei den Kontrollzellen auf $135,4 \pm 3,7$ nmol bei XT-II-überexprimierenden Zellen.

Bei der Zusammensetzung der CS-GAG im Lysat war eine Abnahme des Chondroitin-4-sulfats von $753,1 \pm 56,8$ nmol bei den Kontrollzellen auf $566,7 \pm 91,7$ nmol bei gesteigerter XT-II-Aktivität nachweisbar (Tabelle 3.6). Eine weitere Änderung wurde bei der Stoffmenge der Hyaluronsäure im Lysat detektiert, die von $2083 \pm 115,2$ auf $1753 \pm 60,3$ nmol sank. Weitere signifikante Änderungen waren nicht feststellbar.

Tabelle 3.6: Stoffmengen der CS-Disaccharide bei XT-II-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen im Lysat und ZKÜ.

Δ -Disaccharid	Lysat [nmol]		ZKÜ [nmol]	
	Kontrolle	pCR128.32	Kontrolle	pCR128.32
Δ di-0S _{HA}	$2083 \pm 115,2$	$1753 \pm 60,3$ **	$3317 \pm 183,2$	$3176 \pm 151,0$ ^{ns}
Δ di-0S _{CS}	$277,0 \pm 31,3$	$256,8 \pm 42,5$ ^{ns}	$2269 \pm 379,1$	$2388 \pm 241,0$ ^{ns}
Δ di-mono4S _{CS}	$753,1 \pm 56,8$	$566,7 \pm 91,7$ **	$2717 \pm 346,0$	$2817 \pm 234,2$ ^{ns}
Δ di-mono6S _{CS}	$232,8 \pm 75,0$	$248,2 \pm 106,1$ ^{ns}	$589,9 \pm 147,7$	$579,0 \pm 86,67$ ^{ns}
Δ di-di(2,6)S _{CS}	$71,4 \pm 17,9$	$75,5 \pm 5,5$ ^{ns}	$73,1 \pm 18,7$	$77,8 \pm 13,7$ ^{ns}
Δ di-di(4,6)S _{CS}	$65,2 \pm 5,3$	$64,2 \pm 4,1$ ^{ns}	$78,4 \pm 18,9$	$85,5 \pm 16,9$ ^{ns}
$\Sigma \Delta$ di _{CS}	$3483 \pm 175,2$	$2964 \pm 190,0$ ^{ns}	$5727 \pm 907,7$	$5948 \pm 580,5$ ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$).

3.3 Diabetes-vermittelte Effekte auf glatte Muskelzellen und Hepatozyten

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine metabolische Erkrankung, dessen Inzidenz in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen ist. Die Krankheit geht einher mit einer Vielzahl möglicher Komplikationen, zu denen unter anderem auch die Atherosklerose oder Hepatopathien, wie die nicht-alkoholische Fettleber, zählen. Ein Projekt dieser Arbeit war daher die Untersuchung, ob mit Diabetes mellitus und Insulinresistenzen assoziierte metabolische Veränderungen Effekte auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten und an deren Synthese beteiligte Enzyme von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC, *vascular smooth muscle cell*) und der Hepatozytzelllinie HepG2 zeigen. Hierzu wurden die Zellen in hyperglykämischem oder hyperinsulinämischem Medium kultiviert.

3.3.1 Expressionsanalyse von ECM-Komponenten glatter Muskelzellen

Das Risiko für die Entwicklung einer Atherosklerose ist bei Diabetikern des Typ-2-Diabetes signifikant erhöht. Es kommt zu einer chronischen Entzündung der Arterienwände, die durch eine verlängerte subendotheliale Retention von Lipoproteinen an Proteoglykanen der Intima initiiert wird. Da diese Proteoglykane hauptsächlich von glatten Muskelzellen der Media synthetisiert werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen von Hyperglykämie und -insulinämie auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten und an deren Synthese beteiligte Enzyme in diesem Zelltyp untersucht.

3.3.1.1 Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme

Zur Untersuchung der Effekte von Insulin auf die Expression von extrazellulären Matrixkomponenten wurden vaskuläre glatte Muskelzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Insulin behandelt. Es wurden 200.000 Zellen ausgesät, mit 1, 10 oder 50 nmol/L Insulin versetzt und nach einer Inkubation über sieben Tage geerntet. Um über diesen Zeitraum eine möglichst konstante Glukosekonzentration von 1,0 g/L im Medium aufrecht zu erhalten, wurde diese alle 24 h gemessen und durch Zugabe einer Glukoselösung die verbrauchte Menge resupplementiert.

Die Analyse der relativen Genexpression von induzierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten VSMC ergab teilweise signifikante Änderungen (Abbildung 3.31). Bei den XT-Isoformen war nur bei 10 nmol/L Insulin eine Hochregulation der XT-II-Expression ($1,8 \pm 0,2$) detektierbar, während bei den weiteren Konzentrationen die mRNA-Menge

konstant blieb. Die Behandlung mit der höchsten Insulinkonzentration führte zu einem Anstieg auf das 1,3-fache ($\pm 0,1$) bei der N-Acetylgalaktosaminyltransferase-I (GalNAcT-1) und bei den weiteren untersuchten Genen konnte eine teilweise Herunterregulation der relativen Expression verzeichnet werden. Die Expression von Kollagen 1 α 1 und Osteonektin sank bei einer Konzentration von 1 nmol/L auf das 0,8-fache, bei 10 nmol/L auf das 0,6- bzw. 0,4-fache und wies bei der höchsten Insulinkonzentration die gleiche Expressionsstärke wie die unbehandelten Zellen auf.

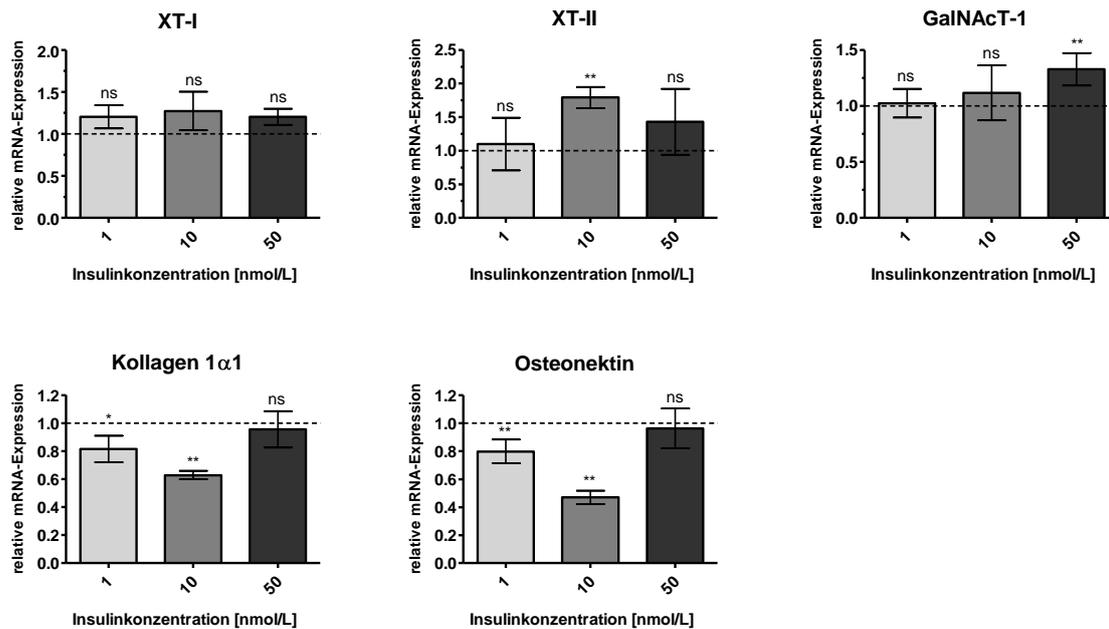


Abbildung 3.31: Relative Genexpressionen vaskulärer glatter Muskelzellen nach Zugabe von 1, 10 oder 50 nmol/L Insulin über einen Zeitraum von 7 d. Die Normierung erfolgte auf die Expression unbehandelter Zellen (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Die relative Genexpression der Proteoglykane Biglycan, Decorin, Perlecan, Syndecan-2 und Versican zeigten keine durch Insulinzugabe hervorgerufene Änderungen und wurden aus diesem Grund nicht dargestellt. Ebenfalls nicht aufgezeigt ist die von der Insulinzugabe unbeeinflusste XT-Aktivität im ZKÜ der vaskulären glatten Muskelzellen.

3.3.1.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von Glukose auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten von vaskulären glatten Muskelzellen untersucht. Nach Aussaat von 200.000 Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L wurde außer bei den Referenz- und Kontrollproben die Glukosekonzentration der weiteren Proben auf 2,75 g/L und 4,5 g/L erhöht. Als osmotische Kontrolle wurde das mit 1,0 g/L glukosehaltige Medium mit einer zur Glukoselösung äquimolaren Mannitollösung

supplementiert. Die Glukosekonzentration wurde alle 24 h überprüft und die verbrauchte Menge wieder zugeführt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet.

Die Analyse der relativen Genexpressionen zeigte eine signifikante Erhöhung der XT-I um das 1,4-fache bei einer Glukosekonzentration von 4,5 g/L ($\pm 0,2$) und bei den osmotischen Kontrollproben ($\pm 0,1$). Die XT-II-Expression blieb unverändert. Bei dem untersuchten Proteoglykan Perlecan wurde im Vergleich zur Referenzprobe bei allen Proben eine verringerte mRNA-Menge detektiert. Diese waren im Einzelnen: $0,6 \pm 0,3$ bei 2,75 g/L Glukose, $0,5 \pm 0,4$ bei 4,5 g/L Glukose und $0,5 \pm 0,3$ bei den mit Mannitol versetzten VSMC. Kollagen $1\alpha 1$ wurde ebenfalls weniger stark bei der höchsten Glukosekonzentration ($0,7 \pm 0,1$) und der osmotischen Kontrolle ($0,9 \pm 0,1$) exprimiert, während bei Osteonektin eine Reduktion der mRNA-Menge bei 2,75 g/L ($0,8 \pm 0,1$) und 4,5 g/L ($0,6 \pm 0,1$) Glukose detektierbar war. Ein Anstieg der relativen Expression war hingegen bei der N-Acetylgalaktosaminyltransferase-I auf das 1,5-fache ($\pm 0,1$) bei hoher Glukosekonzentration und auf das 1,3-fache ($\pm 0,3$) bei osmotischen Kontrollzellen erkennbar.

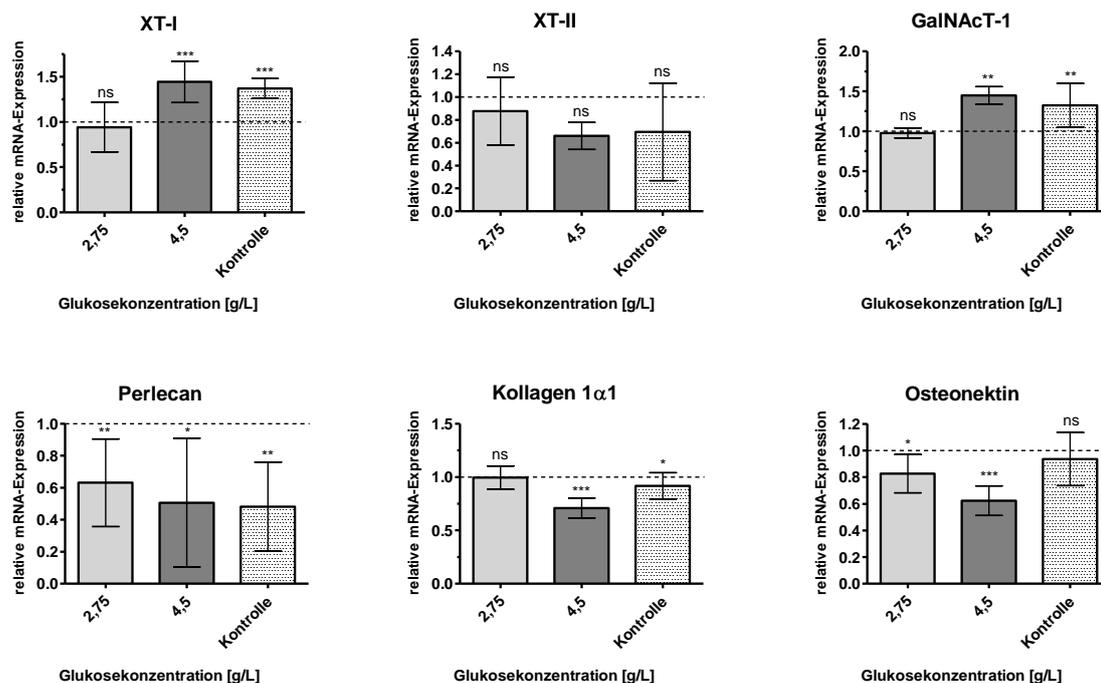


Abbildung 3.32: Relative Genexpressionen vaskulärer glatter Muskelzellen kultiviert in Medium mit einer Gesamtkonzentration an Glukose von 2,75 und 4,5 g/L über einen Zeitraum von 7 d. Als osmotische Kontrolle wurde eine zur höchsten Glukosekonzentration äquimolare Mannitollösung verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Expression von Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je vier biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die bei steigender Glukosekonzentration unveränderten relativen Genexpressionen von Biglycan, Decorin, Syndecan-2 und Versican sowie die auf einem konstanten Wert bleibende XT-Aktivität im ZKÜ wurden nicht abgebildet.

3.3.2 Expressionsanalyse von ECM-Komponenten der Hepatozytzelllinie HepG2

Bei Typ-2-Diabetikern ist das Risiko eine Hepatopathie, wie die nicht-alkoholischen Fettleber, zu erwerben im Vergleich zu Nicht-Diabetikern deutlich erhöht. Über derartige Komplikationen und ihre Entstehung ist noch relativ wenig bekannt, so dass im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Hyperinsulinämie und -glykämie auf die Expression von ECM-Komponenten und der XT-II in Hepatozyten untersucht wurde.

3.3.2.1 Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme

Um die Effekte einer Hyperinsulinämie auf die Hepatozytzelllinie HepG2 zu untersuchen, wurde die Kultivierung ähnlich wie die der glatten Muskelzellen durchgeführt. Es wurden 50.000 Zellen in einer 6-Kavitäten-Schale ausgesät und nach sieben Tagen Inkubation mit 0, 1, 10 oder 50 nmol/L Insulin geerntet. Durch den hohen Stoffumsatz der HepG2-Zellen wurde die Glukosekonzentration des Mediums mit 1,0 g/L zweimal täglich überprüft und der Verbrauch supplementiert. Nach Ernte der Zellen wurde die RNA isoliert und revers transkribiert um eine Genexpressionsanalyse durchführen zu können.

Die XT-I-Isoform wird in HepG2-Zellen nicht exprimiert, so dass diese nicht dargestellt werden konnte. Bei der XT-II zeigte sich dagegen eine verstärkte, konzentrationsabhängige Expression (Abbildung 3.33). Bei den untersuchten Proteoglykanen konnte für Bikunin eine Hochregulation der mRNA-Menge bei einer Insulinkonzentration von 10 und 50 nmol/L auf das etwa 1,3-fache, bei Syndecan-1 eine Verdopplung der Transkriptmenge bei Insulinzugabe von 1 nmol/L und bei Versican eine Erhöhung der Expression auf das 1,4-fache bei der höchsten Insulinkonzentration detektiert werden. Die Transkriptmenge von Osteonektin stieg konzentrationsabhängig bis auf das 1,5-fache.

Keine Änderungen konnten für die Expression von Kollagen 1 α 1 sowie die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand detektiert werden (nicht dargestellt). Ebenfalls keine weiteren Erkenntnisse lieferte ein zweifach durchgeführtes, analoges Experiment mit drei biologischen Replikaten und einer höheren Zellzahl von 200.000 Zellen (nicht dargestellt).

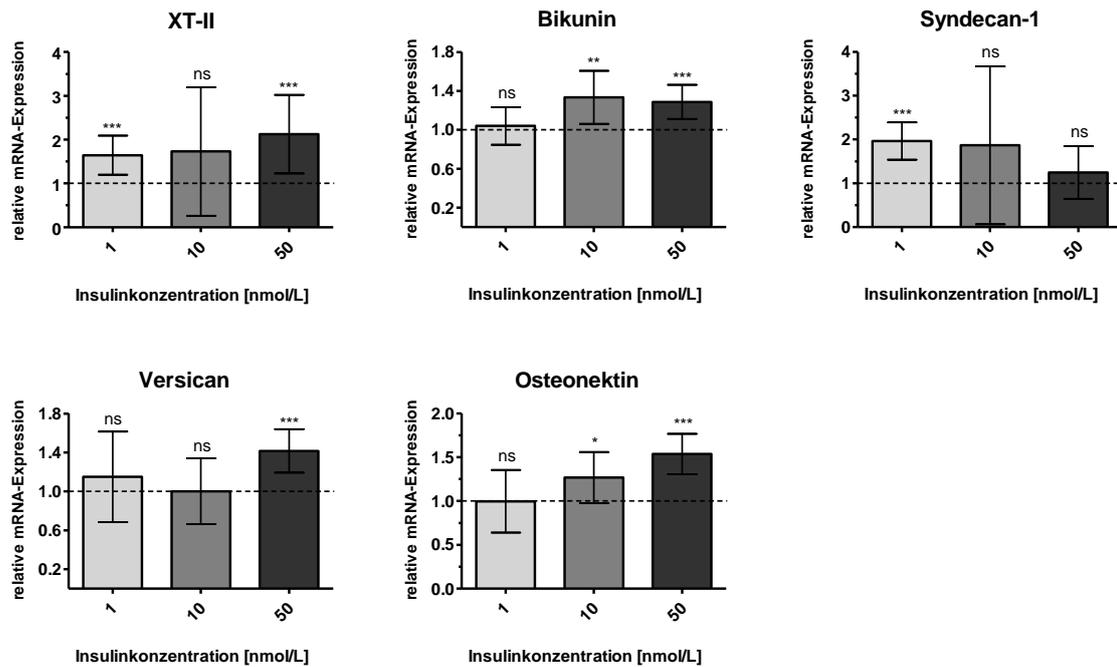


Abbildung 3.33: Relative Genexpressionen von HepG2-Zellen nach Zugabe von 1, 10 oder 50 nmol/L Insulin über einen Zeitraum von 7 d. Die Normierung erfolgte auf die Expression unbehandelter Zellen (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je sechs biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

3.3.2.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix und an der Synthese beteiligter Enzyme

Analog zur Untersuchung der Effekte einer Hyperinsulinämie wurden HepG2-Zellen in Medien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kultiviert, um Auswirkungen einer Hyperglykämie auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten zu analysieren. Als Referenz dienten Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L. Die Menge an Glukose wurde bei den Proben auf 2,75 g/L bzw. 4,5 g/L erhöht und als osmotische Kontrolle wurde das Referenzmedium mit einer zur Glukoselösung äquimolare Mannitollösung supplementiert. Die Konzentrationen wurden zweimal täglich überprüft und verstoffwechselte Glukose wieder hinzugegeben. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und die isolierte mRNA revers transkribiert.

Bei einer Expressionsanalyse konnte eine Veränderung der XT-II-Transkriptmenge nur bei der osmotischen Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 3.34). Die relative Expression von Syndecan-1 und Versican war neben der osmotischen Kontrolle auch bei größeren Glukosekonzentrationen erhöht. Die mRNA-Menge von Kollagen 1 α 1 sank hingegen bei einer mittleren Glukosekonzentration von 2,75 g/L um etwa 40 % und stieg bei maximaler Zuckermenge auf das 1,5-fache.

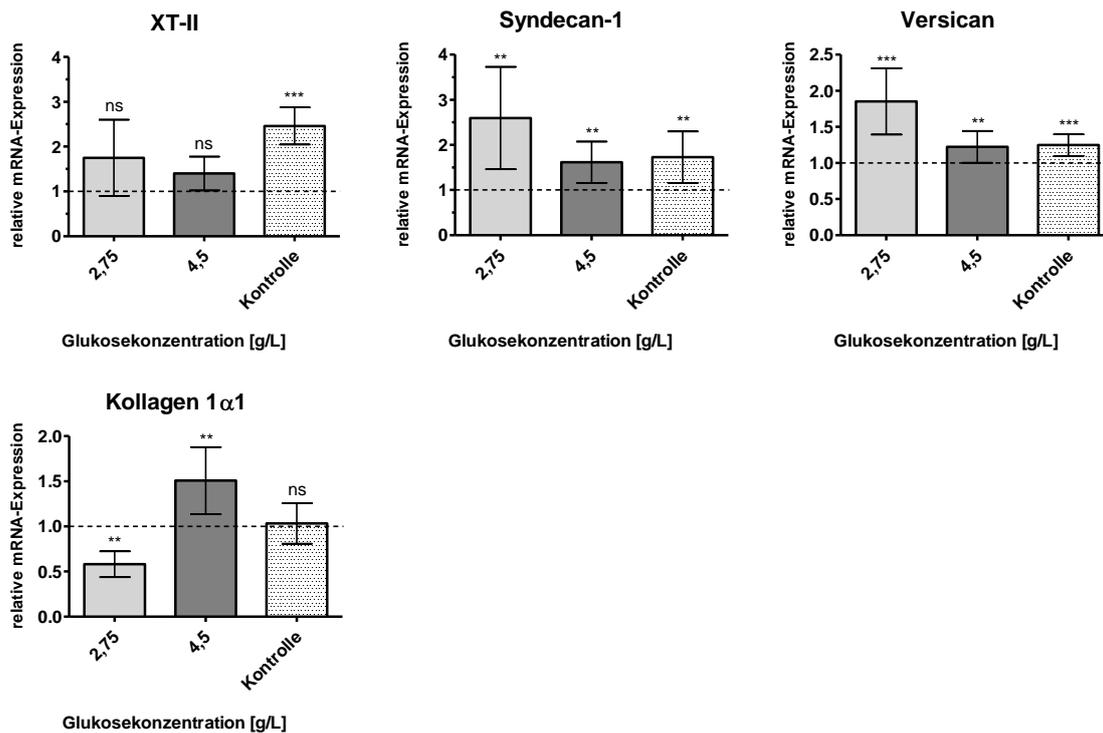


Abbildung 3.34: Relative Genexpressionen von HepG2-Zellen kultiviert in Medium mit einer Gesamtkonzentration an Glukose von 2,75 und 4,5 g/L über einen Zeitraum von 7 d. Als osmotische Kontrolle wurde eine zur höchsten Glukosekonzentration äquimolare Mannitollösung verwendet. Die Normierung erfolgte auf die Expression von Zellen in Medium mit einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L (gestrichelte Linie). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je sechs biologische Replikate in Dreifachbestimmung (ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Keine signifikanten Genexpressionsänderungen konnten für Bikunin und Osteonektin nachgewiesen werden. Ebenfalls nicht von der Glukosekonzentration beeinflusst war die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand.

Die analoge zweifache Zellkultivierung von 200.000 Zellen in je drei biologischen Replikaten zeigte nur Genexpressionsänderungen, die sowohl bei einer Glukosekonzentration von 4,5 g/L als auch der osmotischen Kontrolle auftraten (nicht abgebildet).

4 Diskussion

Die Xylosyltransferasen I und II katalysieren in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt den Xylosetransfer auf spezifische Serinreste von *Core*-Proteinen und initiieren somit die posttranslationale GAG-Biosynthese [29, 30, 33, 40]. Die Isoenzyme weisen hohe funktionelle sowie strukturelle Homologien auf und besitzen Gemeinsamkeiten im Temperaturoptimum, in ihrer Stabilität und ihrer Kationenabhängigkeit bei der enzymatischen Katalyse [31, 35]. Trotz der Homologien zeichnen sich die Isoenzyme durch ein divergentes Expressionsmuster in einer gewebe- und zelllinienspezifischen Expression aus, die sich größtenteils in einer dominierenden XT-II- und teilweise fehlender XT-I-Expression darstellt [29, 30, 39, 40, 76]. Kürzlich konnten signifikante Unterschiede in der transkriptionellen Regulation der XT-Isoformen nachgewiesen werden [77, 78].

Durch die Bedeutsamkeit der ECM und ihrer Komponenten in biochemischen Regulationsprozessen können Dysbalancen und andere Störungen in der Synthese einzelner ECM-Moleküle zum Teil schwere Erkrankungen auslösen. So gelang auch für die XT-Isoformen der Nachweis, dass diese an einer Vielzahl pathologischer Prozesse beteiligt sind und teilweise mit der Schwere der Erkrankung korrelieren [41-44, 46, 52, 53, 79-85].

4.1 Untersuchungen zur Akzeptorspezifität humaner XT-Isoformen

Bislang ist über die Akzeptorspezifitäten der humanen Xylosyltransferasen relativ wenig bekannt, jedoch zeigte sich in Analysen bereits untersuchter Proteoglykan-*Core*-Proteine kein deutlicher Spezifitätsunterschied zwischen den beiden Isoformen. Die vorliegenden Daten und Analysen sind jedoch limitiert und beschränkten sich auf die Untersuchung der Reaktionskinetiken für einen Xylosetransfer auf Bikunin [29, 35-37, 86], L-APLP2 [35, 87], L-APP [35, 37, 87], bFGF (*basic fibroblast growth factor*) [29, 35, 83] und Syndecan [31, 88]. Zur weiteren Aufklärung möglicher Spezifitätsunterschiede und somit auch zur physiologischen Funktion der XT-Isoformen wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Vielzahl möglicher Akzeptorproteine auf Sequenzgrundlage *in vivo* vorkommender Proteoglykane generiert und die Reaktionskinetiken einer XT-I- und XT-II-vermittelten Katalyse bestimmt. Des Weiteren wurden zufällige Mutationen in bestimmten Bereichen der Xylosylierungsstelle der Bikuninsequenz eingeführt und die Auswirkungen auf die Akzeptorfunktion und die Reaktionskinetiken der Katalysen untersucht.

4.1.1 Reaktionskinetiken des XT-vermittelten Xylosetransfers auf GAG-Bindestellen aus *in vivo* Proteoglykanen

Die Synthese potentieller Akzeptorproteine gelang durch die plasmidkodierte Synthese von Fusionsproteinen bestehend aus GST und bekannten oder putativen Xylosylierungsstellen. Die C-terminalen Xylosylierungsstellen umfassten den zentralen Serinrest einer 10 bis 13 Aminosäuren langen Sequenz und wurden durch ein Stop-Codon terminiert. Es wurden PG-Abschnitte ausgewählt, für die bereits eine Funktion als GAG-Akzeptor nachgewiesen war oder bei noch unidentifizierten Xylosylierungsstellen die Abschnitte, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz [32] die wahrscheinlichsten GAG-Bindestellen waren. Zur Auswertung der Reaktionskinetiken wurden Hanes-Woolf-Diagramme erstellt. Dieses Linearisierungsverfahren bietet den Vorteil, dass Fehlergrenzen nur gering verzerrt werden und eine lineare Regression durchgeführt werden kann [89].

Bei Fusionsproteinen mit einem einzelnen GSG-Motiv (Gruppe 1 in Tabelle 3.1) ergab die Untersuchung der Reaktionskinetiken ähnliche K_m -Werte für XT-I- und XT-II-vermittelte Katalysen. Die Affinität der XT-II zu den Proteinen schien jedoch leicht höher zu sein, was sich in den meist etwas kleineren K_m -Werten widerspiegelte. Im Gegensatz dazu deuteten die XT-I-katalysierten Reaktionen mit im Allgemeinen höheren maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten auf einen etwas schnelleren Umsatz durch diese Isoform hin. Positionen und Anzahl saurer Aminosäuren hatten scheinbar nur einen geringen Einfluss auf die Akzeptoreigenschaft des Fusionsproteins, da alle K_m -Werte in einem ähnlichen Bereich lagen. Wang *et al.* konnten jedoch durch eine systematische Mutagenese der Syndecan-1-Sequenz von *C. elegans* zeigen, dass saure Aminosäuren an bestimmten Positionen für eine Xylosylierung vorhanden sein mussten [90]. So waren einzelne saure N-terminale Aminosäuren an der Position -4, -3 oder -2 oder ein entfernteres Paar saurer AS an den Positionen -6 und -5 Voraussetzung für eine Katalyse. Die am weitesten entfernte saure Aminosäure bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteinen war bei Syndecan-1 an der (-5)-Position lokalisiert. Dass dieses Protein dennoch gute Akzeptoreigenschaften zeigte, könnte auf die natürlich vorkommende Aminosäurekombination zurückzuführen sein, die möglicherweise entscheidend zur Akzeptorfunktion beiträgt. Unterschiede in der Reaktionskinetik zwischen L-APP und L-APLP2 könnten ebenfalls auf den Einfluss saurer Aminosäuren zurückzuführen sein. Die größte Abweichung zwischen diesen Sequenzen war ein zusätzlicher Glutamatrest an der (+4)-Position in L-APLP2, der für die bessere Akzeptorfunktion in einer XT-II-katalysierten Reaktion verantwortlich sein könnte. Der gleiche Effekt könnte Unterschiede zwischen Aggrecan und Syndecan-4 erklären.

Die Reaktionskinetiken deckten sich mit ermittelten K_m -Werten einiger weniger bisher untersuchter Proteine. Für Bikunin wurden K_m -Werte von 0,9 bis 22,0 μM für eine XT-I- und Werte von 1,9 bis 22,0 μM für eine XT-II-vermittelte Katalyse beschrieben [29, 35-37,

86, 87, 91-93]. Die hier festgestellten K_m -Werte von 27,4 mit XT-I und 46,3 μM mit XT-II lagen etwas höher. Alle bisher berechneten Daten sind aufgrund Divergenzen der verwendeten Proteine und Unterschiede in der Herkunft der XT aus verschiedenen Organismen bzw. Expressionssystemen allerdings nur bedingt miteinander vergleichbar. So wurden rekombinantes Bikunin [91], biotinylierte oder mit Fluoreszein markierte Varianten unterschiedlicher Länge [29, 35] verwendet. Xylosyltransferasen waren sowohl murinen Ursprungs [37] als auch Produkte aus *Pichia Pastoris* [36] und humanen Expressionssystemen [29]. Bei früher verwendeten Zellkulturüberständen von JAR-Zellen [87, 93] war nur die Existenz der XT-I bekannt, so dass von einer XT-I-katalysierten Reaktion ausgegangen wurde. Heute wurde durch eine Expressionsstudie nachgewiesen, dass beide Isoformen von JAR-Zellen exprimiert werden und es sich bei früheren Experimenten folglich um ein Gemisch aus beiden XT-Isoformen handelte [76]. Die K_m -Werte für L-APP, L-APLP2, bFGF und Syndecan waren ebenfalls vergleichbar mit veröffentlichten Daten, jedoch waren hier dieselben Probleme in der Vergleichbarkeit der Daten erkennbar.

Bei Fusionsproteinen mit kumulierten GSG-Motiven (Gruppe 2, Tabelle 3.1) schien die negative Ladungsdichte und Position saurer Aminosäuren eine höhere Wirkung auf die Akzeptorfunktion auszuüben. Eine höhere negative Ladungsdichte sowie nähere Lokalisation der sauren Aminosäuren zur Xylosylierungsstelle schienen die Akzeptorfunktion zu verbessern. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Länge des kumulierten GSG-Motivs ebenfalls Einfluss auf die Reaktionskinetiken nehmen könnte, da dieses bei SPACRCAN, Agrin und Glypican-1 nicht einheitlich war und variierte.

Fusionsproteine der Gruppe 3 (Tabelle 3.1) mit Variationen des GSG-Motivs in Form von SGx- oder xSG-Motiven wurden hauptsächlich in einer XT-I-katalysierten Reaktion xylosyliert und nur in wenigen Ausnahmefällen fand eine Katalyse mit XT-II statt. Dies demonstrierte eine geringere Stringenz der XT-I in Bezug auf die Akzeptorsequenz. Der Charakter der Aminosäuren an der (-1)- und (+1)-Position, sowie Position und Dichte saurer Aminosäuren schienen einen ausgeprägteren Einfluss auf die Funktionalität des Akzeptors auszuüben, wie im sequenzabhängigen Xylosylierungsgrad deutlich wurde.

Durch diese Studie konnten putative GAG-Bindestellen als *in vitro* Xylosylierungsstellen verifiziert werden, was daraufhin deutet, dass diese Serinreste auch *in vivo* eine Akzeptorfunktion ausüben könnten. Insgesamt konnte für alle getesteten Proteoglykane, außer Epiphygan, eine Xylosylierung durch eine oder beide XT-Isoformen nachgewiesen werden. Bei Epiphygan könnte das nicht untersuchte Serin³²⁰ die eigentliche GAG-Bindestelle sein [94]. Weiterhin sehr auffällig ist ein saurer Cluster aus sieben Glutamatresten der zwischen den untersuchten Sequenzen lokalisiert ist (Abbildung 4.1). Dieser könnte *in vivo* eine für die Xylosylierung notwendige Faltung der Proteinstruktur hervorrufen oder durch Wechselwirkungen mit den Xylosyltransferasen eine Katalyse ermöglichen.

```

1  MKTLAGLVLG LVIFDAAVTA  PTLSEINYDS  ETYDATLEDL  DNLYNYENIP
51  VGKVEIEIAT VMPSGNRELL  TPPPQPEKAQ  EEEEEEESTP  RLIDGSSPQE
           Epiphycan_1           saurer Cluster           Epiphycan_2
101 PEFTGVLGPH  TNEDFPTCLL  CTCISTTVYC  DDHELDAIPP  LPKNTAYFYS
151  RFNRIKKINK  NDFASLSDLK  RIDLTSNLIS  EIDEDAFRKL  PQLRELVLRD
201  NKIRQLPELP  TTLTFIDISN  NRLGRKGIKQ  EAFKDMYDLH  HLYLTDNNLD
251  HIPLPLPENL  RALHLQNNNI  LEMHEDTFCN  VKNLTYIRKA  LEDIRLDGNP
301  INLSKTPQAY  MCLPRLPVGS  LV
           Serin320

```

Abbildung 4.1: Aminosäuresequenz des humanen Epiphycans. Klonierte Sequenzen der GST-Fusionsproteine, der saure Cluster und Serin³²⁰ als weitere potentielle GAG-Bindestelle sind hervorgehoben.

Die Konsensussequenz der XT-I konnte auf die XT-II übertragen werden. Es wurden zwar Proteine wie Betaglycan oder CD44 gefunden, die ausschließlich durch XT-I xylosyliert wurden, jedoch war die Produktmenge nach verlängerter Reaktionszeit so gering, dass diese Akzeptoren nicht für einen routinemäßigen Einsatz im XT-Aktivitätstest einsetzbar sind. Eine differenzierte Xylosylierung durch eine der beiden Isoformen in Bezug auf den Typ der entstehenden GAG-Kette (CS, DS, HS) zeigte sich nicht. Hier deuteten frühere Studien auch eher auf eine wichtige Funktion von serinflankierenden sauren, hydrophoben Aminosäuren hin, die wahrscheinlich zur Ausbildung spezieller Sekundär- oder Tertiärstrukturen führen und dadurch die Entstehung des GAG-Typs beeinflussen [34, 95-99].

4.1.2 Auswirkungen von Mutationen der Bikuninsequenz auf die Reaktionskinetiken der Xylosylierungsreaktionen

In einem weiteren Projekt wurden in der Sequenz des Bikunin-Fusionsproteins zufällige Mutationen amino- oder carboxyterminal sowie im Bereich der Xylosylierungsstelle eingeführt. Hierdurch sollten Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf die Akzeptorfunktion und die Reaktionskinetiken der XT-Isoformen untersucht werden.

Es zeigte sich, dass Mutationen auf der N-terminalen Seite oder im Bereich des GSG-Motivs des Bikunin-Fusionsproteins deutlich öfter in einem Funktionsverlust resultierten als Mutationen im C-Terminus (Tabelle 3.2). Die Analyse der Reaktionskinetiken von N-terminal mutierten Aminosäuren (Gruppe 1) deutete darauf hin, dass mit steigender Anzahl basischer Aminosäuren die Funktionalität des Fusionsproteins als Akzeptor sinkt. Zusätzlich konnte zwischen den beiden Isoformen die geringere Stringenz der XT-I hinsichtlich des Akzeptorspektrums bestätigt werden. Die sauren Aminosäuren waren für eine XT-II-vermittelte Katalyse essentiell, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei anderen AS-Kombinationen eine Xylosylierung auch ohne saure Reste erfolgen könnte. Bei einer XT-I-katalysierten Xylosylierung erhöhten saure Aminosäuren die Mengen an

xylosyliertem Produkt enorm, waren aber nicht essentiell. Ähnliche Ergebnisse fanden Pfeil *et al.*, die eine Reduktion der Glutamatreste des Peptids QEEEGSGGGQGG durchführten und eine Verringerung der Produktmenge beobachten konnten [100]. Auch Wang *et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen einem Fehlen der N-terminalen sauren Aminosäure bei Syndecan-1 und einem Verlust der Akzeptorfunktion [90].

Mutationen im GSGG-Motiv resultierten im Allgemeinen in Fusionsproteinen, die nicht zum Akzeptorspektrum der XT zählten (Gruppe 2). Einige der Peptide bildeten jedoch Ausnahmen. Deren Sequenzen stimmten zum Teil mit den minimalen Konsensussequenzen GSG oder SGxG [33, 34] überein (Peptide 2.1, 2.2, 2.7, 2.8), aber andere wie die Peptide 2.3, 2.4, 2.9 und 2.10 mit GSSGG-, GSSCG- oder GSTSL-Motiven wurden trotz Abweichung von den Minimalmotiven als Akzeptoren erkannt. Dies deutete darauf hin, dass definierte Abweichungen zulässig und die neu erkannten Motive bei künftigen Untersuchungen mit in die Betrachtungen eingeschlossen werden sollten. Keine Xylosylierung konnte für das Protein mit einer S(0)T-Mutation detektiert werden, was sich mit anderen Ergebnissen deckte [90, 100]. Serin und Threonin unterscheiden sich durch eine Methylgruppe, die eventuell als sterische Hinderung einer Xylosylierungsreaktion entgegenwirkt.

Die Reaktionskinetiken der in Gruppe 3 zusammengefassten Fusionsproteine mit Mutationen C-terminal des GSG-Motivs änderten sich bei Aminosäureaustauschen kaum. Dies wies auf einen eher geringen und vernachlässigbaren Effekt der carboxyterminalen Aminosäuren auf die Akzeptoreigenschaft eines Proteins hin und ist ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der gezielten Mutagenese von Syndecan-1 [90].

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Akzeptorspezifität humaner XT-Isoformen

Zusammenfassend zeigte sich, dass beide XT-Isoformen ein ähnliches Akzeptorspektrum umsetzten, die Reaktionskinetiken der Katalyse jedoch leichte Unterschiede aufwiesen. Diese Divergenzen äußerten sich einerseits in einer etwas geringeren Stringenz der XT-I hinsichtlich der Akzeptorsequenz sowie einem etwas schnelleren Umsatz durch diese Isoform und andererseits in einer leicht höheren Affinität der XT-II zu deren Substraten. Die von Brinkmann *et al.* postulierte XT-I-Konsensussequenz a-a-a-a-Gly-Ser-Gly-a-b-a konnte für die XT-II bestätigt und zusätzlich konnten Substrate mit definierten Sequenzabweichungen zu den Minimalmotiven der Konsensussequenz in Form von GSSGG-, GSSCG- und GSTSL-Motiven gefunden werden.

Position und Anzahl saurer Aminosäuren hatten bei Fusionsproteinen mit GAG-Bindestellen aus *in vivo* Proteoglykanen scheinbar nur einen geringen Einfluss auf die Akzeptoreigenschaft. Dies könnte möglicherweise auf die natürlich vorkommenden AS-Kombina-

tionen zurückzuführen sein, die eventuell durch eine evolutionäre Entwicklung optimal auf die Akzeptorfunktionen abgestimmt sind und vielleicht entscheidend zur Funktionalität beitragen. Unterschiede in der Anzahl saurer AS-Reste könnten andererseits jedoch Unterschiede in Reaktionskinetiken von L-APP/L-APLP2 und Aggrecan/Syndecan-2 erklären und die Korrelation von sauren Aminosäuren mit steigender Akzeptorfunktion aufzeigen.

Mutationen des Bikunin-Fusionsproteins auf der N-terminalen Seite und im Bereich des GSG-Motivs führten deutlich häufiger zu einem Funktionsverlust als Mutationen im C-Terminus. Dies deutete auf einen höheren Einfluss dieser Aminosäuren auf die Akzeptorfunktion im Vergleich zu carboxyterminalen Aminosäuren hin.

4.2 Profibrotische Cytokine und Rolle der Xylosyltransferasen in fibrotischen Erkrankungen

Fibrotische Veränderungen können bei einer Vielzahl an Organen auftreten und führen dort zu Funktionseinschränkungen oder -verlusten der physiologischen Gewebefunktion. In der progressiv verlaufenden pathologischen Veränderung des Bindegewebes werden Fibroblasten aktiviert und differenzieren zu Myofibroblasten. Diese synthetisieren eine Vielzahl an ECM-Komponenten, vor allem Kollagene und Proteoglykane, die aufgrund der hohen Konzentrationen akkumulieren und funktionelles durch fibrotisches Gewebe ersetzen [48].

Diese charakteristische Überproduktion von Kollagenen und Proteoglykanen werden bei fibrotischen Hauterkrankungen von TGF- β , CTGF (*connective tissue growth factor*), Activin A, EGF (*epidermal growth factor*), TNF- α (*tumor necrosis factor*) oder anderen Cytokinen hervorgerufen, unter denen das TGF- β 1 jedoch nach bisherigem Kenntnisstand eine Schlüsselfunktion ausübt [101]. Bei den PG treten neben Änderung der Core-Proteinexpressionen Unterschiede in Zusammensetzung und Gehalt der GAG-Ketten auf [102]. Speziell die Wirkung von TGF- β 1 und Activin A auf die Komponenten der ECM standen in dieser Arbeit im Fokus der Untersuchungen. Korrelationen der erhöhten PG-Biosynthese mit der XT als initiiertem Enzym der GAG-Synthese konnten bei verschiedenen fibrotischen Erkrankungen wie der systemischen Sklerodermie nachgewiesen werden [41], so dass im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss erhöhter sowie reduzierter XT-Aktivitäten auf die Zusammensetzung der ECM dermalen Fibroblasten untersucht wurde.

4.2.1 Zwei- und dreidimensionale Kultivierung von dermalen Fibroblasten

Die in den meisten Studien angewendete konventionelle Kultivierung von Zellen erfolgt als monozelluläre, zweidimensionale Schicht auf speziellen Plastikoberflächen. Um die

physiologische Umgebung von Zellen besser zu imitieren, können Zellen jedoch auch dreidimensional z. B. in einer Kollagenmatrix kultiviert werden. Im direkten Vergleich der Kultivierungsmethoden wird der hohe Einfluss der Zellumgebung auf die Zellmorphologie in der lichtmikroskopischen Betrachtung deutlich. Bei den in dieser Arbeit in einer Kollagenmatrix kultivierten Dermalfibroblasten konnte in Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen eine ausgeprägtere spindelförmige Struktur detektiert werden [103, 104]. Durch die Einbettung in die komplexere Kollagenmatrix können von den Fibroblasten sezernierte Moleküle wahrscheinlich stärker zurückgehalten werden und diffundieren je nach Ausprägung des Kollagennetzwerkes eventuell langsamer in das Medium. Es besteht dementsprechend die Vermutung, dass eine Art extrazelluläre Matrix aufgebaut wird, die einen Signalaustausch zwischen den Zellen ermöglicht.

4.2.2 Wirkungen von TGF- β 1 auf Xylosyltransferasen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix

Eine zentrale Rolle in der Wundheilung spielt das Cytokin TGF- β , von dem drei Isoformen bekannt sind. Eine Überproduktion dieser dimeren Polypeptide kann zu ausgeprägter Narbenbildung und Fibrose führen [55]. So konnte unter anderem eine Beteiligung bei fibrotischen Remodellierungen in der Lunge, Niere, Leber, im Herz oder Pankreas nachgewiesen werden. Auch bei Veränderungen der Haut wie der Ausbildung hypertropher Narben, bei Keloiden oder Sklerodermie trägt TGF- β stark zur Pathogenese der Krankheit bei [51]. Die profibrotische Charakteristik des Cytokins wird vor allem durch dessen stimulierende Effekte auf die Biosynthese von ECM-Komponenten als auch der inhibierenden Wirkung auf die Matrixdegradation verursacht [105].

Bei den Genexpressionsanalysen konnte nach TGF- β 1-Zugabe eine Erhöhung der XT-I-Expression in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Derselbe Effekt wurde schon für kardiale Fibroblasten und Astrozyten beschrieben [53, 106]. Erstmals gezeigt werden konnte eine durch TGF- β 1-hervorgerufene Verdopplung der XT-II-Transkriptmenge, die jedoch nur bei einer Kultivierung in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix auftrat. Dies spricht für eine wichtige Rolle der ECM und der Umgebung der kultivierten Zellen bei der Einflussnahme auf die Expression bestimmter Gene. Auch könnte der strukturelle Unterschied der dreidimensional kultivierten Zellen einen Beitrag zu Genexpressionsunterschieden im Vergleich zu konventionell kultivierten Fibroblasten liefern. Durch die Dreidimensionalität der Zellen zueinander und die Einlagerung in die Kollagenmatrix könnte ein strukturelles Gerüst ähnlich der Zellumgebung im Gewebe aufgebaut, von Zellen sekretierte Moleküle würden stärker zurückgehalten und Interaktionen zwischen sezernierten Proteinen ermöglicht oder bestimmte Cytokine durch Wechselwirkungen mit anderen Molekülen lokal konzentriert werden.

Die Erhöhung der XT-I- und teilweise auch XT-II-Expression ging einher mit einer Erhöhung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand. Die höhere Enzymaktivität nach 96 h im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation ist trotz etwa gleich starker XT-Expressionsänderungen durch die Sezernierung der Xylosyltransferasen erklärbar [41]. Mit einer höheren Kultivierungsdauer kann eine höhere Enzymmenge sezerniert werden, die im Zellkulturüberstand akkumuliert und so eine gesteigerte XT-Aktivität verursacht.

Die Genexpressionsanalyse zeigte weiterhin die typische induzierende Wirkung des TGF- β 1 auf die Transkriptmenge des Biglycans, des Versicans und der Kollagene sowie eine negative Regulation der mRNA-Menge des Decorins und des Betaglycans [51, 107, 108]. Es wurden speziell die Expressionen dieser Proteoglykane untersucht, da diese in fibrotischen Erkrankungen verändert sind [102, 109-111] und Biglycan, Decorin sowie Betaglycan zusätzlich eine Rolle in der Signaltransduktion des TGF- β 1 spielen. Biglycan und Decorin sind TGF- β 1-Antagonisten und können dieses durch eine Bindung inaktivieren [112-114]. Betaglycan, auch bekannt als Typ III TGF- β -Rezeptor (TGF β RIII), ist ein membrangebundenes Proteoglykan, das TGF- β 1 bindet und den gebundenen Ligand dem TGF β RII präsentiert. Dieser Rezeptor dimerisiert daraufhin mit TGF β RI und die Signaltransduktion über die Serin/Threonin-Kinaseaktivität kann erfolgen [115]. Durch die Präsentation des TGF- β erhöht Betaglycan die Bindung des Cytokins an seine Signaltransduktionsrezeptoren. Bei der zeitlichen Analyse der Genexpressionsänderungen der Kollagene und Proteoglykane konnten außer kleineren Unterschieden in der Stärke der Hoch- oder Herabregulation einiger Gene keine signifikanten Differenzen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer nachgewiesen werden. Die höchste Variabilität wurden bei der relativen Quantifizierung der Kollagene detektiert, die durch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Physiologie der Haut verursacht sein könnten [116]. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass sich fibrotische Lungenläsionen in weiblichen und männlichen Ratten nach einer Bleomycin-Induktion unterschiedlich stark ausprägten. Ursächlich hierfür war die Wirkung des weiblichen Geschlechtshormons Estradiol, dessen hochregulierender Effekt auf die Kollagenexpression auch in Fibroblasten von Ratten nachweisbar war [117]. Als Östrogenquelle in den hier durchgeführten Genexpressionsstudien käme neben dem FCS-Zusatz der ebenfalls im Medium enthaltene Indikator Phenolrot in Frage, der als schwaches Östrogen wirkt [118]. Ebenfalls zu der hohen Variabilität beitragen könnten der Altersunterschied der Zellspender (F42A: 42-jährige Spenderin, M56D: 56-jähriger Spender) oder Unterschiede in der Entnahmeregion (Dermis des Abdomens vs. faciale Dermis).

Von den GAG als Endprodukten der durch Xylosyltransferasen eingeleiteten PG-Biosynthese wurden Zusammensetzung und Gehalt bestimmt und quantifiziert. Es zeigten sich unabhängig von der Inkubationszeit ein Anstieg der zellulären CS-, HS- und HA-Disaccha-

ride sowie ein höherer Sulfatierungsgrad der CS- und HS-Ketten nach TGF- β 1-Induktion. Der einzige Unterschied zwischen 2D- und 3D-Kultivierung war eine gleichbleibende HS-Konzentration im Lysat dreidimensional kultivierter Zellen. Bei den sekretierten GAG waren die Unterschiede nicht immer signifikant, jedoch konnte bei konventioneller Kultivierung tendenziell eine Erhöhung der CS- und HA-Disaccharide und eine Reduktion der HS-Disaccharide detektiert werden. Im 3D-Modell blieb die HS-Menge konstant. Das zeigte, dass die Kollagenmatrix auch auf die HS-Synthese einen Einfluss hatte. Die Ergebnisse der GAG-Quantifizierung bestätigten somit die bisherigen Ergebnisse der TGF- β 1-Wirkung auf Fibroblasten [107, 119-121] und erklären die Akkumulation von Glykosaminoglykanen in fibrotischen Erkrankungen der Haut [102, 122, 123].

4.2.3 Wirkungen von Activin A auf Xylosyltransferasen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix

Activin A ist ein weiteres Cytokin der TGF- β -Superfamilie. Es wurde ursprünglich als auf die Hypophyse wirkendes Cytokin identifiziert, dessen Funktion in der Induktion der Sezernierung des Follikel-stimulierenden Hormons lag [124]. Heute sind weitere regulatorische Eigenschaften in Prozessen wie der Wundheilung, Zelldifferenzierung oder Apoptose nachgewiesen [125-127]. Weitere Studien haben Activin A mit fibrotischen Erkrankungen wie der systemischen Sklerodermie [57], Leberfibrose [128-131] und pulmonaler Fibrose [132-135] in Verbindung gebracht. Des Weiteren zeigten transgene Mäuse mit einer Überexpression von Activin A in der Epidermis eine Verdickung der Oberhaut, erhöhte Wundheilung, Desorganisation der epidermalen Struktur sowie eine Substitution des Fettgewebes durch Bindegewebe [136].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die induzierende Wirkung des Activin A auf die Genexpression der XT-I gezeigt werden. Die Transkription der XT-II-Isoform sprach hingegen nicht auf die Cytokinzugabe an. Die XT-I-Induktion könnte durch eine direkte Wirkung des Activin A, dessen Signaltransduktionsweg vergleichbar mit dem des TGF- β über Smad-Proteine verläuft [137], ermöglicht werden. Weiterhin denkbar wäre eine indirekte Wirkung, die über eine durch Activin A hervorgerufene TGF- β 1-Induktion erfolgen könnte [138]. Auch auf Translationsebene führte die Erhöhung der XT-I-Expression zu einer Steigerung der Enzymmenge, was sich in höheren XT-Aktivitäten widerspiegelte. Die unveränderte XT-II-Genexpression könnte durch Unterschiede in der transkriptionellen Regulation und im Aufbau der Promotorregion der XT-Isoformen erklärbar sein [77, 78]. Gezeigte XT-I-Genexpressionsänderungen nach Induktion mit Activin A deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer nachgewiesenen Erhöhung der Konzentration von Activin A [57] und der ebenfalls erhöhten XT-Aktivität im Serum von Patienten mit systemischer Sklerodermie hin [41].

Die Zugabe von Activin A zu dermalen Fibroblasten führte weiterhin zu einer erhöhten Expression aller untersuchten Kollagentranskriptmengen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten und reflektieren die pathologische Akkumulation von Kollagenen in fibrotischen Geweben [57, 139, 140]. Über die Wirkung auf die Expression von PG-*Core*-Proteine ist bislang nichts beschrieben, jedoch konnte auch hier dieselbe Wirkung wie die des Cytokins TGF- β 1 gezeigt werden. Die Expressionen von Betaglycan und Decorin wurden, zwar in einem etwas geringeren Grad als bei TGF- β 1, aber dennoch signifikant herabreguliert. Transkriptmengen von Biglycan, Syndecan-2 und Versican stiegen deutlich mit der stärksten Änderung bei Biglycan. Activin A verursacht demzufolge ähnliche Genexpressionsänderungen wie TGF- β 1.

Die Quantifizierung der GAG-Zusammensetzung ergab bei einer zweidimensionalen Kultivierung einen gleichbleibenden CS-, einen verminderten HS- und einen erhöhten HA-Gehalt. Dies stellte einen Unterschied zur Erhöhung aller GAG-Typen nach Induktion mit TGF- β 1 dar. Bei der 3D-Kultur blieben die Disaccharidkonzentrationen in Abhängigkeit des Zelltyps zum Teil konstant oder erhöhten sich. Bei den sekretierten Glykosaminoglykanen zeigten die CS-GAG tendenziell eine erhöhte Konzentration, die HS-GAG eher eine Reduktion der Stoffmenge und bei Disacchariden der Hyaluronsäure war kein klarer Trend erkennbar, da hier Hoch- und Runterregulationen detektiert wurden. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Änderungen nach TGF- β 1-Induktion überein, so dass auch für Activin A eine, wenn auch weniger starke, Rolle in der GAG-Akkumulation in fibrotischen Läsionen der Haut vermutet werden kann.

4.2.4 Effekte einer reduzierten XT-I-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix

Xylosyltransferasen nehmen durch den geschwindigkeitsbestimmenden Xylosetransfer bei der Initiation der PG-Synthese eine zentrale Rolle im posttranslationalen Aufbau der GAG-Ketten ein. In dieser Arbeit wurde die XT-I-Expression mittels siRNA-Transfektion selektiv herabreguliert, um direkte Effekte einer reduzierten XT-I-Aktivität auf die ECM-Komponenten von Dermalfibroblasten zu untersuchen.

Die Genexpressionsanalyse zeigte eine starke Herabregulation der XT-I-Genexpression um 87 %, die mit einer konstanten XT-II-Genexpression und einer Reduktion der XT-Aktivität um 72 % einherging. Diese Ergebnisse bestätigten zum einen die selektive Herabregulation nur einer XT-Isoform und zum anderen, dass Verminderungen der XT-I-Genexpression auf Transkriptebene auch zu annähernd gleichen Reduktionen der Enzymmenge auf Proteinebene führten. Bei den weiteren untersuchten Genexpressionen konnte für Decorin und Kollagen 3 α 1 eine verminderte mRNA-Menge detektiert werden (siehe Tabelle 4.1). Die verminderte Decorinexpression könnte durch Veränderungen in der GAG-Biosynthese

hervorgerufen worden sein. Die Sekretion des Decorins ist abhängig vom Vorhandensein einer GAG-Kette oder einer N-Glykosylierung des *Core*-Proteins [141], so dass aufgrund der vermutlich unveränderten N-Glykosylierung nach *XT-I-Knockdown* das Decorin teilweise als GAG-freies *Core*-Protein sekretiert werden müsste und folglich nicht in der Zelle akkumulieren würde. Da aber ebenfalls beschrieben wurde, dass MMP-9 bei einer Reduktion von GAG-Ketten tragenden *Core*-Proteinen weniger stark sekretiert wird, könnte eine Änderung der GAG-Biosynthese zu einer Verminderung der MMP im Zellkulturüberstand führen [142]. Bei geringeren MMP-Konzentrationen wäre die Degradation von Proteoglykanen reduziert, so dass sich Decorin im Zellkulturüberstand akkumulieren und über einen *Feedback*-Mechanismus die Expression vermindert werden könnte. Da Decorin TGF- β antagonisieren kann und diese Wirkung nach Entfernung der GAG-Kette verstärkt wird [113], könnte eine Änderung der Decorin-PG-Struktur auch die Expression von Kollagenen über ein verändertes TGF- β -*Signaling* beeinflussen. Durch die Zugabe von rekombinanten Decorin zu hepatischen Sternzellen konnte bereits eine verminderte Konzentration an Typ III Kollagen nachgewiesen werden [143], so dass hier die möglicherweise erhöhte Decorinkonzentration verursacht durch eine verminderte Degradation ebenfalls einen Effekt auf die Kollagensynthese haben könnte. Ein weiterer Aspekt ist, dass Decorin an der Fibrillogenese von Kollagenen beteiligt ist und GAG-freies Decorin zu einem signifikanten Anstieg des Fibrillendurchmessers führt [144], so dass hier eventuell auch ein Zusammenhang zur Kollagenexpression bestehen könnte.

Tabelle 4.1: Übersicht über relative Genexpressionsänderungen von Proteoglykanen nach *XT*-Knockdown.

Proteoglykan	XT-I- <i>Knockdown</i>	XT-II- <i>Knockdown</i>	XT-I/II- <i>Knockdown</i>
Biglycan	⇒	⇒	↑
Decorin	↓	↓	↓
Syndecan-2	⇒	↓	⇒
Kollagen 1 α 1	⇒	↓	⇒
Kollagen 3 α 1	↓	↓	↓
Kollagen 5 α 1	⇒	⇒	↑

(↓ = reduzierte Expression, ↑ = erhöhte Expression, ⇒ = unveränderte Expression)

Nach TGF- β 1-Induktion zeigten sich die für das Cytokin typischen Genexpressionsänderungen. Die einzigen Unterschiede zwischen Zellen mit reduzierter *XT-I*-Aktivität und Kontrollzellen waren in den Expressionen von *XT-I* und Biglycan detektierbar. Die *XT-I*-Expression stieg nach Cytokinaddition bei *Knockdown*-Zellen zwar ebenfalls, jedoch war die Expression deutlich geringer als bei induzierten Kontrollzellen und erreichte etwa den physiologischen Expressionswert. Dies korrelierte mit der *XT*-Aktivität und zeigte, dass trotz *Knockdowns* die TGF- β 1-Induktion eine Hochregulation der *XT-I*-mRNA-

Menge bewirkte, die Auswirkungen des *Knockdowns* jedoch nicht vollständig kompensiert werden konnten. Die reduzierende Wirkung des TGF- β 1 auf die Betaglycanexpression war bei XT-I-reduzierten Fibroblasten abgemildert. Betaglycan bindet unabhängig von der GAG-Kette das Cytokin TGF- β 1 über das *Core*-Protein und wirkt als Co-Rezeptor aktivierend auf das *Signaling* [145]. Eickelberg *et al.* konnten jedoch zeigen, dass in Abhängigkeit der GAG-Ketten in manchen Zelltypen Betaglycan das TGF- β -*Signaling* inhibieren kann, indem eine Assoziation des TGF β RI mit dem TGF β RII verhindert wird [146]. Änderungen der Betaglycan-GAG-Kette könnten hier die Wirkung des TGF- β 1 ohne weitere Auswirkungen abmildern. Hier könnte auch die hohe Variabilität zwischen den biologischen Replikaten einen möglichen weiteren Effekt verdecken. Die Änderungen in der GAG-Zusammensetzung waren zwischen den beiden Fibroblastentypen teilweise gegensätzlich (Übersicht in Tabelle 4.2), so dass der Effekt einer XT-I-Aktivitätsreduktion auf die GAG-Komposition nicht herausgearbeitet werden konnte. Ursächlich könnten Unterschiede der Zelllinien sein, die von Spendern unterschiedlichen Alters und Geschlechts stammen sowie Variationen in der Entnahmeregion der Fibroblasten.

Tabelle 4.2: Übersicht über Änderungen der GAG-Komposition nach XT-Knockdown.

GAG	XT-I-Knockdown		XT-II-Knockdown				XT-I/II-Knockdown					
	Lysat		ZKÜ		Lysat		ZKÜ		Lysat		ZKÜ	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
CS _{ges}	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	⇒	↓	⇒	⇒	↑	↓	↓
HS _{ges}	⇒	↑	↑	↓	↓	⇒	↑	↓	⇒	⇒	⇒	⇒
HA _{ges}	⇒	↓	⇒	↓	↑	↓	↓	⇒	↓	⇒	↓	↓
CS-Sulfatierungsgrad	⇒	⇒	↓	↓	⇒	⇒	⇒	⇒	↓	↑	↓	↓
HS-Sulfatierungsgrad	↓	⇒	⇒	↑	⇒	⇒	↓	⇒	↓	↑	⇒	↓

(↓ = reduzierte Stoffmenge, ↑ = erhöhte Stoffmenge, ⇒ = unveränderte Stoffmenge, F = F42A-Zellen, M = M56D-Zellen)

4.2.5 Effekte einer reduzierten XT-II-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix

In einem weiteren Experiment wurde der direkte Einfluss einer XT-II-Aktivitätsreduktion auf die ECM-Komponenten von Dermalfibroblasten mit Hilfe einer siRNA-Transfektion untersucht. Die Effizienz und Selektivität der Transfektion war auch hier sehr erfolgreich und führte zu einer XT-II-Expressionsreduktion um 92 % bei nahezu konstanter XT-I-Genexpression. Die Bestimmung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand ergab jedoch einen widersprüchlichen Anstieg um 38 %. Dies könnte an dem liegen, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der XT-I-Transkriptmenge liegen, die bei einer Reduktion der XT-II wahrscheinlich durch einen Rückkopplungsmechanismus hochreguliert wird [147]. Dieser leichte Anstieg könnte durch die Problematik in der XT-Aktivitätsanalytik jedoch zu einer

dominierenden Überlagerung führen. Mangels spezifischer Substrate stellt der gemessene XT-Aktivitätswert immer die Gesamtaktivität beider Xylosyltransferasen dar. Die XT-I weist zusätzlich eine deutlich höhere Affinität zu dem als Substrat eingesetzten Seidenfibroin mit der sich wiederholenden Hexapeptidsequenz (GSGAGA)_n auf [29, 148]. Aus diesem Grund könnte es möglich sein, dass trotz deutlicher Reduktion der XT-II-Menge ein leichter Anstieg der XT-I-Enzymkonzentration zu den hier beobachteten Änderungen der XT-Aktivität führt. Die Zugabe von TGF-β1 bestätigt die Hochregulation der XT-I durch einen Rückkopplungsmechanismus, da bei XT-II-reduzierten Zellen die XT-I-mRNA-Menge nach Cytokininduktion signifikant höher exprimiert wurde und dies mit einer deutlichen Erhöhung der XT-Aktivität korrelierte. Die XT-II-Reduktion führte des Weiteren zu verminderten Transkriptmengen von Decorin, Syndecan-2, Kollagen 1α1 und Kollagen 3α1 (siehe Übersicht Tabelle 4.1). Ursächlich könnten auch hier, wie bereits bei der reduzierten XT-I-Aktivität diskutiert, veränderte Strukturen von Proteoglykanen sein, die zu einer verminderten MMP-Sekretion, einer erhöhten Decorinkonzentration in der ECM, einer Inhibierung der TGF-β-Wirkung und zu strukturellen Änderungen in der Fibrillogenese führen könnten. Obwohl durch die höhere XT-Aktivität der Verdacht besteht, dass die XT-I-Enzymmenge bei einem XT-II-*Knockdown* gesteigert wird, könnte Decorin dennoch einen geringeren Xylosylierungsgrad aufweisen. Dies bestätigen Ergebnisse der Untersuchung XT-II-defizienter Mäuse durch Condac *et al.*, die zeigen konnten, dass Decorin in der Niere hauptsächlich als GAG-freie Form, Versican hingegen mit normalen posttranslationalen Modifikationen und somit auch gebundenen GAG-Ketten vorliegt [39]. Die Autoren vermuten, dass einige der *Core*-Proteine für die kovalente Verknüpfung mit GAG-Ketten stärker auf eines der beiden Isoformen angewiesen sind als andere *Core*-Proteine. Folglich könnte eine verminderte XT-II-Aktivität trotz erhöhter XT-I-Konzentrationen zu Änderungen der Struktur einiger Proteoglykane führen. Nach TGF-β1-Zugabe konnten zwischen siNK- und siXT-II-transfizierten Fibroblasten keine Unterschiede in den Expressionen der PG-*Core*-Proteine und Kollagene detektiert werden, was zeigt, dass TGF-β1 die durch eine verminderte XT-II-Aktivität hervorgerufenen Expressionsänderungen kompensieren kann. Die Untersuchung der GAG-Zusammensetzung ergab vor allem Änderungen in den Stoffmengen der verschiedenen GAG-Klassen, die jedoch zwischen den beiden verwendeten Zelltypen teilweise gegensätzlich waren, so dass hier keine genaue Aussage hinsichtlich der Auswirkungen einer XT-II-Reduktion auf die GAG-Komposition getroffen werden kann (siehe Tabelle 4.2).

4.2.6 Effekte einer parallel reduzierten Aktivität beider XT-Isoformen auf Komponenten der extrazellulären Matrix

Weiterhin untersucht wurden die Auswirkungen einer parallelen Reduktion der Transkriptmengen beider XT-Isoformen auf die XT-Aktivität und ECM-Komponenten dermalen

Fibroblasten. Es konnten Reduktionen der XT-I-Expression um 75 % und der XT-II-Expression um 85 % nachgewiesen werden, die mit einer gleichzeitigen Reduktion der XT-Aktivität um 70 % einherging. Dies belegt, dass die siRNA-vermittelte Herabregulation beider XT-Isoformen erfolgreich war und in einer verminderten XT-Aktivität resultierte. Des Weiteren wurden verminderte Expressionen von Decorin und Kollagen 3 α 1 sowie erhöhte Transkriptmengen von Biglycan und Kollagen 5 α 1 detektiert (vergleiche Übersicht in Tabelle 4.1). Die reduzierten Expressionen von Decorin und Kollagen 3 α 1 könnten erneut auf die bereits diskutierten Änderungen, die bei der XT-I-Aktivitätsreduktion beschrieben sind, zurückzuführen sein. Die Erhöhung der Biglycanexpression könnte hier aufgrund der geringeren Decorinexpression durch eine kompensatorische Hochregulation erfolgt sein. Diese konnte bereits in der Niere oder in Sehnen, ebenso wie in Fibroblasten gezeigt werden [149-151]. Eine Induktion mit TGF- β 1 führte zu den bekannten Expressionsänderungen. Zwischen siNK- und siXT-I/II-transfizierten Zellen traten Unterschiede in der XT-, der Betaglycan- und der Kollagen 3 α 1-Expression auf. Der stärkste Unterschied bestand jeweils bei den XT-Isoformen, deren Expressionen nach *Knockdown* und Cytokininduktion zwar hochreguliert wurden, aber immer noch unter der Expression unbehandelter Fibroblasten blieb. Entsprechend verhielt sich auch die XT-Aktivität. Dies zeigte, dass eine Supplementierung mit TGF- β 1 eine Hochregulation der XT-Isoformen bewirkte, jedoch nicht ausreichend war, um die ursprüngliche Expressionsstärke wiederherzustellen. Bei der Betaglycantranskriptmenge zeigte sich, wie bereits bei dem XT-I-*Knockdown* gesehen, eine Abmilderung des herabregulierenden TGF- β 1-Effekts, der auch bei der Hochregulation der Kollagen 3 α 1-mRNA detektiert werden konnte. Dies könnte wiederum auf Veränderungen in der GAG-Struktur des Betaglycans zurückzuführen sein, die zu einer veränderten TGF- β 1-Antwort führen könnte, die in diesem Fall in einem geringeren Anstieg der Transkriptmenge von Kollagen 3 α 1 resultieren könnte. Die Analyse der GAG-Zusammensetzung ergab bei den sekretierten Proteoglykanen eine verminderte CS- und HA-Stoffmenge sowie einen verminderten Sulfatierungsgrad (siehe Tabelle 4.2). Dies zeigt, dass eine verminderte Aktivität beider Isoformen zu Reduktionen des GAG-Gehalts führte. Bei der GAG-Komposition des Zelllysats waren die Ergebnisse zwischen den beiden Zelllinien erneut teilweise gegensätzlich, so dass auch hier keine Aussage bezüglich des Effekts einer reduzierten XT-Aktivität getroffen werden kann.

4.2.7 Auswirkungen einer gesteigerten XT-I-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix

Um den direkten Einfluss der XT-I auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurde die XT-I-Transkriptmenge in Dermalfibroblasten durch eine vektorbasierte Überexpression erhöht. In der Analyse der Genexpressionen konnte eine 10-fache

Erhöhung der XT-I-mRNA detektiert werden. Dies korrelierte mit einem Anstieg der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand um 13 %. Der verhältnismäßig geringe Anstieg der Enzymmenge im Vergleich zur deutlich erhöhten mRNA-Menge ist auffällig, da bei einer so deutlichen Transkriptmengenerhöhung ein stärkerer Anstieg der XT-Aktivität erwartet wurde. Durch die fehlende Amplifikation eines Bereichs der *fl ori*-Region des Vektors konnte eine Verunreinigung der mRNA mit plasmidischer DNA ausgeschlossen werden, so dass vielleicht eine verminderte Halbwertszeit der mRNA ursächlich sein könnte.

Die weiteren untersuchten Genexpressionen zeigten negative Regulationen der Transkriptmengen von Betaglycan, Decorin und TGF- β 1, eine Steigerung der mRNA-Menge von Biglycan und keine Veränderungen in den Genexpressionen von XT-II, Syndecan-2 und den untersuchten Kollagenen (Übersicht siehe Tabelle 4.3). Die gleichbleibende XT-II-Transkriptmenge belegt die spezifische Hochregulation der XT-I-Isoform. Alle nachgewiesenen Genexpressionsänderungen entsprachen in der Tendenz denen, die nach Zugabe von TGF- β 1 oder Activin A zu dermalen Fibroblasten detektiert wurden. Es fällt jedoch auf, dass XT-I-bedingte Expressionsänderungen nur die *Core*-Proteine von Proteoglykanen betrafen und die Kollagenexpressionen unverändert blieben. Das könnte daran liegen, dass die TGF- β 1-Expression nach XT-I-Überexpression ebenfalls leicht erniedrigt war und demzufolge, für den Fall einer erniedrigten Bioverfügbarkeit des Cytokins auf Proteinebene, keine verstärkte Induktion der Kollagenexpression erfolgen würde. Ebenso könnten veränderte PG-Konzentrationen, wie beispielsweise der TGF- β 1-Antagonisten Biglycan und Decorin, aber auch des TGF- β -Co-Rezeptors Betaglycan, die Konzentration oder Wirkung des aktiven TGF- β 1 beeinflussen. Die Änderungen der PG- und TGF- β 1-Expressionen scheinen hingegen durch Modifikationen der GAG-Strukturen oder des GAG-Gehaltes hervorgerufen zu werden (siehe Tabelle 4.4), so dass vermutet werden kann, dass eine Erhöhung der XT-I-Enzymmenge in fibrotischen Erkrankungen einen Beitrag zu veränderten PG-Expressionen liefert. Die Erhöhung der XT-I-Aktivität führte zu einer Erhöhung der CS_{ges}-Stoffmenge im Lysat, so dass hier ein direkter Einfluss dieser XT-Isoform in der CS-Synthese vermutet werden kann.

Tabelle 4.3: Überblick über detektierte Genexpressionsänderungen nach Überexpression der XT-Isoformen.

Gen	XT-I-Überexpression	XT-II-Überexpression
Betaglycan	↓	⇔
Biglycan	↑	↑
Decorin	↓	⇔
Kollagen 2 α 1	⇔	↑
Kollagen 5 α 1	⇔	↑
TGF- β 1	↓	↑

(↓ = reduzierte Expression, ↑ = erhöhte Expression, ⇔ = unveränderte Expression)

Tabelle 4.4: Überblick über detektierte Änderungen des GAG-Gehalts nach Überexpression der XT-Isoformen.

Disaccharid	XT-I-Überexpression		XT-II-Überexpression	
	Lysat	ZKÜ	Lysat	ZKÜ
CS _{ges}	↑	⇒	⇒	⇒
HS _{ges}	⇒	⇒	⇒	⇒
HA _{ges}	⇒	⇒	↓	⇒
CS-Sulfatierungsgrad	↑	↑	↓	⇒
HS-Sulfatierungsgrad	↓	↓	↓	⇒

(↓ = reduzierte Stoffmenge, ↑ = erhöhte Stoffmenge, ⇒ = unveränderte Stoffmenge)

4.2.8 Auswirkungen einer gesteigerten XT-II-Aktivität auf Komponenten der extrazellulären Matrix

Abschließend wurden die Auswirkungen einer erhöhten XT-II-Enzymkonzentration auf die ECM-Komponenten durch vektorbasierte Überexpression in dermalen Fibroblasten untersucht. Hier konnte eine Steigerung der XT-II-Transkriptmenge bei nicht signifikant veränderter XT-I-Expression um das 4-fache detektiert werden. Auch hier konnten eine Anreicherung oder Verunreinigung mit plasmidischer DNA ausgeschlossen werden, da eine PCR mit vektorbindenden *fl ori*-Oligonukleotiden keine Amplifikationsprodukte lieferte. Die Messung der XT-Aktivität im Zellkulturüberstand zeigt einen Anstieg um 33 % und belegte die gewünschte Hochregulation. Es wurden erhöhte Transkriptmengen der *Core*-Proteine von Biglycan, Kollagen 2 α 1, Kollagen 5 α 1 und TGF- β 1 detektiert (siehe Übersicht in Tabelle 4.3). Die teilweise auftretenden Expressionsänderungen zeigten erneut dieselben Tendenzen, wie die Veränderungen, die bei einer Induktion mit TGF- β 1 oder Activin A festzustellen waren. Im Gegensatz zur XT-I-Überexpression waren hier jedoch auch die Kollagenexpressionen verändert. Dies könnte auf einen Anstieg der TGF- β 1-Expression zurückzuführen sein, der in diesem Experiment ebenfalls beobachtet wurde. Das Cytokin könnte bei einer höheren Bioverfügbarkeit eine Induktion der Kollagen- und auch der Biglycanexpression verursachen. Da jedoch nicht alle *Core*-Proteinexpressionen eine Änderung aufwiesen, bleibt zu vermuten, dass eventuell die Konzentrationserhöhung des TGF- β 1 nur gering war und somit nicht alle Änderungen induzieren konnte. Ebenfalls Einfluss haben könnten die Änderungen der Hyaluronsäurekonzentration oder des Sulfatierungsgrads der GAG-Ketten im Lysat (siehe Tabelle 4.4). Auch die XT-II scheint zu Veränderungen der PG- und Kollagenexpressionen in fibrotischen Erkrankungen beizutragen und scheint bei einer erhöhten Aktivität die Feinstruktur der GAG sowie die HA-Konzentration zu beeinflussen.

4.2.9 Zusammenfassung

Es zeigte sich zusammenfassend eine induzierende Wirkung des TGF- β 1 auf die XT-I-Expression in dermalen Fibroblasten, die sich in einer Erhöhung der XT-Aktivität widerspiegelte. Erstmals nachgewiesen werden konnte eine Erhöhung der XT-II-Expression nach TGF- β 1-Zugabe in einer Kollagenmatrix. Die Dreidimensionalität der Zellen veränderte des Weiteren die Zellmorphologie. TGF- β 1 verursachte ausgeprägte Genexpressionsänderungen von PG-*Core*-Proteinen und Kollagenen sowie eine Erhöhung des GAG-Gehalts. Erstmals gezeigt werden konnte die Hochregulation der XT-I-Expression und der XT-Aktivität über Activin A. Die detektierten Änderungen der Genexpressionen nach Induktion mit Activin A entsprachen in der Wirkung den Änderungen, die durch TGF- β 1 induziert wurden. Ebenfalls detektiert werden konnten Veränderungen in der GAG-Zusammensetzung und im GAG-Gehalt.

Bei einer selektiven Herabregulation einer oder beider XT-Isoformen mittels siRNA-Transfektion konnte jeweils eine verminderte Transkriptmenge für Decorin und Kollagen 3 α 1 detektiert werden. Die XT-Aktivität war bei verminderter XT-I- und XT-I/II-mRNA-Menge reduziert, bei einem XT-II-*Knockdown* durch eine kompensatorische Hochregulation der XT-I-Expression jedoch erhöht. Die GAG-Zusammensetzung war verändert, allerdings konnten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, da zwischen den beiden verwendeten Zelllinien teilweise deutliche Diskrepanzen hinsichtlich der detektierten Änderungen auftraten. Eine Induktion der transfizierten Zellen mit TGF- β 1 bewirkte die typischen Genexpressionsänderungen, jedoch waren die Wirkung auf die Betaglycantranskription bei einem XT-I-*Knockdown* und auf die Betaglycan- und Kollagen 3 α 1-Transkriptmenge nach Doppel-*Knockdown* abgemildert.

Die selektive Erhöhung der XT-I- oder XT-II-Aktivität gelang mit einer vektorbasierten Überexpression. Höhere XT-I-Expressionen resultierten in einer höheren Biglycantranskription und in verringerter Betaglycan-, Decorin- und TGF- β 1-mRNA. Eine Steigerung der XT-II-Aktivität führte zu Hochregulationen der Transkription von Biglycan, Kollagen 2 α 1, Kollagen 5 α 1 und TGF- β 1. Diese Änderungen entsprachen jeweils den durch Zugabe von TGF- β 1 oder Activin A induzierten Genexpressionsänderungen, so dass die Vermutung besteht, dass die XT-Isoformen teilweise zu fibrotischen Veränderungen beitragen. Des Weiteren veränderte sich die GAG-Komposition nach XT-Überexpression.

4.3 Diabetes-vermittelte Effekte auf glatte Muskelzellen und Hepatozyten

Diabetes mellitus ist eine metabolische Erkrankung die durch Hyperglykämie charakterisiert wird. Die globale Prävalenz ist von 1980 bis 2008 von 153 auf 347 Millionen Erkrankte angestiegen und weist auch künftig eine steigende Tendenz auf [152]. Schwere Folgerkrankungen treten als Folge schlecht eingestellter, zu hoher Blutglukosekonzentrationen auf und umfassen Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien, Hepatopathien und Atherosklerose [61, 153, 154]. So haben Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung wie Herzinfarkt oder Schlaganfall zu versterben [155]. Kardiovaskuläre Komplikationen werden besonders durch Atherosklerose verursacht [68], die initiiert wird durch eine verlängerte Retention von Lipoproteinen in der Arterienwand. Diese wird hervorgerufen durch Wechselwirkungen mit Proteoglykanen, die durch veränderte GAG-Strukturen eine höhere Affinität zu LDL aufweisen [71]. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob metabolische Veränderungen wie Hyperinsulinämie oder Hyperglykämie, die mit Diabetes mellitus und Insulinresistenz assoziiert sind, Effekte auf die Expression von XT-Isoformen und ECM-Komponenten von glatten Muskelzellen zeigen. Weiterhin zeigte sich bei Patienten mit Diabetes mellitus ein erhöhtes Risiko eine Hepatopathie, wie die Leberzirrhose oder das Hepatokarzinom, zu erwerben [61, 156]. Über diabetisch verursachte Veränderungen der Leber-PG ist bislang relativ wenig bekannt, jedoch scheint eine diabetische Stoffwechsellage Unterschiede in den GAG-Strukturen zu verursachen [63, 157]. Ein weiteres Projekt dieser Arbeit war daher die Untersuchung hyperglykämischer und hyperinsulinämischer Effekte auf die Expression der XT-II und ECM-Komponenten der Hepatozytzelllinie HepG2.

4.3.1 Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten glatter Muskelzellen

Bei Typ-2-Diabetikern ist das Risiko eine Atherosklerose zu entwickeln im Vergleich zu Nicht-Diabetikern deutlich erhöht. Der initiale Entstehungsschritt der Atherosklerose ist eine verlängerte Retention von Lipoproteinen, die durch ionische Wechselwirkungen von basischen, positiv geladenen Aminosäuren des Lipoproteins mit negativen Ladungen von Sulfat- und Carboxylgruppen der GAG-Ketten von Proteoglykanen erfolgt. Die in der Intima vorhandenen Proteoglykane sind hauptsächlich Sekretionsprodukte der in der Media lokalisierten glatten Muskelzellen, die Versican, Decorin, Biglycan und Perlecan synthetisieren [69]. Hierbei auftretende Änderungen in der PG-Struktur könnten durch eine Hyperinsulinämie hervorgerufen werden [158], die bei Typ-2-Diabetikern aufgrund der

Entwicklung einer Insulinresistenz der glukoseaufnehmenden Zellen entsteht und durch eine vermehrte Insulinseznernierung der Pankreas kompensiert wird [159].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss einer Hyperinsulinämie auf die Expression der GAG-initiiierenden Xylosyltransferasen humaner glatter Muskelzellen untersucht. Es zeigte sich keine Veränderung der XT-I-Expression bei einer Induktion mit 1, 10 oder 50 nmol/L Insulin, jedoch konnte eine Erhöhung der XT-II-Transkriptmenge auf das 1,8-fache bei einer Insulinkonzentration von 10 nmol/L detektiert werden. Die XT-Aktivitäten im ZKÜ der Insulin-induzierten Proben blieben konstant und zeigten keine Änderungen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Dies könnte dafür sprechen, dass trotz Expressionsänderung die Enzymmenge unverändert blieb. Ebenfalls möglich wäre aber auch, dass die XT-I-Aktivität aufgrund der höheren Affinität zum Akzeptor Seidenfibroin die XT-II-Aktivität überlagert und dadurch insgesamt kein signifikanter XT-Aktivitätsanstieg detektierbar war. Die in einer früheren Studie nachgewiesene verminderte XT-Aktivität im Serum von Patienten mit Diabetes [44] konnte mit dem Zellkulturmodell glatter Muskelzellen nicht bestätigt werden. Die diabetische Abnahme der XT-Serumaktivität ist wahrscheinlich auf die XT-II-Isoform zurückzuführen, da diese aufgrund einer 99 %igen Reduktion der XT-Aktivität im Serum von XYLT2 *Knockout*-Mäuse die dominante Xylosyltransferase im Serum zu sein scheint [37]. Insbesondere die Leber könnte für Konzentrationsänderungen zirkulierender Xylosyltransferasen verantwortlich sein, da diese eine hohe XT-II-Expression aufweist [29, 39, 40] und bei Mäusen mit Lebertumoren reduzierte XT-Aktivitäten im Serum auftreten [37]. Diabetiker weisen häufig auch Dyslipidämien auf, so dass weitere Faktoren wie beispielsweise Fettsäuren eine mögliche XT-Aktivitätsänderung bei dieser Erkrankung verursachen könnten [160].

Bei den untersuchten PG-Expressionen konnten keine Änderungen bei Biglycan, Decorin, Perlecan, Syndecan-2 und Versican festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Rodriguez-Lee *et al.* und Wilson *et al.*, die keine Insulin-induzierenden Effekte auf die Expression von PG-*Core*-Proteinen in glatten Muskelzellen nachweisen konnten [161, 162]. Der leichte Anstieg der GalNacT-1-Expression bei 50 nmol/L Insulin könnte im Zusammenhang mit erhöhten Konzentrationen von CS/DS-GAG in atherosklerotischen Läsionen stehen [163], da dieses Enzym die CD/DS-Synthese initiiert. Osteonektin ist ein Promotor der Kalzifizierung, dessen mRNA zu Beginn einer sich entwickelnden Atherosklerose sinkt und bei Kalzifizierungen in atherosklerotischen Plaques steigt [164, 165]. Die hier gezeigte Herabregulation stimmt demzufolge mit einer verminderten mRNA-Synthese bei beginnender Atherosklerose überein. Kollagen 1 α 1 ist das Kollagen, welches am stärksten in Plaques auftritt, dort akkumuliert und oxidiertes LDL binden kann [166, 167]. Unter Hyperinsulinämie zeigte sich bei einer Insulinkonzentration von 1 und 10 nmol/L eine Herabregulation der Kollagen 1 α 1-Expression.

Unterschiede in PG-Expressionen von beispielsweise Biglycan und Versican in atherosklerotischen Regionen [72] werden wahrscheinlich eher durch andere Faktoren wie TGF- β 1, Angiotensin II, Activin A, PDGF oder Fettsäuren hervorgerufen [160, 168, 169]. Der Einfluss des Sulfatierungsmusters und der Länge der GAG-Ketten auf die Retention von Lipoproteinen sowie detektierte Reduktionen im GAG- und HS-Gehalt und Erhöhungen im CS/DS-Gehalt in atherosklerotischen Läsionen sprechen insgesamt trotzdem für eine wichtige Rolle der an der GAG-Biosynthese beteiligten Enzyme in atherosklerotischen Erkrankungen [69, 163].

4.3.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten glatter Muskelzellen

Die bei Diabetes mellitus als Charakteristikum auftretende Hyperglykämie könnte ebenfalls ein Mediator der veränderten PG-Synthese glatter Muskelzellen sein und zur Pathogenese der Atherosklerose beitragen [158]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Effekte einer Hyperglykämie auf die Expression der Xylosyltransferasen und weiterer Komponenten der ECM untersucht.

Es zeigte sich eine um das 1,4-fache erhöhte XT-I-Expression in VSMC, die mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/L kultiviert wurden sowie in Kontrollproben in äquiosmolarem Medium mit einer Glukosekonzentration von 1,0 g/L. Die Veränderung wurde jedoch nicht durch den Effekt der erhöhten Glukosekonzentration hervorgerufen sondern liegt vielmehr in der Erhöhung der Osmolarität des Mediums begründet. Für die XT-II-Expression konnte ebenso wie für die XT-Aktivität keine Veränderung detektiert werden. Die Genexpressionen der *Core*-Proteine von Biglycan, Decorin, Syndecan-2 und Versican zeigten keine Veränderungen, für Perlecan konnte hingegen eine Verringerung der mRNA-Menge auf das 0,5- bis 0,6-fache bei erhöhten Glukosekonzentrationen sowie bei der osmotischen Kontrolle detektiert werden. Dies stimmt überein mit Ergebnissen von Wilson *et al.* die keine Änderungen in der Genexpression von Biglycan, Decorin und Versican in VSMC detektieren konnten [161], ist jedoch gegensätzlich zu einer konstanten Perlecanexpression bei Duan *et al.* [170] und einer erhöhten Biglycan- sowie verminderten Decorinexpression bei Templeton *et al.* [171]. Die Unterschiede könnten durch die Verwendung von SMC aus verschiedenen Organismen (Mensch, Ratte und Affe) begründet sein, die eventuell unterschiedlich auf erhöhte Glukosekonzentrationen reagieren. Weiterhin gibt es jedoch auch Nachweise, dass die Perlecanexpression in der Retina diabetischer Ratten unter hoher Glukosekonzentration vermindert ist [172]. Ebenso sinkt die Perlecanexpression in der Leber [157] und Niere diabetischer Mäuse [173, 174], so dass die hier gefundene reduzierte Perlecanexpression im Gesamtkontext der Literatur

keinen Widerspruch darstellt. Die mRNA-Expression von GalNAcT-1 stieg, die Transkriptmengen von Osteonektin und Kollagen 1 α 1 sanken hingegen. Einige dieser Expressionsänderungen waren auch in den Kontrollzellen zu beobachten und scheinen daher durch die hohe Osmolarität des Mediums begründet. Die Erhöhung der GalNAcT-1-Expression bei der höchsten Glukosekonzentration könnte auch hier im Zusammenhang mit dem steigenden CS/DS-Gehalt in atherosklerotischen Läsionen stehen [163].

Wahrscheinlich sind andere Faktoren oder multifaktorielle Komponenten eher für atherosklerotische Genexpressionsänderung von Proteoglykanen verantwortlich. Verschiedene Gruppen konnten des Weiteren zeigen, dass eine Hyperglykämie Einfluss auf die Struktur der GAG-Kette in verschiedenen Zelltypen und Organismen hat, jedoch konnte der dahintersteckende Mechanismus noch nicht geklärt werden [171, 175-179]. Dem gegenüber stehen Ergebnisse, bei denen keine Änderung der GAG-Struktur von VSMC unter Hyperglykämie auftraten [177, 180].

4.3.3 Einfluss von Hyperinsulinämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten von Hepatozyten

Bei Diabetes mellitus ist das Risiko des Erwerbs einer Hepatopathie, wie beispielsweise der nicht-alkoholischen Fettleber, statistisch gesehen erhöht [60-62]. Über potentielle PG-Genexpressionsänderungen und Veränderungen in Gehalt oder Struktur der GAG in der Leber bei einer diabetischen Erkrankung ist bislang relativ wenig bekannt. Kjellen *et al.* beschrieben eine verminderte Sulfatierung der Proteoglykane in der Leber diabetischer Ratten [63], die Ebara *et al.* in diabetischen Mäusen bestätigen konnten [157]. Die Gruppe um Olsson zeigte, dass diabetische Ratten einen höheren CS- und einen erniedrigten HS-Gehalt aufwiesen [64]. Ebenfalls Hinweise auf eine veränderte HS-Synthese lieferten Nachweise einer hepatischen Reduktion der GlcNAc N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1, einem an der HS-Synthese beteiligtem Enzym, das eine N-Deacetylierung und N-Sulfatierung von Heparansulfaten katalysiert [181, 182]. Diese Reduktion führte zu verminderten HS-Sulfatierungen und zu einer verminderten *Clearance* von Lipoproteinen [67, 183]. Ein weiteres Enzym, die HS-6-O-Endosulfatase-2, das die Abspaltung von 6-O-Sulfatgruppen von Heparansulfaten katalysiert, ist in der Leber von diabetischen Mäusen stark überexprimiert [184]. Eine Inhibierung dieses Enzyms führte zu einer Änderung der HS-Komposition und zu einer verbesserten *Clearance* von Lipoproteinen [185]. Im Gegensatz zu diesen Forschungsergebnissen konnten Bishop *et al.* und van den Born *et al.* keine Änderungen der Heparansulfate in der Leber von Streptozotocin-induzierten diabetischen Mäusen oder Ratten detektieren [186, 187].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Genexpressionen verschiedener ECM-Komponenten von HepG2-Zellen unter Hyperinsulinämie untersucht. Die XT-II-Genexpression zeigte eine leichte Hochregulation, die sich jedoch nicht in einer veränderten XT-Aktivität widerspiegelte. Dadurch, dass die XT-I-Isoform in HepG2-Zellen als auch in der Leber nicht exprimiert wird [29, 30, 39, 40, 76], stellte die gemessene XT-Gesamtaktivität in diesem Fall ausschließlich die XT-II-Aktivität dar. Bei den Proteoglykanen konnte eine Hochregulation der Bikuninexpression bei höheren Insulinkonzentrationen detektiert werden. Bikunin ist ein Plasma-Proteinase-Inhibitor, der Trypsin inhibiert und in der Leber als *Precursor* mit α_1 -Mikroglobulin synthetisiert wird. Nach der Spaltung des *Precursors* wird Bikunin in das Blut sekretiert und letztendlich über die Niere ausgeschieden [188]. Bei Diabetikern konnten erhöhte Konzentrationen sowohl im Plasma als auch im Blut nachgewiesen werden [189]. Das könnte darauf hindeuten, dass der Zustand der Hyperinsulinämie zu dieser Erhöhung durch die Leber beitragen könnte. Syndecan-1 zeigte ebenfalls eine Expressionssteigerung, die bei höheren Insulinkonzentrationen aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht signifikant ausfiel. Zu demselben Ergebnis kamen Olsson *et al.*, die ebenfalls HepG2-Zellen mit Insulin behandelten und die Leber diabetischer Ratten untersuchten, jedoch konnten Bishop *et al.* in der Leber diabetischer Mäuse keine Genexpressionsänderung detektieren [64, 186]. 2009 konnte nachgewiesen werden, dass Syndecan-1 der primäre hepatische HS-PG-Rezeptor ist, der die *Clearance* von hepatischen und intestinalen Triglycerid-haltigen Lipoproteinen vermittelt und es zu einer Akkumulation von Triglyceriden im Plasma bei einer Syndecan-1-Defizienz in Mäusen kommt [190]. Eine erhöhte Expression dieses HS-PG durch eine vermehrte Sezernierung von Insulin würde sich also positiv auf eine Senkung der Lipoproteine im Blut auswirken, allerdings nur, wenn keine Änderungen der HS-Sulfatierung und HS-Komposition in den GAG-Ketten auftreten würden, da sonst die Affinität zu den Lipoproteinen stark sinkt [67]. Eine verstärkte Expression übereinstimmend mit der Gruppe von Olsson konnte für das *Core*-Protein von Versican detektiert werden [64]. Die Genexpression von Kollagen 1 α 1 blieb konstant.

4.3.4 Einfluss von Hyperglykämie auf die Expression von Xylosyltransferasen und extrazelluläre Matrixkomponenten von Hepatozyten

Die Hyperglykämie, die einen Diabetes mellitus auszeichnet, könnte ein weiterer Faktor sein, der zu Veränderungen der Proteoglykanstrukturen im Lebergewebe führt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der Hyperinsulinämie auch der Einfluss einer Hyperglykämie auf die Expression der XT-II und extrazellulärer Matrixkomponenten von Hepatozyten untersucht.

Die XT-II-Expression zeigte keine Veränderungen und auch die XT-Aktivität im Zellkulturüberstand blieb auf einem konstanten Niveau, was bedeutet, dass eine erhöhte Glukosekonzentration die XT-II-Enzymmenge nicht beeinflusst. Weitere Genexpressionsanalysen lieferten eine Erhöhung der Transkriptmengen der *Core*-Proteine von Syndecan-1 und Versican, wie bereits bei der Hyperinsulinämie gesehen. Durch die ebenfalls erhöhte Genexpression in den Kontrollzellen mit nahezu identischer Veränderungsrate, sind die detektierten Effekte bei einer Glukosekonzentration von 4,5 g/L wahrscheinlich auf die veränderte Osmolarität zurückzuführen. Da die Steigerung bei 2,75 g/L Glukose jedoch jeweils höher war, wäre es möglich, dass der stimulierende Effekt den die zugegebene Glukose auf die Expression ausübt, durch eine weitere Steigerung der Osmolarität reprimiert wurde. Keine Änderungen konnten in der mRNA-Menge von Bikunin und Osteonektin detektiert werden. Da die diabetische Hepatopathie bislang nicht so sehr im Fokus der Forschung stand, sind bisher nur wenige Hinweise auf Veränderungen der Proteoglykane in der Leber beschrieben. Ebara *et al.* zeigten, dass eine Hyperglykämie zu einer verminderten Sulfatierung von HS und zu einer Reduktion des Disaccharidgehalts bei diabetischen Mäusen führte. Die gleichen Ergebnisse zeigten sich bei einer Kultivierung von HepG2-Zellen unter Hyperglykämie [157].

4.3.5 Zusammenfassung

Insgesamt zeigte sich bei einer Hyperinsulinämie kein deutlicher Einfluss auf die Expression der XT-Isoformen in glatten Muskelzellen, so dass hier auch aufgrund konstanter XT-Aktivitäten eher von einem vernachlässigbaren Effekt ausgegangen werden kann. Die Expressionen zeigten leichte Veränderungen bei Osteonektin, Kollagen 1 α 1 und GalNAcT-1. Auch bei einer Hyperglykämie waren die Genexpressionen der XT-Isoformen und Proteoglykane in VSMC nur marginal verändert, so dass diese Effekte wahrscheinlich ebenso vernachlässigbar sind.

Bei HepG2-Zellen konnten unter Einfluss einer Hyperinsulinämie zwar Änderungen in der XT-II-Genexpression jedoch nicht der XT-Aktivität detektiert werden. Es zeigten sich hingegen leichte Änderungen in den Expressionen einiger *Core*-Proteine, die so auch bei Diabetikern oder im Tiermodell auftraten. Die Hyperinsulinämie scheint also zu einer Änderung der PG-Expression zu führen, was durch bereits veröffentlichte Ergebnisse zum Teil bestätigt aber auch widerlegt wird. Auch die Hyperglykämie hatte respektive keinen entscheidenden Einfluss auf die XT-Expression und XT-Aktivität von HepG2-Zellen. Einige PG-*Core*-Proteine zeigten jedoch Hochregulationen die zum Krankheitsbild des Diabetes beitragen könnten.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Vielzahl potentieller Akzeptorproteine mit GAG-Bindestellen auf der Sequenzgrundlage *in vivo* xylosylierter Proteoglykane hergestellt. Die XT-isoformspezifisch ermittelten Reaktionskinetiken des Xylosetransfers auf die Fusionsproteine zeigten Unterschiede in Affinitäten, Reaktionsgeschwindigkeiten und Stringenz der Xylosyltransferasen in Bezug auf ihre Substrate. In weiteren Studien wäre es sinnvoll, Reaktionskinetiken des Xylosetransfers auf native *Core*-Proteine zu ermitteln um den Einfluss von Sekundär- und Tertiärstrukturen auf die Akzeptorfunktionen mit einzuschließen. Des Weiteren wäre es wichtig Akzeptoren zu finden, die exklusiv durch eine der beiden Isoformen xylosyliert werden, so dass in der Analytik der XT-Aktivität zwischen beiden Isoformen differenziert werden könnte.

Für Activin A konnte erstmalig eine aktivierende Wirkung auf XT-I-Expression und XT-Aktivität in Fibroblasten nachgewiesen werden. Induktionen mit Activin A zeigten ferner, dass dieselben Genexpressionsänderungen wie nach TGF- β 1-Induktionen auftraten. Die Hochregulation der XT-II-Expression durch TGF- β 1 in einer Kollagenmatrix zeigte den Einfluss der ECM auf die Regulation bestimmter Gene. In künftigen Versuchen könnte diese Matrix optimiert und mit weiteren Bestandteilen der ECM supplementiert werden, so dass die physiologische Umgebung der Zelle noch besser imitiert werden würde. Bei Hoch- und Herabregulationen der XT-Expressionen in Fibroblasten wurden Alterationen in der PG-Expression und der GAG-Zusammensetzung detektiert. Der *Knockdown* könnte mit anderen siRNA-Molekülen wiederholt werden, um Seiteneffekte auszuschließen und die Verwendung weiterer Zelllinien mit ähnlicherem *Background* hinsichtlich Spenderalter und Entnahmeregion könnte Aufschlüsse über Veränderungen der GAG-Biosynthese liefern. Weiterhin wäre es wichtig XT-I-defiziente Mäuse zu generieren um neue Erkenntnisse über physiologische Funktionen zu erhalten. Mit diesen Modellen könnten Mechanismen hinter biologischen und pathobiologischen Prozessen besser verstanden werden.

Glatte Muskelzellen und Hepatozyten zeigten unter Hyperinsulinämie und -glykämie keine Änderung der XT-Aktivität. Da bei Diabetes mellitus auch andere klinisch-chemische Parameter wie Lipoproteinkonzentrationen pathologische Werte erreichen, wäre es wichtig zu analysieren, ob diese einen Einfluss auf die XT-Aktivität ausüben. Nachgewiesene Veränderungen der GAG-Struktur und der GAG-Kettenlänge lassen vermuten, dass an der GAG-Biosynthese beteiligte Enzyme diese Alterationen verursachen. Eine Aufklärung der an der pathologischen Veränderung involvierten Enzyme würde einen großen Gewinn in der Aufklärung der Pathomechanismen der Diabetes assoziierten Erkrankungen darstellen. Besonders in Bezug auf Hepatopathien sind weitere Untersuchungen essentiell, da die bisherige Ergebnislage der strukturellen Veränderungen deutliche Diskrepanzen aufweist.

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Eine Isolierung von Gesamt-RNA erfolgt mit dem *NucleoSpin RNA II Kit* (Macherey-Nagel). Konventionell kultivierte Zellen werden in 350 µL RA1-Puffer und 3,5 µL β-Mercaptoethanol lysiert. Dreidimensional kultivierte Zellen werden mit der Kollagenmatrix in ein RiboLyser-Röhrchen (Matrix C) mit 500 µL RA1-Puffer und 5,0 µL β-Mercaptoethanol überführt. Der Matrixaufschluss erfolgt im RiboLyser Fast Prep Gerät bei einer Geschwindigkeit von 4,5 Einheiten für 30 sec. Die gewonnenen Lysate werden direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt über NucleoSpin Filter Säulen wird ein Aliquot des Durchflusses für die DNA-Isolierung entnommen und der Rest nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution der RNA erfolgt mit 25 µL Wasser nach einer Inkubationszeit von 1 min bei 11.000 x g. Zur Erhöhung der RNA-Konzentration wird das Eluat erneut auf die Säule gegeben und nach einer weiteren Inkubation von 1 min zentrifugiert. Die eluierte RNA wird bei -80 °C gelagert.

5.1.2 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen wird das *NucleoSpin Blood Kit* (Macherey-Nagel) verwendet. Zu dem bei der RNA-Isolierung entnommenen Aliquot wird ein äquivalentes Volumen Ethanol (99,9 %) gegeben und entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt. Für die finale DNA-Elution werden 35 µL Elutionspuffer (TB-Puffer, 70 °C) auf die Membran gegeben, 3 min inkubiert und bei 11.000 x g 1 min abzentrifugiert. Nach einer erneuten 1-minütigen Inkubation der Membran mit dem Eluat wird abzentrifugiert und die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wird mit dem *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) oder dem *GenElute HP Plasmid Midiprep Kit* (Sigma) nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution erfolgt bei einer Aufreinigung mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* in 50 µL und bei einer Isolation mit dem *GenElute HP Plasmid Midiprep* in 500 µL Wasser. Die Eluate werden bei -20 °C gelagert.

5.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Eine Quantifizierung der Konzentrationen von DNA und RNA in wässrigen Lösungen erfolgt mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer bei den Wellenlängen 230, 260 und 280 nm gegen TB-Puffer oder Wasser. 2 µL der unverdünnten Lösung werden aufgetragen. Durch die Abhängigkeit der Lichtabsorption der Nukleinsäurelösung von der Konzentration an DNA oder RNA nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, lässt sich die unbekannte Konzentration der Nukleinsäuren nach folgender Formel berechnen:

$$c = \frac{A * \varepsilon}{b}$$

c = Nukleinsäurekonzentration [ng/µL]

A = Absorption

ε = Absorptionskoeffizient [ng*cm/µL]

b = Länge der Flüssigkeitssäule [cm]

Der Absorptionskoeffizient beträgt 50 ng*cm/µL für doppelsträngige DNA und 40 ng*cm/µL für einzelsträngige RNA. Über den Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäurelösung abschätzen. Der Quotient für reine DNA liegt bei 1,8 und der für reine RNA bei 2,0.

5.1.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die reverse Transkription von polyadenylierter RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgt mit dem *SuperScript II Reverse Transcriptase Kit* von Invitrogen. Die enzymatisch wirksame Reverse Transkriptase nutzt den RNA-Strang als Matrize und fügt an einen hybridisierten Oligo-dT-*Primer* die zur RNA komplementären Desoxynukleotide an. Zur cDNA-Synthese wird 1 µg RNA mit 2 µL Oligo-dT-*Primer* (7 pmol) und 2 µL dNTP-Mix (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 24 µL aufgefüllt. Die Reagenzien werden gemischt, der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es werden 8 µL *First-Strand-Buffer* (5x) und 4 µL DTT (0,1 M) zugegeben, bei 42 °C 2 min inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µL *SuperScript II* wird 5 min bei 25 °C und 50 min bei 42 °C inkubiert. Die 15-minütige Inaktivierung findet bei 70 °C statt. Die Lagerung der cDNA-Lösung erfolgt bei -20 °C.

5.1.6 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge wird die Agarosegelelektrophorese angewendet. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Moleküle wird die Agarosekonzentration variiert. Hierbei werden zu 1,0-1,8 g Agarose 100 mL TBE-Puffer gegeben, durch Aufkochen gelöst, mit 10 μL interkalierendem Ethidiumbromid (0,5 mg/mL; Extinktion: 302 nm, Emission: 590 nm) versetzt und im Gelträger aushärten gelassen.

In die Geltaschen werden 5 μL der DNA-Probe vermischt mit 2 μL Auftragspuffer bzw. 5 μL eines Längenstandards gegeben. Die Auftrennung erfolgt in TBE-Puffer bei 140 V für 30-45 min. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

5.1.7 Aufkonzentration von Zellkulturüberständen

Eine Aufkonzentration von Zellkulturüberständen erfolgt mit Vivacell 100 Konzentratoren mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa. Die Lösung wird 10 min bei 700 x g zentrifugiert, auf die Säule gegeben und mit Stickstoff bei 4 °C begast, so dass ein Überdruck von 4 bar entsteht. Das Ausgangsvolumen von 1.200 mL wird auf ca. 120 mL reduziert und die 10-fach aufkonzentrierte Lösung nach Aliquotierung bei -20 °C gelagert.

5.1.8 Restriktion des pGEX-6P-1-Plasmids

Die Restriktion des Plasmids pGEX-6P-1 mit den Enzymen XhoI und EcoRI wird aufgrund unterschiedlicher Reaktionsbedingungen in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt. Zunächst erfolgt die Restriktion mit XhoI bei 37 °C über Nacht nach folgendem Ansatz:

Tabelle 5.1: Ansatz zur Restriktion des pGEX-6P-1-Plasmids mit XhoI.

Lösung	Volumen [μL]
pGEX-6P-1-Plasmid	(5 μg)
Puffer 2 10x (NEB)	11,0
BSA 100x (NEB)	1,1
XhoI 20 U/ μL (NEB)	1,9
Aqua dest.	add. 110

Das Enzym wird bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Der Ansatz wird auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt (70 V, 80 min). Die DNA-

Bande des restringierten Plasmids wird herausgeschnitten und mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Anleitung aufgereinigt.

Die Restriktion des mit XhoI linearisierten Plasmids mit EcoRI findet bei 37 °C über Nacht statt. Es schließt sich die Enzym-Inaktivierung für 20 min bei 65 °C an.

Tabelle 5.2: Ansatz zur Restriktion des linearisierten pGEX-6P-1-Plasmids mit EcoRI.

Lösung	Volumen [μL]
linearisiertes pGEX-6P-1-Plasmid	50
Puffer H 10x (Promega)	7,0
BSA 100x (Promega)	0,7
EcoRI 12 U/ μL (Promega)	1,0
Aqua dest.	add. 70

Über eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 gepackte Säulen wird das herausgeschnittene DNA-Fragment entfernt. 0,8 mL Sephadex G-50 in 1x TE-Puffer werden hierfür in *Receiver Columns* Leersäulen pipettiert, für 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Der Restriktionsansatz wird auf die Säulenmatrix gegeben und für 4 min zentrifugiert.

5.1.9 Ligation von restringiertem pGEX-6P-1-Plasmid und Zielsequenz

Für die Ligation binden das XhoI/EcoRI-restringierte Plasmid und eine doppelsträngige DNA-Sequenz aneinander. Die doppelsträngige DNA wird durch Hybridisierung zweier zueinander komplementärer, einzelsträngiger *Primer*-Paare hergestellt. Das Hybridisierungsprodukt weist komplementäre 5'- und 3'-Überhänge zum restringierten pGEX-6P-1-Plasmid auf, und ist dadurch in der Lage an dieses zu binden. Zunächst wird die Hybridisierung der Oligonukleotide nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 5.3: Ansatz zur Hybridisierung von Primern mit einem Gesamtvolumen von 30 μL .

Lösung	Volumen [μL]
Aqua dest.	23
<i>Primer Forward</i> (25 μM)	2
<i>Primer Reverse</i> (25 μM)	2
PCR Puffer 10x (Qiagen)	3

Es wird 2 min bei 80 °C erhitzt und für 5 min in einem 35 °C warmen Wasserbad abgekühlt. Die hergestellte doppelsträngige DNA-Sequenz und das Plasmid werden durch die T4 DNA-Ligase ligiert.

Tabelle 5.4: Reaktionsansatz zur Ligation von linearisiertem pGEX-6P-1-Plasmid und hybridisierten Primern.

Lösung	Volumen [μL]
linearisiertes pGEX-6P-1-Plasmid	100 ng
Hybridisierungsansatz	5
Ligase Puffer 10x (Fermentas)	2
T4 DNA-Ligase 5 U/ μL (Fermentas)	1
Aqua dest.	add. 20

Nach einer Inkubation bei 30 °C für 3 h wird ein Gradient mit einer Senkung der Temperatur um 1 °C alle 15 min (Endtemperatur 4 °C) gefahren. Es wird für 10 min bei 65 °C denaturiert bevor kompetente Bakterienzellen transformiert werden.

5.1.10 Konstruktion des Vektors pcDNA3.1(+)/XYLT2

Da der Vektor pCVM6-XL6-XYLT2 nur eine Ampicillin- und keine Neomycin-Resistenz aufweist, wird das XYLT2-Fragment zur späteren Selektion in Eukaryonten in den Vektor pcDNA3.1(+) umkloniert. Hierzu werden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI restringiert.

Tabelle 5.5: Ansatz zur Restriktion der Plasmide pCMV6-XL6-XYLT2 und pcDNA3.1(+) mit EcoRI und XbaI.

Lösung	Volumen [μL]
Plasmid	(5 μg)
Puffer Tango 10x (Fermentas)	7,5
EcoRI 10 U/ μL (Fermentas)	3,0
XbaI 10 U/ μL (Fermentas)	3,0
Aqua dest.	add. 50

Es wird über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Enzyme anschließend bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Um bei der späteren Ligation der zwei Fragmente eine Religation mit dem Ursprungsvektor zu vermeiden und um eine höhere Effektivität zu erzielen, werden die Produkte der pCVM6-XL6-XYLT2-Restriktion für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert. Anschließend wird 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 5.6: Ansatz zur Dephosphorylierung des restringierten pCMV6-XL6-XYLT2-Plasmids.

Lösung	Volumen [μL]
Restriktionsansatz pCMV6-XL6-XYLT2	20
Puffer RX 10x (USB)	3
SAP/DIL 1 U/ μL (USB)	2
Aqua dest.	5

Der Ligationsansatz wird nach Tabelle 5.7 angesetzt und 3 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird die Temperatur alle 15 min um 1 °C (Endtemperatur 4 °C) gesenkt und danach für 10 min bei 65 °C denaturiert. Die Transformation von kompetenten Bakterienzellen wird mit dem Ligationsansatz durchgeführt.

Tabelle 5.7: Reaktionsansatz zur Ligation des pcDNA3.1(+)-Plasmids und des XYLT2-Fragments.

Lösung	Volumen [μL]
dephosphoryliertes, linearisiertes pCMV6-XL6-XYLT2-Plasmid	13
linearisiertes pcDNA3.1(+)-Plasmid	4
Ligase Puffer 10x (Fermentas)	2
T4 DNA-Ligase 5 U/ μL (Fermentas)	1

5.1.11 Amplifikation von DNA durch Polymeraseketten-Reaktion

Mit der Polymeraseketten-Reaktion (PCR) können DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert werden, wobei jeder neu synthetisierte DNA-Strang im nächsten Zyklus als Matrize dient, so dass sich im Verlauf der PCR die DNA-Konzentration exponentiell erhöht. Der Amplifikationszyklus wird etwa 40- bis 50-mal wiederholt und besteht aus folgenden drei Schritten:

- 1) DNA-Denaturierung
- 2) *Primer-Annealing*
- 3) *Primer-Elongation* an der DNA-Matrize durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

Der Standard-Reaktionsansatz wird nach Tabelle 5.8 hergestellt.

Tabelle 5.8: Standard-Reaktionsansatz für eine PCR.

Lösung	Volumen [μL]
Aqua dest.	16,95
Puffer B 10x	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
Taq DNA Polymerase	0,3
<i>Primer Forward</i> (25 μM)	0,25
<i>Primer Reverse</i> (25 μM)	0,25
dNTP (25 mM)	0,25
<i>Template</i>	2,0

Steht als *Template* ein transformierter Bakterienklon zur Verfügung, wird von der Kolonie eine geringe Menge Zellmaterial entnommen und in ein PCR-Gefäß mit dem Standard-Reaktionsansatz gegeben. Die Amplifikation erfolgt während eines Standard-Temperaturprogramms.

Tabelle 5.9: Standard-Temperaturprogramm der PCR.

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	2	95	1
Denaturierung	1	95	35
<i>Annealing</i>	1	52	
Elongation	2	72	

Bei einer unbekanntem *Annealing*-Temperatur für ein Oligonukleotidpaar wird ein Gradient zwischen 50 $^{\circ}\text{C}$ und 70 $^{\circ}\text{C}$ gefahren und die Konzentration der Produkte in einem Agarosegel ermittelt. Die Temperatur bei der die größte Konzentration an Amplifikat detektierbar ist, entspricht dem Temperaturoptimum und wird als spezifische *Annealing*-Temperatur definiert.

5.1.12 Real-Time-PCR

Eine relative Quantifizierung von Genexpressionen erfolgt mit der Durchführung einer *Real-Time-PCR* (RT-PCR) am *Mastercycler ep realplex*-System der Firma Eppendorf. Hierbei interkaliert der Fluoreszenz-Farbstoff *SYBR-Green* (Extinktion: 480 nm, Emission: 520 nm) in doppelsträngige DNA-Moleküle. Die Signalintensität wird detektiert und aufgrund der Proportionalität zwischen Signalstärke des Fluorophors und DNA-Konzentration kann die DNA-Menge nach jedem Amplifikationszyklus relativ quantifiziert werden.

Der Standard-RT-PCR Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 5.10: Ansatz für die Real-Time-PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 μL .

Lösung	Volumen [μL]
<i>SYBR-Green</i>	5,0
Dest. Wasser	2,0
<i>Template</i> (cDNA 1:10)	2,5
<i>Primer Forward</i> (25 μM)	0,25
<i>Primer Reverse</i> (25 μM)	0,25

Die Proben werden in eine optische 96-Kavitäten-Platte pipettiert, die Platte mit einer *heat-sealig*-Folie verschweißt und 30 sec bei 700 x g zentrifugiert. Die *Real-Time*-PCR-Reaktion wird nach folgendem Programm gestartet:

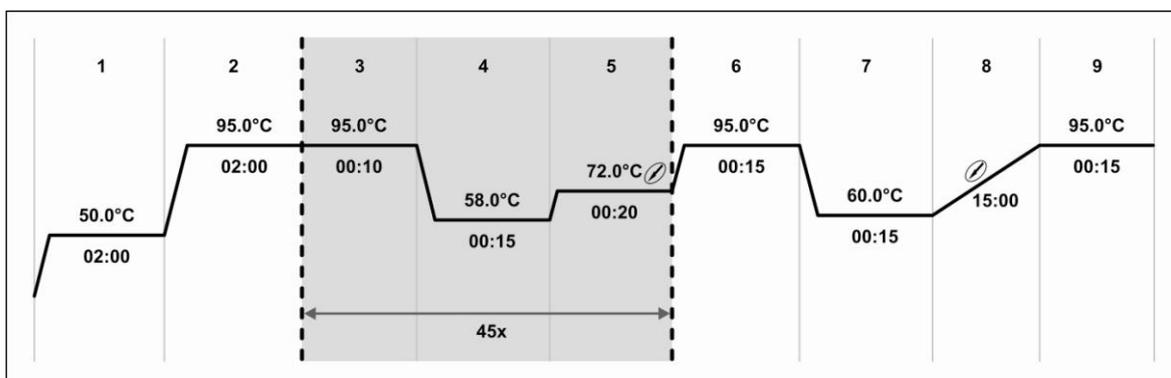


Abbildung 5.1: Temperatur- und Zeitprofil der RT-PCR. Nach jedem der 45 Amplifikationszyklen (Schritte 3-5) werden die Fluoreszenzintensitäten der Proben detektiert. Am Ende der PCR wird eine Schmelzkurve (Schritt 8) aufgenommen, indem sekundlich der Fluoreszenzwert ermittelt wird. In Abhängigkeit vom jeweils eingesetzten Oligonukleotidpaar wird die Annealing-Temperatur (Schritt 4) angepasst.

Bei der Durchführung des Standard-Temperatur-Programms erfolgt jeweils am Ende eines Amplifikationszyklus die Detektion der Fluoreszenzintensität. Diese wird in Abhängigkeit der Zykluszahl graphisch aufgetragen. Zunächst bleibt der Fluoreszenzwert nahezu konstant bis er bei einem bestimmten Zeitpunkt exponentiell ansteigt. Der Zeitpunkt, bei dem die Signalstärke den Schwellenwert des Grundrauschens überschreitet, wird als C_t -Wert (*Cycle Threshold*) bezeichnet. Durch den Vergleich der C_t -Werte der Zielgene mit denen von konstant exprimierten Referenzgenen erfolgt die relative Quantifizierung der mRNA-Expression. Hierbei wird zunächst ein Normalisierungsfaktor durch das Berechnen des geometrischen Mittels der Expressionen der untersuchten Referenzgene bestimmt. Der C_t -Wert des Zielgens wird anschließend unter Einbeziehung der PCR-Effizienzen durch den jeweiligen Normalisierungsfaktor dividiert. Über eine Aufnahme der Schmelzkurve lassen sich unspezifische Reaktionen zum Beispiel durch *Primer*-Dimere erkennen.

5.1.13 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Sequenzierung von DNA nach der Kettenabbruchmethode wird das *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Bei der PCR werden durch die Polymerase sowohl unmarkierte Desoxynukleotide, als auch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddNTP) an die naszierende DNA-Kette kovalent gebunden. Erfolgt der Einbau eines ddNTP findet eine Kettenabbruchreaktion statt, da durch das Fehlen einer freien Hydroxylgruppe keine weitere Elongation mehr möglich ist. Die unterschiedlich langen Nukleotidketten werden bei der Sequenzierung durch eine Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt, und die Basenabfolge wird durch Detektion des endständigen Fluoreszenzfarbstoffs ermittelt.

PCR-Amplifikate werden zunächst durch eine ExoSAP-Reaktion aufgereinigt, während Plasmide ohne weitere Schritte eingesetzt werden können. Zu 5 μL PCR-Amplifikat im Standard-Reaktionsansatz werden 1 μL Exonuklease I WS (1 U/ μL) und 1 μL SAP (1 U/ μL) zugegeben. Es wird 30 min bei 37 °C inkubiert und 15 min bei 80 °C denaturiert.

Es folgt die Sequenzierreaktion nach folgendem Ansatz und Programm:

Tabelle 5.11: Ansatz für Sequenzierreaktionen.

Lösung	Volumen [μL]
ExoSAP-Reaktion	3,0
Sequenzier-Puffer 5x (Perkin Elmer)	4,0
Premix (Applied Biosystems)	2,0
Primer (2,5 μM)	1,5
HPLC-Wasser	add. 20

Tabelle 5.12: Zeit- und Temperaturprogramm für Sequenzierreaktionen.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	2 min	95	1
Denaturierung	10 sec	95	25
Annealing	10 sec	52	
Elongation	4 min	60	

Am Ende findet eine Aufreinigung des gesamten Ansatzes über mit Sephadex G-50 gepackte Säulen (s. 5.1.8) statt. Das Eluat wird mit 20 μL HPLC-Wasser verdünnt und für die Analyse eingesetzt.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Zweidimensionale Kultivierung humaner Zelllinien

Die zweidimensionale Kultivierung von humanen Zellen erfolgt in einem Inkubator bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit. Alle zellkulturtechnischen Arbeiten werden unter einer Sterilbank mit sterilen Einwegmaterialien durchgeführt. Das jeweils verwendete Medium wird mit 10 % FCS und 1 % Antibiotikum/Antimykotikum supplementiert und alle 3-4 Tage gewechselt.

5.2.2 Dreidimensionale Kultivierung dermaler Fibroblasten

Zur dreidimensionalen Kultivierung von dermalen Fibroblasten wird eine Kollagenmatrix hergestellt, in der die Zellen eingebettet werden. In eine 6-Kavitäten-Platte auf einem gekühlten Metallblock wird ein berechnetes Volumen an kaltem Medium vorgelegt, das mit der Zellsuspension ein Gesamtvolumen von 1.790 µL ergibt. Es wird mit 10 µL NaOH (0,5 M) und 200 µL Kollagen I (*Rat Tail*, 5 mg/mL) versetzt und homogenisiert. Das Volumen einer Zellsuspension mit einer Gesamtzellzahl von 500.000 Zellen wird zugegeben, invertiert und ausgesät. Bei 37 °C im Inkubator geliert die Kollagenmatrix und bettet die Zellen ein.

5.2.3 Passagieren von adhärennten Zellen

Erreichen adhärennt wachsende Zellen eine Konfluenz von 80-90 % werden sie passagiert. Nach Abnahme des Mediums wird mit 5 mL PBS gewaschen und die Ablösung von der Oberfläche durch Zugabe von 5 mL Trypsin (1x in PBS) initiiert. Nach 5-10 min Inkubation bei 37 °C werden zur Inhibierung der Enzymaktivität 5 mL Medium zugegeben. Die Suspension wird in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen in 4 mL Medium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl in 10 mL Medium ausgesät.

5.2.4 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung von Zellen werden diese bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % wachsen gelassen, abtrypsiniert und nach Zentrifugation bei 700 x g für 5 min in 1 mL Medium resuspendiert. Ein 500 µL Aliquot Zellsuspension wird zu 500 µL kaltem Einfriermedium (DMEM mit 25 % DMSO und 20 % FCS) in ein Kryoröhrchen gegeben und vermengt. Die Kryoröhrchen werden in einem kalten Aluminiumblock in eine

Styroporbox gestellt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam eingefroren. Nach 24 h erfolgt die Umlagerung der Kryogefäße in einen Tank mit flüssigem Stickstoff.

Zur Revitalisierung wird die Zellsuspension im Kryoröhrchen in der Hand angetaut und die noch gefrorenen Zellen in 10 mL vorgewärmtes Medium überführt. Die aufgetaute Suspension wird homogen verteilt und am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

5.2.5 Zellernte

Werden auf 6-Kavitäten-Schalen ($9,6\text{ cm}^2$ Wachstumsfläche) adhären gewachsene Zellen geerntet, wird der Zellkulturüberstand abgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Zellen werden mit 2 mL PBS gewaschen, mit 500 μL Trypsin bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5-10 min inkubiert und anschließend mit 500 μL Medium versetzt. Nach Zentrifugation wird mit 1 mL PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und die Zellen in 350 μL RA1-Puffer und 3,5 μL β -Mercaptoethanol lysiert.

Dreidimensional in einer Kollagenmatrix gewachsene Zellen werden zweimal mit je 2 mL PBS gewaschen. Das PBS bleibt jeweils etwa 10 min auf den Zellen, so dass das Medium aus der Matrix diffundieren kann. Die Zellen werden mit der Kollagenmatrix in ein RiboLyser-Röhrchen (Matrix C) mit 500 μL RA1-Puffer und 5,0 μL β -Mercaptoethanol überführt.

5.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wird 1:1 mit einer sterilfiltrierten Trypanblaulösung (0,4 %) vermengt und 20 μL der Suspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wird die Anzahl der Zellen in den acht Eck-Großquadraten ausgezählt. Tote Zellen erscheinen hierbei blau und vitale Zellen nahezu farblos. Die Zellzahl wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$c = \frac{n * F}{V}$$

c = Zellkonzentration [Zellen/mL]

n = Mittelwert der gezählten Zellen pro Eck-Großquadrat

F = Verdünnungsfaktor

V = Volumen über einem Eck-Großquadrat [10^{-4} mL]

5.2.7 Behandlung mit Cytokinen, Hormonen und Glukose

Für die Untersuchung der Effekte von TGF- β 1, Activin A, Insulin oder Glukose auf humane Zellen werden die Zellen in Doppel- oder Dreifachbestimmung ausgesät. Das jeweilige Protein oder Molekül wird in gelöster Form in das Medium gegeben, so dass die gewünschte Konzentration eingestellt wird. Als Kontrolle wird zu den unbehandelten Zellen ein äquivalentes Volumen des Lösungsmittels gegeben und als osmotische Kontrolle eine zur Glukoselösung äquimolare Mannitollösung verwendet. Die Zellen werden über einen definierten Zeitraum inkubiert und dann geerntet.

5.2.8 Transfektion humaner Dermalfibroblasten mit siRNA

Zur Liposomen-vermittelten reversen Transfektion von dermalen Fibroblasten mit siRNA wird das Transfektionsreagenz *Lipofectamin 2000* (Invitrogen) verwendet. Es werden 300.000 Zellen in mit 10 % FCS supplementiertem, antibiotikafreiem DMEM ausgesät, wobei das Volumen an DMEM eingesetzt wird, das mit den anderen Reagenzien des Transfektionsansatzes ein Gesamtvolumen von 2 mL erreicht. Pro Ansatz wird eine Verdünnung von 10 μ L *Lipofectamin 2000* in 500 μ L Medium hergestellt. Nach 5 min Inkubation wird diese Lösung mit einem Gemisch aus 32 μ L siRNA-Verdünnung (2,5 μ M) in 500 μ L un-supplementiertem DMEM vermischt. Das Gemisch wird 15 min im Dunkeln inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben, so dass eine Endkonzentration von 40 nM siRNA eingestellt wird. Am nächsten Tag wird der ZKÜ abgenommen und durch 2 mL vollsupplementiertes DMEM ersetzt. Gegebenenfalls werden Cytokine in gewünschter Konzentration zugegeben.

5.2.9 Transfektionen von Dermalfibroblasten mittels Elektroporation

Eine Transfektion dermalen Fibroblasten findet unter der Verwendung des *Human Dermal Fibroblast Nucleofactor Kits* von Amaxa und dem GenePulser Xcell Elektroporator von Bio-Rad statt. Dazu werden zunächst 1,5 mL supplementiertes DMEM pro Kavität in einer 6-Kavitäten-Schale auf 37 °C vorinkubiert und 430 μ L der auf RT erwärmten *Nucleofactor* Lösung nach Herstellerangaben mit 95,6 μ L *Supplement* versetzt. Es werden 500.000 M56D-Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben, bei 200 x g für 10 min zentrifugiert und der Zellrückstand in 100 μ L supplementierter *Nucleofactor* Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 2 μ g Plasmid-DNA wird die Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation mit einem *Square Wave* Programm mit folgenden Einstellungen am Gerät durchgeführt:

Tabelle 5.13: Einstellungen am Elektroporator für ein Square Wave Programm.

Parameter	Einstellung
Spannung	1.500 V
Pulslänge	0,1 mS
Anzahl der Pulse	2 Pulse
Pulsintervall	5 sec
Durchmesser der Küvette	2 mm

5.2.10 Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer Übernachtskultur (ÜNK) werden 50 mL antibiotikafreies LB-Flüssigmedium mit *E. coli* BL21 DE3 Zellen an geimpft. Es wird auf einem Schüttler bei 180 rpm und 37 °C inkubiert bis die Start-OD_{600 nm} von 0,1 auf 0,4 Einheiten gestiegen ist. Die Suspension wird 30 min bei 4 °C gelagert, 10 min bei 3.500 x g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bakterienrückstand in 5 mL kaltem, sterilfiltriertem TSS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wird aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Die Kontaminationskontrolle erfolgt auf ampicillin- und kanamycinhaltigen LB-Agarplatten.

5.2.11 Transformation von Bakterien

50 µL kompetente *E. coli* BL21 DE3 Zellen werden auf Eis aufgetaut, 10 µL Ligationsansatz zugegeben und vermennt. Nach 25 min Inkubation auf Eis, wird für 30 sec bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt, für 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium (37 °C) für 60 min rotierend bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wird auf eine vorgewärmte LB-Agar Platte mit 75 µg/µL Ampicillin ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Klone werden gesichert.

5.2.12 Glycerinkultur von Bakterien

Zur Sicherung von Bakterienklonen werden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wird 1 mL der Suspension aus einer 5 mL Übernachtskultur entnommen und zu 400 µL Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben, vermennt und bei -80 °C gelagert.

5.2.13 Expression von Ligationsprodukten

50 mL LB-Ampicillin Flüssigmedium werden durch Zugabe eines Teils einer 5 mL ÜNK der transformierten Bakterien auf eine OD_{600 nm} von 0,1 an geimpft. Es wird 2 h bei 30 °C

und 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert ($OD_{600\text{ nm}} \sim 0,5$), mit 166,7 μL IPTG (150 mM) induziert und 4 h inkubiert. Es wird 10 min bei 3500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bakterienrückstand mit 1,2 mL PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wird der Rückstand in 400 μL PBS resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.2.14 Lyse von Bakterienzellen

Zur Lyse von Bakterien wird die Bakteriensuspension auf RT gebracht und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens 30 min eingefroren. Der Einfrier-Auftau-Zyklus wird weitere zweimal wiederholt, dann 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit den freigesetzten Bakteriensubstanzen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.3 Proteinchemische Methoden

5.3.1 Radiochemischer XT-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der XT-Enzymaktivität in Zellkulturüberständen oder zur Untersuchung der Funktionalität potentieller Akzeptorproteine wird der radiochemische XT-Aktivitätstest durchgeführt. In einer von der XT-Konzentration abhängigen enzymatischen Reaktion wird ein radioaktiv markierter Xyloserest kovalent an solvatisiertes Seidenfibroin oder ein anderes Akzeptormolekül gebunden. 250 μL UDP- ^{14}C -Xylose (370 KBq/mL) werden zunächst in 950 μL Wasser und 50 μL MES-Puffer (pH 6,5) verdünnt und als Stammlösung im Reaktionsansatz eingesetzt. Da die Konzentration der UDP- ^{14}C -Xylose nicht im Sättigungsbereich liegt, werden bei Messungen zur Bestimmung der Enzymkinetik 7,93 μL einer unmarkierten UDP-Xylose-Lösung (10 mg/mL) zur Stammlösung gegeben und das Volumen an Wasser dementsprechend reduziert.

Tabelle 5.14: Ansatz für den radiochemischen XT-Aktivitätstest.

Lösung	Volumen [μL]
MES-Puffer (pH 6,5)	5
Mg/Mn-Lösung	5
UDP- ^{14}C -Xylose (74 KBq/mL)	10
ZKÜ oder XT-haltige Lösung	50
Seidenfibroin oder anderes Akzeptorprotein	30

Die Proben werden vermischt, 90 min oder länger bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend 90 μL des Reaktionsansatzes auf die Mitte eines Nitrocellulose-Plättchens pipettiert. Nach 2 h trocknen bei RT wird die Membran in ein Szintillationsgefäß überführt und das

Protokoll nach Tabelle 5.15 zur Präzipitation der Proteine und zum Entfernen überschüssiger UDP-[¹⁴C]-Xylose durchgeführt.

Tabelle 5.15: Präzipitation- und Waschprotokoll.

Lösung	Volumen [mL]	Zeit [min]
TCA (10 %)	3	10
TCA (5 %)	4	15
TCA (5 %)	3	10
TCA (5 %)	3	15

Es werden 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit zugegeben, über Nacht inkubiert und die β -Zerfälle im Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR gemessen.

5.3.2 Bradford-Test

Proteinkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1,4 mg/mL werden mit dem Bradford-Reagenz bestimmt. Der Test beruht darauf, dass sich zwischen Proteinen und dem Farbstoff Brilliant Blau G ein Komplex bildet, der einen *Shift* des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm bewirkt.

Zu 250 μ L Bradford Reagenz werden 5 μ L Probe- bzw. Standardlösung (bovines Serumalbumin BSA) gegeben, 30 sec gemischt und 5-45 min bei RT inkubiert. Die Absorptionen aller Proben werden photometrisch in Kunststoffküvetten bei $\lambda = 595$ nm innerhalb von 10 min gemessen. Die Absorption ist proportional zur Proteinmenge und wird anhand der Standardreihe berechnet.

5.3.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Eine Isolierung von GST-Fusionsproteinen erfolgt mit dem *GST-Bind Kit* (Novagen) nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Hierbei tritt die schistosomale GST-Domäne des Fusionsproteins in Wechselwirkungen mit dem *GST-Bind* Harz, bestehend aus einer quervernetzten Agarose-Matrix mit in regelmäßigen Abständen über Sulfidbrücken gebundenem reduzierten Glutathion, und bindet an dieses. Ungebundene Proteine werden durch Waschen entfernt und das GST-Fusionsprotein am Ende der Aufreinigung durch Zugabe von freiem, reduziertem Glutathion von der Matrix eluiert.

Nach Inversion der Harz-Suspension werden 1,2 mL entnommen, 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. 3 mL *GST Bind/Wash* Puffer werden zugegeben, invertiert und zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird in 600 μ L

GST Bind/Wash Puffer äquilibriert, die aufzureinigende Proteinlösung zugegeben und 1 h bei RT und leicht rollender Bewegung inkubiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wird der Harz zweimal mit 6 mL *GST Bind/Wash* Puffer gewaschen. Zur Elution des GST-Fusionsproteins werden 600 µL *GST Elution* Puffer zugegeben, für 10 min bei RT und leichter Bewegung inkubiert und der Überstand nach einer Zentrifugation abgenommen. Die Elution wird zweimal wiederholt und alle Eluate vereinigt.

5.3.4 Dialyse von aufgereinigten GST-Fusionsproteinen

Um reduziertes Glutathion in der Eluatlösung des GST-Fusionsproteins zu entfernen, wird eine Dialyse durchgeführt. Das Eluat wird luftblasenfrei in einen benzoilierten Dialyse-Schlauch (Sigma, MWCO 2 kDa) gegeben und 2x2 h bei RT auf einem Magnetrührer gegen PBS dialysiert. Das Volumen der Dialyseflüssigkeit entspricht hierbei dem 200- bis 300-fachen des Probenvolumens. Das PBS wird erneut gewechselt und die Dialyse über Nacht bei 4 °C fortgeführt. Die reine Proteinlösung wird bei -20 °C gelagert.

5.4 Glykosaminoglykan-Analytik

5.4.1 Isolierung von Glykosaminoglykanen aus Lysaten und Zellkulturüberständen

Zur Aufarbeitung von Zellen für die GAG-Analytik werden die drei- oder zweidimensional gewachsenen Zellen in der Zellkulturschale zunächst zweimal mit 2 mL PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 µL Lysepuffer wird 2 h bei 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Von diesem Lysat werden 400 µL für den Verdau mit Natriumborhydrid (5.4.2) eingesetzt.

Zur Aufarbeitung des Zellkulturüberstandes wird 1 mL des ZKÜ abgenommen, mit 5 mL Ethanol (99 %) versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Es wird 20 min bei 17.300 x g zentrifugiert, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand in 400 µL Wasser gelöst bevor der Natriumborhydrid-Verdau erfolgt.

5.4.2 Verdau von Proteoglykanen mit Natriumborhydrid

Die Proben werden mit einer 5 M Natriumborhydridlösung auf eine Endkonzentration von 1 M Natriumborhydrid eingestellt und 48-96 h bei 37 °C inkubiert. Zur Neutralisierung des pH-Wertes auf Eis wird 6 M Salzsäure zugegeben und das Ergebnis mit Indikatorpapier überprüft.

5.4.3 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zur Fällung der Proteine werden die Proben mit 30%iger Trichloressigsäure (TCA) auf eine TCA-Endkonzentration von 10 % eingestellt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 17.300 x g für 20 min bei 2 °C wird der Überstand abgenommen und der Rückstand mit 500 µL 10%iger TCA gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand mit dem zuvor abgenommenen vereinigt.

5.4.4 GAG-Fällung mit Kaliumacetat

Die nach TCA-Fällung hergestellte Lösung wird mit dem 4-fachen Volumen einer Kaliumacetatlösung (5 % in vergälltem Ethanol) versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Es wird bei 17.300 x g für 30 min bei 2 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Rückstand bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 1,5-3 mL Wasser gelöst.

5.4.5 Entsalzung

Um die hohen Salzkonzentrationen der Proben zu reduzieren wird eine Dialyse in Slide-A-Lyzer Mini Dialyse Gefäßen (Thermo Scientific) durchgeführt. 250 µL Probe werden gegen des 250 bis 300-fache Volumen Wasser für 2x2 h unter Rühren dialysiert. Nach erneutem Austausch des Wassers wird über Nacht dialysiert. Die Proben werden bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge oder bei 37 °C im Inkubator getrocknet und der Rückstand in 250 µL Wasser gelöst.

5.4.6 Enzymatischer Verdau von Glykosaminoglykanen

Ein enzymatischer Verdau der Glykosaminoglykane erfolgt zur Herstellung von Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Fragmenten zum einen mit Chondroitinase und zum anderen mit den Heparinasen 1, 2 und 3. Je 50 µL der Probe werden in einer Doppelbestimmung bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Für den Verdau mit 5 µL Chondroitinase ABC (1 U/mL) wird der Rückstand in 45 µL Ammoniumacetat-Puffer (50 mM, pH 8,0) und für den Verdau mit je 5 µL Heparinase 1, 2 und 3 (je 0,1 U/mL) wird die Probe in 35 µL Heparinase-Puffer (pH 7,1) gelöst. Die Enzyme werden in den jeweiligen Ansatz gegeben, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Proben bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

5.4.7 Aufreinigung von 2-Aminoacridon

Um bei der HPLC-Analytik störende Verunreinigungen des 2-Aminoacridon (AMAC) zu entfernen wird dieses aufgereinigt. 5 mL einer Macro-Prep t-Butyl HIC Aufschlammung werden sedimentiert, der Überstand entfernt und der Rückstand mit Wasser auf 5 mL aufgefüllt. Die Aufschlammung wird in Poly-Prep Chromatographie Säulen überführt und mit 10 mL Wasser äquilibriert. 10 mg AMAC werden in 1 mL DMSO/konz. Essigsäure (85 %/15 %) gelöst, mit Wasser auf 5 mL aufgefüllt und auf die Säule gegeben. Es wird mit 20 mL Methanol (20 %) gewaschen und mit 2-5 mL Methanol (100 %) eluiert. Das Methanol wird in einer Vakuumzentrifuge entfernt, das AMAC in 1 mL DMSO/konz. Essigsäure (85 %/15 %) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

5.4.8 Derivatisierung von Disaccharid-Fragmenten mit 2-Aminoacridon

Zur Derivatisierung werden die Proben mit 5 µL gereinigtem, gelöstem AMAC 5 min inkubiert, 5 µL einer 1 M Natriumcyanoborhydrid-Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Es werden 190 µL eines DMSO/Wasser-Gemisches (1:1) zugegeben und die Proben in HPLC-Gefäße überführt.

5.4.9 HPLC-Analytik

Die Auftrennung und Quantifizierung der derivatisierten Disaccharide erfolgt mittels einer HPLC. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,662 mL/min wird ein binärer Gradient mit Ammoniumacetat-Puffer (60 mM, pH = 5,6) und Acetonitril als mobile Phase gefahren. Die Trennung erfolgt über eine X-Bridge Shield RP18 Säule von Waters (3,5 µm, 4,6x100 mm) und die Detektion über einen Fluoreszenzdetektor mit einer Anregungswellenlänge von 442 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Nachdem die Säule ausreichend äquilibriert ist, wird mittels Direktinjektions-*Autosampler* ein Teil der Probe injiziert. Der Gradient wird abhängig von der Art der Disaccharide nach folgenden Programmen gefahren:

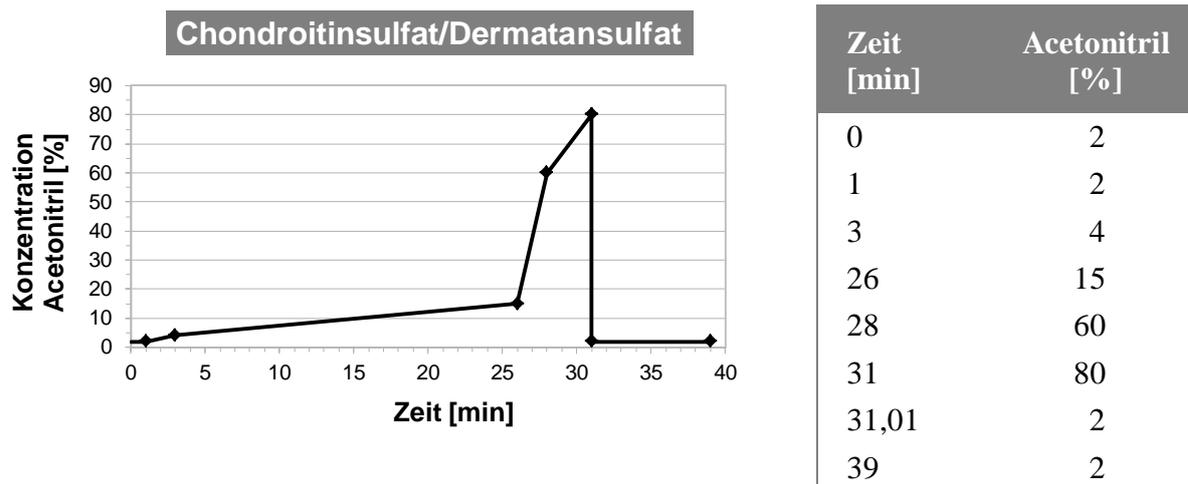


Abbildung 5.2: Zusammensetzung des binären Gradienten zur Auftrennung von CS und DS in Abhängigkeit der Zeit.

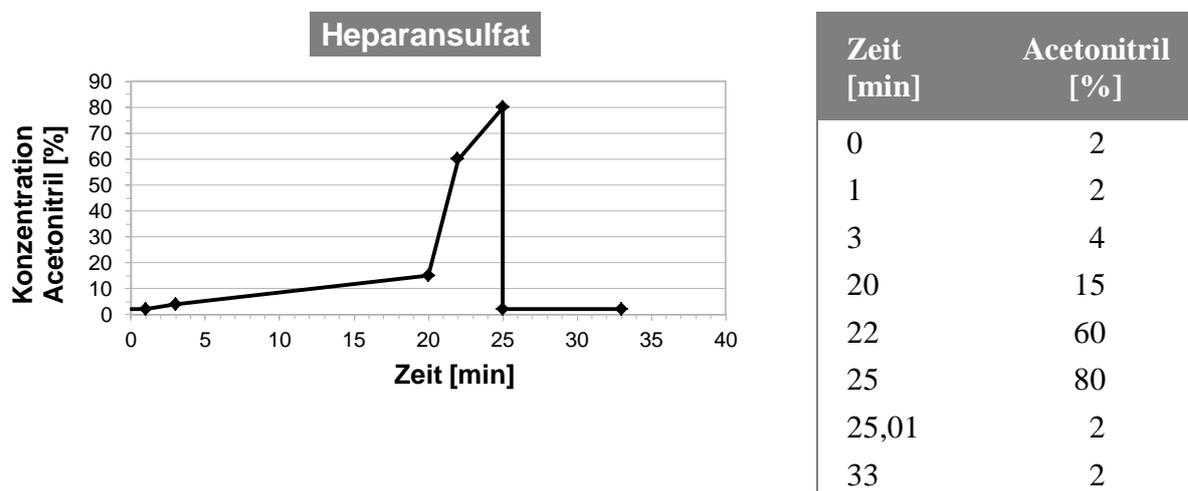


Abbildung 5.3: Zusammensetzung des binären Gradienten zur Auftrennung von HS in Abhängigkeit der Zeit.

Zur Erstellung einer Standardkurve werden 12,5, 25, 50 und 100 μL der jeweiligen Standardsubstanz (1 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach Derivatisierung der Standardsubstanzen (s. 5.4.8) werden je 20 μL der Lösungen in die HPLC-Anlage eingespritzt und aufgetrennt. Die Integration der Peakflächen erfolgt über die *Shimadzu LC solution postrun analysis* Software.

Die Peakzuordnung der analysierten Proben erfolgt anhand der Retentionszeiten der Standardsubstanzen.

6 Material und Geräte

6.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril (HPLC-Gradient-Grade)	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEQ Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
AMAC	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumacetat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Ascorbinsäure	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bradford Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Calciumacetat	Sigma, Taufkirchen
CS-Disaccharid Standardsubstanzen	Dextra, Reading, UK
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
dNTP (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, Estland
ECGS	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut oder vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutathion, reduziert	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Taufkirchen
HS-Disaccharid Standardsubstanzen	Dextra, Reading, UK
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumfluorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Kollagen I (<i>Rat Tail</i> , 5 mg/mL)	Invitrogen, San Diego, USA
Macro-Prep t-Butyl HIC	Bio-Rad, München

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Mannitol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MES	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumborhydrid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcyanoborhydrid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma, Taufkirchen
Oligo-dT- <i>Primer</i>	Biomers, Ulm
Pepton	Roth, Karlsruhe
<i>Primer</i>	Biomers, Ulm
Proteaseinhibitor PMSF	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Seide	Idee, Bielefeld
Sephadex G-50	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Szintillationsflüssigkeit <i>Ready Flow III</i>	Beckman Coulter, Krefeld
TES	Sigma, Taufkirchen
Transferrin	Sigma, Taufkirchen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblaulösung	Fluka, Buchs, Schweiz
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
UDP-[¹⁴ C]-Xylose (370 KBq/mL)	Perkin Elmer, Boston, USA
Wasser (HPLC- <i>Gradient-Grade</i>)	Fisher Scientific, Schwerte
Wasser (Aqua ad. iniectabilia)	Diprom, Hamburg

6.2 Puffer und Lösungen

Ammoniumacetat-Puffer (pH 8,0)	50 mM Ammoniumacetat
Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,6)	60 mM Ammoniumacetat 2,5 g NaN ₃ add. 5 L mit HPLC-Wasser

Auftragspuffer	0,05 % Bromphenolblau 60 % Saccharose 0,05 % Xylencyanol
Glutathion <i>Reconstitution</i> Puffer (10x, pH 8,0)	500 mM TRIS-HCl
GST <i>Bind/Wash</i> Puffer (10x, pH 7,3)	27 mM KCl 14,7 mM KH ₂ PO ₄ 1,37 M NaCl 43 mM Na ₂ HPO ₄
GST <i>Elution</i> Puffer (10x)	1 g Glutathion, reduziert 32,5 mL Glutathion <i>Reconstitution</i> Puffer (10x, pH 8,0)
Ham's F-12K zur Kultivierung von VSMC	0,05 mg/mL Ascorbinsäure 0,01 mg/mL Insulin 0,01 mg/mL Transferrin 10 ng/mL Natriumselenit 0,03 mg/mL ECGS 10 mM HEPES 10 mM TES
Heparinase-Puffer (pH 7,1)	20 mM Ammoniumacetat 4 mM Calciumacetat
Lysepuffer	4 M Guanidinhydrochlorid 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA 2 % Triton X100 1 mM Proteaseinhibitor PMSF
MES-Puffer (pH 6,5)	500 mM MES 100 mM KF
Mg/Mn-Lösung	250 mM KCl 100 mM MgCl ₂ 100 mM MnCl ₂
Natriumborhydridlösung (5 M)	2,84 g NaBH ₄ add. 15 mL NaOH (2,5 M)

PBS (10x, pH 7,2)	40 g NaCl 1 g KCl 5,75 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1 g KH ₂ PO ₄ add. 500 mL dest. H ₂ O
Puffer B (pH 9,45)	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 800 mM TRIS 0,2 % Tween-20
TE-Puffer (pH 7,5)	1 mM EDTA 10 mM TRIS
TBE-Puffer (pH 8,3)	90 mM Borsäure 1 mM EDTA 100 mM TRIS-HCL
TSS-Puffer	5 % DMSO 0,5 g Hefeextrakt 50 mM MgCl ₂ 0,5 g NaCl 10 % PEG 8000 1 g Pepton add. 100 mL dest. H ₂ O, Sterilfiltration

6.3 Zelllinien

CHO pgsA-745	XT-defiziente Mutante von Chinesischen Hamster Ovarien [75]
F42A	normale humane Dermalfibroblasten: weibliche Spenderin, 42 Jahre, Entnahmeregion: Dermis des Abdomens (Cambrex)
HA-VSMC	glatte humane Muskelzellen: weibliche Spenderin, 11 Monate, Entnahmeregion: Aorta (ATCC)
HepG2	humane Leberhepatoblastomzellen (ATCC)
M56D	normale humane Dermalfibroblasten: männlicher Spender, 56 Jahre, Entnahmeregion: faziale Dermis (Genlantis)

6.4 Zellkulturmedien und Zusätze

<i>Antibiotic-Antimycotic Solution</i> (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM (1x <i>high glucose</i>)	Invitrogen, San Diego, USA
DMEM (1x <i>low glucose</i>)	Invitrogen, San Diego, USA
Dulbecco's PBS (1x)	Invitrogen, San Diego, USA
FCS (fötales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
G-418 Sulfat	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glukoselösung (156,2 mg/mL)	angesetzte Lösung, sterilfiltriert
Ham's F-12	Invitrogen, San Diego, USA
Ham's F-12K	Invitrogen, San Diego, USA
Insulinlösung (10 mg/mL)	Sigma, Taufkirchen
Mannitollösung (157,9 mg/mL)	angesetzte Lösung, sterilfiltriert
Trypsinlösung (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

6.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 DE3	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> XL10-Gold	Stratagene, La Jolla, Kanada

6.6 Nährmedien für *E. Coli*

Ampicillinlösung	50 mg/mL Ampicillin in 70%igem Ethanol
Kanamycinlösung	50 mg/mL Kanamycin in Wasser
LB-Flüssigmedium	5 g Hefeextrakt 10 g NaCL 10 g Pepton add. 1 L mit dest. Wasser, autoklavieren
LB-Ampicillin Flüssigmedium	LB-Flüssigmedium mit 75 µg/mL Ampicillin
LB-Agarplatten	20 g Agar 5 g Hefeextrakt 10 g NaCL 10 g Pepton add. 1 L mit dest. Wasser, autoklavieren

LB-Ampicillin Agarplatten	LB-Agarplatten mit 75 µg/mL Ampicillin
LB-Kanamycin Agarplatten	LB-Agarplatten mit 30 µg/mL Kanamycin
SOC-Medium	20 mM Glukose 0,5 % Hefeextrakt 10 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2 % Trypton

6.7 Enzyme

Chondroitinase ABC (1 U/mL)	Sigma, Taufkirchen
EcoRI (10 U/µL)	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI (12 U/µL)	Promega, Mannheim
Exonuklease I (20 U/µL)	New England BioLabs, Frankfurt
Heparinase I (0,1 U/mL)	Grampian Enzymes, Orkney, UK
Heparinase II (0,1 U/mL)	Grampian Enzymes, Orkney, UK
Heparinase III (0,1 U/mL)	Grampian Enzymes, Orkney, UK
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen, San Diego, USA
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP, 1 U/µL)	USB, Cleveland, USA
T4 DNA-Ligase (5 U/µL)	Fermentas, St. Leon-Rot
XbaI (10 U/µL)	Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI (20 U/µL)	New England BioLabs, Frankfurt

6.8 Reaktionssysteme

<i>Human Dermal Fibroblast Nucleofactor Kit</i>	Amaya, Köln
<i>BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>GenElute HP Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma, Taufkirchen
<i>GST-Bind Kit</i>	Merck, Darmstadt
Lipofectamin 2000	Invitrogen, San Diego, USA
<i>NucleoSpin Blood Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>NucleoSpin RNA II Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit</i>	Invitrogen, San Diego, USA
<i>SuperScript II Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, San Diego, USA

6.9 Längen- und Größenstandards

1 kb DNA- <i>Ladder</i> (0,05 µg/µL)	MBBL, Bielefeld
pUC19/MspI DNA- <i>Ladder</i> (0,05 µg/µL)	MBBL, Bielefeld

6.10 Vektoren

pCVM6-XL6-XYLT2	Origene, Rockville, USA
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, San Diego, USA
pcDNA3.1(+)/XYLT2 (pCR128.32)	Eigenherstellung durch Umklonierung des XYLT2-Fragment aus pCVM6-XL6-XYLT2 in pcDNA3.1(+)
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	Invitrogen, San Diego, USA
pcDNA3.1/CT-GFP-XYLT1 (pSS1)	Eigenherstellung durch Klonierung der XYLT1-cDNA in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO [38]
pGEX-6P-1	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

6.11 Oligonukleotide

6.11.1 Vektorbindende Oligonukleotide

Tabelle 6.1: Zur Sequenzierung und Amplifikation von DNA eingesetzte vektorbindende Oligonukleotide.

Oligonukleotidname	Sequenz	Annealing-Temperatur
pGEX_5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	52 °C
pGEX_3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	
BGH Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG	55°C
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGGC	
f1_ori_4934_Up	CCCTGTAGCGGCGCATTAAAG	58°C
f1_ori_5154_Lo	CGATGGCCCACTACGTGAAC	

6.11.2 Oligonukleotide zur Synthese von GST-Fusionsproteinen

Die für die Synthese von GST-Fusionsproteinen verwendeten Oligonukleotide sind in Appendix A der Referenz [76] aufgelistet. Die ausgewählten Aminosäuresequenzen

wurden unter Berücksichtigung des *Codon Usage* von *E. coli* in entsprechende *Codons* revers translatiert.

6.11.3 Oligonukleotide für die *Real-Time-PCR*

Oligonukleotide die in der *Real-Time-PCR* eingesetzt werden, sind intronüberspannend konstruiert, so dass eine Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen wird.

Tabelle 6.2: Oligonukleotide zur Amplifikation von Referenz- und Zielgenen in der *Real-Time-PCR*.

Gen	Oligonukleotidname	Sequenz	Annealing-Temperatur und Produktgröße
B2M	B2M/E1/84U22	TGTGCTCGCGCTACTCTCTCT	58 °C
	B2M/E2/200L21	CGGATGGATGAAACCCAGACA	137 bp
BGN	BGN/E6/912U18	AGGACCTGCTTCGCTACT	58 °C
	BGN/E8/1186L16	GGGCACGGGGTTGTTG	290 bp
COL1A1	COL1A1/3908U17E49	GATGTGCCACTCTGACT	58 °C
	COL1A1/4058L15E50	GGGTTCTTGCTGATG	151 bp
COL2A1	COL2A1/E51/4000U15	GGGCTCCCGCAAGAA	58 °C
	COL2A1/E53/4305L18	GCAGGCGTAGGAAGGTCA	323 bp
COL3A1	COL3A1/E34/2498U18	GTGGTAGCCCTGGTGAGA	58 °C
	COL3A1/E39/2780L16	GGGGGTCCTGGGTTAC	298 bp
COL5A1	COL5A1/E3/782U18	CGCTCTCCCGTCTTCCTC	58 °C
	COL5A1/E4/1021L20	CACCCTCAAACACCTCCTCA	259 bp
DCN	DCN/E1/572U16	CCTTCCGCTGTCAATG	58 °C
	DCN/E2/656L18	GCAGGTCTAGCAGAGTTG	102 bp
GalNAcT1	GalNAcT1/E4/1262U18	CTTACACGGCCTCTGATT	58 °C
	GalNAcT1/E5/1446L18	GCTAGAGGCACGATAACA	202 bp
GAPDH	GAPDH/E2+3/116U18	AGGTCGGAGTCAACGGAT	58 °C
	GAPDH/E4/338L18	TCCTGGAAGATGGTGATG	223 bp
HPRT1	HPRT1/E3/311U18	GCTGACCTGCTGGATTAC	58 °C
	HPRT1/E6/568L18	TGCGACCTTGACCATCTT	258 bp
HSPG2	Perl/E33/4116U17	TGAACCCACAGCGAAAC	58 °C
	Perl/E34/4287L19	GTGTAGGAGAGGGTGTATC	190 bp
SDC2	SDC2/E2+3/790U18	GGAGCTGATGAGGATGTA	58 °C
	SDC2/E4+5/1051L18	AATGACAGCTGCTAGGAC	279 bp
SPARC	SPARC/E6/466U18	TCTTCCTGCCACTTCTTT	58 °C
	SPARC/E7/641L18	TGTCCTCATCCCTCTCAT	193 bp

Tabelle 6.2: Oligonukleotide zur Amplifikation von Referenz- und Zielgenen in der Real-Time-PCR (Fortsetzung).

Gen	Oligonukleotidname	Sequenz	Annealing-Temperatur und Produktgröße
TGFB3	TGFB3/E14/2664U19	TGGACGCCTCGATAATCTG	58 °C
	TGFB3/E16/2848L19	GAGTGCTCCGATCACAAAG	203 bp
VCAN	VCAN/E3/684U18	CAAGACGGGGTGTCACTG	58 °C
	VCAN/E4/823L18	AAGAGCTGCTCTGGAGTT	123 bp
XYLT1	XT-I/E11/2489U18	ACTGCCGAATTCACACAC	58 °C
	XT-I/E11-12/2633L19	GTGCCTCCTCAGGTTTGAT	163 bp
XYLT2	XT-II/E10/2258U18	CCTTGTGCTGCCCTTGAC	58 °C
	XT-II/E11/2352L18	GCCCTGGAACTCTGCTC	112 bp

6.11.4 siRNA-Oligonukleotide

Die verwendeten siRNA-Moleküle werden von der Firma Ambion bezogen, in Nuklease-freiem Wasser gelöst und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6.3: siRNA-Oligonukleotide zur Herabregulation der XT-Expression.

Zielgen	ID siRNA	siRNA-Sequenz	Bindestelle
XYLT1	112165	GCAUCAUGCUACCAAUCUGtt CAGAUUGGUAGCAUGAUGCtt	Exon 10
XYLT2	112168	CCUGUAUUUCUAUGACGACTt GUCGUCAUAGAAUACAGGtg	Exon 9
NK	#1 siRNA		

6.12 Rekombinante Wachstumsfaktoren

Lyophilisierte Wachstumsfaktoren werden in PBS mit 0,2 % BSA gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 6.4: In der Zellkultur eingesetzte Wachstumsfaktoren.

Wachstumsfaktor	Quelle	Hersteller
Activin A (human)	HEK293 Zellen	HumanZyme, Chicago, USA
TGF-β1 (human)	HEK293 Zellen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

6.13 Sonstige Materialien

Dialyse-Schlauch, benzoiliert, MWCO 2 kDa	Sigma, Taufkirchen
Indikatorpapier (pH 1-14)	Thermo Scientific, Schwerte
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulosemembran 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
Poly-Prep Chromatographie Säulen (0,8x4 cm)	Bio-Rad, München
<i>Receiver Columns</i> 20 µm	Macherey-Nagel, Düren
RiboLyser-Röhrchen, Matrix C	Qbiogene, Heidelberg
RT-PCR Platten ThermoFast 96, weiß	Peqlab, Erlangen
Slide-A-Lyzer Mini Dialyse Gefäße, MWCO 2kDa	Thermo Scientific, Schwerte
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Szintillations-Röhrchen	Zinsler Analytik, Frankfurt
Vivacell 100 Konzentrador PES, MWCO 5 kDa	Vivascience, Hannover
X-Bridge Shield RP18 (3,5 µm; 4,6x100 mm)	Waters, Eschborn
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen

6.14 Software

Clone Manager Suite 7	Scientific & Educational Software, Cary, USA
CorelDRAW X3	Corel Corporation
EndNote 7	Thomson ISI ResearchSoft
Mastercycler Software 1.0	Eppendorf, Hamburg
Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Sequenz Analysis 3.7	Perkin Elmer, Foster City, USA
Shimadzu LC solution	Shimadzu, Kyoto, Japan

6.15 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 5075 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Automatik- und Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellkulturen Galaxy R	Thermo Scientific, Schwerte
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresenetzteile PS3002	Life Technologies, Carlsbad, USA
Elektroporator (GenePulser Xcell)	Bio-Rad, München
<i>Glucoseanalyser</i> GA1	Kabe Labortechnik, Nümbrecht

<i>Heat Sealer</i>	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator <i>RiboLyser Fast Prep</i>	Hybaid, Vista, USA
HPLC (Shimadzu <i>Prominence LC-20A</i>)	Shimadzu, Kyoto, Japan
Lichtmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
<i>Mastercycler ep Realplex</i>	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000	Nikon, Düsseldorf
pH-Meter 766 <i>Calimatic</i>	Knick, Berlin
Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Schwerte
Sterilbank Varilab W90	Waldner, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
TGradient <i>Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen
<i>Thermocycler</i>	Landgraf, Langenhagen
UV-Illuminator	Raytest, Straubenhardt
Vakuumzentrifuge	Saur, Reutlingen
Waagen	Sartorius, Göttingen
	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Zentrifugen	Hettich, Tuttlingen
	Heraeus, Buckinghamshire, England

7 Abkürzungen

AMAC	2-Aminoacridon
APLP	Amyloid <i>Precursor-like</i> Protein
APP	β -A4-Amyloid Protein <i>Precursor</i>
AS	Aminosäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CS	Chondroitinsulfat
C _t	<i>Cycle Threshold</i>
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GlcA	Glukuronsäure
GlcAT-I	Glukuronsäuretransferase I
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Galaktosyltransferase
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatographie</i>
HS	Heparansulfat
IdoA	Iduronsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

k	kilo
kb	Kilobase
KS	Keratansulfat
L	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
m	milli
M	molar
min	Minute
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
μ	mikro
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl
n	nano
NAFLD	nicht-alkoholische Fettleber
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phospate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	Polyethersulfon
PG	Proteoglykan
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLRP	<i>small leucine-rich proteoglycan</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
TCA	Trichloressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGFβR	TGF-β-Rezeptor
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>Unit</i>
UDP	Uracildiphosphat
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WT	Wildtyp
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8 Literatur

- [1] Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., *The extracellular matrix at a glance*, J Cell Sci 123 (2010): 4195-4200.
- [2] Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*, Science 326 (2009): 1216-1219.
- [3] Aszodi, A., Legate, K.R., Nakchbandi, I., Fassler, R., *What mouse mutants teach us about extracellular matrix function*, Annu Rev Cell Dev Biol 22 (2006): 591-621.
- [4] Kjellen, L., Lindahl, U., *Proteoglycans: structures and interactions*, Annu Rev Biochem 60 (1991): 443-475.
- [5] Inatani, M., Tanihara, H., *Proteoglycans in retina*, Prog Retin Eye Res 21 (2002): 429-447.
- [6] Prydz, K., Dalen, K.T., *Synthesis and sorting of proteoglycans*, J Cell Sci 113 Pt 2 (2000): 193-205.
- [7] Yamada, H., Watanabe, K., Shimonaka, M., Yamaguchi, Y., *Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family*, J Biol Chem 269 (1994): 10119-10126.
- [8] Nadanaka, S., Kitagawa, H., Sugahara, K., *Demonstration of the immature glycosaminoglycan tetrasaccharide sequence GlcAbeta1-3Galbeta1-3Galbeta1-4Xyl on recombinant soluble human alpha-thrombomodulin. An oligosaccharide structure on a "part-time" proteoglycan*, J Biol Chem 273 (1998): 33728-33734.
- [9] Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., *Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting*, Febs J (2010).
- [10] Couchman, J.R., *Transmembrane signaling proteoglycans*, Annu Rev Cell Dev Biol 26 (2010): 89-114.
- [11] Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*, Annu Rev Biochem 67 (1998): 609-652.
- [12] Schaefer, L., Iozzo, R.V., *Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction*, J Biol Chem 283 (2008): 21305-21309.
- [13] Gandhi, N.S., Mancera, R.L., *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*, Chem Biol Drug Des 72 (2008): 455-482.
- [14] Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., Kitagawa, H., *FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region*, Biochem J 421 (2009): 157-162.
- [15] Tone, Y., Pedersen, L.C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J., Negishi, M., Sugahara, K., *2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis*, J Biol Chem 283 (2008): 16801-16807.

- [16] Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., *Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans*, J Biol Chem 280 (2005): 1417-1425.
- [17] Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., *Human xylosyltransferases in health and disease*, Cell Mol Life Sci 64 (2007): 1498-1517.
- [18] Gulberti, S., Jacquinet, J.C., Chabel, M., Ramalanjoana, N., Magdalou, J., Netter, P., Coughtrie, M.W., Ouzzine, M., Fournel-Gigleux, S., *Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) involved in chondroitin sulfate initiation: Impact of sulfation on activity and specificity*, Glycobiology (2012).
- [19] Hänsel, R., Sticher, O., *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, 9. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2010): 663-704.
- [20] Taylor, K.R., Gallo, R.L., *Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation*, Faseb J 20 (2006): 9-22.
- [21] Trowbridge, J.M., Gallo, R.L., *Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan*, Glycobiology 12 (2002): 117R-125R.
- [22] Sarrazin, S., Lamanna, W.C., Esko, J.D., *Heparan sulfate proteoglycans*, Cold Spring Harb Perspect Biol 3 (2011).
- [23] Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate biosynthesis*, IUBMB Life 54 (2002): 187-194.
- [24] Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., Withers, S.G., *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*, Annu Rev Biochem 77 (2008): 521-555.
- [25] Hu, Y., Walker, S., *Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases*, Chem Biol 9 (2002): 1287-1296.
- [26] www.cazy.org/GlycosylTransferases.html.
- [27] Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., Henrissat, B., *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*, J Mol Biol 328 (2003): 307-317.
- [28] Breton, C., Mucha, J., Jeanneau, C., *Structural and functional features of glycosyltransferases*, Biochimie 83 (2001): 713-718.
- [29] Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J.C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J.D., Kleesiek, K., Götting, C., *Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans*, J Biol Chem 282 (2007): 5201-5206.
- [30] Cuellar, K., Chuong, H., Hubbell, S.M., Hinsdale, M.E., *Biosynthesis of chondroitin and heparan sulfate in chinese hamster ovary cells depends on xylosyltransferase II*, J Biol Chem 282 (2007): 5195-5200.
- [31] Voglmeir, J., Voglauer, R., Wilson, I.B., *XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity*, J Biol Chem 282 (2007): 5984-5990.

- [32] Brinkmann, T., Weilke, C., Kleesiek, K., *Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*, J Biol Chem 272 (1997): 11171-11175.
- [33] Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J., Schwartz, N.B., *Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase*, Biochemistry 30 (1991): 7477-7483.
- [34] Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B., Ruoslahti, E., *Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins*, Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987): 3194-3198.
- [35] Casanova, J.C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II*, Biochem Biophys Res Commun 365 (2008): 678-684.
- [36] Casanova, J.C., Roch, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *First in-gel detection and purification of human xylosyltransferase II*, Biochem Biophys Res Commun 379 (2009): 243-248.
- [37] Condac, E., Dale, G.L., Bender-Neal, D., Ferencz, B., Towner, R., Hinsdale, M.E., *Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum*, Glycobiology 19 (2009): 829-833.
- [38] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II*, J Biol Chem 281 (2006): 14224-14231.
- [39] Condac, E., Silasi-Mansat, R., Kosanke, S., Schoeb, T., Towner, R., Lupu, F., Cummings, R.D., Hinsdale, M.E., *Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis*, Proc Natl Acad Sci U S A 104 (2007): 9416-9421.
- [40] Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K., *Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II*, J Mol Biol 304 (2000): 517-528.
- [41] Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K., *Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis*, J Invest Dermatol 112 (1999): 919-924.
- [42] Götting, C., Hendig, D., Adam, A., Schön, S., Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., *Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis*, J Mol Med 83 (2005): 984-992.
- [43] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K., *Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men*, Clin Chim Acta 317 (2002): 199-202.
- [44] Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., *Serum xylosyltransferase activity in diabetic patients as a possible marker of reduced proteoglycan biosynthesis*, Diabetes Care 31 (2008): 2018-2019.

- [45] Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K., *Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis*, Acta Derm Venereol 80 (2000): 60-61.
- [46] Kuhn, J., Gressner, O.A., Götting, C., Gressner, A.M., Kleesiek, K., *Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis*, Clin Chim Acta 409 (2009): 123-126.
- [47] Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H.R., Brinkmann, T., Kleesiek, K., *High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells*, Mol Hum Reprod 8 (2002): 1079-1086.
- [48] Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*, J Pathol 214 (2008): 199-210.
- [49] Grinnell, F., *Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices*, Trends Cell Biol 13 (2003): 264-269.
- [50] Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., *Wound repair and regeneration*, Nature 453 (2008): 314-321.
- [51] Branton, M.H., Kopp, J.B., *TGF-beta and fibrosis*, Microbes Infect 1 (1999): 1349-1365.
- [52] Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency*, Clin Biochem 38 (2005): 486-488.
- [53] Prante, C., Milting, H., Kassner, A., Farr, M., Ambrosius, M., Schön, S., Seidler, D.G., Banayosy, A.E., Korfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling*, J Biol Chem 282 (2007): 26441-26449.
- [54] Koslowski, R., Pfeil, U., Fehrenbach, H., Kasper, M., Skutelsky, E., Wenzel, K.W., *Changes in xylosyltransferase activity and in proteoglycan deposition in bleomycin-induced lung injury in rat*, Eur Respir J 18 (2001): 347-356.
- [55] Blobel, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., *Role of transforming growth factor beta in human disease*, N Engl J Med 342 (2000): 1350-1358.
- [56] Werner, S., Alzheimer, C., *Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease*, Cytokine Growth Factor Rev 17 (2006): 157-171.
- [57] Takagi, K., Kawaguchi, Y., Kawamoto, M., Ota, Y., Tochimoto, A., Gono, T., Katsumata, Y., Takagi, M., Hara, M., Yamanaka, H., *Activation of the activin A-ALK-Smad pathway in systemic sclerosis*, J Autoimmun 36 (2011): 181-188.
- [58] Löffler, G., *Basiswissen Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2008): 354.
- [59] Hahn, J.-M., *Checkliste Innere Medizin*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York (1998): 479-480.
- [60] Arrese, M., *Nonalcoholic fatty liver disease: liver disease: an overlooked complication of diabetes mellitus*, Nat Rev Endocrinol 6 (2010): 660-661.

- [61] Porepa, L., Ray, J.G., Sanchez-Romeu, P., Booth, G.L., *Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease*, *Cmaj* 182 (2010): E526-531.
- [62] Cusi, K., *Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus*, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16 (2009): 141-149.
- [63] Kjellen, L., Bielefeld, D., Hook, M., *Reduced sulfation of liver heparan sulfate in experimentally diabetic rats*, *Diabetes* 32 (1983): 337-342.
- [64] Olsson, U., Egnell, A.C., Lee, M.R., Lunden, G.O., Lorentzon, M., Salmivirta, M., Bondjers, G., Camejo, G., *Changes in matrix proteoglycans induced by insulin and fatty acids in hepatic cells may contribute to dyslipidemia of insulin resistance*, *Diabetes* 50 (2001): 2126-2132.
- [65] Mahley, R.W., Ji, Z.S., *Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E*, *J Lipid Res* 40 (1999): 1-16.
- [66] Williams, K.J., Fuki, I.V., *Cell-surface heparan sulfate proteoglycans: dynamic molecules mediating ligand catabolism*, *Curr Opin Lipidol* 8 (1997): 253-262.
- [67] MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., Esko, J.D., *Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members*, *J Clin Invest* 117 (2007): 153-164.
- [68] Lusis, A.J., *Atherosclerosis*, *Nature* 407 (2000): 233-241.
- [69] Ballinger, M.L., Nigro, J., Frontanilla, K.V., Dart, A.M., Little, P.J., *Regulation of glycosaminoglycan structure and atherogenesis*, *Cell Mol Life Sci* 61 (2004): 1296-1306.
- [70] Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hulten, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., Boren, J., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*, *Nature* 417 (2002): 750-754.
- [71] Gustafsson, M., Boren, J., *Mechanism of lipoprotein retention by the extracellular matrix*, *Curr Opin Lipidol* 15 (2004): 505-514.
- [72] Little, P.J., Osman, N., O'Brien, K.D., *Hyperelongated biglycan: the surreptitious initiator of atherosclerosis*, *Curr Opin Lipidol* 19 (2008): 448-454.
- [73] Glass, C.K., Witztum, J.L., *Atherosclerosis: the road ahead*, *Cell* 104 (2001): 503-516.
- [74] Roch, C., *Untersuchung gewebe- und zellspezifischer Genexpression von Xylosyltransferasen in humanen und murinen Proben und Bestimmung der Akzeptorspezifitäten von humanen Xylosyltransferasen*, Universität Bielefeld, Diplomarbeit (2007).
- [75] Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H., *Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985): 3197-3201.
- [76] Roch, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans*, *Biochem Biophys Res Commun* 391 (2010): 685-691.

- [77] Müller, B., Prante, C., Kleesiek, K., Götting, C., *Identification and characterization of the human xylosyltransferase I gene promoter region*, J Biol Chem 284 (2009): 30775-30782.
- [78] Müller, B., *Identifizierung und funktionelle Analyse der humanen Xylosyltransferase I- und II-Promotoren*, Universität Bielefeld, Dissertation (2009).
- [79] Shi, H., Wang, J., Dong, F., Wang, X., Li, H., Hou, Y., *The effect of proteoglycans inhibited by RNA interference on metastatic characters of human salivary adenoid cystic carcinoma*, BMC Cancer 9 (2009): 456.
- [80] Götting, C., Prante, C., Schillinger, M., Exner, M., Domanovits, H., Raith, M., Kuhn, J., Kleesiek, K., *Xylosyltransferase I variants and their impact on abdominal aortic aneurysms*, Clin Chim Acta 391 (2008): 41-45.
- [81] Hurtado, A., Podinin, H., Oudega, M., Grimpe, B., *Deoxyribozyme-mediated knockdown of xylosyltransferase-I mRNA promotes axon growth in the adult rat spinal cord*, Brain 131 (2008): 2596-2605.
- [82] Bahr, C., Schön, S., Kuhn, J., Groop, P.H., Parkkonen, M., Wessman, M., Kleesiek, K., Götting, C., *Novel sequence variants in the human xylosyltransferase I gene and their role in diabetic nephropathy*, Diabet Med 23 (2006): 681-684.
- [83] Schön, S., Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagen, F.W., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis*, Osteoarthritis Cartilage 14 (2006): 442-448.
- [84] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A125S) is a risk factor for diabetic nephropathy in type I diabetes*, Diabetes Care 29 (2006): 2295-2299.
- [85] Schön, S., Prante, C., Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type I diabetic patients with and without nephropathy*, Kidney Int 68 (2005): 1483-1490.
- [86] Müller, S., Disse, J., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., *Human xylosyltransferase I and N-terminal truncated forms: functional characterization of the core enzyme*, Biochem J 394 (2006): 163-171.
- [87] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K., *Xylosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase*, J Protein Chem 17 (1998): 295-302.
- [88] Wilson, I.B., *Functional characterization of Drosophila melanogaster peptide O-xylosyltransferase, the key enzyme for proteoglycan chain initiation and member of the core 2/I N-acetylglucosaminyltransferase family*, J Biol Chem 277 (2002): 21207-21212.
- [89] Bisswanger, H., *Enzymkinetik - Theorie und Methoden*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim (2000): 68-70.
- [90] Wang, H., Julenius, K., Hryhorenko, J., Hagen, F.K., *Systematic Analysis of proteoglycan modification sites in Caenorhabditis elegans by scanning mutagenesis*, J Biol Chem 282 (2007): 14586-14597.

- [91] Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., *Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity*, J Biol Chem 279 (2004): 42566-42573.
- [92] Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Götting, C., Kleesiek, K., *Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity*, Biochem J 386 (2005): 227-236.
- [93] Kuhn, J., Müller, S., Schnolzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., Kleesiek, K., *High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form*, Biochem Biophys Res Commun 312 (2003): 537-544.
- [94] Deere, M., Johnson, J., Garza, S., Harrison, W.R., Yoon, S.J., Elder, F.F., Kucherlapati, R., Hook, M., Hecht, J.T., *Characterization of human DSPG3, a small dermatan sulfate proteoglycan*, Genomics 38 (1996): 399-404.
- [95] Esko, J.D., Zhang, L., *Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly*, Curr Opin Struct Biol 6 (1996): 663-670.
- [96] Mann, D.M., Yamaguchi, Y., Bourdon, M.A., Ruoslahti, E., *Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis*, J Biol Chem 265 (1990): 5317-5323.
- [97] Zhang, L., Esko, J.D., *Amino acid determinants that drive heparan sulfate assembly in a proteoglycan*, J Biol Chem 269 (1994): 19295-19299.
- [98] Zhang, L., David, G., Esko, J.D., *Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans*, J Biol Chem 270 (1995): 27127-27135.
- [99] Greenfield, B., Wang, W.C., Marquardt, H., Piepkorn, M., Wolff, E.A., Aruffo, A., Bennett, K.L., *Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44*, J Biol Chem 274 (1999): 2511-2517.
- [100] Pfeil, U., Wenzel, K.W., *Purification and some properties of UDP-xylosyltransferase of rat ear cartilage*, Glycobiology 10 (2000): 803-807.
- [101] Jinnin, M., *Mechanisms of skin fibrosis in systemic sclerosis*, J Dermatol 37 (2010): 11-25.
- [102] Kuroda, K., Shinkai, H., *Decorin and glycosaminoglycan synthesis in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis*, Arch Dermatol Res 289 (1997): 481-485.
- [103] Hakkinen, K.M., Harunaga, J.S., Doyle, A.D., Yamada, K.M., *Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices*, Tissue Eng Part A 17 (2011): 713-724.
- [104] Helary, C., Ovtracht, L., Coulomb, B., Godeau, G., Giraud-Guille, M.M., *Dense fibrillar collagen matrices: a model to study myofibroblast behaviour during wound healing*, Biomaterials 27 (2006): 4443-4452.
- [105] Ihn, H., *Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF*, Curr Opin Rheumatol 14 (2002): 681-685.

- [106] Susarla, B.T., Laing, E.D., Yu, P., Katagiri, Y., Geller, H.M., Symes, A.J., *Smad proteins differentially regulate transforming growth factor-beta-mediated induction of chondroitin sulfate proteoglycans*, J Neurochem 119 (2011): 868-878.
- [107] Venkatesan, N., Ouzzine, M., Kolb, M., Netter, P., Ludwig, M.S., *Increased deposition of chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycan and upregulation of beta1,3-glucuronosyltransferase I in pulmonary fibrosis*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 300 (2011): L191-203.
- [108] Hempel, N., How, T., Cooper, S.J., Green, T.R., Dong, M., Copland, J.A., Wood, C.G., Blobe, G.C., *Expression of the type III TGF-beta receptor is negatively regulated by TGF-beta*, Carcinogenesis 29 (2008): 905-912.
- [109] Hesselstrand, R., Westergren-Thorsson, G., Scheja, A., Wildt, M., Akesson, A., *The association between changes in skin echogenicity and the fibroblast production of biglycan and versican in systemic sclerosis*, Clin Exp Rheumatol 20 (2002): 301-308.
- [110] Westergren-Thorsson, G., Hernnas, J., Sarnstrand, B., Oldberg, A., Heinegard, D., Malmstrom, A., *Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats*, J Clin Invest 92 (1993): 632-637.
- [111] Mukhopadhyay, A., Wong, M.Y., Chan, S.Y., Do, D.V., Khoo, A., Ong, C.T., Cheong, H.H., Lim, I.J., Phan, T.T., *Syndecan-2 and decorin: proteoglycans with a difference--implications in keloid pathogenesis*, J Trauma 68 (2010): 999-1008.
- [112] Kolb, M., Margetts, P.J., Sime, P.J., Gauldie, J., *Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 280 (2001): L1327-1334.
- [113] Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., Ruoslahti, E., *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*, Biochem J 302 (Pt 2) (1994): 527-534.
- [114] Yamaguchi, Y., Mann, D.M., Ruoslahti, E., *Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin*, Nature 346 (1990): 281-284.
- [115] Gray, P.C., Bilezikjian, L.M., Vale, W., *Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan*, Mol Cell Endocrinol 188 (2002): 254-260.
- [116] Giacomoni, P.U., Mammone, T., Teri, M., *Gender-linked differences in human skin*, J Dermatol Sci 55 (2009): 144-149.
- [117] Gharaee-Kermani, M., Hatano, K., Nozaki, Y., Phan, S.H., *Gender-based differences in bleomycin-induced pulmonary fibrosis*, Am J Pathol 166 (2005): 1593-1606.
- [118] Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*, Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986): 2496-2500.
- [119] Denk, P.O., Roth-Eichhorn, S., Gressner, A.M., Knorr, M., *Cytokine regulation of hyaluronate production by human Tenon's capsule fibroblasts*, Curr Eye Res 20 (2000): 77-80.

- [120] Dubaybo, B.A., Thet, L.A., *Effect of transforming growth factor beta on synthesis of glycosaminoglycans by human lung fibroblasts*, Exp Lung Res 16 (1990): 389-403.
- [121] Tiedemann, K., Malmstrom, A., Westergren-Thorsson, G., *Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separate and synergistic effects*, Matrix Biol 15 (1997): 469-478.
- [122] Salbach, J., Rachner, T.D., Rauner, M., Hempel, U., Anderegg, U., Franz, S., Simon, J.C., Hofbauer, L.C., *Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone*, J Mol Med (Berl) (2011).
- [123] Sondergaard, K., Heickendorff, L., Risteli, L., Risteli, J., Zachariae, H., Stengaard-Pedersen, K., Deleuran, B., *Increased levels of type I and III collagen and hyaluronan in scleroderma skin*, Br J Dermatol 136 (1997): 47-53.
- [124] Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., Spiess, J., *Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid*, Nature 321 (1986): 776-779.
- [125] Hübner, G., Alzheimer, C., Werner, S., *Activin: a novel player in tissue repair processes*, Histol Histopathol 14 (1999): 295-304.
- [126] Sulyok, S., Wankell, M., Alzheimer, C., Werner, S., *Activin: an important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection*, Mol Cell Endocrinol 225 (2004): 127-132.
- [127] Chen, Y.G., Lui, H.M., Lin, S.L., Lee, J.M., Ying, S.Y., *Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin*, Exp Biol Med (Maywood) 227 (2002): 75-87.
- [128] Huang, X., Li, D.G., Wang, Z.R., Wei, H.S., Cheng, J.L., Zhan, Y.T., Zhou, X., Xu, Q.F., Li, X., Lu, H.M., *Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis*, World J Gastroenterol 7 (2001): 37-41.
- [129] Patella, S., Phillips, D.J., Tchongue, J., de Kretser, D.M., Sievert, W., *Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290 (2006): G137-144.
- [130] Sugiyama, M., Ichida, T., Sato, T., Ishikawa, T., Matsuda, Y., Asakura, H., *Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers*, Gastroenterology 114 (1998): 550-558.
- [131] Wada, W., Kuwano, H., Hasegawa, Y., Kojima, I., *The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells*, Endocrinology 145 (2004): 2753-2759.
- [132] Aoki, F., Kurabayashi, M., Hasegawa, Y., Kojima, I., *Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by follistatin*, Am J Respir Crit Care Med 172 (2005): 713-720.
- [133] Matsuse, T., Ikegami, A., Ohga, E., Hosoi, T., Oka, T., Kida, K., Fukayama, M., Inoue, S., Nagase, T., Ouchi, Y., Fukuchi, Y., *Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis*, Am J Pathol 148 (1996): 707-713.

- [134] Ohga, E., Matsuse, T., Teramoto, S., Katayama, H., Nagase, T., Fukuchi, Y., Ouchi, Y., *Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts*, *Biochem Biophys Res Commun* 228 (1996): 391-396.
- [135] Apostolou, E., Stavropoulos, A., Sountoulidis, A., Xirakia, C., Giaglis, S., Protopapadakis, E., Ritis, K., Mentzelopoulos, S., Pasternack, A., Foster, M., Ritvos, O., Tzelepis, G.E., Andreakos, E., Sideras, P., *Activin-A Over-Expression in the Murine Lung Causes Pathology that Simulates Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*, *Am J Respir Crit Care Med* (2011).
- [136] Munz, B., Smola, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., Brauchle, M., Lein, I., Evans, L.W., Huylebroeck, D., Balling, R., Werner, S., *Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair*, *Embo J* 18 (1999): 5205-5215.
- [137] Ajiboye, S., Sissung, T.M., Sharifi, N., Figg, W.D., *More than an accessory: implications of type III transforming growth factor-beta receptor loss in prostate cancer*, *BJU Int* 105 (2010): 913-916.
- [138] Gaedeke, J., Boehler, T., Budde, K., Neumayer, H.H., Peters, H., *Glomerular activin A overexpression is linked to fibrosis in anti-Thy1 glomerulonephritis*, *Nephrol Dial Transplant* 20 (2005): 319-328.
- [139] Mukhopadhyay, A., Chan, S.Y., Lim, I.J., Phillips, D.J., Phan, T.T., *The role of the activin system in keloid pathogenesis*, *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (2007): C1331-1338.
- [140] Fumagalli, M., Musso, T., Vermi, W., Scutera, S., Daniele, R., Alotto, D., Cambieri, I., Ostorero, A., Gentili, F., Caposio, P., Zucca, M., Sozzani, S., Stella, M., Castagnoli, C., *Imbalance between activin A and follistatin drives postburn hypertrophic scar formation in human skin*, *Exp Dermatol* 16 (2007): 600-610.
- [141] Seo, N.S., Hocking, A.M., Hook, M., McQuillan, D.J., *Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions*, *J Biol Chem* 280 (2005): 42774-42784.
- [142] Pejler, G., Winberg, J.O., Vuong, T.T., Henningson, F., Uhlin-Hansen, L., Kimata, K., Kolset, S.O., *Secretion of macrophage urokinase plasminogen activator is dependent on proteoglycans*, *Eur J Biochem* 270 (2003): 3971-3980.
- [143] Shi, Y.F., Zhang, Q., Cheung, P.Y., Shi, L., Fong, C.C., Zhang, Y., Tzang, C.H., Chan, B.P., Fong, W.F., Chun, J., Kung, H.F., Yang, M., *Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation*, *Biochim Biophys Acta* 1760 (2006): 1587-1595.
- [144] Rühland, C., Schönherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R.V., Bruckner, P., Seidler, D.G., *The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis*, *Febs J* 274 (2007): 4246-4255.
- [145] Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., Massague, J., *Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites*, *J Cell Biol* 124 (1994): 557-568.
- [146] Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., Wells, R.G., *Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function*, *J Biol Chem* 277 (2002): 823-829.

- [147] Prante, C., *Untersuchungen zur Synthese der extrazellulären Matrix bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen*, Universität Bielefeld, Dissertation (2006).
- [148] Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Roden, L., Fessler, J.H., *Silk--a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase*, *Anal Biochem* 137 (1984): 505-516.
- [149] Merline, R., Lazaroski, S., Babelova, A., Tsalastra-Greul, W., Pfeilschifter, J., Schluter, K.D., Gunther, A., Iozzo, R.V., Schaefer, R.M., Schaefer, L., *Decorin deficiency in diabetic mice: aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration*, *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4 (2009): 5-13.
- [150] Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P.S., Beason, D.P., Carine, E.T., Soslowsky, L.J., Iozzo, R.V., Birk, D.E., *Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development*, *J Cell Biochem* 98 (2006): 1436-1449.
- [151] Ferdous, Z., Wei, V.M., Iozzo, R., Hook, M., Grande-Allen, K.J., *Decorin-transforming growth factor- interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices*, *J Biol Chem* 282 (2007): 35887-35898.
- [152] Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants*, *Lancet* 378 (2011): 31-40.
- [153] Stolar, M., *Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus*, *Am J Med* 123 (2010): S3-11.
- [154] Bugianesi, E., Vanni, E., Marchesini, G., *NASH and the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in type 2 diabetes*, *Curr Diab Rep* 7 (2007): 175-180.
- [155] Stamler, J., Vaccaro, O., Neaton, J.D., Wentworth, D., *Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial*, *Diabetes Care* 16 (1993): 434-444.
- [156] El-Serag, H.B., Tran, T., Everhart, J.E., *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*, *Gastroenterology* 126 (2004): 460-468.
- [157] Ebara, T., Conde, K., Kako, Y., Liu, Y., Xu, Y., Ramakrishnan, R., Goldberg, I.J., Shachter, N.S., *Delayed catabolism of apoB-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice*, *J Clin Invest* 105 (2000): 1807-1818.
- [158] Zhang, H., Dellsperger, K.C., Zhang, C., *The link between metabolic abnormalities and endothelial dysfunction in type 2 diabetes: an update*, *Basic Res Cardiol* 107 (2012): 1-11.
- [159] www.diabetes-deutschland.de/typ2diabetes.html.
- [160] Tannock, L.R., King, V.L., *Proteoglycan mediated lipoprotein retention: a mechanism of diabetic atherosclerosis*, *Rev Endocr Metab Disord* 9 (2008): 289-300.

- [161] Wilson, P., Drennon, K., Tannock, L.R., *Regulation of vascular proteoglycan synthesis by metabolic factors associated with diabetes*, J Investig Med 55 (2007): 18-25.
- [162] Rodriguez-Lee, M., Ostergren-Lunden, G., Wallin, B., Moses, J., Bondjers, G., Camejo, G., *Fatty acids cause alterations of human arterial smooth muscle cell proteoglycans that increase the affinity for low-density lipoprotein*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 26 (2006): 130-135.
- [163] Wasty, F., Alavi, M.Z., Moore, S., *Distribution of glycosaminoglycans in the intima of human aortas: changes in atherosclerosis and diabetes mellitus*, Diabetologia 36 (1993): 316-322.
- [164] Hao, H., Hirota, S., Ishibashi-Ueda, H., Kushiro, T., Kanmatsuse, K., Yutani, C., *Expression of matrix Gla protein and osteonectin mRNA by human aortic smooth muscle cells*, Cardiovasc Pathol 13 (2004): 195-202.
- [165] Dhore, C.R., Cleutjens, J.P., Lutgens, E., Cleutjens, K.B., Geusens, P.P., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., Spronk, H.M., Vermeer, C., Daemen, M.J., *Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 21 (2001): 1998-2003.
- [166] Katsuda, S., Kaji, T., *Atherosclerosis and extracellular matrix*, J Atheroscler Thromb 10 (2003): 267-274.
- [167] Greilberger, J., Schmut, O., Jurgens, G., *In vitro interactions of oxidatively modified LDL with type I, II, III, IV, and V collagen, laminin, fibronectin, and poly-D-lysine*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997): 2721-2728.
- [168] Olsson, U., Bondjers, G., Camejo, G., *Fatty acids modulate the composition of extracellular matrix in cultured human arterial smooth muscle cells by altering the expression of genes for proteoglycan core proteins*, Diabetes 48 (1999): 616-622.
- [169] Ueland, T., Aukrust, P., Aakhus, S., Smith, C., Endresen, K., Birkeland, K.I., Gullestad, L., Johansen, O.E., *Activin A and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus*, Diab Vasc Dis Res (2012).
- [170] Duan, W., Paka, L., Pillarisetti, S., *Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis*, Cardiovasc Diabetol 4 (2005): 16.
- [171] Templeton, D.M., Fan, M.Y., *Posttranscriptional effects of glucose on proteoglycan expression in mesangial cells*, Metabolism 45 (1996): 1136-1146.
- [172] Bollineni, J.S., Alluru, I., Reddi, A.S., *Heparan sulfate proteoglycan synthesis and its expression are decreased in the retina of diabetic rats*, Curr Eye Res 16 (1997): 127-130.
- [173] Menne, J., Park, J.K., Boehne, M., Elger, M., Lindschau, C., Kirsch, T., Meier, M., Gueler, F., Fiebeler, A., Bahlmann, F.H., Leitges, M., Haller, H., *Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C-alpha-deficient diabetic mice*, Diabetes 53 (2004): 2101-2109.
- [174] Conde-Knape, K., *Heparan sulfate proteoglycans in experimental models of diabetes: a role for perlecan in diabetes complications*, Diabetes Metab Res Rev 17 (2001): 412-421.

- [175] Edwards, I.J., Wagner, J.D., Vogl-Willis, C.A., Litwak, K.N., Cefalu, W.T., *Arterial heparan sulfate is negatively associated with hyperglycemia and atherosclerosis in diabetic monkeys*, Cardiovasc Diabetol 3 (2004): 6.
- [176] Vogl-Willis, C.A., Edwards, I.J., *High glucose-induced alterations in subendothelial matrix perlecan leads to increased monocyte binding*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 24 (2004): 858-863.
- [177] Vogl-Willis, C.A., Edwards, I.J., *High-glucose-induced structural changes in the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, of cultured human aortic endothelial cells*, Biochim Biophys Acta 1672 (2004): 36-45.
- [178] Chen, C.P., Chang, S.C., Vivian Yang, W.C., *High glucose alters proteoglycan expression and the glycosaminoglycan composition in placentas of women with gestational diabetes mellitus and in cultured trophoblasts*, Placenta 28 (2007): 97-106.
- [179] Gharagozlian, S., Borrebaek, J., Henriksen, T., Omsland, T.K., Shegarfi, H., Kolset, S.O., *Effect of hyperglycemic condition on proteoglycan secretion in cultured human endothelial cells*, Eur J Nutr 45 (2006): 369-375.
- [180] Tannock, L.R., Little, P.J., Wight, T.N., Chait, A., *Arterial smooth muscle cell proteoglycans synthesized in the presence of glucosamine demonstrate reduced binding to LDL*, J Lipid Res 43 (2002): 149-157.
- [181] Williams, K.J., Liu, M.L., Zhu, Y., Xu, X., Davidson, W.R., McCue, P., Sharma, K., *Loss of heparan N-sulfotransferase in diabetic liver: role of angiotensin II*, Diabetes 54 (2005): 1116-1122.
- [182] Unger, E., Pettersson, I., Eriksson, U.J., Lindahl, U., Kjellen, L., *Decreased activity of the heparan sulfate-modifying enzyme glucosaminyl N-deacetylase in hepatocytes from streptozotocin-diabetic rats*, J Biol Chem 266 (1991): 8671-8674.
- [183] Goldberg, I.J., Hu, Y., Noh, H.L., Wei, J., Huggins, L.A., Rackmill, M.G., Hamai, H., Reid, B.N., Blaner, W.S., Huang, L.S., *Decreased lipoprotein clearance is responsible for increased cholesterol in LDL receptor knockout mice with streptozotocin-induced diabetes*, Diabetes 57 (2008): 1674-1682.
- [184] Chen, K., Liu, M.L., Schaffer, L., Li, M., Boden, G., Wu, X., Williams, K.J., *Type 2 diabetes in mice induces hepatic overexpression of sulfatase 2, a novel factor that suppresses uptake of remnant lipoproteins*, Hepatology 52 (2010): 1957-1967.
- [185] Hassing, H.C., Mooij, H., Guo, S., Monia, B.P., Chen, K., Kulik, W., Dallinga-Thie, G.M., Nieuwdorp, M., Stroes, E.S., Williams, K.J., *Inhibition of hepatic Sulf2 in vivo: A novel strategy to correct diabetic dyslipidemia*, Hepatology (2012).
- [186] Bishop, J.R., Foley, E., Lawrence, R., Esko, J.D., *Insulin-dependent diabetes mellitus in mice does not alter liver heparan sulfate*, J Biol Chem 285 (2010): 14658-14662.
- [187] van den Born, J., van Kraats, A.A., Hill, S., Bakker, M.A., Berden, J.H., *Vessel wall heparan sulfate and transcapillary passage of albumin in experimental diabetes in the rat*, Nephrol Dial Transplant 12 Suppl 2 (1997): 27-31.
- [188] Fries, E., Blom, A.M., *Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor*, Int J Biochem Cell Biol 32 (2000): 125-137.

-
- [189] Pugia, M.J., Valdes, R., Jr., Jortani, S.A., *Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement*, Adv Clin Chem 44 (2007): 223-245.
- [190] Stanford, K.I., Bishop, J.R., Foley, E.M., Gonzales, J.C., Niesman, I.R., Witztum, J.L., Esko, J.D., *Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice*, J Clin Invest 119 (2009): 3236-3245.

9 Publikationen und Präsentationen

Publikationen

- [1] Casanova, J.C., **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., First in-gel detection and purification of human xylosyltransferase II, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (2009): 243-248.
- [2] **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391 (2010): 685-691.

Kongressvortrag

- [1] **Roch, C.**, Unterschiedliche Genexpressionen und Akzeptorspezifitäten humaner Xylosyltransferasen, 5. Jahrestagung der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland (2008).

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

- [1] **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Differences in gene expression and acceptor specificities of human xylosyltransferases, 5. Jahrestagung der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46(9) (2008): A032.
- [2] **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Hyperglycemia and hyperinsulinemia do not affect proteoglycan gene expression in vascular smooth muscle cells, 6. Jahrestagung der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Leipzig, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47(9) (2009): A47.
- [3] **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Gene expression pattern of human xylosyltransferases in murine tissues and various cell lines, 18th IFCC – EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EUROMEDLAB), Innsbruck, Österreich. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47(S1) (2009): S429.

- [4] **Roch, C.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Differences in acceptor specificities of human xylosyltransferases, 20th Joint Glycobiology Meeting, Köln, Deutschland (2009).
- [5] **Roch, C.**, Götting, C., Kleesiek, K., Hendig, D., Effects of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) on extracellular matrix remodelling, 7. Jahrestagung der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48(9) (2010): A138.
- [6] Hendig, D., Brock, A., **Roch, C.**, Szliska, C., Götting, C., Kleesiek, K., First insights into the pathomechanisms of extracellular matrix calcification in Pseudoxanthoma Elasticum, 7. Jahrestagung der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48(9) (2010): A127.
- [7] Hendig, D., **Roch, C.**, Potthast, A., Müller, B., Kuhn, J., Prante, C., Götting, C., Kleesiek, K., Role of human xylosyltransferases in fibrotic extracellular remodelling, Hj.-Staudinger-Symposium der Deutsche Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Bad Staffelstein, Deutschland (2010). Abstractsammlung.
- [8] Prante, C., Müller, B., **Roch, C.**, Carrera, J.C., Götting, C., Kleesiek, K., Knabbe, C., Xylosyltransferasen I und II als Schlüsselenzyme der Matrixformation, FoRUM Tagung, Bochum, Deutschland (2010).
- [9] **Roch, C.**, Kleesiek, K., Knabbe, C., Hendig, D., Effects of activin A on extracellular matrix remodelling, 21th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC - WORLDLAB), Berlin, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49(S1) (2011): S854.
- [10] Hendig, D., Potthast, A., **Roch, C.**, Kleesiek, K., Knabbe, C., Knock-Down of human xylosyltransferase expression decreases collagen gene expression, 21th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC - WORLDLAB), Berlin, Deutschland. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49(S1) (2011): S836.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christina Roch
Geburtsort: Gütersloh

Schulbildung

08/1990-06/1999 Städtisches Gymnasium Gütersloh
Abitur, Gesamtnote: Gut

Studium

Seit 11/2007 Doktorarbeit im Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad
Oeynhausen, Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,
Prof. Dr. Knut Kleesiek
Thema: „Akzeptorspezifitäten und Einfluss humaner Xylosyl-
transferasen auf fibrotische und mit Diabetes mellitus assoziierte
Erkrankungen“

02/2007-11/2007 Diplomarbeit im Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad
Oeynhausen, Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,
Prof. Dr. Knut Kleesiek
Thema: „Untersuchung gewebe- und zellspezifischer Genexpres-
sion von Xylosyltransferasen in humanen und murinen Proben und
Bestimmung der Akzeptorspezifitäten von humanen Xylosyl-
transferasen“
Note: Sehr gut

10/2002-11/2007 Studium der Diplom-Biochemie an der Universität Bielefeld
Gesamtnote: Sehr gut

Berufliche Erfahrungen

07/2002-10/2002 Chemielaborantin im Bereich Qualitätskontrolle, Dr. August Wolff
GmbH & Co. KG Arzneimittel, Bielefeld

08/1999-07/2002 Ausbildung zur Chemielaborantin, Dr. August Wolff GmbH & Co.
KG Arzneimittel, Bielefeld
Gesamtnote: Sehr gut

11 Erklärung

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

Datum, Ort

Unterschrift

12 Anhang

Tabelle 12.1: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 48 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	TGF- β 1	Kontrolle	TGF- β 1
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	1902 \pm 478,6	2100 \pm 396,0 ^{ns}	1368 \pm 54,8	1742 \pm 250,2 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	2161 \pm 99,3	2199 \pm 145,2 ^{ns}	2688 \pm 135,5	2768 \pm 154,1 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{CS}	7631 \pm 190,0	7247 \pm 504,9 ^{ns}	347,8 \pm 26,6	917,0 \pm 25,4 [*]
	Δ di-mono4S _{CS}	581,4 \pm 54,2	1090 \pm 71,2 ^{**}	223,1 \pm 70,8	348,3 \pm 59,1 ^{**}
	Δ di-mono6S _{CS}	162,8 \pm 21,5	269,7 \pm 21,5 ^{**}	7469 \pm 119,8	7173 \pm 212,2 [*]
	Σ Δ di-CS _{ges}	10525 \pm 297,8	10806 \pm 667,2 ^{ns}	10827 \pm 222,8	11081 \pm 408,8 ^{ns}
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	2637 \pm 927,8	3714 \pm 1259 ^{ns}	3178 \pm 962,5	5488 \pm 419,0 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	2178 \pm 200,7	2278 \pm 283,7 ^{ns}	2608 \pm 135,6	2806 \pm 159,4 [*]
	Δ di-mono2S _{CS}	7250 \pm 176,0	6740 \pm 590,1 ^{ns}	2877 \pm 79,7	3988 \pm 103,2 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	3011 \pm 144,6	3902 \pm 83,0 ^{**}	265,1 \pm 31,2	423,5 \pm 35,7 ^{**}
	Δ di-mono6S _{CS}	209,9 \pm 19,7	255,2 \pm 18,4 ^{**}	6850 \pm 753,8	6407 \pm 356,8 ^{**}
	Σ Δ di-CS _{ges}	5399 \pm 341,9	6434 \pm 355,7 ^{ns}	12351 \pm 555,4	13668 \pm 448,8 ^{**}
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	8320 \pm 875,0	9638 \pm 617,3 [*]	10946 \pm 1654	13199 \pm 2209 [*]
	Δ di-monoN0S _{HS}	187,5 \pm 20,9	272,3 \pm 13,0 ^{**}	142,5 \pm 16,9	230,2 \pm 11,9 ^{**}
	Δ di-mono6S _{HS}	194,3 \pm 47,9	224,8 \pm 20,1 ^{ns}	126,4 \pm 22,9	129,6 \pm 10,4 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	169,1 \pm 18,0	182,6 \pm 17,4 ^{ns}	179,9 \pm 12,4	191,9 \pm 9,7 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{HS}	139,8 \pm 10,5	140,3 \pm 6,0 ^{ns}	156,4 \pm 7,6	150,4 \pm 9,9 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	8999 \pm 942,9	10450 \pm 626,5 [*]	11551 \pm 1633	13901 \pm 2208 [*]
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	9117 \pm 368,0	9983 \pm 206,5 ^{**}	8994 \pm 802,4	11666 \pm 1180 ^{**}
	Δ di-monoN0S _{HS}	241,4 \pm 16,0	304,2 \pm 22,1 ^{**}	256,3 \pm 18,6	329,2 \pm 23,1 ^{**}
	Δ di-mono6S _{HS}	215,2 \pm 19,3	223,3 \pm 21,2 ^{ns}	131,3 \pm 25,0	150,2 \pm 25,7 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	181,8 \pm 4,8	189,8 \pm 10,5 ^{ns}	204,4 \pm 15,6	202,2 \pm 12,3 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{HS}	138,7 \pm 11,5	138,6 \pm 9,4 ^{ns}	149,8 \pm 10,6	157,3 \pm 15,4 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	9894 \pm 359,3	10839 \pm 221,6 ^{**}	9736 \pm 812,1	12505 \pm 1154 ^{**}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.2: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	TGF- β 1	Kontrolle	TGF- β 1
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	2455 \pm 91,2	2625 \pm 38,1 *	1350 \pm 134,4	1634 \pm 49,2 **
	Δ di-0S _{CS}	382,3 \pm 94,6	354,1 \pm 51,8 ^{ns}	233,7 \pm 13,2	351,8 \pm 63,7 **
	Δ di-mono4S _{CS}	487,9 \pm 26,8	848,1 \pm 89,6 **	210,9 \pm 13,2	1038 \pm 62,0 **
	Δ di-mono6S _{CS}	272,1 \pm 97,3	401,4 \pm 95,4 *	275,1 \pm 84,8	571,6 \pm 51,6 **
	Δ di-di2,4S _{CS}	58,8 \pm 19,3	57,9 \pm 9,1 ^{ns}	26,2 \pm 5,4	52,1 \pm 6,4 **
	Σ Δ di-CS _{ges}	1201 \pm 170,1	1661 \pm 181,1 **	745,9 \pm 101,4	2013 \pm 167,1 **
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	2819 \pm 54,8	3159 \pm 91,3 **	1737 \pm 20,5	2097 \pm 8,8 **
	Δ di-0S _{CS}	526,9 \pm 33,9	490,1 \pm 40,5 ^{ns}	418,9 \pm 43,3	478,2 \pm 23,4 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	2529 \pm 112,9	2775 \pm 132,8 *	1677 \pm 51,8	1957 \pm 11,0 **
	Δ di-mono6S _{CS}	506,1 \pm 112,1	968,7 \pm 69,3 **	521,5 \pm 79,8	1171 \pm 36,5 **
	Δ di-di2,4S _{CS}	106,1 \pm 12,7	123,8 \pm 15,4 *	110,6 \pm 11,9	142,3 \pm 8,5 **
	Σ Δ di-CS _{ges}	3669 \pm 227,3	4357 \pm 216,4 **	2740 \pm 129,8	3743 \pm 47,4 **
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	3210 \pm 254,6	3793 \pm 287,7 **	2634 \pm 42,0	2881 \pm 31,3 **
	Δ di-monoN0S _{HS}	215,9 \pm 7,9	305,0 \pm 23,4 **	78,3 \pm 1,8	330,8 \pm 5,2 **
	Δ di-mono2S _{HS}	66,5 \pm 14,3	160,0 \pm 52,1 **	34,9 \pm 4,0	80,3 \pm 19,3 *
	Δ di-mono6S _{HS}	85,5 \pm 5,1	95,1 \pm 3,7 ^{ns}	43,3 \pm 4,5	74,7 \pm 11,6 **
	Σ Δ di-HS _{ges}	3599 \pm 235,7	4367 \pm 269,6 **	2799 \pm 28,3	3385 \pm 46,2 **
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	3340 \pm 62,7	3006 \pm 139,5 **	2063 \pm 171,8	1761 \pm 138,1 *
	Δ di-monoN0S _{HS}	244,8 \pm 19,8	303,4 \pm 7,7 **	104,1 \pm 6,5	177,9 \pm 21,5 **
	Δ di-mono2S _{HS}	98,7 \pm 26,1	183,9 \pm 23,2 **	22,5 \pm 3,3	27,9 \pm 8,5 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	65,3 \pm 3,9	87,6 \pm 10,8 **	20,5 \pm 5,0	17,8 \pm 4,2 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	3749 \pm 108,2	3569 \pm 170,5 ^{ns}	2218 \pm 189,8	1984 \pm 164,8 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.3: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 48 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	TGF- β 1	Kontrolle	TGF- β 1
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	6900±1151	7360±743,9 ^{ns}	1232±307,1	3382±224,5 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	3249±159,2	3260±170,2 ^{ns}	1808±730,2	2137±74,7 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	4090±112,9	5657±178,9 ^{**}	1531±897,5	2972±759,5 ^{**}
	Δ di-mono6S _{CS}	2618±75,7	2926±63,9 ^{**}	529,8±265,5	722,3±68,2 ^{ns}
	Σ Δ di-CS _{ges}	9957±319,4	11844±344,9 ^{**}	3508±2059	5831±851,4 ^{ns}
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	7382±1559	11408±510,9 ^{**}	3825±245,9	5280±476,8 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	3445±192,8	3500±89,0 ^{ns}	1762±469,6	1687±316,5 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	5085±114,1	6217±168,8 ^{**}	2313±728,6	2885±770,1 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	2942±76,5	1839±136,7 ^{**}	541,4±181,2	591,8±193,4 ^{ns}
	Σ Δ di-CS _{ges}	11472±199,6	11556±319,7	5493±202,1	5163±1269 ^{ns}
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	506,0±65,5	345,6±35,7 [*]	5565±257,6	5763±185,9 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	40,1±6,0	56,6±11,7 ^{ns}	326,2±38,7	332,3±46,2 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	47,0±7,3	26,4±13,1 ^{ns}	nd	nd
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	161,3±22,3	181,9±22,5 ^{ns}
	Δ di-di2,6S _{HS}	81,9±3,2	77,2±12,5 ^{ns}	nd	nd
Σ Δ di-HS _{ges}	675,0±93,9	496,0±44,3 [*]	6053±285,5	6295±163,8 ^{ns}	
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	360,7±95,0	332,1±64,3 ^{ns}	5833±135,6	5880±329,3 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	68,0±12,2	50,4±7,9 ^{ns}	350,6±34,8	319,9±35,3 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	16,2±1,2	17,0±2,3 ^{ns}	nd	nd
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	180,3±23,1	183,3±18,0 ^{ns}
	Δ di-di2,6S _{HS}	85,8±11,3	82,4±4,7 ^{ns}	nd	nd
Σ Δ di-HS _{ges}	540,9±117,3	490,4±63,2 ^{ns}	6364±120,6	6383±339,1 ^{ns}	

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.4: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 5 ng/mL TGF- β 1 über 96 h im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	TGF- β 1	Kontrolle	TGF- β 1
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	373,7±92,4	346,8±147,5 ^{ns}	616,3±226,5	2154±971,6 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	890,5±351,2	1055±485,8 ^{ns}	3106±111,4	3325±106,1 [*]
	Δ di-mono4S _{CS}	2646±193,5	2720±207,6 ^{ns}	3951±67,2	4625±67,7 ^{**}
	Δ di-mono6S _{CS}	574,4±119,2	820,4±168,2 [*]	1076±107,8	1618±59,0 ^{**}
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	250,9±48,7	227,7±87,4 ^{ns}	361,8±45,4	454,2±26,6 [*]
	Σ Δ di-CS _{ges}	4318±434,9	5173±503,1 [*]	8486±212,2	10121±326,1 ^{**}
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	441,2±221,3	705,7±362,1 ^{ns}	3867±628,0	3563±965,1 ^{ns}
	Δ di-0S _{CS}	648,9±135,6	1004±411,1 ^{ns}	3111±62,2	3088±165,9 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	2462±144,7	2867±51,2 ^{**}	4062±150,9	4361±97,3 ^{**}
	Δ di-mono6S _{CS}	677,8±50,7	927,2±78,9 ^{**}	805±61,5	1355±131,5 ^{**}
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	120,9±10,9	151,1±13,5 ^{**}	343,6±48,0	414,0±19,1 [*]
	Σ Δ di-CS _{ges}	3946±195,1	4950±438,5 ^{**}	8449±444,3	9218±332,7 ^{**}
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	1632±197,4	1252±178,9 ^{ns}	1129±233,2	947,8±89,2 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	161,9±20,8	189±27,2 ^{ns}	141,3±11,6	169,8±8,2 [*]
	Δ di-mono2S _{HS}	31,4±4,4	32,5±8,8 ^{ns}	32,1±7,8	27,3±3,1 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	37,4±5,6	28,4±4,0 [*]	nd	nd
	Δ di-di2,6S _{HS}	nd	nd	46,3±6,0	49,6±7,5 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	1868±184,2	1510±190,1 ^{ns}	1350±251,5	1222±83,9 ^{ns}
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	1538±322,1	1114±274,8 ^{ns}	642,4±103,9	563,2±20,1 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	101,1±23,6	122,3±12,9 ^{ns}	145,6±8,0	158,4±23,2 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	45,5±4,7	37,5±14,4 ^{ns}	21,4±4,5	23,3±2,5 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	21,9±3,6	10,9±2,1 ^{**}	nd	nd
	Δ di-di2,6S _{HS}	nd	nd	26,0±7,1	29,7±4,4 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	1706±307,3	1285±277,8 ^{ns}	836,6±98,2	782,4±33,3 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.5: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 50 ng/mL Activin A im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	Activin A	Kontrolle	Activin A
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	2758±27,6	2862±72,7 *	1555±201,7	2042±429,1 *
	Δ di-0S _{CS}	530,5±154,8	513,4±71,1 ^{ns}	72,5±6,7	40,3±9,9 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	347±27,0	411,8±86,4 ^{ns}	20,9±1,4	20,9±4,3 **
	Δ di-mono6S _{CS}	249,6±63,6	247,3±97,5 ^{ns}	133,7±9,7	78,6±8,3 ^{ns}
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	27,5±4,7	33,6±4,3 *	nd	nd
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	115,6±15,1	39,5±10,1 *	nd	nd
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	41,5±11,2	38,6±12,8 ^{ns}	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	1510±409,6	1406±325,6 ^{ns}	1173±83,6	1117±118,7 ^{ns}
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	3106±81,3	3153±49,4 ^{ns}	3704±51,9	4217±100,8 **
	Δ di-0S _{CS}	602,2±130,1	596,6±210,1 ^{ns}	69,1±10,9	69,6±14,2 *
	Δ di-mono4S _{CS}	2734±32,0	2778±14,8 ^{ns}	377,2±15,2	401,5±28,2 **
	Δ di-mono6S _{CS}	365,3±71,3	424,1±13,4 ^{ns}	184,2±20,5	161,5±20,6 *
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	117,7±4,7	128,1±5,8 *	nd	nd
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	260,8±79,0	258,4±32,1 ^{ns}	nd	nd
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	92,64±11,8	86,0±2,5 ^{ns}	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	4208±292,7	4271±243,2 ^{ns}	2963±112,5	4010±254,6 **
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	5068±273,7	2654±668,8 **	3857±604,9	3705±335,4 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	83,2±5,8	115,2±14,0 **	140,6±8,8	190,4±8,5 **
	Δ di-mono2S _{HS}	51,8±22,3	46,6±15,3 ^{ns}	nd	nd
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	45,86±3,0	48,42±4,1 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	5203±275,0	2808±690,3 **	4182±565,7	3943±328,9 ^{ns}
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	3954±326,2	3860±616,9 ^{ns}	7108±415,0	9149±1324 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	109,8±29,1	111,6±21,0 ^{ns}	229,9±25,5	295,5±15,2 **
	Δ di-mono2S _{HS}	48,9±3,2	41,4±5,0 *	nd	nd
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	54,1±6,2	58,7±3,7 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	4113±351,6	4013±642,4 ^{ns}	7705±511,4	9498±1326 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.6: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach Zugabe von 50 ng/mL Activin A im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		Kontrolle	Activin A	Kontrolle	Activin A
CS (2D)	Δ di-0S _{HA}	1018±378,4	366,6±105,0 **	955,0±71,0	1213±137,8 **
	Δ di-0S _{CS}	1258±142,8	1081±136,1 ^{ns}	1337±56,5	1386±50,5 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1892±94,3	1853±17,0 ^{ns}	1782±65,8	1826±18,8 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	865,2±57,6	864±73,8 ^{ns}	850,3±18,2	965,6±66,2 **
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	39,5±17,0	42,7±8,6 ^{ns}	72,9±8,6	79,5±9,6 ^{ns}
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	nd	nd	85,6±17,8	92,2±16,6 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	4066±203,6	3845±90,8 ^{ns}	4128±118,6	4349±53,6 **
CS (3D)	Δ di-0S _{HA}	463,6±55,0	1282±165,2 *	1503±137,2	1001±73,7 *
	Δ di-0S _{CS}	1167±50,2	1340±34,4 **	1260±88,7	1205±4,9 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1919±35,9	1957±27,1 ^{ns}	1739±55,9	1751±13,5 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	921,5±47,5	951,7±51,2 ^{ns}	937,8±36,6	1114±23,7 **
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	55,7±6,5	61,2±12,6 ^{ns}	64,7±5,8	90,7±10,5 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	nd	nd	131,9±16,9	114,0±17,8 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	4066±132,9	4310±75,4 **	4118±166,3	4275±39,8 *
HS (2D)	Δ di-0S _{HS}	960,6±178,5	892,6±166,7 ^{ns}	533,8±94,4	516,0±152,2 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	200,5±12,0	102,5±6,6 *	93,2±7,4	103,9±5,0 *
	Δ di-mono2S _{HS}	19,4±3,0	12,1±2,0 **	75,4±19,9	73,1±37,6 ^{ns}
	Δ di-di2,6S _{HS}	25,1±4,6	22,1±3,2 ^{ns}	38,9±7,0	48,4±10,3 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	1163±115,3	1031±162,8 ^{ns}	741,3±101,0	741,4±180,5 ^{ns}
HS (3D)	Δ di-0S _{HS}	861,1±89,5	521,3±55,5 **	600,6±52,5	572,8±81,9 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	137,5±16,8	148,4±19,4 ^{ns}	146,7±17,4	110,0±8,3 *
	Δ di-mono2S _{HS}	21,8±2,7	14,2±2,5 **	82,8±3,5	87,3±15,2 ^{ns}
	Δ di-di2,6S _{HS}	15,9±2,8	14,5±3,0 ^{ns}	48,6±7,3	34,3±10,5 *
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	995,2±110,4	698,3±40,8 **	872,1±40,3	863,2±163,2 ^{ns}

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je drei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.7: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol/]	
		siNK	siXT-I	siNK	siXT-I
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	4784±136,0	4604±20,0 ^{ns}	2443±24,5	2332±92,0 [*]
	Δ di-0S _{CS}	793,3±93,5	1438±174,1 ^{**}	653,4±31,5	639,5±74,0 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1388±12,7	1175±77,6 ^{**}	499,7±60,3	526,4±37,6 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	625,5±32,9	939,5±311,8 ^{ns}	94,0±39,3	91,8±11,1 ^{ns}
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	nd	nd	52,8±12,6	53,8±5,3 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	201,5±51,5	352,2±133,4 ^{ns}	nd	nd
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	120,3±10,6	97,6±11,1 [*]	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	3128±133,5	4002±678,2 ^{ns}	1300±113,3	1312±111,9 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HA}	4975±115,6	5028±131,1 ^{ns}	3018±225,7	2601±37,0 [*]
	Δ di-0S _{CS}	1182±172,2	979,3±169,8 ^{ns}	603,4±56,3	682,9±40,9 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1465±9,0	1681±78,3 ^{**}	919,5±87,7	796,9±6,1 [*]
	Δ di-mono6S _{CS}	652,2±40,1	835,7±144,7 [*]	321,2±134,4	137,7±18,4 [*]
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	nd	nd	71,7±4,4	66,4±7,9 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	188,1±8,0	343,5±75,5 ^{**}	nd	nd
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	165,0±19,4	126,5±15,4 [*]	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	3638±160,4	3966±133,5 [*]	1916±236,8	1684±67,8 ^{ns}
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	5652±624,9	6571±808,9 ^{ns}	3782±322,3	4102±238,7 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	339,0±7,3	256,2±14,1 ^{**}	113,4±9,3	135,1±10,6 [*]
	Δ di-mono2S _{HS}	148,8±5,6	124,4±19,5 [*]	83,6±5,6	71,3±8,1 [*]
	Δ di-mono6S _{HS}	140,2±16,1	120,7±7,2 ^{**}	81,8±6,1	85,3±7,7 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	6280±782,2	7072±1050 ^{ns}	3979±334,9	4393±236,2 [*]
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HS}	5414±287,8	6497±88,0 ^{**}	4108±189,0	4385±152,9 [*]
	Δ di-monoN0S _{HS}	346,0±21,7	390,8±15,6 [*]	211,2±3,7	173,8±4,3 ^{**}
	Δ di-mono2S _{HS}	95,1±14,5	131,0±9,4 ^{**}	84,0±11,6	73,6±10,5 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	104,1±2,4	129,5±3,9 ^{**}	94,7±6,4	96,6±7,3 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	5959±380,2	7148±121,8 ^{**}	4498±209,7	4729±162,8 ^{ns}

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.8: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		siNK	siXT-I	siNK	siXT-I
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	59,2±13,1	77,8±19,5 ^{ns}	1944±4,4	1403±64,4 ^{**}
	Δ di-0S _{CS}	681,7±151,4	708,8±153,4 ^{ns}	1360±223,3	1582±36,4 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1412±33,4	1389±32,5 ^{ns}	1968±72,0	2036±43,0 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	677,0±16,3	544,6±41,9 ^{**}	952,6±150,7	755,2±43,7 [*]
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	32,5±10,0	29,5±6,2 ^{ns}	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	2803±245,9	2672±300,5 ^{ns}	4280±160,0	4374±115,4 ^{ns}
+ TGF-β1	Δ di-0S _{HA}	107,6±4,6	61,8±12,2 ^{**}	2306±98,7	2062±40,1 [*]
	Δ di-0S _{CS}	515,0±55,4	344,4±58,6 ^{**}	1541±76,2	1508±77,2 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1451±14,7	1445±9,8 ^{ns}	2049±126,6	1994±75,7 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	848,7±30,9	704,3±15,3 ^{**}	770,4±131,2	793,2±137,6 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	29,7±3,9	25,7±1,5 ^{ns}	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	2844±60,3	2519±70,7 ^{**}	4360±326,9	4295±201,7 ^{ns}
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	135,6±29,1	215,6±31,7 ^{**}	1046±454,1	421,6±43,3 ^{**}
	Δ di-monoN0S _{HS}	50,8±26,0	53,7±23,6 ^{ns}	44,1±8,0	60,3±2,5 ^{**}
	Δ di-mono2S _{HS}	22,3±1,4	19,5±1,4 ^{**}	46,9±4,5	47,9±6,3 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	8,7±1,5	10,4±0,8 [*]	20,0±0,4	20,9±0,7 [*]
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	217,4±56,4	299,2±54,7 [*]	1157±574,2	550,7±54,4 [*]
+ TGF-β1	Δ di-0S _{HS}	213,7±7,9	192,3±81,1 ^{ns}	397,5±50,0	500,8±190,3 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	43,2±6,3	27,1±6,3 ^{**}	59,4±11,1	56,0±13,0 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	32,7±11,4	19,7±4,4 ^{ns}	47,8±5,7	42,0±2,6 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	9,4±0,9	10,6±1,5 ^{ns}	20,2±2,1	21,8±0,9 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	299,0±12,8	249,6±92,4 ^{ns}	524,9±77,2	620,5±231,6 ^{ns}

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.9: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		siNK	siXT-II	siNK	siXT-II
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	5191±158,8	5651±159,6 **	3003±90,5	2778±75,2 **
	Δ di-0S _{CS}	268,9±7,9	269,8±3,1 ^{ns}	528,9±80,2	399,8±52,4 *
	Δ di-mono4S _{CS}	986,5±28,9	1105±137,0 ^{ns}	595,2±62,1	591,6±142,6 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	434±21,1	437,2±69,1 ^{ns}	707,7±43,4	679,4±65,5 ^{ns}
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	nd	nd	101,9±3,3	106,7±10,3 ^{ns}
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	189,7±16,9	180,0±21,6 ^{ns}	nd	nd
	Σ Δ di-CS _{ges}	2184±62,0	2456±222,7 ^{ns}	1934±176,6	1777±164,3 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HA}	5700±26,9	5738±197,7 ^{ns}	3273±26,7	2875±42,3 **
	Δ di-0S _{CS}	285,7±22,8	251,0±8,2 *	596,2±97,8	463,4±50,5 *
	Δ di-mono4S _{CS}	1223±20,0	1388±144,6 ^{ns}	1129±11,9	1095±17,6 *
	Δ di-mono6S _{CS}	475,7±17,4	639,4±210,7 ^{ns}	910,2±116,0	736,9±27,9 **
	Δ di-di(2,4)S _{CS}	nd	nd	149,2±8,8	135,1±4,9 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	199,4±6,4	178,2±14,5 *	nd	nd
	Σ Δ di-CS _{ges}	1992±21,5	14,46±367,0 ^{ns}	2785±218,2	2431±72,7 **
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	8004±297,2	7180±61,5 **	3985±277,2	3571±632,8 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	250,5±5,9	283,2±13,5 **	148,3±4,3	175,4±37,1 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	154,1±3,9	149,2±50,3 ^{ns}	81,6±18,8	96,9±3,8 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	83,8±4,6	109,1±13,3 **	101,6±11,8	120,4±19,8 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	40,0±3,0	55,5±1,7 *	nd	nd
	Σ Δ di-HS _{ges}	8542±372,0	7777±174,0 **	4311±275,3	3927±693,5 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HS}	6692±526,4	6370±329,9 ^{ns}	3465±817,2	4160±256,0 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	383,5±19,2	323,5±5,1 **	244,7±4,9	213,2±7,1 **
	Δ di-mono2S _{HS}	173,5±11,1	131,3±33,0 *	149,7±57,9	165,7±14,9 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{HS}	118,5±6,9	108,4±5,0 *	131,0±19,4	137,0±6,8 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	58,6±5,4	57,9±3,7 ^{ns}	nd	nd
	Σ Δ di-HS _{ges}	7426±638,3	6992±473,2 ^{ns}	3990±889,6	4676±278,0 ^{ns}

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.10: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-II-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		siNK	siXT-II	siNK	siXT-II
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	275,7±13,9	94,32±19,4 **	1137±380,9	1453±477,4 ^{ns}
	Δ di-0S _{CS}	2043±58,7	1456±166,4 *	2080±55,1	2086±109,1 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	2715±32,3	2644±16,7 **	2425±32,3	2474±60,4 ^{ns}
	Δ di-mono6S _{CS}	692,6±30,6	754,8±56,0 *	723,6±67,1	677,6±31,5 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	nd	nd	35,9±2,7	28,2±5,7 *
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	115,8±23,0	87,9±11,5 *	83,5±9,6	67,9±13,7 ^{ns}
	Σ Δ di-CS _{ges}	732,6±142,9	561,9±38,8 **	5348±117,7	5333±136,0 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HA}	223,2±109,5	98,9±7,8 **	3101±155,2	1734±761,5 **
	Δ di-0S _{CS}	1261±416,4	823,4±37,1 ^{ns}	2203±21,5	2012±85,0 **
	Δ di-mono4S _{CS}	2767±74,7	2890±21,2 **	2695±18,7	2618±33,5 **
	Δ di-mono6S _{CS}	948,6±30,0	851,3±47,1 **	877,2±22,9	819,0±65,4 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	nd	nd	83,5±4,9	32,0±4,4 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	116,7±29,9	76,3±3,2 *	190,8±17,0	70,3±10,8 **
	Σ Δ di-CS _{ges}	481,5±63,5	451,7±5,6 *	6049±71,4	5551±103,5 **
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	415,5±11,3	567,5±32,4 **	473,5±63,8	278,0±95,7 *
	Δ di-monoN0S _{HS}	153,8±12,0	84,3±24,2 **	54,0±5,6	62,9±11,8 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	32,2±2,4	46,0±6,4 **	54,6±4,6	45,3±12,1 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	20,9±0,6	15,4±2,4 **	15,1±2,1	16,2±1,8 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	622,4±22,6	713,2±48,5 **	556,7±87,2	402,4±94,9 *
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HS}	990,5±211,9	517,6±48,4 **	197,3±1,6	308,8±108,3 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	88,2±10,1	70,2±2,3 **	82,3±2,9	72,9±13,8 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	55,8±16,6	42,2±9,8 ^{ns}	33,2±3,0	49,8±13,2 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	16,6±0,6	13,7±0,9 **	18,4±1,3	17,5±1,4 ^{ns}
	Σ Δ di-HS _{ges}	1151,0±237,4	643,7±56,7 **	332,2±3,1	449,0±106,0 ^{ns}

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24 h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.11: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im Lysat von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		siNK	siXT-I/II	siNK	siXT-I/II
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	4784±136,0	4580±12,2 **	3654±163,0	3333±283,4 ^{ns}
	Δ di-0S _{CS}	793,3±93,5	831,9±128,9 ^{ns}	389,2±35,7	436,6±57,7 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1388±12,7	1238±4,2 **	377,1±18,7	430,6±8,9 **
	Δ di-mono6S _{CS}	625,5±32,9	506,8±31,7 **	337,9±20,9	519,1±13,3 **
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	201,5±51,5	283,0±27,8 *	83,4±2,8	96,4±5,5 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	120,3±10,6	134,2±19,9 ^{ns}	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	3128±133,5	2994±113,0 ^{ns}	1173±84,8	1483±47,2 **
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HA}	4975±115,6	4923±19,8 ^{ns}	4710±629,0	4261±127,9 ^{ns}
	Δ di-0S _{CS}	1182±172,2	672,1±64,2 **	424,0±21,2	466,5±66,2 ^{ns}
	Δ di-mono4S _{CS}	1465±9,0	1552±42,2 **	839,5±121,2	1045±111,0 *
	Δ di-mono6S _{CS}	652,2±40,1	909,2±237,0 ^{ns}	602,9±25,8	509,6±7,6 **
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	188,1±8,0	207,8±37,8 ^{ns}	91,6±5,1	118,2±6,5 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	165,0±19,4	115,5±31,5 *	nd	nd
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	3638±160,4	3457±329,8 ^{ns}	1907±55,9	2425±438,1 *
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	5652±624,9	6047,0±73,1 ^{ns}	1751±164,5	1555±533,1 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	339,0±7,3	311,7±3,7 **	109,9±3,0	124,3±1,9 **
	Δ di-mono2S _{HS}	148,8±5,6	96,0±8,5 **	68,5±6,4	85,0±7,3 **
	Δ di-mono6S _{HS}	140,2±16,1	112,4±4,4 **	35,2±2,7	41,0±3,9 *
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	28,5±4,0	35,6±1,0 *
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	6280±782,2	6567,0±89,1 ^{ns}	1993±158,1	1841±538,4 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HS}	5414±287,8	5936,0±589,7 ^{ns}	1957±210,3	2160±397,3 ^{ns}
	Δ di-monoN0S _{HS}	346,0±21,7	387,7±19,3 *	209,2±18,1	227,7±9,2 ^{ns}
	Δ di-mono2S _{HS}	95,1±14,5	121,9±5,1 **	110,6±3,5	9,3±1,5 **
	Δ di-mono6S _{HS}	104,1±2,4	105,6±7,9 ^{ns}	56,6±1,0	60,2±11,9 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	nd	nd	32,1±5,1	33,9±3,0 ^{ns}
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	5959±380,2	6551,0±738,7 ^{ns}	2375±206,1	2602±419,7 ^{ns}

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

Tabelle 12.12: Stoffmengen der CS- und HS-Disaccharide im ZKÜ von dermalen Fibroblasten nach siRNA-vermittelter Herabregulation der XT-I- und XT-II-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen nach 96 h.

	Δ -Disaccharid	F42A [nmol]		M56D [nmol]	
		siNK	siXT-I/II	siNK	siXT-I/II
unbehandelt	Δ di-0S _{HA}	59,2±13,1	33,2±4,0 **	1597±287,6	296,9±60,2 **
	Δ di-0S _{CS}	681,7±151,4	480,6±24,7 **	1574±56,4	1319±128,4 **
	Δ di-mono4S _{CS}	1412±33,4	1369±14,4 ^{ns}	2009±48,4	1787±158,6 **
	Δ di-mono6S _{CS}	677,0±16,3	561,2±9,0 **	783,0±53,1	722,5±143,3 ^{ns}
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	32,5±10,0	24,8±2,8 ^{ns}	50,0±3,5	21,6±1,9 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	nd	nd	87,4±19,5	47,3±10,2 **
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	2803±245,9	2436±36,0 **	4503±156,7	3898±559,6 **
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HA}	107,6±4,6	54,5±11,1 **	2430±157,2	1862±3,3 **
	Δ di-0S _{CS}	515,0±55,4	398,4±93,5 *	1564±42,7	1448±20,6 **
	Δ di-mono4S _{CS}	1451±14,7	1485±24,9 ^{ns}	2100±47,5	1926±21,0 **
	Δ di-mono6S _{CS}	848,7±30,9	675,7±45,1 **	845,8±31,1	577,0±12,9 **
	Δ di-di(2,6)S _{CS}	29,7±3,9	31,1±4,1 ^{ns}	97,0±2,7	41,7±0,1 **
	Δ di-di(4,6)S _{CS}	nd	nd	176,7±3,5	91,7±1,1 **
	$\Sigma \Delta$ di-CS _{ges}	2844±60,3	2591±209,4 *	4783±133,9	4085±124,2 **
unbehandelt	Δ di-0S _{HS}	135,6±29,1	182,0±57,6 ^{ns}	441,9±95,1	427,7±96,1 ^{ns}
	Δ di-monoNOS _{HS}	50,8±26,0	41,7±9,8 ^{ns}	70,2±3,4	50,4±6,3 **
	Δ di-mono2S _{HS}	22,3±1,4	22,7±6,6 ^{ns}	35,2±11,9	23,6±3,5 ^{ns}
	Δ di-diN6S _{HS}	8,7±1,5	8,9±1,9 ^{ns}	22,8±1,5	17,6±0,5 **
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	217,4±56,4	255,4±73,7 ^{ns}	570,1±136,3	519,3±122,1 ^{ns}
+ TGF- β 1	Δ di-0S _{HS}	213,7±7,9	88,8±23,4 **	269,1±24,2	149,2±19,6 **
	Δ di-monoNOS _{HS}	43,2±6,3	27,5±3,9 **	70,6±5,2	57,3±10,5 *
	Δ di-mono2S _{HS}	32,7±11,4	18,6±8,1 *	29,8±6,2	20,0±5,5 *
	Δ di-diN6S _{HS}	9,4±0,9	8,9±2,1 ^{ns}	22,4±1,0	18,3±1,0 *
	$\Sigma \Delta$ di-HS _{ges}	299,0±12,8	143,8±35,9 **	391,9±39,7	247,8±72,7 *

Die Induktion mit 5 ng/mL TGF- β 1 erfolgte 24h nach siRNA-Zugabe. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für je zwei biologische Replikate in Doppelbestimmung (nd = nicht detektierbar; ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).