

**Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der humanen
Xylosyltransferase-Isoformen und Generierung eines
stabilen CRISPR/Cas9-vermittelten *XYLT1* knockouts in
Dermalfibroblasten**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

Vorgelegt von

Bastian Fischer

aus Bielefeld

Bielefeld/Bad Oeynhausen

Mai 2019

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von **Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe** am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum in Bad Oeynhausen in der Zeit von Februar 2016 bis Mai 2019.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe
2. Gutachter: apl. Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen und mich unterstützten.

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit am Herz- und Diabeteszentrum durchzuführen. Ich danke ihm ebenfalls für die interessante Themenstellung und das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Torben Lübke bedanke ich mich dafür, dass er mein Zweitgutachten übernahm und mich mit Wissen und Ideen unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Isabel Faust für die vielen hilfreichen Gespräche und die stetige Unterstützung während meiner gesamten Zeit am Herz- und Diabeteszentrum.

Ein großer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Doris Hendig, die mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich auf diesem Wege auch bei Herrn Dr. rer. nat. Joachim Kuhn bedanken, der mich in die Methodik der Massenspektrometrie eingearbeitet hat.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern aus dem Labor 11, die stets für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mit denen viele gute Gespräche entstanden sind. Dabei möchte ich vor allem Christoph Lichtenberg, Janina Tiemann und Thanh-Diep Ly für ihre stetige Unterstützung und Kollegialität danken.

Vielen Dank auch an meine Freundin und meine Familie, die mir vor allem während der schriftlichen Erstellung dieser Arbeit stets zur Seite standen und mich unterstützten, wo sie nur konnten.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Extrazelluläre Matrix	3
2.1.1 Proteoglykane	3
2.1.2 <i>Transforming growth factor beta 1</i> (TGF- β 1)	5
2.1.3 Xylosyltransferasen	6
2.1.4 ECM-assoziierte Erkrankungen.....	8
2.1.4.1 Dermale Wundheilung und Fibrosen	8
2.1.4.2 Skeletale Dysplasien.....	9
2.2 Genome-editing	11
2.2.1 Entstehung und Arten von Mutationen.....	11
2.2.1.1 Doppelstrangbrüche und deren Reparatur.....	11
2.2.1.2 Genome-editing: Gezielte Generierung eines Doppelstrangbruches	12
2.2.2 Das natürliche CRISPR/Cas9 System	13
2.2.2.1 CRISPR/Cas9 basiertes genome-editing	15
2.3 Massenspektrometrie	16
2.4 Zielsetzung der Arbeit	17
3. Ergebnisse	20
3.1 Potenzial von UDP und verschiedenen GAG zur Inhibition der XT-Aktivität	20
3.1.1 Einfluss einer UDP-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF	20
3.1.1.1 Analyse der XT-Aktivität.....	21
3.1.1.2 Analyse der Genexpression.....	21
3.1.1.3 Analyse der Proliferation und Viabilität.....	23
3.1.1.4 Einfluss eines siRNA-vermittelten UXS1 knockdowns auf die XT-Aktivität.....	23
3.1.2 Einfluss einer GAG-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF	25
3.1.2.1 Analyse der XT-Aktivität.....	25
3.1.2.2 Analyse der Genexpression.....	25
3.2 Auswirkungen einer XT-Defizienz auf die ECM-Homöostase und Viabilität von HEK293-Zellen	28
3.2.1 siRNA-vermittelter <i>XYLT2 knockdown</i> in HEK293-Zellen	28
3.2.1.1 Analyse der Zellmorphologie	29
3.2.1.2 Analyse der Genexpression und XT-Aktivität.....	30
3.2.2 CRISPR/Cas9 vermittelter <i>XYLT2 knockout</i> in HEK293-Zellen	30

3.2.2.1	Transfektion und Zellvereinzelung.....	31
3.2.2.2	Charakterisierung der Mutationen in den generierten Zellklonen	32
3.3	Entwicklung eines XT-I spezifischen UPLC MS/MS XT-Aktivitätstests	35
3.3.1	Identifizierung eines XT-I spezifischen Akzeptorpeptids	36
3.3.2	Validierung des XT-I spezifischen MS XT-Aktivitätstests unter Verwendung des Akzeptorpeptids KE-74303	38
3.3.3	Methodenvergleich zur Bestimmung der XT-I Aktivität.....	40
3.4	Charakterisierung der ECM-Homöostase und Myofibroblasten-Differenzierung dermalen Fibroblasten eines Patienten mit einer <i>XYLT1</i>-Defizienz assoziierten skeletalen Dysplasie	41
3.4.1	Vergleich der basalen Genexpressionen und XT-Aktivitäten	41
3.4.2	Vergleich der Genexpressionen und XT-Aktivitäten nach TGF- β 1 vermittelter Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung	43
3.4.3	Quantifizierung der α -SMA Proteinexpression.....	44
3.4.4	Quantifizierung der TGF- β 1 Proteinexpression	46
3.4.5	Wundheilungs- und Kontraktionsassay.....	46
3.4.6	Vergleich der zellulären Seneszenz.....	48
3.5	Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten <i>XYLT1</i> knockouts in neonatalen NHDF	50
3.5.1	Transfektion und FACS-Isolierung der neonatalen NHDF.....	51
3.5.2	Zellvereinzelung und Mutationsnachweis transfizierter NHDF	53
3.5.3	Erste Charakterisierung der neonatalen NHDF CRISPR- <i>XYLT1</i> knockout Zellen	55
3.5.3.1	Vergleich der Genexpression und extrazellulären XT-Aktivität.....	55
3.5.3.2	Vergleichende Quantifizierung der TGF- β 1 Proteinexpressionen im ZKÜ.....	56
4.	Diskussion	58
4.1	Potenzial von UDP und verschiedenen GAG zur Inhibition der XT-Aktivität.....	58
4.1.1	Einfluss einer UDP-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiertes Moleküle kultivierter NHDF	58
4.1.2	Einfluss einer GAG-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiertes Moleküle kultivierter NHDF	61
4.2	Auswirkungen einer XT-Defizienz auf die ECM-Homöostase und Viabilität von HEK293-Zellen.....	63
4.2.1	siRNA-vermittelter <i>XYLT2</i> knockdown in HEK293-Zellen	63
4.2.2	CRISPR/Cas9 vermittelter <i>XYLT2</i> knockout in HEK293-Zellen	65
4.3	Entwicklung eines XT-I spezifischen UPLC MS/MS XT-Aktivitätstests	67
4.3.1	Identifizierung eines XT-I spezifischen Akzeptorpeptids	67
4.3.2	Validierung des XT-I spezifischen MS XT-Aktivitätstests unter Verwendung des Peptids KE-74303.....	70

4.3.3 Methodenvergleich zur Bestimmung der XT-I Aktivität.....	71
4.4 Charakterisierung der ECM-Homöostase und Myofibroblasten-Differenzierung dermalen Fibroblasten eines Patienten mit einer <i>XYLT1</i>-Defizienz assoziierten skeletalen Dysplasie	72
4.4.1 Vergleich der Genexpressionen verschiedener ECM-assoziiierter Gene und der XT-Aktivitäten.....	73
4.4.2 Weiterführende Charakterisierung der Myofibroblasten-Differenzierung.....	76
4.4.3 Vergleich der zellulären Seneszenz.....	77
4.5 Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten <i>XYLT1 knockouts</i> in neonatalen NHDF	78
4.5.1 Transfektion und FACS-Isolierung der neonatalen NHDF.....	78
4.5.2 Zellvereinzlung und Mutationsnachweis transfizierter neonataler NHDF.....	80
4.5.3 Erste Charakterisierung der neonatalen NHDF CRISPR <i>XYLT1 knockout</i> Zellen	81
4.6 Ausblick.....	83
5. Methoden.....	85
5.1 Zellbiologische Methoden	85
5.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	85
5.1.1.1 Passagieren und Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen	85
5.1.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	85
5.1.1.3 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen	85
5.1.1.4 Behandlung von NHDF mit UDP und Glykosaminoglykanen	86
5.1.1.5 UDP-Xylose Assay.....	86
5.1.1.6 Induktion von Fibroblasten mit TGF- β 1	87
5.1.1.7 Detergenz-vermittelte Lyse zur Bestimmung der intrazellulären XT-Aktivität .	87
5.1.1.8 Liposomen-vermittelte siRNA Transfektion	87
5.1.1.9 Liposomen-vermittelte Plasmid-DNA Transfektion	88
5.1.1.10 Isolierung von NHDF am Durchflusszytometer	88
5.1.1.11 Zellvereinzlung von NHDF	88
5.1.1.12 Wundheilungsassay.....	89
5.1.1.13 Kontraktionsassay.....	89
5.1.1.14 Zellproliferations- und Viabilitätsassay (WST-I)	90
5.1.2 Kultivierung von <i>E.coli</i>	90
5.1.2.1 Transformation von E.coli TOP10	90
5.1.2.2 Ansetzen von E.coli TOP10 Übernachtskulturen	90
5.2 Molekularbiologische Methoden	91
5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten	91
5.2.2 Reverse Transkription.....	91

5.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Zelllysaten	91
5.2.4 Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	92
5.2.5 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ..	93
5.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	93
5.2.7 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	94
5.2.8 Reinigung von PCR-Produkten	96
5.2.9 Sanger-Sequenzierung gereinigter PCR-Produkte.....	96
5.2.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	97
5.2.11 Klonierung von <i>XYLT</i> -spezifischen gRNA-Sequenzen in den Vektor PX458	98
5.2.12 TA-Klonierung	99
5.2.13 T7-Endonuklease Assay.....	100
5.3 Proteinbiochemische Methoden.....	101
5.3.1 BCA-Assay zur Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration	101
5.3.2 Radiochemischer XT-Aktivitätstest.....	101
5.3.3 Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis von α -SMA.....	102
5.3.4 Western Blot Analyse zum quantitativen Nachweis von α -SMA	103
5.3.5 Quantitativer Seneszenz-Assay	104
5.3.6 Qualitativer Seneszenz-Assay.....	105
5.3.7 Immunassay zur Quantifizierung von aktiviertem TGF- β 1	105
5.4 Massenspektrometrische Methoden	106
5.4.1 Nachweis von XT-I spezifisch xylosylierten Peptiden.....	106
5.4.1.1 Bestimmung der Produkt-Ionen	106
5.4.1.2 Probenvorbereitung	107
5.4.1.3 Zweidimensionale online SPE-UPLC-MS/MS Methode.....	107
6. Material	109
6.1 Chemikalien und Reagenzien	109
6.2 Puffer und Lösungen	110
6.2.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden	110
6.2.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	110
6.2.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	110
6.2.4 Kommerzielle Puffer und Lösungen	111
6.3 Zelllinien	111
6.4 Zellkulturmedien und -zusätze.....	112
6.5 Bakterienstämme.....	112
6.6 Nährmedien für <i>E.coli</i>.....	112
6.7 Rekombinante Proteine	112

6.8 Enzyme und Enzympuffer	112
6.9 Antikörper.....	113
6.10 Oligonukleotide	113
6.10.1 Oligonukleotide für die quantitative <i>real-time</i> PCR.....	113
6.10.2 Oligonukleotide zur Amplifizierung CRISPR/Cas9 modifizierter Bereiche im Genom.....	114
6.11 siRNA-Sequenzen.....	114
6.12 Plasmide	115
6.13 Chromatographie- und Extraktionssäulen	115
6.14 Kommerzielle Reaktionssysteme	115
6.15 Verbrauchsmaterialien.....	115
6.16 Geräte	116
6.17 Software und Datenbanken.....	116
7. Abkürzungen	118
8. Literatur	120
9. Publikationen und Präsentationen.....	147
10. Lebenslauf	149
11. Anhang	150
11.1 Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).....	150
11.2 Synthetische Akzeptorpeptide.....	151
12. Erklärung.....	152

1. Zusammenfassung

Die humanen Xylosyltransferasen-I und -II (XT-I und XT-II) katalysieren den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Proteoglykan (PG)-Biosynthese. PG sind Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix (ECM), weshalb erhöhte XT-Expressionen mit einer verstärkten Myofibroblasten-Differenzierung und Manifestation fibrotischer Erkrankungen assoziiert sind. In allen höheren Organismen existieren zwei XT-Isoformen, die gewebespezifisch exprimiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation sollten die Folgen veränderter XT-Expressionen untersucht und dadurch die funktionelle Relevanz beider Isoformen besser charakterisiert werden.

Obwohl Fibrosen zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen weltweit zählen, gibt es bis heute keine adäquate Therapieform. Eine Inhibition der XT könnte diesbezüglich ein vielversprechender Ansatz sein, da erhöhte Aktivitäten des Enzyms in fibrotischem Gewebe nachgewiesen wurden. Da bisher kein spezifischer XT-Inhibitor identifiziert wurde, sollte im ersten Teil dieser Arbeit eruiert werden, ob das Nukleotid Uridin-Diphosphat (UDP) und die Glykosaminoglykane (GAG) Heparin und Dermatan sulfat die XT-Aktivität kultivierter normaler humaner dermaler Fibroblasten (NHDF) inhibieren. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass UDP die XT-Aktivität extrazellulär reprimiert, während intrazellulär induktive Effekte detektiert wurden. Durch weitere Analysen wurde ein hypothetischer UDP-Wirkmechanismus beschrieben, bei dem die intrazelluläre, kompensatorische XT-Induktion auf verminderte UDP-Xylose Konzentrationen zurückzuführen ist. Die beiden GAG hatten eine inhibierende Wirkung auf die intra- und extrazellulären XT-Aktivitäten. Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass GAG sich für die Entwicklung einer anti-fibrotischen Therapie durch die Inhibition der XT-Aktivität eignen könnten, wobei weitere Analysen folgen müssen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde erstmals überprüft, welchen Einfluss verminderte Expressionen beider XT-Isoformen auf immortalisierte HEK293-Zellen haben, die eine natürliche XT-I Defizienz aufweisen. In Folge eines erfolgreichen siRNA-vermittelten *XYLT2 knockdowns* wiesen die Zellen ein verändertes Genexpressionsprofil, abnorme Morphologien und erhöhte zelluläre Seneszenzen auf. Die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Generierung eines stabilen *XYLT2 knockouts* bestätigte die Vermutung, dass verminderte Expressionen beider XT-Isoformen in HEK293-Zellen nicht kompensiert werden können und zu einer verminderten Zellviabilität führen.

Für einen sensitiven, Isoform-spezifischen Nachweis der XT-I Aktivität wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*ultra performance liquid chromatography, UPLC*) Tandem Massenspektrometrie-(MS/MS) Methode entwickelt. Nach Identifizierung eines spezifisch von der XT-I xylosylierten Akzeptorpeptids konnte der Test erfolgreich validiert werden. Im Vergleich zum bisher verwendeten radiochemischen XT-Aktivitätstest zeichnet sich der UPLC MS/MS Aktivitätstest durch eine hohe Spezifität, Sensitivität und eine einfache und kosteneffiziente Durchführbarkeit aus.

Im vierten Teil dieser Arbeit wurden NHDF eines Skelettdysplasie-Patienten charakterisiert, bei dem kausative *compound* heterozygote *XYLT1* Mutationen identifiziert wurden. Diese war u.a. durch eine 3,3 Mb Deletion auf Chromosom 16 charakterisiert, wodurch weitere Gene heterozygot deletiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die XT-I Defizienz in den Patienten-Fibroblasten mit einer stark veränderten ECM-Homöostase und Myofibroblasten-Differenzierung assoziiert ist.

Durch die geringe Verfügbarkeit XT-I defizienter Fibroblasten sollten im letzten Teil dieser Arbeit neonatale NHDF mit einem CRISPR/Cas9-vermittelten stabilen *XYLT1 knockout* generiert werden, um die zuvor ermittelten Auswirkungen einer XT-I Defizienz im weiteren Verlauf verifizieren zu können. Es konnten erfolgreich Zellklone generiert werden, die im Exon 9 des *XYLT1* Gens *compound* heterozygote *frameshift*-Mutationen aufwiesen, die zur Bildung eines um 255 AS verkürzten XT-I Proteins führten. Neben verminderten *XYLT1* mRNA-Expressionsleveln wurden, unter Verwendung des in dieser Arbeit etablierten XT-I UPLC MS/MS Aktivitätstests, signifikant verminderte XT-I Enzymaktivitäten detektiert. Die generierten Zellen stellen ein optimales Modell zur weiteren Charakterisierung der XT-I, u.a. während fibrotischer Erkrankungen, dar.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertation wichtige Erkenntnisse bzgl. der Relevanz beider XT-Isoformen für die ECM-Homöostase und Zellviabilität erzielt werden. Durch die Charakterisierung der erstmals in dieser Arbeit generierten XT-I defizienten NHDF und die Anwendung des entwickelten XT-I UPLC MS/MS Aktivitätstests kann dieses Wissen zukünftig vertieft werden.

Abstract

Human xylosyltransferases-I and -II (XT-I and XT-II) catalyze the initial and rate-limiting step in proteoglycan (PG)-biosynthesis. Because PG are a major component of the extracellular matrix (ECM), elevated XT-expression is associated with the manifestation of fibrotic diseases. All higher organisms contain two isoforms, which are expressed in a tissue-specific manner. The aim of this thesis was to investigate the consequences of altered XT-expression and, thus, to characterize the relevance of both isoforms.

Although fibrosis-associated diseases are a main cause of worldwide mortality, there currently exists no appropriate therapy to heal fibrosis. Regarding this, XT-inhibition could be a promising strategy. Because there has been no suitable enzyme-inhibitor developed so far, we first evaluated whether the nucleotide uridine-diphosphate (UDP) and the glycosaminoglycans (GAG) heparin and dermatan sulfate are suitable to inhibit XT-activity in cultivated normal human dermal fibroblasts (NHDF). It has been shown for the first time, that UDP inhibits extracellular XT-activity, while inductive effects were observed intracellularly. Further analysis revealed a hypothetical effect-mechanism of UDP, whereby intracellular XT-induction was explained by compensation as a result of decreased UDP-xylose concentrations. Both GAG tested showed an inhibiting effect on intra- and extracellular XT-activity. These results provide an initial indication that GAG could be suitable for development of an anti-fibrotic therapy, whereby further studies are required to clarify these issues.

In the second part of this dissertation, we examined for the first time whether decreased expressions of both XT-isoforms have an impact on naturally XT-I deficient, immortalized HEK293-cells. A successful siRNA mediated *XYLT2* knockdown led to an altered gene expression, abnormal morphologies and elevated cellular senescence of these cells. Conduction of a stable CRISPR/Cas9 *XYLT2* knockout confirmed that HEK293-cells cannot compensate for diminished expressions of both XT-isoforms and, consequently, show reduced cell viability.

Next, an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) tandem mass spectrometry (MS/MS) method for a sensitive and isoform-specific measurement of XT-I activity was developed. After identification of a specific XT-I acceptor-peptide, the method was successfully validated. In comparison to the radiochemical XT-assay used previously, the UPLC MS/MS assay for quantification of XT-I activity is characterized by high specificity, sensitivity, and an easy and cost-effective implementation.

In the penultimate part of this thesis, NHDF of a patient suffering from skeletal dysplasia were characterized. The cells harbored causative compound heterozygous *XYLT1* mutations, *inter alia* marked by a 3.3 Mb deletion on chromosome 16, leading to heterologous mutations of further genes. It was shown for the first time, that a deficiency of XT-I, which is a myofibroblast-marker, is associated with abnormal ECM-homeostasis and myofibroblast-differentiation.

Because of the low availability of XT-I deficient fibroblasts and to verify previous results, neonatal NHDF harboring a CRISPR/Cas9-based *XYLT1* knockout were generated within the last part of this dissertation. The cell-clones obtained harbored compound heterozygous frameshift mutations within exon 9 of *XYLT1*, leading to a 255 aa shortened XT-I protein. In addition to reduced *XYLT1*-expression levels, cell-clones generated showed decreased XT-I activities, which was determined by using the UPLC MS/MS assay established within this thesis. These cells are an optimal model for the comprehensive characterization of XT-I, for instance during fibrotic diseases.

In summary, the results of this dissertation revealed important new findings concerning the relevance of both XT-isoforms for ECM-homeostasis and cell viability. An extensive characterization of the XT-I deficient neonatal NHDF generated and the standardized usage of the XT-I UPLC MS/MS activity assay developed will deepen this knowledge.

2. Einleitung

2.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) stellt ein dreidimensionales, komplexes Netzwerk dar, welches im Interzellularraum aller Gewebe vorzufinden ist. Sie sorgt für mechanische und biologische Stabilität und verleiht den Organen Elastizität, sowie Druck- und Zugfestigkeit [1]. Für die umliegenden Zellen bildet die ECM eine physikalische Stützstruktur und ermöglicht die interzelluläre Kommunikation, die bezüglich der Morphogenese, Differenzierung und Homöostase des Gewebes essentiell ist [2]. Durch die Speicherung von Wachstumsfaktoren und die Wechselwirkung mit Zelloberflächenrezeptoren hat die ECM einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion und die Regulation der Genexpression [3]. Die Zelladhäsion findet dabei über spezifische ECM-Rezeptoren statt, zu denen Integrine [4, 5] und Syndekane zählen [6]. Die Hauptkomponenten der ECM stellen Proteoglykane, Faserproteine (Kollagene, Elastine, Fibronektine), sowie lösliche Adhäsionsproteine dar [7]. Die Moleküle werden von residenten Zellen sekretiert, wobei die zelluläre und molekulare Zusammensetzung und Topologie von der Art des umliegenden Gewebes abhängt. Im Bindegewebe sind Fibroblasten der dominierende Zelltyp, wohingegen Chondrozyten und Osteoblasten primär im Knorpel- bzw. Knochengewebe vorzufinden sind [8–10]. Durch die gegenseitige Interaktion der ECM-Komponenten entsteht eine fibrilläre, dynamische Struktur, die einem streng regulierten, ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Eine Dysregulation innerhalb der Remodellierung ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs oder Fibrosen, assoziiert [11]. *Loss-of-function* Mutationen ECM-assoziiierter Moleküle stehen ebenfalls im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen [12]. Aus diesen Gründen stellen einige Moleküle der ECM interessante *targets* bei der Entwicklung neuer Therapien dar [13]. Ein besseres Verständnis über die ECM könnte demzufolge dazu beitragen, neue, zielgerichtete Therapien zur Behandlung assoziierter Erkrankungen zu entwickeln.

2.1.1 Proteoglykane

Proteoglykane (PG) sind glykosylierte, stark negativ geladene Makromoleküle, die ubiquitär auf der Zelloberfläche, in intrazellulären Kompartimenten und insbesondere innerhalb der ECM vorkommen. Durch ihren stark hydrophilen Charakter sorgen sie innerhalb der ECM für die Formation eines Hydrogels und garantieren dadurch die Aufrechterhaltung der Matrix-Druckkraft [13]. PG bestehen aus einem *core*-Protein und kovalent gebundenen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten. Bisher sind über 40 unterschiedliche PG *core*-Proteine bekannt, deren Molekulargewicht zwischen 10 und > 500 kDa variiert. Durch die variable Anzahl verknüpfter GAG-Ketten (zwischen 1 und > 100) entsteht eine hohe Heterogenität bezüglich der gebildeten PG [14, 15].

Als Bindeglied zwischen GAG und *core*-Protein fungiert ein aus vier Monosacchariden bestehender *linker* (Tetrasaccharid-*linker*) $\text{GlcA-}\beta(1,3)\text{-Gal-}\beta(1,3)\text{-Gal-}\beta(1,4)\text{-Xyl-}\beta\text{-O-Ser}$, dessen Synthese durch vier verschiedene Glykosyltransferasen katalysiert wird. Im ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt überträgt die Xylosyltransferase (XT) aktivierte Xylose von Uridin-Diphosphat (UDP)-Xylose (Xyl) auf einen definierten Serinrest im *core*-Protein, wodurch eine O-glykosidische Bindung entsteht. Als nächstes übertragen die beiden Galaktosyltransferasen $\beta\text{-1,4-Galaktosyltransferase 1 (GalT-I)}$ und $\beta\text{-1,3-Galaktosyltransferase 2 (GalT-II)}$ jeweils ein Galaktose (Gal)-Molekül des natürlichen Substrats UDP-Gal auf die an das *core*-Protein gebundene Xylose [16–18]. Im finalen Schritt überträgt die $\beta\text{-1,3-Glukuronyltransferase I (GlcAT-1)}$ Glukuronsäure (GlcUA) von UDP-GlcUA auf die endständige Galaktose des dadurch komplettierten Tetrasaccharid-*linker* [19]. Pathogene Mutationen in den Genen der vier katalysierenden Glykosyltransferasen, sogenannte GAG-Linkeropathien, stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung von Dysplasien der Haut und des Skeletts. Diese sind phänotypisch u.a. durch Kleinwuchs und vorzeitige Alterungssymptomaten der Haut charakterisiert [20–24].

GAG sind unverzweigte Kohlenhydratketten variabler Länge bestehend aus repetitiven Disaccharid-Einheiten, die sich, in Abhängigkeit des eingebauten Aminozuckers, in zwei Gruppen unterteilen lassen. Während bei der Bildung der Galaktosaminoglykane N-acetylierte Galaktosamine (GalNAc) miteinander verknüpft werden, werden Glukosaminoglykane durch die Verknüpfung N-acetylierter Glukosamine (GlcNAc) gebildet. Neben den Aminozuckern beinhalten die Disaccharid-Einheiten Uronsäuren (Glukuron- (GlcA) oder Iduronsäure (IdoA)) oder einen Galaktoserest, wobei durch Kombination aus Aminozucker und Uronsäure (bzw. Galaktoserest) fünf unterschiedliche GAG entstehen. Dabei bilden Dermatansulfat (DS) und Chondroitinsulfat (CS) die Gruppe der Galaktosaminoglykane und Heparin/Heparansulfat (HS), Keratansulfat (KS) und Hyaluronsäure (HA) die Gruppe der Glukosaminoglykane (Tab. 1) [25, 26]. Während die meisten GAG im Golgi-Apparat synthetisiert werden, findet die HA-Synthese an der Zellmembran statt. Des Weiteren ist HA das einzige unsulfatierte und nicht Protein-gebundene GAG. Posttranslationale Sulfatierungen können an verschiedenen Hydroxygruppen innerhalb der GAG-Kette stattfinden und haben einen Einfluss auf die Regulierung verschiedener extrazellulärer Signale, wie beispielsweise Zell-Matrix oder Zell-Zell Interaktionen. Die GAG-Sulfatierung ist streng reguliert und Fehlregulationen können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen [27].

Tabelle 2.1: GAG und deren jeweilige Zusammensetzung aus Aminosucker und Uronsäure. GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; GlcA = Glukuronsäure; IdoA = Iduronsäure; Gal = Galaktose.

GAG	Aminosucker	Uronsäure
Dermatansulfat (DS)	GalNAc	GlcA, IdoA
Chondroitinsulfat (CS)	GalNAc	GlcA
Heparin/Heparansulfat (HS)	GlcNAc	GlcA, IdoA
Keratansulfat (KS)	GlcNAc	Gal
Hyaluronsäure (HS)	GlcNAc	GlcA

PG weisen ein breites Funktionsspektrum auf, wobei die Klassifizierung aufgrund des *core*-Proteins, der GAG-Ketten oder der Lokalisation stattfindet. Dadurch ergeben sich drei Hauptklassen: kleine, Leucin-reiche PG (SLRPs), modulare PG und Zelloberflächen-PG. SLRPs sind in einigen wichtigen Signalwegen involviert. Beispielsweise binden und aktivieren sie den *insuline-like-growth factor I* (IGF-I) oder Zytokine der *transforming growth factor-beta* (TGF- β) Familie. Während modulare PG Prozesse wie die Migration, Proliferation, Apoptose und Zelladhäsion regulieren, fungieren Zelloberflächen-PG als Ko-Rezeptoren unterschiedlicher Signalrezeptoren [28–30]. Die Interaktion mit anderen Molekülen findet dabei meist über die GAG-Ketten der PG statt.

2.1.2 Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)

Zytokine bilden eine heterogene Gruppe kleiner Proteine, die diverse biologische Prozesse initiieren und regulieren. Meist wirken diese Signalmoleküle durch Bindung an einen spezifischen, auf der Zelloberfläche exprimierten, Rezeptor über einen autokrinen, parakrinen oder endokrinen Weg [31]. Eine wichtige Untergruppe innerhalb der Zytokine ist die TGF- β Superfamilie. In Säugetieren wurden bisher drei verschiedene Mitglieder dieser Familie beschrieben, wobei das 25 kDa große TGF- β 1 zu den am besten charakterisierten Zytokinen zählt [32]. Anhand verschiedener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass eine TGF- β 1 Defizienz zu Dysregulierungen des Immunsystems [33], entzündlichen Erkrankungen [34] und einer veränderten Wundheilung [35] führen kann.

TGF- β 1 wird intrazellulär zunächst in Form eines Homodimers gebildet, dessen Bindung an das Peptid LAP (*latency associated peptide*) zur Bildung des *small-latent-complex* (SLC) führt. Dieser Komplex verbleibt in der Zelle und kann nicht sekretiert werden. Die über Disulfidbrücken verknüpfte Bindung des SLC an das Protein LTBP (*latent TGF- β binding protein*) führt zur Bildung des größeren, weiterhin latenten LLC (*large-latent-complex*)-Komplexes, der sekretiert und in der ECM gespeichert werden kann. Die latente Form kann durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden, wodurch eine schnelle Bereitstellung des Zytokins sichergestellt wird [36, 37].

TGF- β 1 wird in seiner aktiven Form nicht nur von Zelloberflächen-Rezeptoren, sondern auch von verschiedenen ECM-Komponenten gebunden. Aus Studien geht hervor, dass PG und TGF- β einen wechselseitigen Einfluss aufeinander haben. Dabei stellte sich zum einen heraus, dass HS einen regulatorischen Einfluss auf die TGF- β -Verfügbarkeit innerhalb der ECM haben [38] und andererseits, dass TGF- β in Zellen und Geweben regulatorische Aufgaben in Bezug auf die PG-Biosynthese einnimmt [39–41]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TGF- β die Synthese des PG Dekorin stimuliert [42], wohingegen Dekorin wiederum TGF- β 1 binden kann und, über einen *negative-feedback* Mechanismus dessen Aktivität reguliert [43]. Die Interaktion dieser beiden Moleküle hat darüber hinaus einen Einfluss auf die dreidimensionale Organisation der ECM [44].

2.1.3 Xylosyltransferasen

Die Xylosyltransferasen (XT, EC 2.4.2.26) werden den Glykosyltransferasen (EC 2.4.2) zugeordnet und katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PG-Biosynthese [45]. Dabei erkennt die XT innerhalb des PG *core*-Proteins das spezifische Aminosäure (AS)-Motiv a-a-a-a-G-S-G-a-G/a-a (G = Glycin, S = Serin, a = saure AS) und überträgt Xylose von UDP-Xylose, welche das natürliche Substrat der XT darstellt, auf den Serinrest innerhalb des Motivs [46]. Zur Komplettierung des Tetrasaccharid-*linkers* (siehe 2.1.1) werden im weiteren Verlauf zunächst zwei Galaktose-Moleküle und final eine Glukuronsäure an die Xylose geknüpft.

In allen höheren Organismen treten zwei XT-Isoformen (XT-I und XT-II) auf, deren Gene in unterschiedlichen Bereichen des Genoms kodiert sind. Während sich das für die humane XT-I kodierende *XYLT1*-Gen auf Chromosom 16 (16p12.3) befindet, ist das für die humane XT-II kodierende *XYLT2*-Gen auf Chromosom 17 (17q21.33) lokalisiert. Eine Studie aus dem Jahr 2010 gab erste Hinweise auf ein unterschiedliches Expressionsmuster der *XYLT*-Gene. Während *XYLT1* nur in etwa der Hälfte der 33 getesteten humanen Zelllinien exprimiert wurde, konnte eine *XYLT2*-Expression ubiquitär in allen Zelllinien nachgewiesen werden [47]. Interessanterweise konnte in den Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* nur jeweils ein XT-Ortholog nachgewiesen werden [48, 49]. Mutationen im *XYLT1*- [20] und *XYLT2*-Gen [50] sind mit einer veränderten PG-Biosynthese assoziiert, was einen Hinweis darauf gibt, dass beide Isoformen an der PG-Assemblierung beteiligt sind.

Die XT gehören zu den Typ-II Transmembranproteinen und sind im Golgi-Apparat lokalisiert. Die beiden Isoformen weisen eine AS-Sequenzhomologie von etwa 55 % und einen dementsprechend ähnlichen strukturellen Aufbau auf [51]. Beide Isoformen weisen N-terminal eine kurze zytoplasmatische Region auf, der eine Transmembran-Domäne, eine Golgi-ständige Stammregion und eine katalytische Domäne folgen [51]. Wie in Abb. 2.1

schematisch dargestellt, unterscheiden sich die XT-Isoformen primär im Bereich der Stammregion, welche im XT-II Protein verkürzt vorliegt. Vergleichend ist die Gesamtlänge des XT-II Proteins daher kürzer (865 AS, 97 kDa) als die des XT-I Proteins (959 AS, 108 kDa).

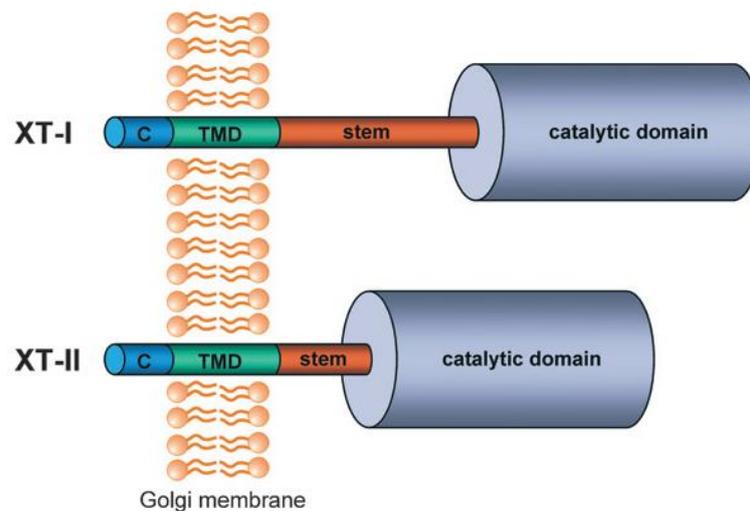


Abbildung 2.1: Struktureller Aufbau der XT-Isoformen. Die XT-Isoformen (XT-I und XT-II) weisen eine AS-Sequenzhomologie von 55 % auf. Neben einer zyttoplasmatischen (C) Region und einer Transmembrandomäne (TMD) bestehen beide Proteine aus einer Golgi-ständigen Stammregion (*stem*), die bei der XT-II verkürzt vorliegt. Am C-terminalen Ende besitzen beide Enzyme eine stark homologe katalytische Domäne (*catalytic domain*) [52].

Obwohl die Xylosylierung des PG *core*-Proteins durch membranständige XT im Golgi-Apparat katalysiert wird, ist die nachgewiesene XT-Aktivität im Bereich dieses Zellkompartimentes vergleichsweise gering. Ein Großteil der Aktivität wird im Extrazellulärraum nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die XT-I nach erfolgreicher Xylosylierung des *core*-Proteins proteolytisch durch Cysteinproteasen von der Oberfläche des Golgi-Apparats abgespalten und in ihrer aktiven Form in den extrazellulären Raum sekretiert wird [53]. Das aktive, zirkulierende Protein kann daher als Serum-Biomarker verschiedener PG-assoziiierter Erkrankungen herangezogen werden. Erhöhte Serumaktivitäten konnten beispielsweise bei Patienten nachgewiesen werden, die an Pseudoxanthoma elasticum (PXE) [54], systemischen Sklerosen [55, 56] oder Fibrosen [57] leiden. Diese Erkrankungen sind allesamt u.a. durch eine erhöhte PG-Biosynthese charakterisiert [58–61]. Im Gegensatz dazu wurde eine verminderte XT-Aktivität in Seren von Diabetes mellitus Patienten nachgewiesen [62], einer Erkrankung, die u.a. mit erniedrigten HS Konzentrationen assoziiert ist [63].

Mutationen in den Genen der beiden XT-Isoformen werden mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. In einer Studie aus dem Jahr 2006 zeigten Schön *et al.*, dass homo- und heterozygote Sequenzvariationen in den *XYLT*-Genen genetische Co-Faktoren

hinsichtlich der Schwere einer PXE-Erkrankung darstellen. Eine *missense*-Mutation im *XYLT1*-Gen (p.A115S) stand dabei im Zusammenhang mit erhöhten XT-Aktivitäten, Substitutionen im *XYLT2*-Gen (c.2402C>G; p.T801R) führten vermehrt zu Bildungen von Hautläsionen [64]. Darüber hinaus werden homozygote [20, 65] bzw. *compound* heterozygote [66] Mutationen im *XYLT1*-Gen mit der Ausbildung verschiedener Erkrankungen assoziiert, die durch eine verminderte Entwicklung des Knochen- und Knorpelgewebes charakterisiert sind und dadurch zu Kleinwuchs führen.

In Mäusen führt ein *Xylt2 knockout* zu der Bildung polyzystischer Nieren und Lebern [67]. Darüber hinaus konnten Munns *et al.* 2015 nachweisen, dass Patienten, die an einem Spondylo-okulären Syndrom erkrankten, Mutationen im *XYLT2*-Gen aufwiesen. Merkmale dieser Erkrankung sind u.a. Schwerhörigkeit, Lernstörungen und Knochenbrüchigkeit [50].

2.1.4 ECM-assoziierte Erkrankungen

2.1.4.1 Dermale Wundheilung und Fibrosen

Die Homöostase der ECM ist physiologisch streng reguliert und unterliegt ständigen Auf- und Abbauprozessen. Bei der Entwicklung von Fibrosen gerät dieses Gleichgewicht auseinander, wodurch es in den betroffenen Organen oder Geweben zu einer pathologisch gesteigerten Expression und Akkumulation von ECM-Komponenten kommt. Wenn dieser fibrotische Status persistiert, kann dies zu einem pathologischen Funktionsverlust des betreffenden Organs führen [68].

Eine erhöhte ECM-Synthese findet beispielsweise im Rahmen der komplexen dermalen Wundheilung statt, welche sich in drei Phasen aufteilen lässt: In der ersten Phase, der sogenannten Exsudationsphase, kommt es durch Aktivierung der Blutgerinnungskaskade zur Blutstillung. Mastzellen setzen verschiedene Moleküle, wie z.B. das Hormon Histamin, frei, wodurch lokale Entzündungsreaktionen ausgelöst werden und es anschließend zur Exsudation, dem vermehrten Austreten von Blutplasma im Wundbereich, kommt. Dies sorgt für eine „Säuberung“ der Wunde [69, 70].

In der zweiten Phase der Wundheilung, der sogenannten Granulationsphase, kommt es zu der Bildung von Granulationsgewebe. An dessen Bildung sind verschiedene Zelltypen beteiligt, wobei Endothelzellen für die Gefäßneubildung, und Makrophagen für die Phagozytose etwaiger Krankheitserreger sorgen [71, 72]. ECM-residente Fibroblasten differenzieren in dieser Phase zu Myofibroblasten. Dabei kommt es, bedingt durch mechanischen Stress, zunächst zu der Bildung von Proto-Myofibroblasten. Diese Zellen zeichnen sich durch die Expression Aktin-haltiger Stressfasern, zellulären Fibronektins (darunter auch die Extra-Domäne A (ED-A) Variante) und der Ausbildung kontraktile Kräfte aus. Das Zytokin TGF- β 1, welches während der Wundheilung vermehrt sekretiert wird, sorgt

u.a. für eine erhöhte Expression des ED-A Fibronektins. Beide Moleküle, TGF- β 1 und ED-A Fibronektin, stimulieren wiederum die Differenzierung von Proto-Myofibroblasten zu Myofibroblasten. Charakteristisch für die ausdifferenzierten Myofibroblasten ist die *de-novo* Expression des alpha-Glattmuskelaktins (α -SMA) und eine, im Vergleich zu den Proto-Myofibroblasten, erhöhte Kontraktilität. Myofibroblasten sind während der Granulationsphase der Wundheilung der primär vorherrschende Zelltyp. Sie sorgen für die Kontraktion des Granulationsgewebes und, durch eine erhöhte Synthese von ECM-Komponenten, eine regenerierende Neubildung der ECM [73–75]. Auch die XT-Aktivität ist während dieser Phase erhöht, weshalb die XT, neben dem α -SMA, als Fibrose- und Myofibroblasten-Marker herangezogen werden kann [76]. In der letzten Phase der Wundheilung, der Epithelisierung, kommt es zur Vernetzung und Stabilisierung der zuvor exprimierten Kollagene und zum Abbau des überschüssigen Granulationsgewebes unter Narbenbildung. Final kommt es zur Bedeckung der Wundoberfläche durch Epithelzellen (Epithelisierung) und zur Apoptose oder Re-Differenzierung der Myofibroblasten zu Fibroblasten [73, 74].

Fibrotische Erkrankungen entstehen durch eine persistente Anreicherung von Myofibroblasten, was wiederum zu einer exzessiven Synthese von Granulationsgewebe führt (anhaltendes *ECM-remodelling*). Obwohl Fibrosen zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen weltweit zählen, gibt es bis heute keine adäquate Therapieform [68, 77].

2.1.4.2 Skeletale Dysplasien

Pathologische Mutationen in den Genen der an der Tetrasaccharid-*linker* Synthese beteiligten Enzyme XT-I (*XYLT1*), XT-II (*XYLT2*), GalT-I (*B4GALT7*), GalT-II (*B3GALT6*) und GlcAT-I (*B3GAT3*) führen allesamt zu Dysplasie-Syndromen, sogenannte GAG-Linkeropathien, die die Haut und das Skelett betreffen [78].

Skeletale Dysplasien beschreiben eine heterogene Gruppe seltener, vererbbarer Erkrankungen, die primär das Knochen- und Knorpelgewebe betreffen. Bisher sind über 450 verschiedene Arten beschrieben, wobei die genetische Ursache in den meisten Fällen bekannt ist [79]. Eine Form stellt dabei die Desbuquois skeletale Dysplasie (DBSD) dar, bei der zwei Typen unterschieden werden. Während Typ 1-Patienten Handanomalien aufweisen, tun dies Typ 2-Patienten nicht. Zuletzt wurde eine dritte Variante, die sogenannte Kim-Variante, beschrieben, die ebenfalls durch Handanomalien charakterisiert ist, allerdings ein schwächeres klinisches Krankheitsbild ausbildet. Während DBSD Typ1 und die Kim-Variante durch Mutationen im *CANT1*-Gen hervorgerufen werden [80, 81], sind rezessive *XYLT1*-Mutationen für die meisten DBSD Typ2-Erkrankungen verantwortlich [65]. Die in diesem Zusammenhang bisher beschriebenen *XYLT1*-Mutationen sind heterogen und beinhalten u.a. Spleiß-Mutationen, *nonsense*-Mutationen oder *missense*-Substitutionen. Die Mutationen führen zu einer verminderten CS-Synthese und resultieren allesamt in schweren klinischen

Manifestationen, charakterisiert u.a. durch eine Mikrosomie und einer Hypermobilität der Gelenke [65].

Van Koningsbruggen *et al.* berichteten über einen Patienten, der unter einer besonders schweren Ausprägung einer skeletalen Dysplasie litt, welche aus *compound* heterozygoten Mutationen (3.3 bp Deletion auf Chromosom 16 und 18 bp Deletion im Bereich der Spleißstelle zwischen Intron 7 und Exon 8 des *XYLT1*-Gens) im *XYLT1*-Gen resultierte. Diese Mutationen führten zur Bildung von vier verkürzten Transkriptvarianten des *XYLT1*-Gens. Phänotypisch wies der Patient neben einer Mikrosomie Charakteristika auf, die bisher nicht im Zusammenhang mit DBSD Typ2 standen, wozu stark verkürzte Gliedmaßen, ein vorgewölbtes Abdomen und Atemwegsprobleme zählten. Dies war daher der erste beschriebene Fall einer XT-I Defizienz-assoziierten skeletalen Dysplasie, die nicht der DBSD Typ2 zugeordnet werden konnte. Der Patient starb im Säuglingsalter an den Folgen einer Kathetersepsis [66].

Schreml *et al.* beschrieben in ihrer Arbeit eine weitere homozygote *XYLT1*-Mutation, die zu einer Aminosäure-Substitution (p.R481W) innerhalb der katalytischen Domäne des Enzyms führte. Daraus resultiert eine unvollständige Synthese des PG Dekorin und eine Delokalisierung des Proteins im Zytoplasma. Die Patienten entwickelten ein autosomal rezessives Syndrom, das u.a. zu Knochen-Fehlbildungen, Kleinwuchs und intellektuellen Einschränkungen führte [20].

Obwohl bisher nur wenige pathogene Mutationen im *XYLT2*-Gen beschrieben wurden, zeigt eine Arbeit aus dem Jahr 2015, dass homozygote *frameshift*-Mutationen in diesem Gen zu einer verminderten XT-Aktivität und damit einhergehend zu einer Abnahme in der Synthese von CS und HS PG führt. Die Mutationen hatten teils schwere klinische Manifestationen, wie Osteoporose, Hypakusis und Vorhofseptumdefekte zur Folge [50]. Darüber hinaus stehen homozygote Mutationen im *XYLT2*-Gen im Zusammenhang mit der Manifestation des Spondylo-okulären Syndroms [82–84].

Loss-of-function Mutationen in den Genen *B3GALT6* und *B4GALT7* stehen im Zusammenhang mit der Entwicklung progeroider Formen des Ehlers-Danlos Syndroms, einer schweren Bindegewebserkrankung, welche u.a. durch Kleinwuchs und eine defekte Wundheilung charakterisiert ist [85, 86]. Darüber hinaus führen Mutationen im *B3GALT6*-Gen zur Entstehung der *seal dysplasia with joint laxity type 1* (SEMD-JL1)-Erkrankung, einer skeletalen Dysplasie, deren Phänotyp äußerst heterogen ist und meist zu einem frühen Tod der betroffenen Patienten führt [87, 88].

Eine Studie aus dem Jahre 2015 brachte hervor, dass eine homozygote *missense* Mutation (p.P140L) im *B3GAT3*-Gen u.a. zu einer verminderten Synthese von CS und HS führte. Die betroffenen Patienten sind ebenfalls kleinwüchsig und weisen Knochen-Anomalien auf [89].

Die Diversität der sich aus den GAG-Linkeropathien ergebenden Phänotypen und Krankheitsbilder verdeutlicht die enorme biologische Relevanz der an der *tetrasaccharid-linker* Synthese beteiligten Enzyme und der im weiteren Verlauf entstehenden PG.

2.2 Genome-editing

2.2.1 Entstehung und Arten von Mutationen

Im Genom aller Organismen treten, bedingt durch endogene und exogene Einflussfaktoren, regelmäßig Mutationen auf. In den meisten Fällen haben die dadurch verursachten Änderungen innerhalb der DNA-Sequenz keine Auswirkungen auf den Organismus. In einigen Fällen kann es jedoch zu einer Änderung des Leserasters kommen, was direkte Folgen für die Assemblierung des Genproduktes haben kann [90].

Prinzipiell werden drei Arten von Genmutationen unterschieden: Bei einer Punktmutation (Substitution) kommt es zum Basenaustausch an einer Position im Genom. Eine derartige Mutation hat keine Auswirkungen auf das Leseraster der DNA. Punktmutationen werden weiter in stille, *missense*- und *nonsense*-Mutationen untergliedert. Bei der stillen Mutation hat die Basensubstitution keine Änderung der AS-Sequenz zur Folge, wohingegen es bei einer *missense*-Mutation an dieser Position zu einem Austausch einer AS kommt. Durch eine *nonsense*-Mutation entsteht ein vorzeitiges Stopp-Codon in der mRNA. Dies kann, je nach biologischer Relevanz des betreffenden Proteins, gravierende Folgen für den gesamten Organismus haben [91].

Bei Insertions- und Deletions-Mutationen werden eine oder mehrere Basen im Genom eingefügt oder entfernt. Werden dabei ein oder zwei Basen inseriert oder deletiert, führt dies zu einer Verschiebung des DNA-Leserasters (*frameshift*-Mutation). Werden drei Basen oder ein Vielfaches davon eingefügt oder entfernt, handelt es sich um eine *in-frame* Mutation, da das Leseraster der DNA sich in diesen Fällen nicht ändert [92].

2.2.1.1 Doppelstrangbrüche und deren Reparatur

Doppelstrangbrüche (DSB) bezeichnen die simultane Schädigung der beiden homologen DNA-Stränge [93, 94]. Derartige DNA-Schädigungen müssen unmittelbar repariert werden, um die chromosomale Integrität aufrechtzuerhalten [95]. Eukaryotische Zellen verfügen diesbezüglich über zwei DNA-Reparaturmechanismen: die homologe, direkte Reparatur (*homologous direct repair*, HDR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (*non homologous end-joining*, NHEJ).

Der HDR-Mechanismus lässt sich in drei Phasen unterteilen: In der ersten Phase kommt es zur Bildung von 3'-Überhängen im Bereich des DSB. Diese dienen zum einen als Ausgangspunkt für die spätere Reparatur der DNA und zum anderen als Bindestelle für an der Reparatur beteiligte Proteine. In der zweiten Phase kommt es zur komplementären Bindung zwischen einem Strang der geschädigten DNA und einem Strang eines homologen DNA-Moleküls des Schwesterchromatids. Im dritten und letzten Schritt der HDR-Reparatur werden die Stränge elongiert, wodurch letztendlich zwei identische DNA-Moleküle entstehen [96].

Der NHEJ-Mechanismus kann in vier Phasen untergliedert werden: In der ersten Phase wird die DNA im Bereich des DSB von spezifischen Proteinen unter Bildung eines stabilen Komplexes (NHEJ-Komplex) gebunden. In der zweiten Phase werden die DNA-Enden durch weitere Proteine derart modifiziert, dass sie im späteren Verlauf miteinander ligieren können. In der dritten Phase werden die beiden DNA-Enden in räumliche Nähe zueinander gebracht und im Bereich des DSB stabilisiert. Im vierten Schritt kommt es letztendlich zur Ligation der DNA-Enden und zur Auflösung des NHEJ-Komplexes [97].

Im Gegensatz zum HDR-Mechanismus benötigt der NHEJ-Mechanismus kein homologes DNA-*template*. Da eine derartige Vorlage, in Form eines Schwesterchromatids, nur während der S- und G2-Phase des Zellzyklus vorhanden ist, beschränkt sich die Aktivität des HDR-Mechanismus auf diese beiden Phasen des Zellzyklus. Die Aktivierung des NHEJ-Mechanismus ist demgegenüber Zellzyklus-unabhängig und tritt dadurch sehr viel häufiger auf. Die Vorlagen-unabhängige Reparatur führt zu einer erhöhten Fehlerrate des NHEJ-Mechanismus, wodurch häufig Insertionen und Deletionen (InDels) in der reparierten DNA auftreten. Dadurch kann die gezielte Einführung von DSB an bestimmten Stellen im Genom und die darauffolgende zelluläre Aktivierung des fehleranfälligen NHEJ-Mechanismus zu *frameshift*-Mutationen und einem *knockout* des betreffenden Gens führen. Durch den gezielten *knockout* eines Gens *in vitro* oder *in vivo* lassen sich Aussagen über dessen Funktionalität innerhalb einer Zelle oder eines Organismus tätigen (reverse Genetik) [98].

2.2.1.2 Genome-editing: Gezielte Generierung eines Doppelstrangbruches

Das *genome-editing* ist eine molekularbiologische Methode zur gezielten *in vitro* oder *in vivo* Modifikation des Genoms unter Verwendung spezieller Nukleasen. Die Nukleasen werden dabei zur gewünschten Stelle im Genom geleitet, um dort einen DSB einzufügen. Bisherige *genome-editing* Methoden basierten dabei auf der Interaktion der DNA mit synthetischen Restriktionsenzymen, die aus einer DNA-bindenden Proteindomäne und einer gebundenen Endonuklease bestehen. *Transcription activator like effectors (TALEs)* sind Proteine, die primär in pflanzenpathogenen Bakterien vorkommen und durch die Erkennung einzelner Basenpaare an die DNA binden. Zink-Finger (ZF) sind Proteine, die in vielen eukaryotischen

Organismen vorkommen und über die Erkennung eines Basen-Triplets mit der DNA interagieren. Zum gezielten *genome-editing* können DNA-bindende TALEs und ZF Proteindomänen derart modifiziert werden, dass sie in einem gewünschten Bereich im Genom binden. Durch die Fusionierung mit einer Endonuklease wird an dieser Stelle im Genom ein DSB eingefügt. Die Verwendung dieser beiden Systeme gilt als zeit- und preisintensiv [99].

2.2.2 Das natürliche CRISPR/Cas9 System

Das *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)* System ist ein aus Bakterien und Archaeen adaptiertes, molekularbiologisches *genome-editing* System, welches in diesen Organismen als adaptives Immunsystem fungiert. Der Name bezieht sich dabei auf eine palindromische, im prokaryotischen Genom vorkommenden Region, die aus einer Serie repetitiver Sequenzen (*repeats*), mit einer jeweiligen Länge von 20-50 bp, und flankierenden 20-70 bp langen, nicht-repetitiven Elementen (*spacer*) besteht. Alternierende *repeat*- und *spacer*-Regionen bilden zusammen den CRISPR-Array, dessen Länge zwischen den Organismen variiert. Über eine nicht kodierende, 300-500 bp lange *leader*-Sequenz (enthält u.a. den Promotor des Systems), ist der CRISPR-Array mit CRISPR-assoziierten (Cas) Genen verbunden [100]. Zusammen ergeben der CRISPR-Array und die Cas-Gene den sogenannten CRISPR-Locus (Abb. 2.2), dessen Existenz schon vor vielen Jahren im *Escherichia coli*-Genom nachgewiesen wurde [101–104]. Im Jahr 2007 konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass Bakterien bei einer viralen Infektion Phagen-DNA in ihren CRISPR-Locus integrieren und auf diese Weise eine adaptive Immunität entwickeln [105].

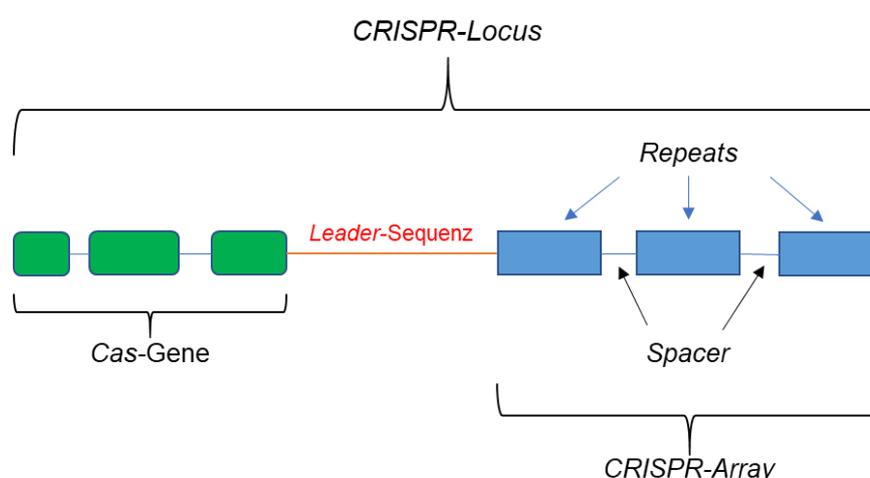


Abbildung 2.2: Vereinfachte Darstellung des CRISPR-Locus. Der CRISPR-Array besteht aus einer Serie repetitiver Sequenzen (*repeats*), die von nicht-repetitiven Elementen (*spacer*) flankiert werden. Über eine nicht kodierende *leader*-Sequenz ist der CRISPR-Array mit den Cas-Genen verbunden. Die Cas-Gene und der CRISPR-Array bilden zusammen den CRISPR-Locus.

Es gibt verschiedene CRISPR/Cas-Systeme, wobei das Typ2-System von *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) das am besten untersuchte ist. Neben der *repeat-spacer* Architektur enthält dieses System vier Protein-kodierende Gene (*cas1*, *cas2*, *cas9* und *cns2*) und eine nicht Protein-kodierende trans-aktivierende CRISPR-RNA (*tracr*-RNA). Da das *cas9*-Gen für eine der späteren Hauptkomponenten des Systems kodiert, spricht man bei dem Typ2-System kurz vom CRISPR/Cas9-System [106].

Die Erlangung der adaptiven Immunität nach einer Phagen-Neuinfektion mittels CRISPR/Cas9 kann in drei Phasen unterteilt werden: In der ersten Phase, der Akquisition, wird ein spezieller, etwa 30 bp langer Abschnitt der Fremd-DNA (Protospacer) unter Beteiligung mehrerer Cas-Gene in den CRISPR-Lokus des infizierten prokaryotischen Organismus inseriert [107]. Der zu inserierende Bereich der Fremd-DNA wird dabei nicht willkürlich gewählt, sondern muss sich in unmittelbarer Nähe zu einem definierten Sequenzmotiv, dem *protospacer adjacent motif* (PAM) befinden [108]. Beim CRISPR/Cas9-System ist dies das Motiv NGG (N = variable Base), welches nicht mit in den CRISPR-Locus integriert wird [109]. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Motiv zu einem Verlust der CRISPR-Cas vermittelten Immunität führen [110].

Im zweiten Schritt kommt es zur Expression des CRISPR-Arrays, wodurch die prä-crRNA gebildet wird. Diese wird im weiteren Verlauf unter Bildung einer Bibliothek kurzer crRNAs fragmentiert. Dabei enthält jede der gebildeten crRNAs eine spezifische, etwa 20 bp lange *spacer*-Sequenz, die von repetitiven Sequenzen flankiert wird [111]. Die parallel exprimierte *tracr*-RNA bindet an die repetitiven Bereiche der crRNA, wodurch es zur Ausbildung einer Duplex-Struktur (crRNA:tracrRNA-Komplex) kommt. Dieser Komplex wird von einer spezifischen, vom verwendeten CRISPR/Cas-System abhängigen Endonuklease gebunden [112]. Beim Typ2 CRISPR/Cas-System handelt es sich bei der Endonuklease um das Cas9-Protein [113]. Im Gegensatz zu anderen prokaryotischen Endonukleasen, wie beispielsweise Restriktionsenzymen, ist Cas9 daher eine RNA-geleitete Endonuklease [114].

In der finalen Interferenzphase kommt es zum Abbau der Fremd-DNA durch Generierung eines DSB. Dazu bindet der crRNA:tracrRNA:Cas9-Komplex zunächst spezifisch an den etwa 20 bp langen Bereich in der Fremd-DNA, der komplementär zur *spacer*-Sequenz der crRNA ist. Die Erkennung der in der Fremd-DNA kodierten PAM-Sequenz ermöglicht es der Cas9-Endonuklease, die DNA etwa drei Basenpaare *upstream* der PAM-Sequenz zu schneiden. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen dem PAM-Motiv und der C-terminalen *PAM-interacting domain* (PI)-Domäne des Cas9-Proteins. An der Restriktion der DNA sind zwei Nukleasedomänen des Cas9-Enzyms beteiligt (HNH und RuvC). Die HNH-Domäne spaltet dabei den an die crRNA hybridisierten Strang der Fremd-DNA und die RuvC-Domäne den dazu komplementären Strang [115–117].

2.2.2.1 CRISPR/Cas9 basiertes *genome-editing*

Die Erkenntnisse über das natürliche CRISPR/Cas System wurden für die Entwicklung einer neuartigen *genome-editing* Methode adaptiert. Im Jahr 2012 zeigten Jinek *et al.* erstmals, dass lediglich zwei Komponenten für die Verwendung des Systems als *genome-editing* Methode essentiell sind: eine der natürlichen crRNA nachempfundene, synthetische *single guide* RNA (gRNA) und eine Cas9-Endonuklease, die die DNA im Bereich der gRNA-Bindungsstelle doppelsträngig schneidet. Durch Modifikationen der crRNA konnte gezeigt werden, dass lediglich die ersten zehn Nukleotide der crRNA (*seed-sequence*) für die komplementäre Bindung im Genom entscheidend sind. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die tracrRNA essentiell für die Bindung des Cas9-Proteins an die DNA ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine einzelsträngige gRNA konzipiert, deren Aufbau dem natürlichen crRNA:tracrRNA-Komplex nachempfunden wurde. Diese beinhaltet an ihrem 5'-Ende eine 20 bp lange Sequenz, die komplementär zu dem Bereich in der Ziel-DNA ist, an dem im späteren Verlauf der DSB eingefügt werden soll. Des Weiteren enthielt das RNA-Molekül an seinem 3'-Ende eine der natürlichen tracrRNA nachempfundene Haarnadelstruktur, an die die Cas9-Endonuklease binden kann. Wie beim natürlichen System ist auch für das CRISPR/Cas-basierte *genome-editing* das Vorhandensein einer PAM-Sequenz essentiell [118–120].

Es gibt mehrere Varianten der für das *genome-editing* verwendbaren CRISPR/Cas-Systeme. Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines *all-in-one* Vektorsystems, bei dem sowohl die gRNA- als auch die kodierende Cas9-Sequenz zusammen auf einem Expressionsvektor kodiert sind. Dabei steht die Cas9-Expression meist unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und am C-terminalen Ende der Sequenz befindet sich eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal*, NLS). Das Kernlokalisierungssignal dient dabei einem effektiveren Transport des reifen Proteins in den Zellkern [121]. Die Expression der gRNA wird häufig von einem humanen U6-Promotor kontrolliert. Die Expressionsvektoren beinhalten meist noch eine für ein fluoreszierendes Fusionsprotein kodierende Sequenz, um die Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie visuell quantifizieren zu können [122]. Ein Vorteil des vektorbasierten Systems ist es, dass die gRNA-Sequenz durch einfache Klonierung in den Vektor inseriert und dementsprechend variiert werden kann. Dadurch kann ein derartiger Vektor für das *targeting* unterschiedlicher Sequenzen im Genom verwendet werden. Ein Nachteil ist die Größe des Vektors (> 9000 bp) und eine damit verbundene, verminderte Transfektionseffizienz [123, 124].

Eine weitere CRISPR/Cas-basierte *genome-editing* Variante ist die Verwendung eines Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes. Dabei wird die spezifische gRNA zunächst mittels *in vitro* Transkription synthetisiert und anschließend mit dem reifen Cas9-Protein fusioniert.

Dadurch ist, im Gegensatz zum vektorbasierten System, keine intrazelluläre Transkription und Translation notwendig und der gebildete RNP-Komplex kann nach erfolgreicher Transfektion direkt in den Zellkern transportiert werden [125, 126].

Im Vergleich zu bisherigen *genome-editing* Systemen (*TALEN* und *ZF*) sind die beschriebenen CRISPR/Cas-basierten Methoden kosteneffizienter und technisch einfacher durchführbar. Während für die Verwendung von *TALEN* und *ZF* ganze Proteindomänen synthetisiert werden müssen, sind es beim CRISPR/Cas-basierten System nur kleine RNA-Moleküle. Des Weiteren bietet das CRISPR/Cas-basierte System die Möglichkeit, mehrere unterschiedliche gRNAs parallel zu transfizieren. Dieses Multiplexpotenzial ermöglicht es, simultan in mehreren Bereichen des Genoms einen DSB einzufügen [127, 128].

In dieser Arbeit wurde das vektorbasierte CRISPR/Cas9 System verwendet, um sowohl einen *XYLT1 knockout* in normalen humanen Dermalfibroblasten (NHDF), als auch einen *XYLT2 knockout* in immortalisierten HEK293 Zellen durchzuführen.

2.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zum selektiven und sensitiven Nachweis von Molekülen innerhalb eines Stoffgemisches. Ein Massenspektrometer lässt sich in drei Grundeinheiten unterteilen: Die Ionenquelle, den Massenanalysator und den Detektor. Dem Massenspektrometer ist in den meisten Fällen eine Chromatographie-Einheit vorgeschaltet, mittels derer das zu analysierende Stoffgemisch zunächst chromatographisch aufgetrennt wird [129].

In dieser Arbeit sollte eine *on-line* Festphasenextraktions-(*solid phase extraction, SPE*) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-(*ultra performance liquid chromatography, UPLC*) Tandem Massenspektrometrie (MS/MS)-Methode entwickelt werden. Dabei wird ein geringes Volumen (1-10 µL) der zu analysierenden Flüssigkeit injiziert und in der mobilen Phase über eine Extraktionssäule geleitet. Durch die Interaktion des Analyten mit dem Sorbens der Säule kommt es zu dessen Anreicherung. Polare Moleküle, wie Salze und Saccharide, werden mit der mobilen Phase aus dem System entfernt. Durch eine veränderte Zusammensetzung der mobilen Phase werden die angereicherten Analyten von der Extraktionssäule eluiert und über ein Umschaltventil mit erhöhter Flussgeschwindigkeit und hohem Druck auf die Analytensäule übertragen. Die unterschiedlich starke Wechselwirkung mit den auf der Oberfläche der Analytensäule gebundenen Molekülen (stationäre Phase) führt zur Separierung der einzelnen Komponenten des Gemisches. Aufgrund der Erhöhung des organischen Anteils in der mobilen Phase werden die an der Säule gebundenen Analyten eluiert und in das *electrospray ionization* (ESI)-Modul des Massenspektrometers

weitergeleitet, wo es zur Ionisierung und Überführung der Moleküle in die Gasphase kommt [130].

Die Probe wird über eine Kapillare in die Ionenquelle eingebracht und die Ionenbildung durch das Anlegen einer Hochspannung (> 1 kV) an der Kapillare initiiert, wodurch ein elektrisches Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode gebildet wird. Die daraus resultierende Potenzialdifferenz und das Verdampfen des Lösungsmittels führen zur Bildung von Vorläufer-Ionen und deren Überführung in die Gasphase. Die Ladung der Ionen ist dabei abhängig von der angelegten Kapillarspannung. Während durch das Anlegen einer positiven Spannung (ESI+ Modus) positiv geladene Ionen gebildet werden, resultieren aus einer negativen Kapillarspannung (ESI- Modus) negativ geladene Ionen [131, 132].

Im Anschluss kommt es zur Überführung der sich in der Gasphase befindlichen Ionen in den Massenanalysator, der aus drei hintereinander geschalteten Quadrupolen (Triple-Quadrupol) besteht. Im ersten Quadrupol (Q1) kommt es zur Selektion der Vorläufer-Ionen aufgrund des Masse-zu-Ladung (m/z)-Verhältnisses. Nur Ionen, die ein zuvor bestimmtes m/z -Verhältnis nicht überschreiten, können den Q1 passieren und in den zweiten Quadrupol (Q2), die sogenannte Kollisionszelle, gelangen. Q2 enthält ein Inertgas (meist Argon), das mit den Vorläufer-Ionen wechselwirkt (Kollision). Dadurch kommt es, unter Bildung der Produkt-Ionen, zur Fragmentierung der Vorläufer-Ionen, wobei jedes Vorläufer-Ion ein einzigartiges Fragmentierungsmuster aufweist. Im dritten Quadrupol (Q3) kommt es, erneut anhand des m/z -Verhältnisses, zur Selektion der im Q2 entstandenen Produkt-Ionen. Bei der Erfassung von zwei oder mehr Fragmentierungen innerhalb eines Zyklus wird vom *multiple reaction monitoring* (MRM) gesprochen [133, 134].

Die gebildeten und selektierten Produkt-Ionen werden durch einen Detektor registriert, anhand dessen ein zweidimensionales Massenspektrum generiert wird. Darin ist die Signalintensität (Ordinate) gegen das m/z -Verhältnis (Abszisse) aufgetragen [135].

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die homologen Isoformen XT-I und XT-II katalysieren den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PG-Biosynthese, weshalb erhöhte XT-I Expressionen mit der Manifestation von Fibrosen assoziiert sind. Der genaue Grund für das Auftreten zweier XT-Isoformen in allen höheren Organismen konnte bisher nicht geklärt werden. Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher die Folgen veränderter XT-Expressionen analysiert und dadurch die Relevanz beider XT-Isoformen besser charakterisiert werden.

Erhöhte XT-Aktivitäten stehen in Zusammenhang mit der Entwicklung fibrotischer Erkrankungen. Da bisher weder eine adäquate Therapieform für Fibrosen noch ein spezifischer XT-Inhibitor existiert, sollte im ersten Teilprojekt dieser Arbeit das inhibitorische Potenzial des Nukleotids UDP und der GAG Heparin und DS auf die XT-Aktivität kultivierter NHDF getestet werden.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass immortalisierte HEK293-Zellen stark verminderte *XYLT1*-Expressionen aufweisen. Um ein besseres Verständnis für die Relevanz beider XT-Isoformen zu bekommen, sollten die Auswirkungen einer zusätzlichen XT-II Defizienz in diesen Zellen analysiert werden. Dazu sollte zunächst ein siRNA-basierter *knockdown* und zur Verifizierung ein stabiler CRISPR/Cas9-basierter *knockout* des *XYLT2* Gens durchgeführt werden.

Bisherige Verfahren zur Quantifizierung der XT-Aktivität sind nicht Isoform-spezifisch und nicht sensitiv, was den Nachweis geringer XT-Aktivitäten erschwert. In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit sollte daher ein Isoform-spezifischer und hoch sensitiver massenspektrometrischer UPLC-MS/MS XT-I Aktivitätstest entwickelt werden. Dazu sollte zunächst ein Akzeptorpeptid identifiziert werden, das spezifisch von der XT-I xylosyliert wird und der Test anschließend weiter validiert werden. Abschließend sollten exemplarisch repräsentative Proben mit dem neu entwickelten MS XT-I Test und dem bisher verwendeten, weniger sensitiven radiochemischen XT-I Aktivitätstest gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Im vierten Teilprojekt dieser Arbeit sollten Fibroblasten eines Patienten charakterisiert werden, der aufgrund von *compound* heterozygoten *XYLT1* Mutationen an einer skeletalen Dysplasie erkrankte. Während bisherige Studien Auswirkungen erhöhter XT-I Aktivitäten aufzeigen, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals eruiert werden, welche Folgen verminderte XT-I Aktivitäten in NHDF haben. Dazu sollten zunächst die mRNA-Level unterschiedlicher ECM-assoziiierter *targets* nach basaler (10 % FCS) und serumreduzierter (0,1 % FCS) Kultivierung, sowie nach einer Induktion der Zellen mit dem Zytokin TGF- β 1 quantifiziert werden. Durch eine Behandlung mit TGF- β 1 sollte die Myofibroblasten-Differenzierung von Patienten- und Kontrollzellen induziert und verschiedene Charakteristika der differenzierten Zellen, wie bspw. die Wundheilungsfähigkeit und die α -SMA Expression, in unterschiedlichen Assays miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollten vergleichend die intra- und extrazellulären XT-I Aktivitäten mit dem zuvor etablierten Isoform-spezifischen XT-Aktivitätstest von Patienten- und Kontrollzellen quantifiziert werden.

Die *compound* heterozygoten *XYLT1* Mutationen in den Patientenzellen waren u.a. durch eine 3,3 Mb große Deletion auf einem der Allele gekennzeichnet, was heterozygote

Mutationen weiterer Gene zur Folge hat. Obwohl die Mutationen im *XYLT1*-Gen als einzige *compound* heterozygot waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass etwaig detektierte Effekte auch durch die Mutation der anderen betroffenen Gene beeinflusst werden. Die geringe Verfügbarkeit *XYLT1*-defizienter Fibroblasten limitiert die Anzahl biologischer Replikate und somit auch die Aussagekraft erzielter Ergebnisse. Aus diesen Gründen sollte im letzten Teil dieser Arbeit eine Methode zur Generierung eines *XYLT1* *knockouts* in neonatalen NHDF entwickelt werden. Dazu sollte eine CRISPR/Cas9-vermittelte *frameshift*-Mutation im Exon 9 des *XYLT1*-Gens eingefügt werden, die ein Stopp-Codon und die dadurch bedingte Synthese eines verkürzten XT-I Proteins zur Folge hat. Für die Allel-spezifische Charakterisierung der Mutationen sollte eine TA-Klonierung durchgeführt und zur Verifizierung des *knockout* u.a. der in dieser Arbeit etablierte XT-I MS-Aktivitätstest verwendet werden.

3. Ergebnisse

3.1 Potenzial von UDP und verschiedenen GAG zur Inhibition der XT-Aktivität

Fibrosen sind durch eine exzessive Synthese und Akkumulierung von ECM-Molekülen charakterisiert. Sie können unterschiedliche Gewebe und Organe betreffen und entscheidend zu einem Funktionsverlust des betroffenen Organs beitragen. PG stellen eine Hauptkomponente der ECM dar und ihre Biosynthese wird durch die XT initiiert, deren Aktivität während fibrotischer Erkrankungen erhöht ist [136]. Die Inhibition der XT könnte daher ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung einer anti-fibrotischen Therapie sein. In institutseigenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Nukleotid UDP und die GAG Heparin und DS die XT-Aktivität im zellfreien System inhibieren [137]. Darauf aufbauend sollte im Rahmen dieser Arbeit eruiert werden, ob die Moleküle ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die XT-Aktivität kultivierter NHDF haben. Durch die Expressionsbestimmung ECM-assoziiierter Gene sollte darüber hinaus überprüft werden, ob eine mögliche XT-Inhibition weiterführende anti-fibrotische Effekte zur Folge hat.

3.1.1 Einfluss einer UDP-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF

In Vorarbeiten haben Casanova *et al.* [137] das inhibitorische Potenzial diverser Nukleotide auf die XT getestet. In dem dabei verwendeten, zellfreien System konnte gezeigt werden, dass UDP, aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur UDP-Xylose (natürliches Substrat der XT), die XT-Aktivität konzentrationsabhängig am stärksten reduziert. Während UDP in einer Konzentration von 10 mg/mL zu einer 95%igen Reduktion der XT-Aktivität führte, waren die Effekte bei einer UDP-Konzentration von 1 mg/mL nur unwesentlich schwächer (92%ige Reduktion). Eine Nukleotid-Konzentration von 0,1 mg/mL führte hingegen lediglich zu einer 53%igen Reduktion der Enzymaktivität.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit der Effekt von UDP auf die XT-Aktivität und die Genexpression von ECM-Molekülen in NHDF untersucht. Die Zellen wurden in einer geringen Zelldichte (50 Zellen/mm²) ausgesät und für insgesamt 48 oder 72 h mit UDP-supplementiertem (1 mg/mL) Zellkulturmedium kultiviert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und für die Genexpressionsanalyse in cDNA umgeschrieben. Die intra- und extrazelluläre XT-Aktivität wurde jeweils nach einer Kultivierungszeit von 48 und 72 h im radiochemischen XT-Test bestimmt.

3.1.1.1 Analyse der XT-Aktivität

Im Vergleich zu den Kontrollen war die extrazelluläre XT-Aktivität der NHDF 48 h nach der UDP-Behandlung signifikant vermindert (0,7-fach, Abb. 3.1 a). Im Gegensatz dazu wurde intrazellulär zum selben Zeitpunkt eine 1,3-fach erhöhte XT-Aktivität nach Behandlung mit UDP nachgewiesen (Abb. 3.1 a). Durch eine gesteigerte, zeitabhängige XT-Sekretion war die extrazelluläre XT-Aktivität in den behandelten Fibroblasten nach 72 h signifikant erhöht (1,7-fach, Abb. 3.1 b). Intrazellulär wurde, vergleichend zu den Kontrollen, nach 72 h eine 2,8-fach erhöhte Enzymaktivität gemessen (Abb. 3.1 b).

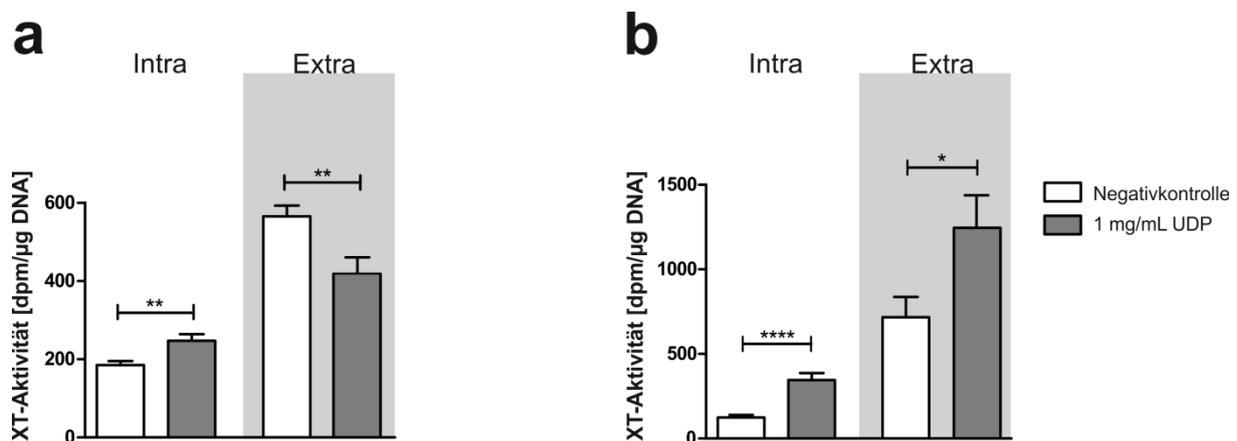


Abbildung 3.1: Intra- und extrazelluläre XT-Aktivitäten nach Behandlung von NHDF mit dem Nukleotid UDP. Die NHDF (n=3) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und nach 24 h mit 1 mg/mL UDP behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach jeweils 48 (a) und 72 h (b) wurde der ZKÜ (extrazelluläre XT-Aktivität) gesichert und die Zellen lysiert (intrazelluläre XT-Aktivität). ZKÜ und Lysate wurden im radiochemischen XT-Test zur Quantifizierung der XT-Aktivität eingesetzt und die resultierenden *dpm*-Werte auf den DNA-Gehalt der Zellen normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (* = p<0,1; ** = p<0,01; **** = p<0,0001).

3.1.1.2 Analyse der Genexpression

Die *XYLT1* Genexpression UDP-behandelter und unbehandelter NHDF unterschied sich nach 48 h nicht signifikant voneinander, das *XYLT2* mRNA-Expressionslevel war hingegen 0,7-fach vermindert (Abb. 3.2 a, b). Die relative Genexpression der beiden folgenden, an der Tetrasaccharid-Linker beteiligten Enzyme, β -1,4-Galaktosyltransferase 7 (*B4GALT7*) und β -1,3-Galaktosyltransferase 6 (*B3GALT6*), waren im Vergleich zur Kontrolle nach der UDP-Behandlung 0,6- bzw. 0,7-fach vermindert (Abb. 3.2 c, d).

Die Nukleotid-Behandlung führte darüber hinaus zu verminderten Expressionen der PG core-Proteine Aggrecan (*ACAN*, 0,2-fach, Abb. 3.2 e) und Decorin (*DCN*, 0,7-fach, Abb. 3.2 f), sowie des Kollagens Typ I α I (*COL1A1*, 0,6-fach, Abb. 3.2 g). Interessanterweise war die mRNA-Expression der Ekto-5'-Nukleotidase (*NT5E*), ein Enzym, das die Umsetzung von Nukleotiden zu Nukleosiden katalysiert, im Vergleich zu den Kontrollen 1,4-fach erhöht

(Abb. 3.2 h). Die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ist ein bedeutender Aspekt bei der Manifestation von Fibrosen, da diese Zellen maßgeblich an der Remodellierung der ECM beteiligt sind. Myofibroblasten sind u.a. durch eine *de-novo* α -SMA Expression charakterisiert, die durch das Zytokin TGF- β 1 induziert wird. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen waren die Expressionen der beiden Gene *TGF- β 1* (0,6-fach, Abb. 3.2 i) und *ACTA2* (0,3-fach, Abb. 3.2 j) nach UDP-Behandlung ebenfalls signifikant erniedrigt. Die mRNA Expression von *UXS1*, dem Enzym, das die Bildung von UDP-Xylose aus UDP-Glucuronat katalysiert, war nach der Behandlung ebenfalls vermindert (0,7-fach, Abb. 3.2 k).

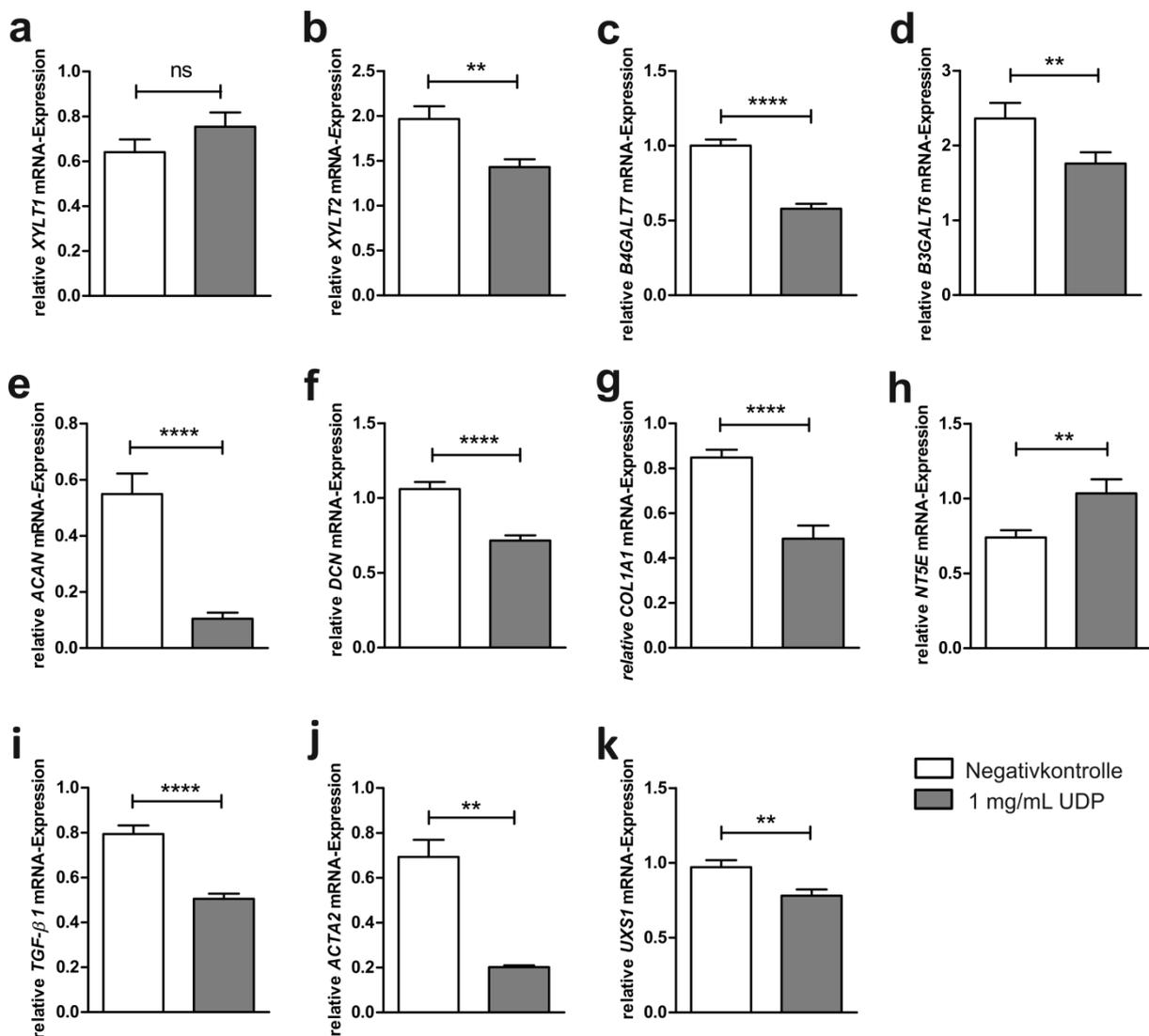


Abbildung 3.2: Relative Genexpression verschiedener ECM-Moleküle 48 h nach Behandlung von NHDF mit dem Nukleotid UDP. Die NHDF (n=3) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und nach 24 h mit 1 mg/mL UDP behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach weiteren 48 h wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYL1* (a), *XYL2* (b), *B4GALT7* (c), *B3GALT6* (d), *ACAN* (e), *DCN* (f), *COL1A1* (g), *NT5E* (h), *TGF- β 1* (i), *ACTA2* (j) und *UXS1* (k) in einer qPCR zu bestimmen. Die ermittelten relativen mRNA-Expressionen wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; ** = p<0,01; **** = p<0,0001).

3.1.1.3 Analyse der Proliferation und Viabilität

Um ausschließen zu können, dass die beschriebenen Effekte auf mRNA- und Proteinebene auf eine toxische Wirkung von UDP zurückzuführen sind, wurde ein WST-1 Assay durchgeführt. Der Test basiert auf der enzymatischen Umsetzung des WST-1 Reagenzes (Tetrazolium) zu Formazan, welche nur in Zellen mit einer intakten Atmungskette abläuft. Die Absorptionen wurden 44 h nach UDP-Behandlung stündlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 h bestimmt.

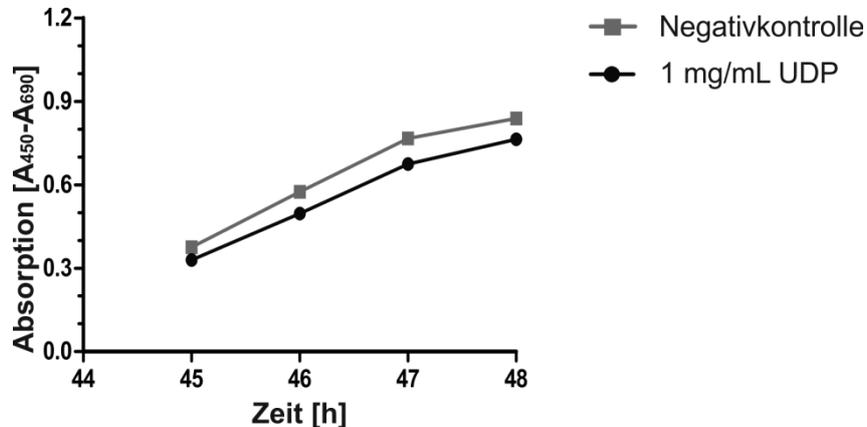


Abbildung 3.3: WST-I Assay zur Bestimmung der Viabilität und Proliferation von NHDF nach Behandlung mit UDP. Für den WST-I Assay wurden 1700 Zellen pro Kavität einer 96-Kavitätenplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen in Vollmedium kultiviert, das mit UDP (1 mg/mL) oder einem äquivalenten Volumen Wasser (Negativkontrolle) versetzt wurde. Nach 44 h wurden 10 µL WST-I Reagenz in jede Kavität pipettiert und dessen Umsetzung stündlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 h photometrisch bei 450 nm bestimmt. Der Assay wurde pro Bedingung mit jeweils drei Zelllinien durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden die gemittelten Absorptionswerte von drei biologischen und drei technischen Replikaten berechnet.

Die Absorptionswerte der UDP-behandelten Zellen waren für alle Messzeitpunkte etwas geringer als die der Kontrollzellen (Abb. 3.3).

3.1.1.4 Einfluss eines siRNA-vermittelten *UXS1* knockdowns auf die XT-Aktivität

Um weitere Zusammenhänge zwischen einer verminderten *UXS1* Genexpression und einer Induktion der XT-Aktivität zu evaluieren, wurde ein siRNA-vermittelter *UXS1* knockdown durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit einer siRNA transfiziert wurden, die an keine humane mRNA bindet. Nach 48 h wurde die RNA der transfizierten Zellen isoliert und, nach dem Umschreiben in cDNA, Genexpressionsanalysen durchgeführt. Zur Verifizierung des knockdowns wurde zunächst die *UXS1*-Genexpression quantifiziert. Diese war 48 h nach der siRNA-Transfektion im Vergleich zu den Kontrollen 0,03-fach vermindert (Abb. 3.4 a). Sowohl die *XYLT1*-Genexpression (1,6-fach, Abb. 3.4 b), als auch die nach 72 h bestimmte extrazelluläre XT-Aktivität (1,3-fach, Abb. 3.4 d) waren nach Durchführung des *UXS1* knockdowns erhöht. Die *XYLT2*-Genexpressionslevel unterschieden sich hingegen nicht signifikant von denen der Kontrollen (Abb. 3.4 c). Ergänzend wurde vergleichend die intrazelluläre Konzentration der UDP-Xylose, dem natürlichen XT-Substrat,

bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen war die UDP-Xylose Konzentration in *UXS1*-siRNA transfizierten NHDF 0,7-fach vermindert (Abb. 3.4 e).

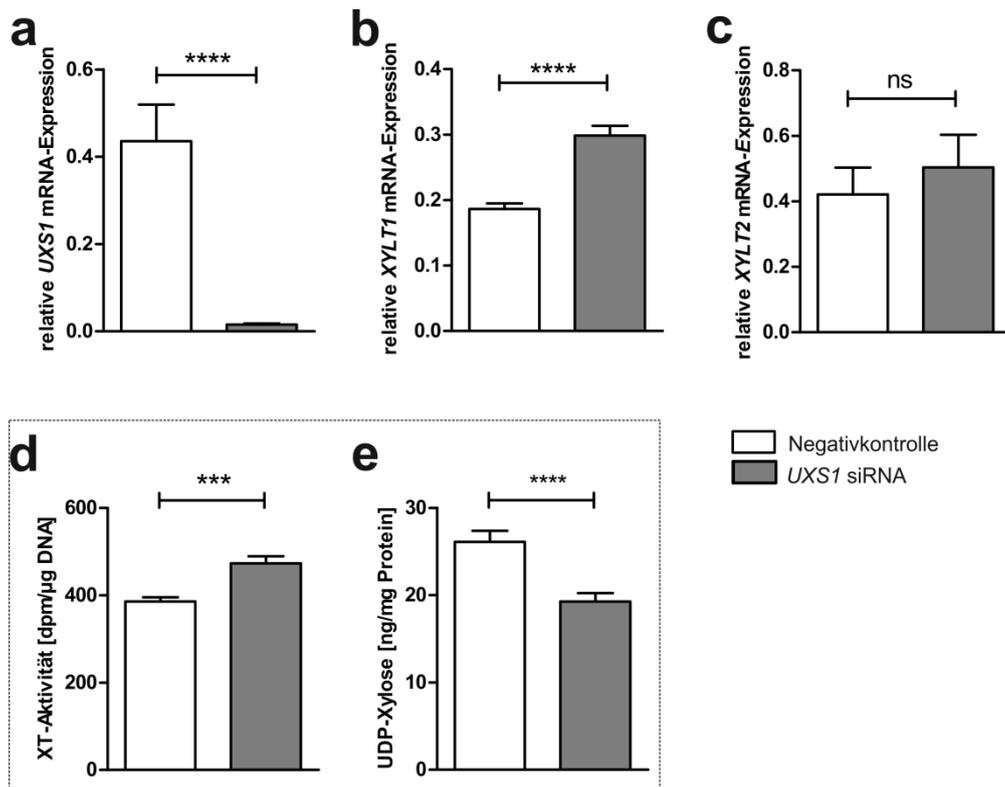


Abbildung 3.4: Relative Expressionen verschiedener Gene (a-c), extrazelluläre XT-Aktivität (d) und intrazelluläre UDP-Xylose-Konzentration (e) nach Durchführung eines *UXS1* siRNA knockdowns in NHDF. Die NHDF (n=3) wurden nach dem Aussäen mit 40 nM einer Kontroll- (Negativkontrolle) oder *UXS1*-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *UXS1* (a), *XYLT1* (b) und *XYLT2* (c) in einer qPCR zu bestimmen. Die ermittelten relativen mRNA-Expressionen wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Die extrazelluläre XT-Aktivität (d, radiochemischer XT-Test) und die intrazelluläre UDP-Xylose-Konzentration (e) wurden 72 h nach Durchführung des knockdowns bestimmt und auf den DNA- bzw. Gesamt-Proteingehalt der Zellen normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

Durch die erzielten Ergebnisse lässt sich ein Mechanismus beschreiben, der nach UDP-Behandlung von NHDF zu einer XT-Induktion in den Zellen führt. In Übereinstimmung mit Vorarbeiten wird die extrazelluläre XT-Aktivität innerhalb der ersten 48 h durch eine Nukleotidkonzentration von 1 mg/mL inhibiert. Auf mRNA-Ebene konnten nach UDP-Behandlung, bedingt durch eine mögliche UDP-GlcA Substratinhibition, verminderte *UXS1*-Expressionen nachgewiesen werden. Daraus resultierend kommt es zu einer verminderten UDP-Xylose Synthese und zu einer kompensatorischen Induktion der intrazellulären XT-Aktivität. Eine verminderte UDP-Xylose Verfügbarkeit führt letztlich zu einer Reduktion der PG-Biosynthese. Die nach 72 h extrazellulär erhöhte XT-Aktivität lässt sich durch eine sukzessive XT-Sekretion begründen.

3.1.2 Einfluss einer GAG-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF

In institutseigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die GAG Heparin und DS die XT-Aktivität im zellfreien System, vermutlich in Form einer Endprodukthemmung, inhibieren. Darauf aufbauend sollte in dieser Arbeit eruiert werden, ob die beiden GAG zusätzlich das Potenzial haben, die XT-Aktivität kultivierter NHDF zu inhibieren und ob dies zu weiteren anti-fibrotischen Effekten innerhalb der ECM führt. Die Zellen wurden in geringer Zelldichte (50 Zellen/mm²) ausgesät und am nächsten Tag mit jeweils 1 mg/mL DS oder Heparin behandelt. Die mRNA-Level wurden nach 48 h und die intra- und extrazellulären XT-Aktivitäten nach jeweils 72 h ermittelt.

3.1.2.1 Analyse der XT-Aktivität

Eine Behandlung von NHDF mit 1 mg/mL Heparin führte nach 72 h extrazellulär zu einer 0,2-fach verminderten XT-Aktivität. Im Vergleich zu den Kontrollen war die intrazelluläre XT-Aktivität zum selben Zeitpunkt 0,3-fach vermindert (Abb. 3.5 a). Vergleichend dazu waren die Effekte nach der Behandlung mit 1 mg/mL DS schwächer. 72 h nach der DS-Behandlung war die extrazelluläre XT-Aktivität, im Vergleich zu den Kontrollen, 0,5-fach reduziert. Intrazellulär führte eine DS-Behandlung zu einer 0,7-fach verminderten XT-Aktivität (Abb. 3.5 b).

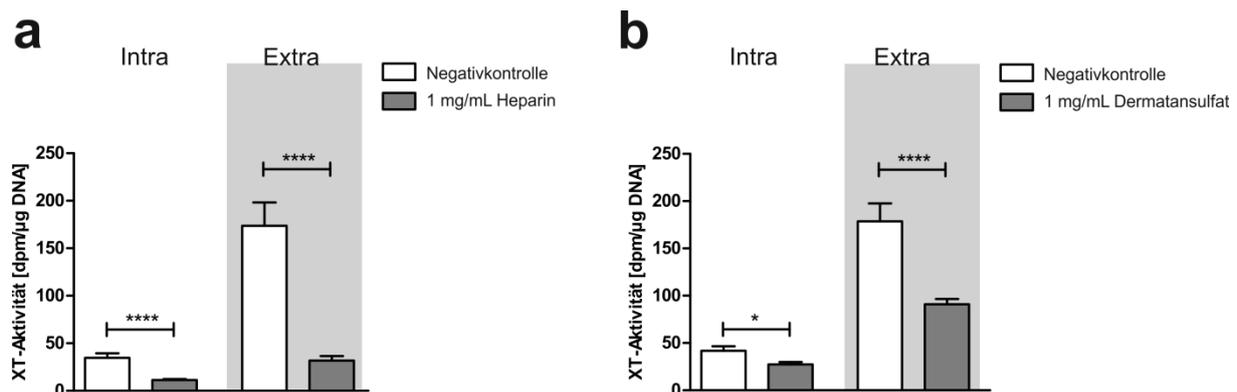


Abbildung 3.5: Intra- und extrazelluläre XT-Aktivitäten nach Behandlung von NHDF mit den GAG Heparin (a) und DS (b). Die NHDF (n=3) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und nach 24 h mit 1 mg/mL Heparin (a) oder DS (b) behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 72 h wurde der ZKÜ (extrazelluläre XT-Aktivität) gesichert und die Zellen lysiert (intrazelluläre XT-Aktivität). ZKÜ und Lysate wurden im radiochemischen XT-Test zur Quantifizierung der XT-Aktivität eingesetzt und die resultierenden *dpm*-Werte auf den DNA-Gehalt der Zellen normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (* = $p < 0,1$; **** = $p < 0,0001$).

3.1.2.2 Analyse der Genexpression

48 h nach Supplementierung des Zellkulturmediums mit 1 mg/mL Heparin oder DS wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen führte die Behandlung von NHDF mit Heparin zu keinen

signifikant veränderten Expressionen der Gene *XYLT1*, *XYLT2*, *B4GALT7*, *B3GALT6* und *ELN* (Abb. 3.6 a-e). Im Gegensatz dazu war die *COL1A1* mRNA-Expression nach Heparin-Behandlung 1,4-fach erhöht (Abb. 3.6 f).

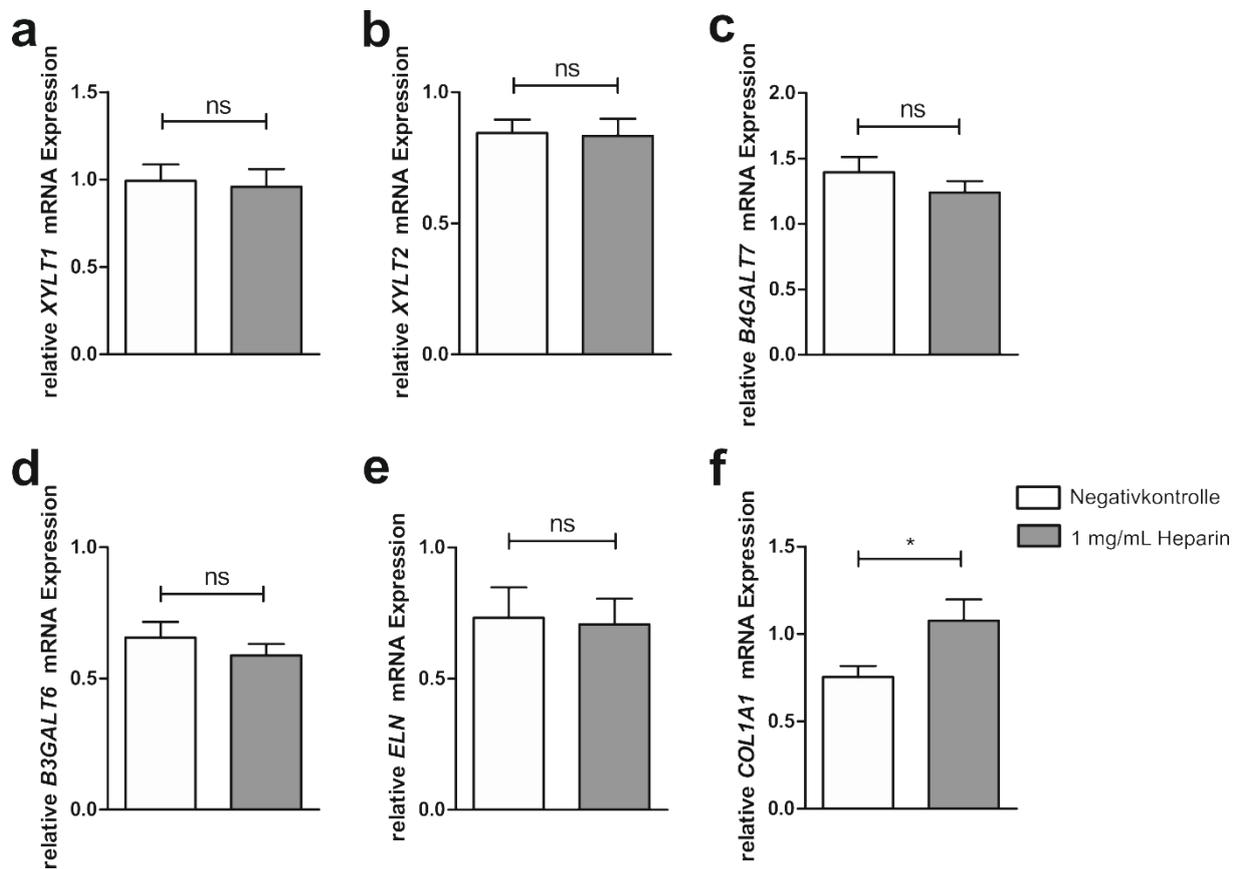


Abbildung 3.6: Relative Genexpressionen verschiedener ECM-Moleküle 48 h nach Behandlung von NHDF mit dem GAG Heparin. Die NHDF (n=3) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und nach 24 h mit 1 mg/mL Heparin behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach weiteren 48 h wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT1* (a), *XYLT2* (b), *B4GALT7* (c), *B3GALT6* (d), *ELN* (e) und *COL1A1* (f) in einer qPCR zu bestimmen. Die ermittelten relativen mRNA-Expressionen wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = p<0,1).

Eine DS-Behandlung führte in NHDF zu verminderten Expressionen der Gene *XYLT1* (0,7-fach, Abb. 3.7 a), *B3GALT6* (0,8-fach, Abb. 3.7 b) und *ELN* (0,4-fach, Abb. 3.7 c). Die Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die *XYLT2*, *B4GALT7* und *COL1A1* mRNA-Expressionen (Abb. 3.7 d-f).

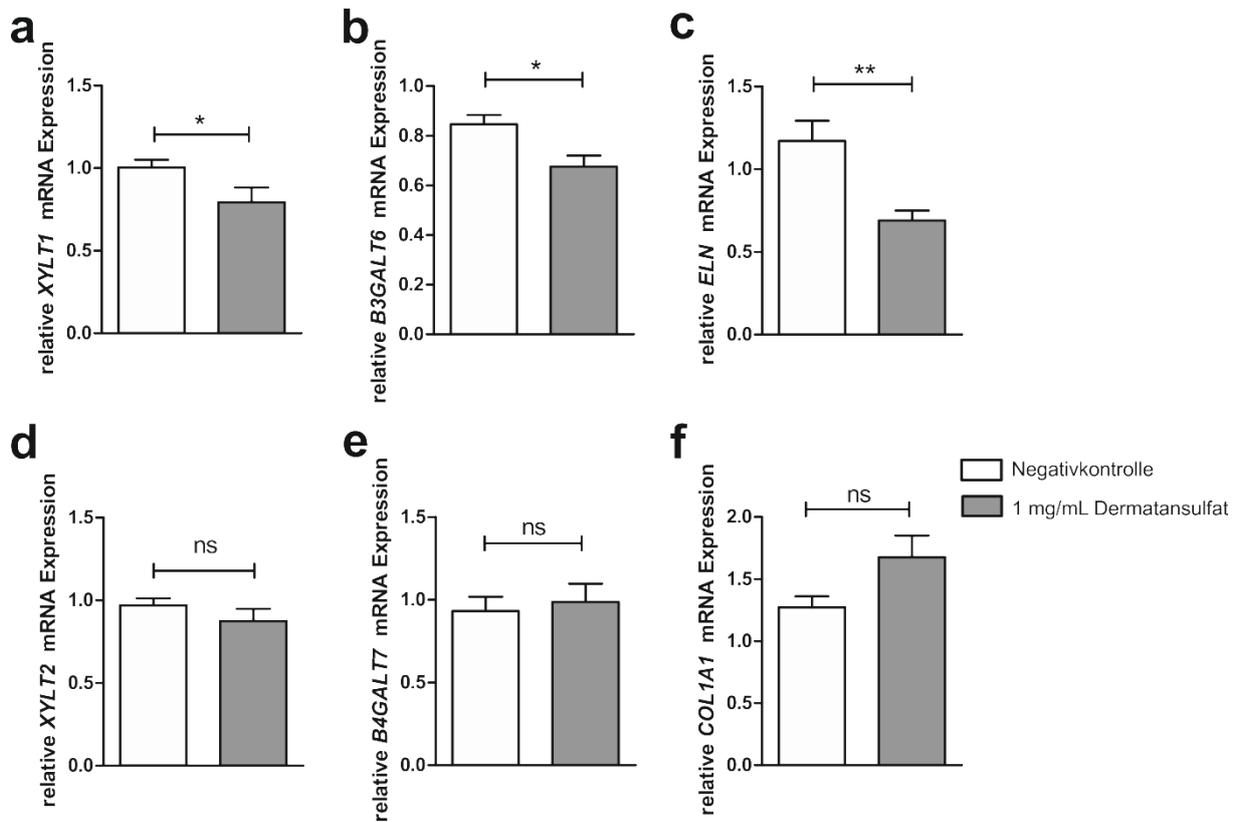


Abbildung 3.7: Relative Genexpressionen verschiedener ECM-Moleküle 48 h nach Behandlung von NHDF mit dem GAG DS. Die NHDF ($n=3$) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/ mm^2 ausgesät und nach 24 h mit 1 mg/mL DS behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach weiteren 48 h wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT1* (a), *B3GALT6* (b), *ELN* (c), *XYLT2* (d), *B4GALT7* (e) und *COL1A1* (f) in einer qPCR zu bestimmen. Die ermittelten relativen mRNA-Expressionen wurden auf die Expression einer Zelllinie normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$).

3.1.2.3 Analyse der Proliferation und Viabilität

Um ausschließen zu können, dass die beschriebenen Effekte auf mRNA- und Proteinebene auf eine toxische Wirkung der GAG zurückzuführen sind, wurde ein WST-1 Assay durchgeführt. Dabei wurde die Absorptionen 44 h nach GAG-Behandlung stündlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 h bestimmt.

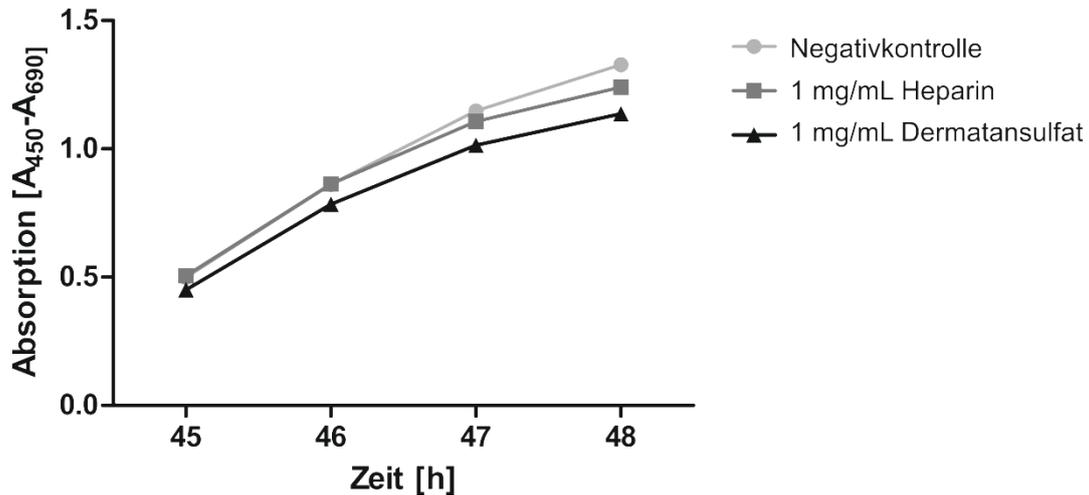


Abbildung 3.8: WST-I Assay zur Bestimmung der Viabilität und Proliferation von NHDF nach Behandlung mit Heparin und DS. Für den WST-I Assay wurden 1700 Zellen pro Kavität einer 96-Kavitätenplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen in Vollmedium kultiviert, das mit Heparin oder DS (1 mg/mL) oder einem äquivalenten Volumen Wasser (Negativkontrolle) versetzt wurde. Nach 44 h wurden 10 μ L WST-I Reagenz in jede Kavität pipettiert und dessen Umsetzung stündlich über einen Zeitraum von insgesamt 4 h photometrisch bei 450 nm bestimmt. Der Assay wurde pro Bedingung mit jeweils drei Zelllinien durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden die gemittelten Absorptionswerte von drei biologischen und drei technischen Replikaten berechnet.

Die Absorptionswerte der GAG-behandelten Zellen waren für alle Messzeitpunkte etwas geringer als die der Kontrollzellen (Abb. 3.8).

3.2 Auswirkungen einer XT-Defizienz auf die ECM-Homöostase und Viabilität von HEK293-Zellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Potenzial verschiedener Moleküle getestet, die intra- und extrazelluläre XT-Aktivität zu reprimieren. Darauf aufbauend sollte im weiteren Verlauf analysiert werden, welche Auswirkungen verminderte Expressionen beider XT-Isoformen auf die Homöostase der ECM und die Viabilität von HEK293-Zellen haben. In einer vorausgegangenen Arbeit wurden die *XYLT*-Genexpressionen in unterschiedlichen Zelltypen quantifiziert [47]. Die Studie ergab, dass immortalisierte humane, embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney*, HEK) lediglich eine *XYLT2*-, aber keine quantifizierbare *XYLT1*-Genexpression aufweisen. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine *XYLT1* mRNA-Expression in HEK293-Zellen mittels qPCR nicht nachgewiesen werden. Um die zellulären Auswirkungen vermindelter Expressionen beider XT-Isoformen zu analysieren, wurde erstmals ein siRNA basierter *knockdown* und anschließend, zur Verifizierung der Ergebnisse, ein CRISPR/Cas9-vermittelter *knockout* des *XYLT2* Gens in HEK293-Zellen durchgeführt.

3.2.1 siRNA-vermittelter *XYLT2* *knockdown* in HEK293-Zellen

Für den *XYLT2* *knockdown* wurden 3×10^5 HEK-Zellen ausgesät und mittels Lipofektion revers transfiziert. Die Bindung der verwendeten siRNA (Tab.6.5) innerhalb von Exon 9 der *XYLT2* mRNA führte zum reversiblen *gene-silencing*. Kontrollzellen wurden mit einer FAM-

markierten siRNA transfiziert, die an keine humane mRNA bindet. Anhand der fluoreszierenden Kontroll siRNA wurde nach 24 h eine nahezu 100%ige Transfektionseffizienz nachgewiesen. 48 h nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand zur Bestimmung der extrazellulären XT-Aktivität gesichert und die Zellen lysiert. Anschließend erfolgten die RNA-Isolierung, die cDNA-Synthese und die Expressionsbestimmung ECM-assoziiierter Gene mittels qPCR-Analyse.

3.2.1.1 Analyse der Zellmorphologie

Im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wiesen die *XYLT2* siRNA transfizierten Zellen eine veränderte Morphologie auf. 24 h nach der Transfektion waren die Kontrollzellen adhärirt und bildeten vereinzelt bereits längliche Zell-Ausläufer aus (Abb. 3.9). Auch die charakteristische Clusterbildung einiger Zellen war bereits zu diesem frühen Zeitpunkt zu sehen. Zellen, bei denen ein *XYLT2 knockdown* durchgeführt wurde, befanden sich 24 h nach der siRNA Transfektion größtenteils in Suspension und wiesen dementsprechend eine runde Morphologie auf. Nach weiteren 48 h (insgesamt 72 h nach der Transfektion) bildeten die Kontrollzellen größere Zellcluster und Polaritäten aus (periphere, längliche Zellausläufer). Die mit der *XYLT2* siRNA transfizierten Zellen bildeten nach dieser Zeit nur vereinzelt größere Cluster aus und wiesen weiterhin eine zum Großteil runde Morphologie auf. Zu diesem Zeitpunkt wurden interessanterweise auch Zellen detektiert, die einen seneszenten Phänotyp aufwiesen (Abb. 3.9, rote Pfeile). Durch die zeitliche Degradation der siRNA ähnelte die Morphologie der *XYLT2 knockdown* Zellen nach 96 h der der Kontrollzellen nach 72 h.

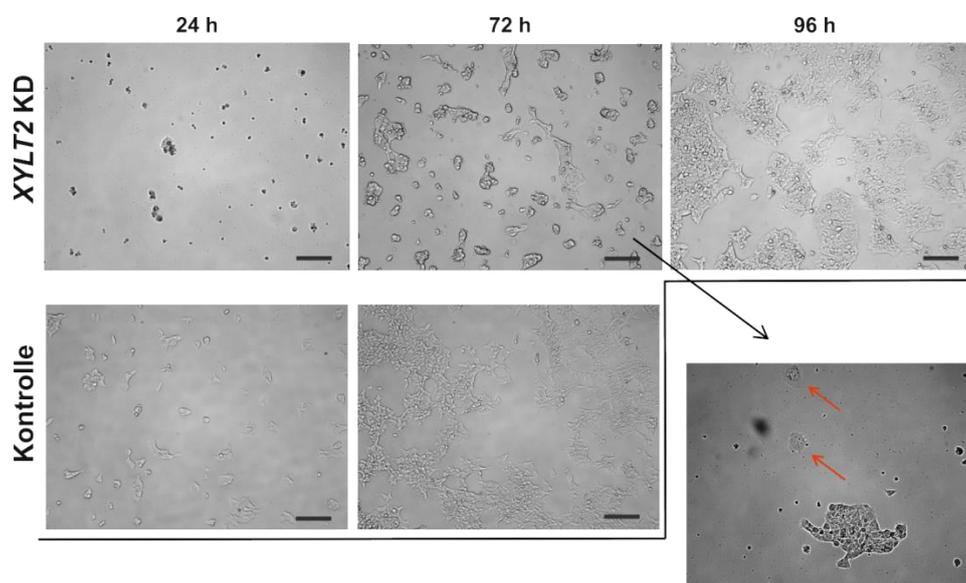


Abbildung 3.9: Mikroskopische Hellfeldaufnahmen der Morphologien von HEK293-Zellen nach Durchführung eines *XYLT2* siRNA *knockdowns*. Die HEK293-Zellen wurden nach dem Aussäen mit 40 nM einer Kontroll- (Kontrolle) oder *XYLT2*-siRNA (*XYLT2* KD) transfiziert. Nach 24, 72, und 96 h wurden die Morphologien der Zellen miteinander verglichen. Die roten Pfeile (*XYLT2* KD, stärkere Vergrößerung (40x), 72 h) deuten auf Zellen mit einem seneszenten Phänotyp. Maßstab = 100 μ m.

3.2.1.2 Analyse der Genexpression und XT-Aktivität

In Übereinstimmung mit vorherigen Arbeiten [47] konnte auf mRNA-Ebene keine *XYLT1*-Expression nachgewiesen werden. Die *XYLT2* Genexpression war, bedingt durch den erfolgreichen *knockdown*, im Vergleich zu den Kontrollen 0,3-fach (Abb. 3.10 a) erniedrigt. Die mRNA-Expressionslevel von *ACAN* (4,2-fach, Abb. 3.10 b), *ELN* (2,8-fach, Abb. 3.10 c) und *FN1* (1,9-fach, Abb. 3.10 d) waren nach der *XYLT2* siRNA Behandlung signifikant erhöht.

Im Vergleich zu den Kontrollen war die im radiochemischen Assay bestimmte, extrazelluläre XT-Aktivität in den behandelten Zellen 2,6-fach erhöht (Abb. 3.10 e).

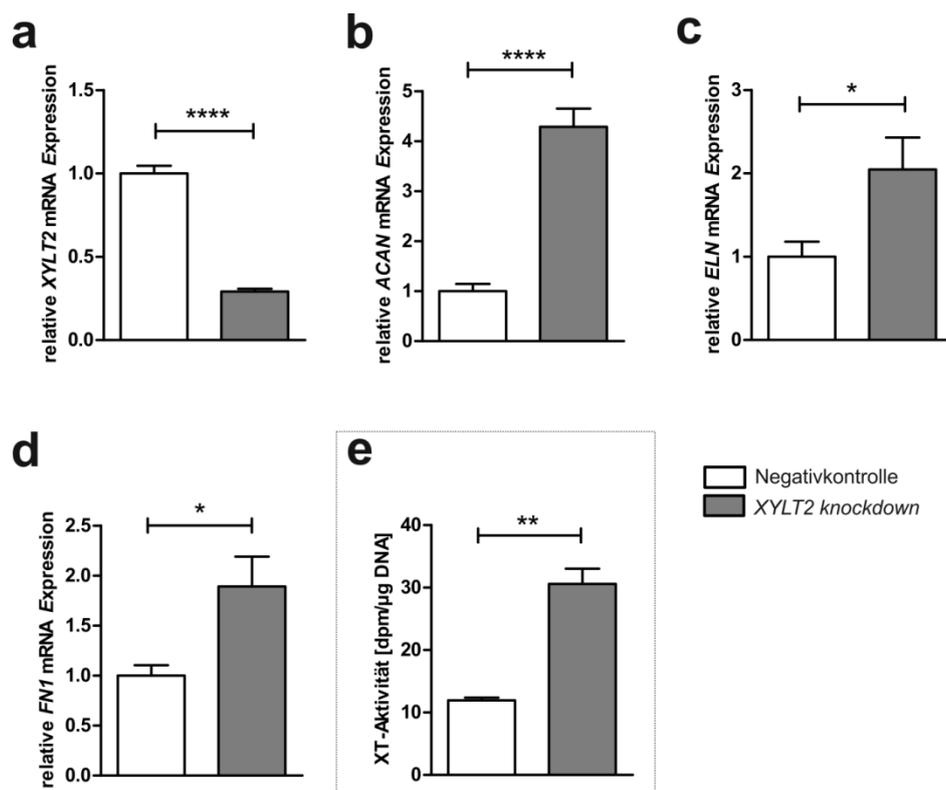


Abbildung 3.10: Relative Expressionen verschiedener Gene (a-d) und extrazelluläre XT-Aktivität (e) nach Durchführung eines siRNA-vermittelten *XYLT2* knockdowns in HEK293-Zellen. Die HEK293-Zellen wurden nach dem Aussäen mit 40 nM einer Kontroll- (Negativkontrolle) oder *XYLT2*-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT2* (a), *ACAN* (b), *ELN* (c) und *FN1* (d) in einer qPCR zu bestimmen. Die extrazelluläre XT-Aktivität (e) wurde nach 72 h im ZKÜ der Zellen bestimmt (radiochemischer XT-Test). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei (Genexpression) bzw. zwei (XT-Aktivität) technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$).

3.2.2 CRISPR/Cas9 vermittelter *XYLT2* knockout in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen weisen basal keine quantifizierbare *XYLT1* Genexpression auf [47]. Ein zusätzlicher siRNA *knockdown* des *XYLT2*-Gens führte u.a. zu einer verminderten Proliferation und starken morphologischen Veränderungen der Zellen. Diese Ergebnisse

ließen vermuten, dass verminderte Expressionen beider XT-Isoformen einen essenziellen, direkten Einfluss auf das Wachstum und die Viabilität der Zellen haben könnten. Um dies näher zu untersuchen wurde eruiert, ob HEK293-Zellen nach Einführung eines CRISPR/Cas9-vermittelten stabilen *XYLT2 knockouts* weiterhin vital und proliferativ sind.

3.2.2.1 Transfektion und Zellvereinzellung

Es wurden 1×10^5 HEK293-Zellen pro Kavität einer 12-Kavitätenplatte ausgesät und am nächsten Tag mit dem Plasmid PX458 transfiziert, auf dem alle, für das CRISPR/Cas9-basierte *gene-editing* relevanten, Komponenten kodiert waren. Neben der Cas9- und der gRNA- Sequenz beinhaltete das Plasmid eine GFP-kodierende Sequenz zur Bestimmung der Transfektionseffizienz. Es wurden vergleichend zwei unterschiedliche Vektoren transfiziert, die sich lediglich bezüglich der in den Vektor klonierten gRNA-Sequenzen unterschieden. Die gRNA-Sequenzen waren dabei komplementär zu Bereichen im Exon 2 und Exon 9 des *XYLT2* Gens (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Sequenzen der komplementär im Exon 2 und Exon 9 des *XYLT2* Gens bindenden gRNAs.

Exon	gRNA (5' → 3')	PAM-Sequenz (5' → 3')
2	GGCTGGGAGCCTCATGCCCA	AGG
9	GGCGCAGTGACCAGGCCAGC	CGG

24 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz (~ 60 %) anhand der GFP-Expression visuell am Fluoreszenzmikroskop bestimmt (Abb. 3.11).

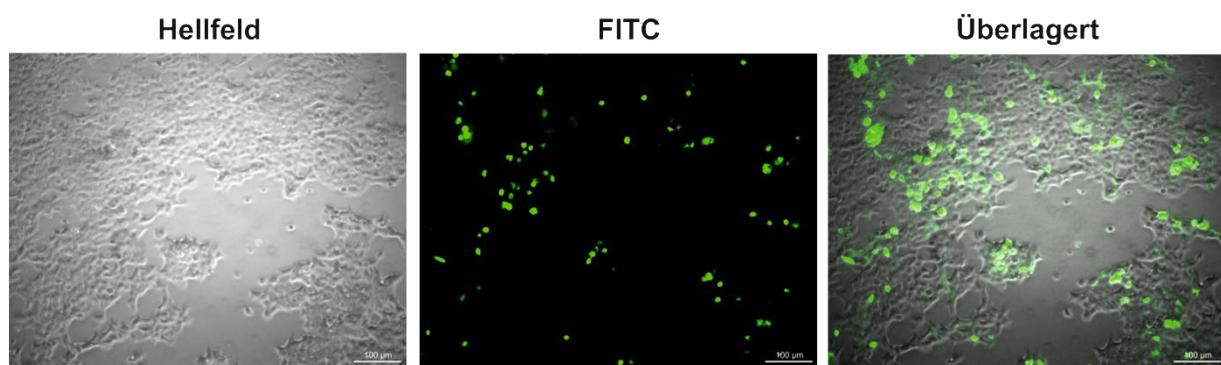


Abbildung 3.11: Bestimmung der Transfektionseffizienz nach erfolgreicher Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). Pro Kavität einer 12-Kavitätenplatte wurden 1×10^5 HEK293-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit 1,5 µg des Plasmids PX458 transfiziert (*Lipofectamine* LTX). Der Vektor kodiert für GFP, wodurch die Transfektionseffizienz nach 24 h am Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden konnte. Maßstab = 100 µm.

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und in einer Konzentration von 5 Zellen/mL in Zellkulturmedium verdünnt. Pro Kavität einer 96-Kavitäten Platte wurden 200 µL der Zellsuspension ausgesät und am nächsten Tag mikroskopiert. Kavitäten, in denen Einzelklone detektiert wurden, wurden markiert und die Viabilität und das Wachstum

der Zellen regelmäßig beobachtet. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen sukzessive passagiert, bis sie letztendlich von einer 100 x 20 mm Schale geerntet wurden. Von den anfangs detektierten Einzelklonen sind lediglich 7,2 % (6/83, Exon 2) bzw. 8,8 % (9/102, Exon 9) bis zur Konfluenz auf einer 100 x 20 mm Zellkulturschale gewachsen.

3.2.2.2 Charakterisierung der Mutationen in den generierten Zellklonen

Nachdem die DNA aller proliferativen Klone isoliert wurde, wurden, unter Verwendung der in Tabelle 6.4 aufgeführten Primer, zwei PCRs zur Amplifizierung der zu den gRNAs komplementären Bereiche im *XYLT2* Gen durchgeführt.

Im Vergleich zu der Referenzsequenz (*genbank accession ID*: NG_012175.1) wies die sequenzierte DNA von 66,6 % (4/6, Exon 2) bzw. 88,8 % (8/9, Exon 9) der Klone keine Mutationen innerhalb der amplifizierten Bereiche auf. Die DNA-Sequenzen der restlichen Zellklone stimmten lediglich im 5'-Bereich mit denen der jeweiligen Referenzsequenz überein. In den zu den gRNAs komplementären Bereichen zeigten die durch die Sequenzierung generierten Elektropherogramme an vielen Positionen Basenüberlagerungen, wodurch die weitere Basenabfolge nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch, vergleichend zur Referenzsequenz, die Sequenzen der Klone 1 und 2, die im Bereich von Exon 2 des *XYLT2*-Gens Mutationen zeigten.

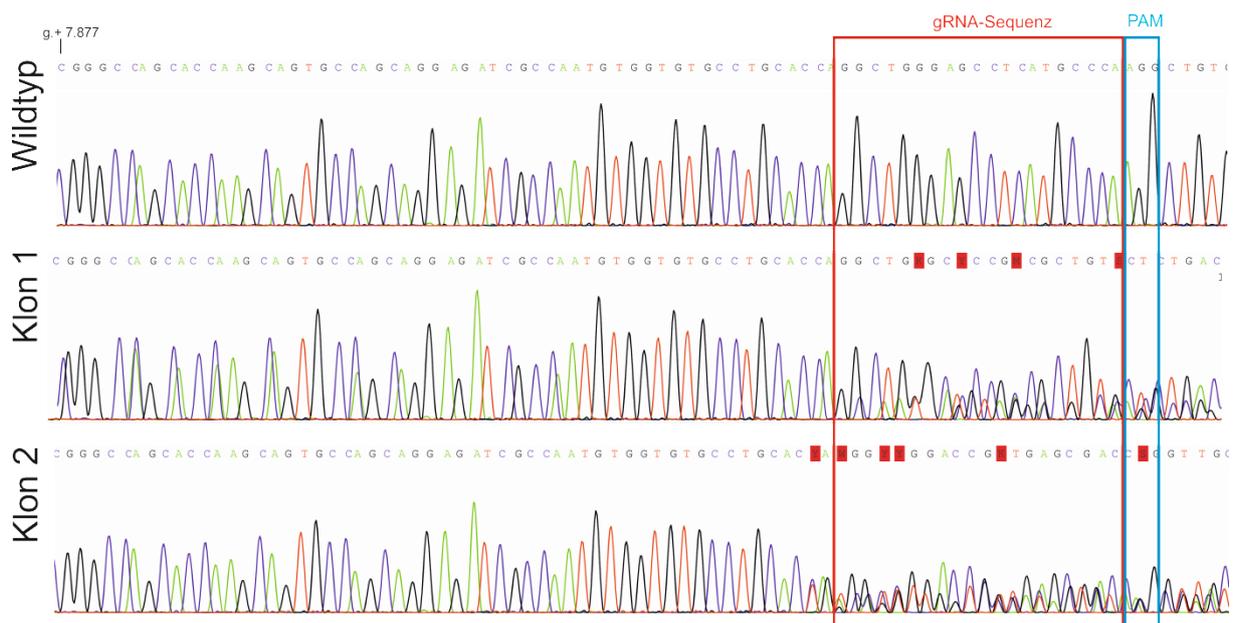


Abbildung 3.12: Vergleich der DNA-Sequenzen der mittels CRISPR/Cas9-System generierten HEK293-Klone 1 und 2 mit der Referenzsequenz im zur gRNA komplementären Bereich innerhalb von Exon 2 des *XYLT2* Gens. Die dargestellten Sequenzen beginnen jeweils bei Base g.+ 7.877 (*genbank accession ID*: NG_012175.1). Hervorgehoben sind die gRNA-Sequenz zur komplementären Bindung im Exon 2 des *XYLT2* Gens (rote Umrandung) und die für die Cas9-Bindung (*S. pyogenes* Cas9) essenzielle PAM-Sequenz (blaue Umrandung).

Zur Separierung der Allele und einer damit verbundenen, besseren Charakterisierung der heterozygoten Mutationen wurde eine TA-Klonierung durchgeführt.



Abbildung 3.13: Sequenz-Alignment der Allel-spezifischen Sequenzen im Bereich der zur gRNA komplementären Sequenz im Exon 2 (a) und Exon 9 (b) des XYL2 Gens. Die Allele der Klone 1 (3 Allele) und 2 (2 Allele) (XYLT2, Exon 2) und des Klons, der nach Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems Mutationen im Exon 9 des XYL2 Gens aufwies (2 Allele), wurden mittels TA-Klonierung separiert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen beginnen an Position g.+ 7.909 (Exon 2) bzw. an Position g.+ 11.051 (Exon 9) in der aus den HEK293-Zellen isolierten genomischen DNA. Hervorgehoben sind die gRNA-Sequenzen zur komplementären Bindung im Exon 2 (a) und Exon 9 (b) des XYL2 Gens (rote Umrandungen) und die für die Cas9-Bindung (*S. pyogenes* Cas9) essenziellen PAM-Sequenzen (blaue Umrandungen). Referenzsequenz: *genbank accession ID* NG_012175.1. Grün = komplementäre Bereiche, weiß = Deletierte Bereiche.

Tabelle 3.2: Spezifizierung der CRISPR/Cas9-vermittelten Mutationen in den Exons 2 und 9 des XYL2 Gens und deren Auswirkung auf die Proteinbiosynthese (nach HGVS (*Human Genome Variation Society*) [138]).

		Deletion [bp]	Art der Mutation
Exon 2	Klon 1	21	<i>In-frame</i> (p. (Gly195_Ala201del))
		16	<i>Frameshift</i> (p. (Ala194Profs*10))
		16	<i>Frameshift</i> (p. (Ala194Profs*10))
	Klon 2	21	<i>In-frame</i> (p. (Gly195_Ala201del))
		8	<i>Frameshift</i> (p. (Leu197Glnfs*14))
Exon 9	Klon 1	6	<i>In-frame</i> (p. (Gln639_Ala640del))
		4	<i>Frameshift</i> (p. (Ser641Glyfs*64))

Die in der Abbildung 3.13 dargestellten Sequenz-Alignments der durch die TA-Klonierung identifizierten Sequenzen zeigen die Heterogenität der CRISPR/Cas9-vermittelten Mutationen auf, wobei die Cas9-Endonuklease den DSB in den meisten Fällen (5/7, 71 %) 3 bp *upstream* der PAM-Sequenz einfügte.

Für jeden der analysierten Klone konnte jeweils eine *in-frame* Mutation nachgewiesen werden, die auf dem betreffenden Allel zu keiner Verschiebung des Leserasters führte. Bei den beiden Klonen, die Mutationen im Exon 2 aufwiesen, wurden dabei jeweils 21 Basen

deletiert, wodurch das 865 AS lange XT-II Protein um 7 AS verkürzt gebildet wurde. Die *in-frame* Mutation des Klons, der im Exon 9 heterozygote Mutationen aufwies, war durch eine Deletion von 6 bp charakterisiert, was zu einem Verlust von 2 AS im Protein führte. Die zwei Klone, bei denen das CRISPR/Cas9-System im Exon 2 durchgeführt wurde, wiesen darüber hinaus noch auf zwei (Klon 1, jeweils 16 bp) bzw. einem (Klon 2, 8 bp) Allel *frameshift*-Mutationen auf. Für den Klon, der Mutationen im Exon 9 des *XYLT2* Gens aufwies, wurde ein weiteres Allel mit einer 4 bp Deletion (*frameshift*) gefunden (Tab. 3.2).

Die *frameshift*-Mutationen führten zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons, was die Bildung verkürzter XT-II Proteine zur Folge hatte (Tab. 3.2). Die proliferativen Klone wiesen somit allesamt mindestens ein funktionales Allel auf.

Um beurteilen zu können, ob die beschriebenen Mutationen einen Einfluss auf die *XYLT2* Genexpression haben, wurde abschließend eine qPCR-Analyse durchgeführt. Im Vergleich zu HEK293-Wildtyp Zellen war die *XYLT2* mRNA Expression in den Zellen von Klon 1 (Exon 2) 1,4-fach erhöht. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die weiteren beiden Klone (Exon 2, Klon 2 und Exon 9, Klon 1) keine signifikant veränderten *XYLT2*-Expressionen (Abb. 3.14). Insgesamt konnte somit kein proliferativer HEK293-Klon detektiert werden, der einen nachweisbaren, CRISPR/Cas9-vermittelten *XYLT2* *knockout* aufwies.

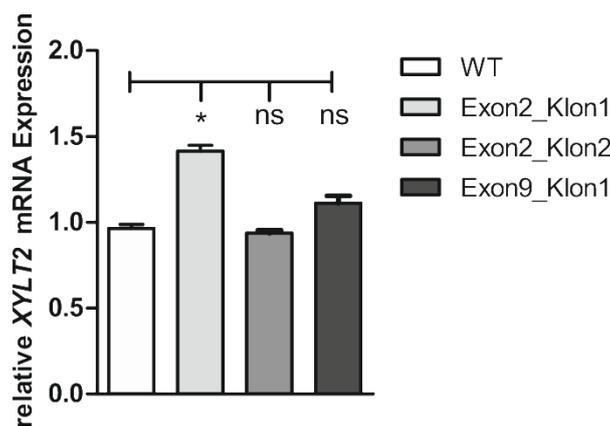


Abbildung 3.14: Relative *XYLT2* mRNA Expressionen der Zellklone, die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutationen im *XYLT2* Gen aufwiesen. Die HEK293-Klone und -Wildtypzellen wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h in Zellkulturmedium kultiviert. Nach der RNA-Isolierung und der cDNA-Synthese wurden die relativen *XYLT2* mRNA-Expressionslevel mittels qPCR bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,1$).

3.3 Entwicklung eines XT-I spezifischen UPLC MS/MS XT-Aktivitätstests

Zur Quantifizierung der XT-Aktivität wurde bisher, neben dem radiochemischen (RC) XT-Test, ein bereits publizierter eindimensionaler MS XT-Test verwendet [139]. Beim vornehmlich XT-I spezifischen RC XT-Test wird die zu analysierende Probe u.a. mit Seidenfibroin (Akzeptor) und radiomarkierter UDP-[¹⁴C]-Xylose (Substrat) inkubiert. Der Reaktionsansatz wird bei 37 °C inkubiert, wobei sich die Xylosylierung des Seidenfibroins proportional zur XT-Aktivität in der Probe verhält. Die Menge an radioaktiv markiertem xylosyliertem Peptid wird anschließend in einer Szintillationsmessung bestimmt [52]. Das Prinzip des XT-II spezifischeren MS XT-Tests beruht auf dem Nachweis eines xylosylierten Peptids (K1-Peptid), dessen Konzentration proportional zur XT-Aktivität ist. Die zu analysierende Probe wird zusammen mit dem Peptid und der UDP-Xylose (natürliches Substrat der XT) bei 37 °C inkubiert. Die XT-Aktivität der Probe wird durch die anschließende Integrierung der Peakfläche (xylosyliertes Peptid) am Massenspektrometer bestimmt (Abb. 3.15).

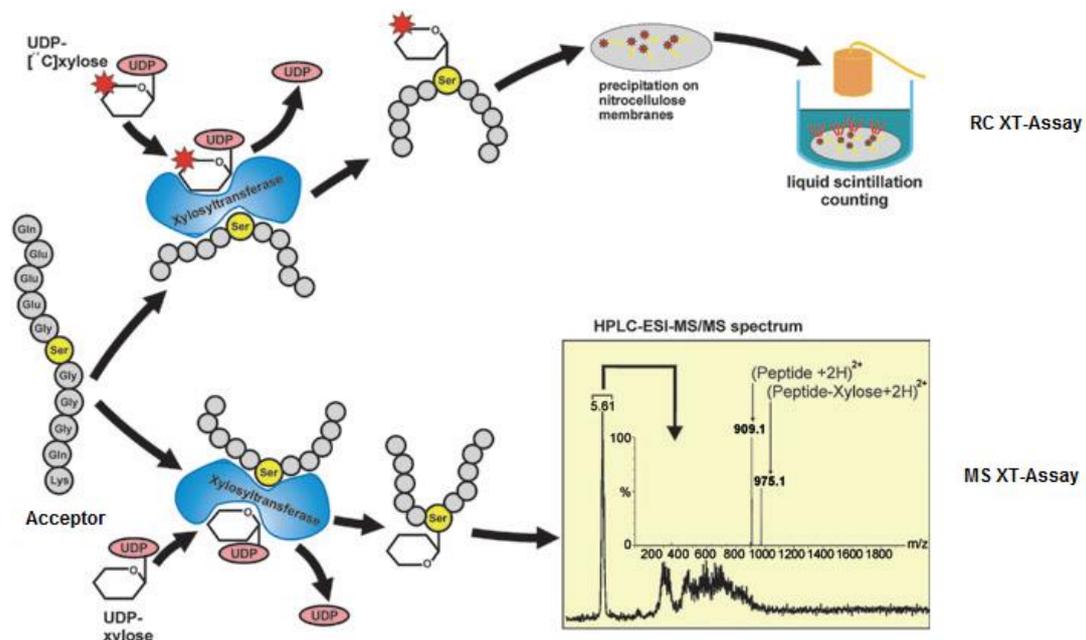


Abbildung 3.15 [52]: Vergleichender schematischer Ablauf des RC und MS XT-Aktivitätstests. Der RC XT-Test (oberer Pfad) basiert auf der XT-katalysierten Inkorporation radiochemischer [¹⁴C]-Xylose auf einen Serinrest des als Akzeptor verwendeten Seidenfibroins. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes (enthält u.a. die zu analysierende Probe, UDP-[¹⁴C] Xylose und den Akzeptor) für 1,5 h bei 37 °C werden die xylosylierten Peptide auf einer Nitrozellulose-Membran gefällt und überschüssige Xylose entfernt. Die Menge an xylosyliertem Peptid wird radiochemisch am Szintillationszähler bestimmt und ist proportional zur XT-Aktivität der Probe. Der für den MS XT-Test verwendete Reaktionsansatz enthält u.a. ein synthetisches Peptid als Akzeptor, nicht-radioaktiv markierte UDP-Xylose und die zu analysierende Probe. Nach einer Inkubation für 24 h bei 37 °C wird der Reaktionsansatz chromatographisch aufgetrennt und das xylosylierte Peptid spezifisch am MS detektiert, wobei die integrierte Peakfläche proportional zur XT-Aktivität der Probe ist.

Dadurch, dass das bisher verwendete K1-Peptid stärker von der XT-II als von der XT-I xylosyliert wird, konnten mit Hilfe dieses Tests bisher primär Aussagen über die XT-II Aktivität getätigt werden. Darüber hinaus sollte, aus ökonomischen Gründen und zur Vermeidung radiochemischer Arbeiten, der alternative (XT-I spezifische) radiochemische XT-Test ersetzt werden. Aus diesen Gründen sollte, durch die Identifizierung eines Isoform-spezifischen Peptids, im Rahmen dieser Arbeit ein XT-I spezifischer MS XT-Test entwickelt werden.

3.3.1 Identifizierung eines XT-I spezifischen Akzeptorpeptids

Die Sequenz des bisher im MS XT-Test als Akzeptor verwendeten synthetischen K1-Peptids leitet sich vom Bikunin ab und enthält N- und C-terminale Modifikationen (Biotinyl bzw. Fluorescein). Um zu überprüfen, ob die Modifikationen für den Nachweis des Peptids essenziell sind, wurde das unmodifizierte bzw. das nur C- oder N-terminal modifizierte Peptid im Reaktionsansatz eingesetzt. Da keine der drei Peptidvarianten massenspektrometrisch nachweisbar war, beinhalteten die im weiteren Verlauf untersuchten Peptide am C-Terminus einen Fluorescein (FL)- und am N-Terminus einen Biotinylrest (Bio).

Für jedes Peptid wurde zunächst die spezifische Fragmentierung (Vorläufer-Ion → Produkt-Ion) und die dafür optimale Konus-Spannung und Kollisionsenergie am MS ermittelt (siehe Tab. 11.1). Um Isoform-spezifische Aussagen über die Xylosylierung der Peptide tätigen zu können, wurden die zu testenden Peptide mit Zellkulturüberständen inkubiert, die nur eine der beiden XT-Isoformen (XT-I oder XT-II) enthielten. Generiert wurden die Überstände durch die Kultivierung von CHO pgsA-745 Zellen, die zuvor mit einem Plasmid transfiziert wurden, das entweder die gesamte XT-I (pSS1) oder XT-II (pCMV6-XL6-XYLT2) cDNA enthielt. Durch die ursprüngliche XT-Defizienz der CHO pgsA-745 Zellen entstanden CHO-Zellen, die die jeweiligen Vollängenproteine exprimierten [140]. Nach einer Inkubation von 24 h bei 37 °C wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei 99 °C denaturiert, zentrifugiert und der Überstand für die MS Analyse verwendet. Die Isoform-spezifischen Xylosylierungen wurden massenspektrometrisch, durch die Quantifizierung der integrierten Peakflächen des xylosylierten Peptids, ermittelt und vergleichend zueinander ins Verhältnis gesetzt. Zunächst wurden vom K1-Peptid abgeleitete Peptide getestet, die sich an unterschiedlichen AS-Positionen vom K1-Peptid unterschieden (Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: AS-Sequenzen K1-abgeleiteter Peptide und das jeweilige Verhältnis der Isoform-spezifischen Xylosylierung. N.x. = nicht xylosyliert; Bio = Biotinyl; FL = Fluorescein.

Trivialname Peptid	AS-Sequenz (N → C)	Peptid-Xyl (XT-I : XT-II)
K1	Bio-QEEEGSGGGQKK-FL	1,0 : 1,7
P1	Bio-QLTTGSGGGQKK-FL	1,7 : 1,0
P2	Bio-QEEERSGGGQKK-FL	n.x.
- 1N	Bio- EEEGSGGGQKK-FL	1,0 : 1,3
K3	Bio- EEEGSGGGQ K-FL	1,0 : 1,7

Aus den ermittelten Verhältnissen (Tab. 3.3) wurde ersichtlich, dass drei der fünf getesteten Peptide stärker von der XT-II xylosyliert wurden (rote Zahlen). Dabei wurden das K1- und das K3-Peptid jeweils 1,7-fach und das -1N-Peptid 1,3-fach stärker von der XT-II xylosyliert. Im Vergleich zum K1-Peptid fehlte den Peptiden -1N und K3 die N-terminale Aminosäure Glutamin (Q), das K3-Peptid unterschied sich zusätzlich durch das Fehlen des C-terminalen Lysins (K). Beim P2-Peptid wurde an fünfter Position im Peptid ein Glycin (G) durch ein Arginin (R) substituiert. Durch den dadurch bedingten Verlust des -G-S-G- Motives kam es durch keine der beiden Isoformen zu einer Xylosylierung des Peptids (nicht xylosyliert, n.x.). Das P1-Peptid wurde zwar XT-I spezifischer (1,7-fach, grün) xylosyliert, jedoch waren die quantifizierten Peakflächen vergleichsweise gering, was für einen geringen Gesamtumsatz des Peptides spricht (siehe Tab. 11.1).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden die XT-I Aktivitäten von HEK293-ZKÜ vergleichend unter Verwendung diverser Akzeptoren einer Peptid-Bibliothek bestimmt [141]. Die Bibliothek entstand durch die sukzessive Substitution aller AS eines vom Bikunin abgeleiteten Moleküls (QEEEGSGGGQGG) durch alle 20 proteinogenen AS. Durch einen Lumineszenz-Assay wurde die XT-I Aktivität für jedes Peptid der Bibliothek bestimmt und in ein prozentuales Verhältnis zum Bikunin gesetzt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden fünf Peptide, für die in der Studie eine hohe XT-I Aktivität nachgewiesen wurde, ausgewählt und deren Isoform-spezifische Xylosylierung massenspektrometrisch detektiert (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: AS-Sequenzen abgeleiteter Peptide aus der Publikation von Briggs *et al.* und das jeweilige Verhältnis der Isoform-spezifischen Xylosylierung; Bio = Biotinyl; FL = Fluorescein.

Trivialname Peptid	AS-Sequenz (N → C)	Peptid-Xyl (XT-I : XT-II)
KE-74301	Bio-QEEEGSGGPQGGK-FL	1,0 : 1,0
KE-74302	Bio-QEEEGSGVGQGGK-FL	1,0 : 1,3
KE-74303	Bio-QESSGSGGGQGGK-FL	2,2 : 1,0
KE-75524	Bio-QEPEGSGGGQGGK-FL	1,0 : 2,0
KE-75527	Bio-QEESGSGGGQGGK-FL	1,0 : 1,0
KE-75528	Bio-QEESGSGGGQGGK-FL	1,0 : 1,0

Die aus der Publikation abgeleiteten Peptide hatten eine Länge von 12 AS und wurden mit dem Biotinyl- bzw. Fluoresceinrest am N- und C-Terminus synthetisiert. Das Fluorescein war dabei jeweils an ein endständiges Lysin (K) gebunden. Das Peptid KE-74301, bei dem eine AS an der 8. Position im Peptid substituiert wurde (G → P), wurde von beiden XT gleich stark xylosyliert. Das Peptid KE-74302, das im Vergleich zum Bikunin an der 7. Position ein Valin (G → V) aufwies, wurde 1,3-fach stärker von der XT-II xylosyliert. Das Peptid KE-74303, bei dem an der dritten und vierten Position jeweils ein Glutamat durch ein Serin (E → S) substituiert wurde, wurde 2,2-fach stärker von der XT-I xylosyliert. Darüber hinaus wurde, anhand der Peakflächen, ein hoher Gesamtumsatz des Peptides detektiert (siehe Tab. 11.1). Das durch die einzelne Substitution des Glutamats (3. AS-Position im Bkiunin-Peptid) durch Prolin (KE-75524) entstandene Peptid wurde 2,0-fach stärker von der XT-II umgesetzt. Eine Serin-Substitution (E → S) an derselben Stelle führte zu keiner Isoform-spezifischen Xylosylierung des entstandenen Peptids (KE-75527). Nach der Substitution eines einzelnen Serins an der vierten Position im Peptid (KE-75528) konnte ebenfalls keine Isoform-spezifische Xylosylierung des Akzeptors detektiert werden.

3.3.2 Validierung des XT-I spezifischen MS XT-Aktivitätstests unter Verwendung des Akzeptorpeptids KE-74303

Die weiterführenden Optimierungen des MS XT-Tests wurden unter Verwendung des Peptides KE-74303 als Akzeptor durchgeführt. Als Enzymquelle wurden weiterhin die Isoform-spezifischen Zellkulturüberstände verwendet. Zunächst wurden die Inkubationszeiten variiert und die resultierenden Isoform-spezifischen Umsätze, durch Quantifizierung der Peakflächen der xylosylierten Peptide, zeitabhängig bestimmt (Tab. 3.5).

Tabelle 3.5: Isoform-spezifische Xylosylierung des Peptids KE-74303 in Abhängigkeit zur Inkubationszeit.

Inkubationszeit [h]	Peptid-Xyl (arbitrary unit)		Verhältnis (XT-I : XT-II)
	XT-I	XT-II	
4	4613	2335	2,0 : 1,0
18	31222	15799	2,0 : 1,0
24	27819	12778	2,2 : 1,0
41	24915	22968	1,1 : 1,0

Durch das Variieren der Inkubationszeiten konnte gezeigt werden, dass das Peptid KE-74303 nach 24 h am spezifischsten von der XT-I xylosyliert wurde und die Verhältnisse sich nach einer Inkubationszeit von 41 h angleichen. Anhand der Peakflächen des xylosylierten Peptids wurde ersichtlich, dass der Gesamtumsatz nach 4 h Inkubationszeiten für beide XT-Isoformen gering war. Im Gegensatz dazu wurden nach 18 h die höchsten Peakflächen quantifiziert.

Als nächstes wurde die Linearität des Tests, unter Verwendung des Peptids KE-74303 und ausschließlich XT-I spezifischer Überstände, bestimmt. Dazu wurden die Reaktionsansätze für 24 h bei 37 °C inkubiert und die Peakflächen der xylosylierten Peptide in Abhängigkeit zum Injektionsvolumen bestimmt (Abb. 3.16).

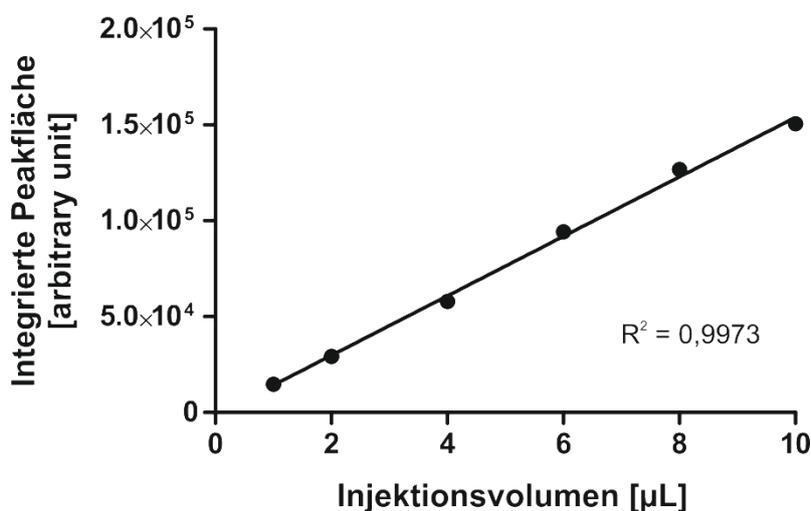


Abbildung 3.16: Lineare Regression zur Bestimmung der Linearität des MS XT-Tests nach Injektion verschiedener Reaktionsvolumina. Aufgetragen wurden die aus der XT-I katalysierten Xylosylierung des KE-74303 Peptids resultierenden Peakflächen gegen die Injektionsvolumina.

Für die lineare Regression wurde die massenspektrometrisch ermittelte Peakfläche des xylosylierten KE-74303 Peptides gegen das jeweilige Injektionsvolumen der Probe

aufgetragen. Das sich aus der linearen Regression ergebende Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,9973 zeigte, dass der Test bis zu einem Injektionsvolumen von mindestens 10 μL linear ist.

3.3.3 Methodenvergleich zur Bestimmung der XT-I Aktivität

Für die Validierung wurden die XT-Aktivitäten verschiedener Proben vergleichend mit dem radiochemischen (RC) und dem MS XT-I Test ermittelt. Für die Quantifizierung der massenspektrometrisch bestimmten Proben wurde eine Standardreihe vermessen, die das xylosylierte Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Bei den Proben handelte es sich um Zellkulturüberstände zweier neonataler NHDF Zelllinien (NHDF1, NHDF2) und einer XT-I defizienten Fibroblastenzelllinie (XT-I_{Def}), die durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen (basal, serumreduziert, TGF- β 1 induziert) der Zellen entstanden. Zur Bildung der in Tabelle 3.6 angegebenen Verhältnisse wurden die für die jeweilige Bedingung und Zelllinie ermittelten *dpm*-Werte (RC-Test) bzw. die Peakflächen des xylosylierten Peptids (MS-Test) gemittelt und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 3.6: Vergleichsmessungen zwischen dem RC XT-I Test und dem MS XT-I Test. Verglichen wurde jeweils das Verhältnis der gemittelten Testwerte (*dpm*-Werte (RC-Test) oder Peakflächen des xylosylierten KE-74303 Peptids (MS-Test)) für verschiedene Zelllinien unter unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Zusätzlich wurden die induktiven Effekte (Änderung der XT-Aktivität nach TGF- β 1 Induktion) berechnet und miteinander verglichen. Berechnet wurden jeweils die Mittelwerte von zwei biologischen und zwei technischen Replikaten.

Bedingung	Vergleich	RC	MS
0,1 % FCS	NHDF1 : NHDF2	0,98	1,01
	NHDF1 : XT-I _{Def}	1,75	1,32
	NHDF2 : XT-I _{Def}	1,79	1,31
0,1 % FCS +TGF- β 1	NHDF1 : NHDF2	0,84	0,81
	NHDF1 : XT-I _{Def}	12,18	5,04
	NHDF2 : XT-I _{Def}	14,55	6,23
10 % FCS	NHDF1 : NHDF2	2,21	2,95
	NHDF1 : XT-I _{Def}	7,77	10,11
	NHDF2 : XT-I _{Def}	3,51	3,43
Induktiver Effekt	NHDF1 _{TGF} : NHDF1 _{0,1}	7,03	4,02
	NHDF2 _{TGF} : NHDF2 _{0,1}	8,25	5,00
	XT-I _{Def} (TGF) : XT-I _{Def} (0,1)	1,01	1,05

In Tabelle 3.6 sind die im RC- und MS XT-I Test ermittelten XT-Aktivitätsverhältnisse der einzelnen Zelllinien zueinander aufgelistet. Die Zellen wurden jeweils basal (10 % FCS), serumreduziert (0,1 % FCS) oder serumreduziert und mit TGF- β 1 induziert (0,1 % FCS + TGF- β 1) kultiviert.

Die anhand der Werte des RC-Tests ermittelten Verhältnisse zwischen den beiden NHDF (NHDF1:NHDF2) stimmten für alle Bedingungen mit denen des MS XT-I Tests überein. Im

Vergleich zum MS-Test waren die durch den RC XT-Test berechneten Verhältnisse zwischen den NHDF und der XT-I defizienten (XT-I_{Def}) Zelllinie meist höher, wobei die Unterschiede nach Behandlung der Zellen mit TGF- β 1 am größten waren. Zusätzlich wurde noch der durch TGF- β 1 vermittelte, induktive Effekt für jede Zelllinie bestimmt. Dabei wurden die nach TGF- β 1-Induktion ermittelten Werte zu denen ins Verhältnis gesetzt, die nach serumreduzierter Kultivierung der Zellen ermittelt wurden. Beide Tests zeigten, dass TGF- β 1 keinen induktiven Effekt auf die XT-I Aktivität in den XT-I defizienten Zellen hatte. Für die NHDF konnten durch beide Tests induktive Effekte gezeigt werden, wobei die im RC-Test ermittelten Effekte allesamt stärker waren.

3.4 Charakterisierung der ECM-Homöostase und Myofibroblasten-Differenzierung dermalen Fibroblasten eines Patienten mit einer *XYLT1*-Defizienz assoziierten skeletalen Dysplasie

Skeletale Dysplasien sind eine Gruppe von vererbaren genetischen Erkrankungen, die vor allem das Knochen- und Knorpelgewebe betreffen. Eine Form der skeletalen Dysplasie ist die Desbuquois skeletale Dysplasie (DBSD), die in zwei Typen unterschieden werden kann. Während DBSD Typ1 durch Mutationen im *CANT1* Gen ausgelöst wird [142], sind autosomal rezessive Mutationen im *XYLT1* Gen meist für die Entwicklung von DBSD Typ2 verantwortlich [65]. Königsbruggen *et al.* charakterisierten kürzlich dermale Fibroblasten eines Patienten, die *compound* heterozygote Mutationen im *XYLT1* Gen aufwiesen. Diese waren durch eine 3,3 Mb große Deletion auf Chromosom 16 und eine 18 bp Deletion innerhalb der Intron 7/Exon 8 Grenze auf dem zweiten Allel charakterisiert und führten zur Bildung von vier stark verkürzten, alternativen *XYLT1* mRNA-Transkripten. Der Patient entwickelte eine skeletale Dysplasie, die Ähnlichkeiten zu der DBSD aufwies [66].

Bisher wurden humane *XYLT1*-Mutationen meist mit skeletalen Erkrankungen assoziiert, wobei die XT-I auch als Mediator der Myofibroblasten-Differenzierung beschrieben wurde [76, 143]. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmals, durch die Charakterisierung der beschriebenen Patientenfibroblasten, untersucht werden, ob Mutationen im *XYLT1*-Gen Auswirkungen auf die Myofibroblasten-Differenzierung, ECM-Zusammensetzung und zelluläre Seneszenz dermalen Fibroblasten haben.

3.4.1 Vergleich der basalen Genexpressionen und XT-Aktivitäten

Um die basale Genexpression der Patientenfibroblasten mit denen zweier neonataler NHDF (M1FS, M1DFS) Zelllinien zu vergleichen, wurden die Zellen in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und für 48 h kultiviert. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden qPCR-Analysen zur Bestimmung der basalen mRNA-Expressionslevel unterschiedlicher Gene durchgeführt.

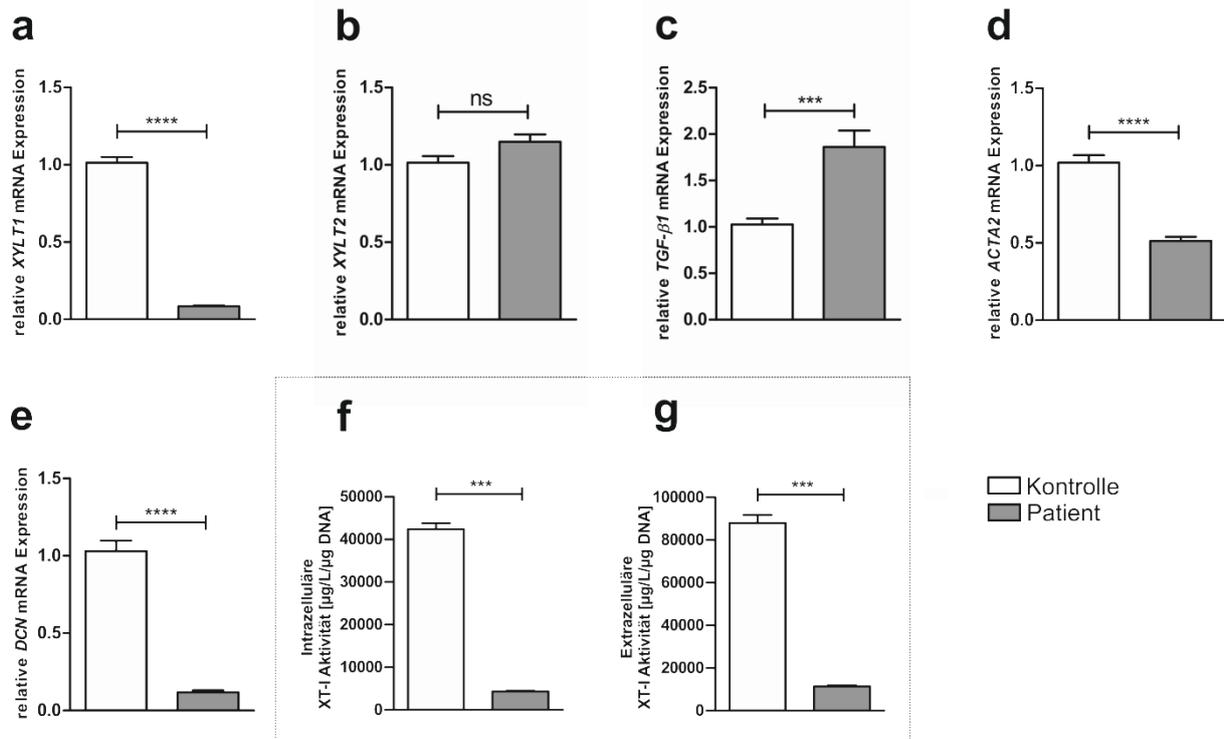


Abbildung 3.17: Vergleich der basalen, relativen mRNA-Expressionen und XT-Aktivitäten von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten. Die Kontroll (n=2) und Patienten Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Danach wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde verwendet, um die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT1* (a), *XYLT2* (b), *TGF-β1* (c), *ACTA2* (d) und *DCN* (e) mittels qPCR zu bestimmen. Die intrazellulären (f) und extrazellulären XT-Aktivitäten (g) wurden nach 72 h im MS XT-I Test bestimmt. Für die relative Quantifizierung der Proben wurden Standards vermessen, die das xylosylierte Peptid KE-74303 in bekannten Konzentrationen enthielten. Die daraus resultierenden Werte [µg/L] wurden auf die DNA-Konzentration normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei (Genexpression) bzw. zwei (XT-Aktivität) technische Replikate (ns = nicht signifikant; *** = p<0,001; **** = p<0,0001).

Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten die Patienten-Fibroblasten eine basal 0,1-fach verminderte *XYLT1* mRNA Expression, wohingegen keine Unterschiede in der *XYLT2* Expression detektiert wurden (Abb. 3.17 a,b). Interessanterweise wurden für die Expression des, die Myofibroblasten-Differenzierung induzierenden, Zytokins *TGF-β1* 1,8-fach höhere mRNA-Level in den Patienten-Zellen nachgewiesen (Abb. 3.17 c). Die Genexpressionen des Myofibroblasten-Markers *ACTA2* und des PG core-Proteins *DCN* waren, im Vergleich zu den Kontrollzellen, 0,5-fach und 0,1-fach reduziert (Abb. 3.17 d,e). Die basalen intrazellulären (Lysat) und extrazellulären (ZKÜ) XT-Aktivitäten wurden nach einer Kultivierungszeit von 72 h bestimmt, wobei der in dieser Arbeit entwickelte MS XT-I Test verwendet wurde. Im Vergleich zu den Kontrollen waren die intrazellulären- und extrazellulären XT-Aktivitäten unter basalen Bedingungen bei den Patienten-Fibroblasten gleich stark vermindert (jeweils 0,1-fach, Abb. 3.17 f,g).

3.4.2 Vergleich der Genexpressionen und XT-Aktivitäten nach TGF- β 1 vermittelter Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung

Zur Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung wurden die Fibroblasten einen Tag nach Durchführung eines Serumentzugs mit bzw. ohne 5 ng/mL TGF- β 1 behandelt.

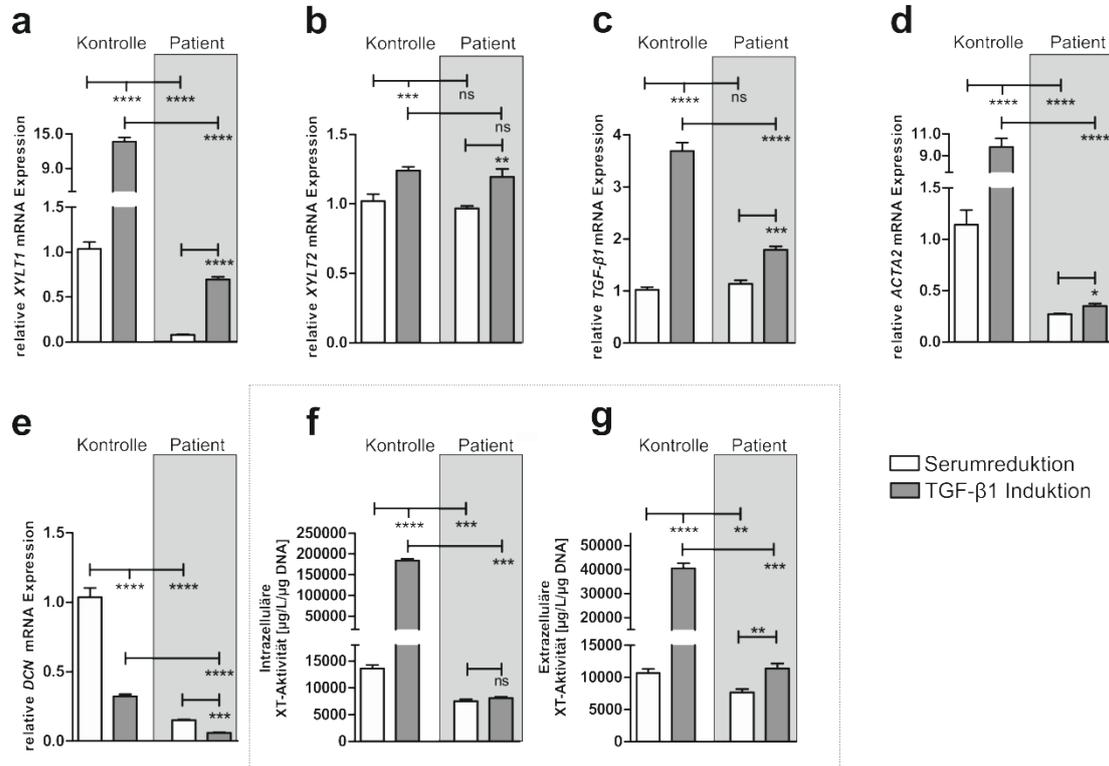


Abbildung 3.18: Vergleich der relativen mRNA-Expressionen und XT-Aktivitäten von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten nach serumreduzierter Kultivierung und TGF- β 1 Induktion. Die Kontroll (n=2) und Patienten-Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Serumentzug für 24 h durchgeführt und die Zellen danach mit TGF- β 1 induziert oder weiter in serumreduziertem Medium kultiviert. Nach 48 h wurde die RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qPCR wurden die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT1* (a), *XYLT2* (b), *TGF- β 1* (c), *ACTA2* (d) und *DCN* (e) mittels qPCR bestimmt. Die intrazellulären (f) und extrazellulären XT-Aktivitäten (g) wurden nach 72 h im MS XT-I Test bestimmt. Für die relative Quantifizierung der Proben wurden Standards vermessen, die das xylosylierte Peptid KE-74303 in bekannten Konzentrationen enthielten. Die daraus resultierenden Werte [μ g/L] wurden auf die DNA-Konzentration normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei (Genexpression) bzw. zwei (XT-Aktivität) technische Replikate (ns = nicht signifikant; ** = p<0,01; *** = p<0,001; **** = p<0,0001).

Im Vergleich zu den Kontrollen war die basale *XYLT1* Genexpression unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen in den Patienten-Zellen 0,1-fach vermindert. Die nach TGF- β 1-Behandlung beobachteten induktiven Effekte bzgl. der *XYLT1* Expression waren in den Patienten-Zellen (8,7-fach) schwächer als in den Kontrollzellen (13,2-fach) (Abb. 3.18 a). Interessanterweise waren die *XYLT2* mRNA Level unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen zwischen Kontroll- und Patientenfibroblasten vergleichbar. Die TGF- β 1 Supplementierung des Mediums führte ebenfalls zu gleich starken, induktiven Effekten (jeweils 1,2-fach) (Abb. 3.18 b). Die *TGF- β 1* Genexpression war auch unter serumreduzierten Zellkulturbedingungen in den Patienten-Fibroblasten tendenziell erhöht,

wobei der Unterschied nicht signifikant war. Nach Induktion der Zellen erhöhte sich die *TGF-β1* Expression in den Kontrollzellen 3,6-fach, in den Patientenzellen nur 1,6-fach (Abb. 3.18 c). Unter Serumentzug exprimierten die Fibroblasten des Patienten im Vergleich zu den Kontrollen 0,2-fach weniger *ACTA2*. Während die Kontrollzellen nach *TGF-β1* Induktion 8,6-fach höhere mRNA Level des Myofibroblasten-Markers aufwiesen, wurde die Expression in den Patienten-Fibroblasten nur 1,3-fach induziert (Abb. 3.18 d). Die Zellen des Patienten exprimierten das PG *core*-Protein *DCN* unter Serumentzug 0,1-fach geringer als die Kontroll-Fibroblasten. Die Expression wurde nach Supplementierung mit *TGF-β1* sowohl in den Kontrollen (0,3-fach), als auch in den Patientenzellen (0,4-fach) reprimiert (Abb. 3.18 e).

Unter Serumentzug wurden intrazellulär (0,6-fach) und extrazellulär (0,7-fach) verminderte XT-Aktivitäten in den Patientenzellen nachgewiesen. Bei den Kontrollzellen resultierte die *TGF-β1* Behandlung nach 72 h in einer 13,5-fach erhöhten intrazellulären XT-Aktivität. In den Patienten-Zellen wurde hingegen keine Änderung der intrazellulären Enzymaktivität nach der Behandlung mit dem Zytokin festgestellt. Eine Supplementierung des Zellkulturmediums mit *TGF-β1* führte sowohl bei den Kontrollen (3,8-fach), als auch bei den Fibroblasten des Patienten (1,5-fach) zu einer Erhöhung der extrazellulären XT-Aktivität, wobei die induktiven Effekte bei den Kontrollen erneut stärker waren (Abb. 3.18 f, g).

3.4.3 Quantifizierung der α -SMA Proteinexpression

Aufbauend auf den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse wurde eine Immunfärbung zum Nachweis des α -SMA Proteins in den Kontroll- und Patientenfibroblasten durchgeführt. Dafür wurden die Zellen wie zuvor unter drei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen (basal, serumreduziert, *TGF-β1*-induziert) kultiviert und nach 120 h für die Immunfärbung fixiert. Im Vergleich zu den Patienten-Fibroblasten wurde für die Kontrollzellen unter allen Kultivierungsbedingungen eine höhere (korrigierte) absolute Zell-Fluoreszenz (*corrected total cell fluorescence, CTCF*) ermittelt (Abb. 3.19 a,b). Im Vergleich zur Standardkultivierung der Kontrollzellen führte ein Serumentzug zu einer 0,3-fachen Verminderung des Fluoreszenzsignals (Abb. 3.18 b). Nach der *TGF-β1* vermittelten Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung wurde eine 2,9-fach höhere Fluoreszenz ermittelt (Abb. 3.19 b). Die induzierten Kontroll-Fibroblasten zeigten dabei einen charakteristischen Myofibroblasten-Phänotyp, der sich u.a. durch die Ausbildung von Stressfasern äußerte (Abb. 3.19 a). Bei den Patienten-Fibroblasten war die ermittelte Fluoreszenz unter basalen Bedingungen am höchsten. Durch hohe Standardfehler unterschieden sich die nach basaler Kultivierung berechneten *CTCF*-Werte allerdings nicht signifikant von denen, die unter serumreduzierten Bedingungen oder nach Induktion mit *TGF-β1* ermittelt wurden. Die α -SMA Expression ließ sich in den Patienten-Fibroblasten nicht induzieren und die Zellen entwickelten keine charakteristische Myofibroblasten-Morphologie. Auch die Zelldichte der

Patienten-Fibroblasten war, vor allem unter Serumentzug und nach TGF- β 1-Induktion, geringer als die der Kontrollzellen.

Ergänzend zur Immunfärbung wurde die basale α -SMA Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse in den Kontroll- und Patientenzellen quantifiziert. Während die Kontrollzellen das Glattmuskelaktin (42 kDa) ähnlich stark exprimierten, wurden im Lysat der Patientenzellen nur sehr geringe Konzentrationen des Proteins nachgewiesen. Die Bandenintensität war dabei 0,1-fach schwächer als die gemittelte Bandenintensität der Kontrollen (Abb. 3.19 c).

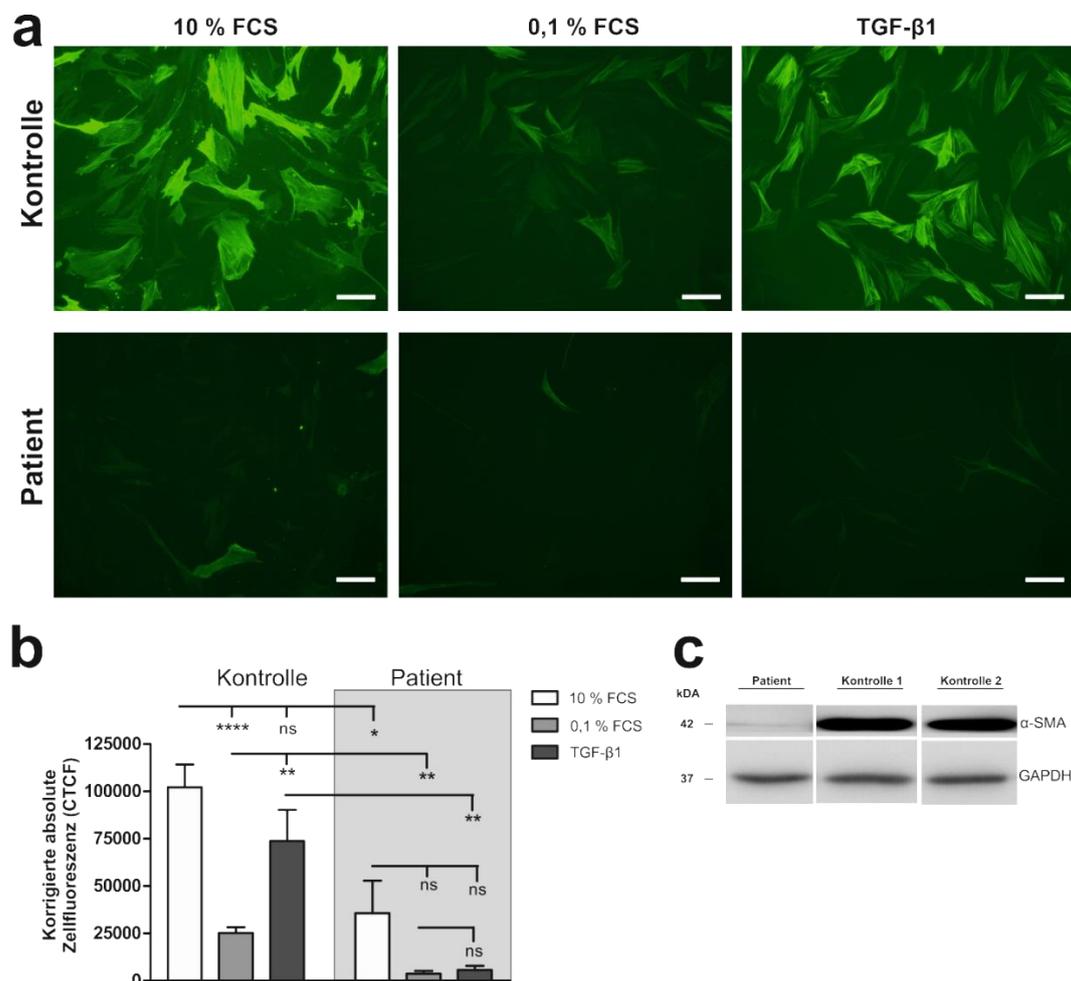


Abbildung 3.19: Quantifizierung der α -SMA Proteinexpression von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten mittels Immunfluoreszenz und Western Blot-Analyse. Kontroll- (n=2) und Patienten-Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät und ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 h entweder in Standard- oder serumreduziertem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Danach wurden die unter serumreduzierten Bedingungen kultivierten Zellen entweder mit TGF- β 1 oder einem äquivalenten Volumen Wasser behandelt und für weitere 120 h kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und die α -SMA Proteinexpression fluoreszenzbasiert detektiert (a) und mittels *ImageJ* quantifiziert (b). Für die Western Blot-Analyse wurden die Zellen für 72 h in Standard Zellkulturmedium kultiviert, lysiert und die Proteinkonzentration im BCA-Assay bestimmt. 20 μ g Protein wurden jeweils mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran transferiert. Der primäre α -SMA Antikörper, sowie der primäre GAPDH-Antikörper (Ladekontrolle) wurden 1:2000 verdünnt. Die Intensitäten der Proteinbanden wurden mit *ImageJ* quantifiziert und die Produktgrößen anhand eines aufgetragenen Größenmarkers bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von jeweils zwei biologischen und drei technischen Replikaten (ns = nicht signifikant; * = p<0,1; ** = p<0,01; **** = p<0,0001). Maßstab = 100 μ m.

3.4.4 Quantifizierung der TGF- β 1 Proteinexpression

Für die Quantifizierung der TGF- β 1 Proteinkonzentration im ZKÜ der Kontroll- und Patienten-Fibroblasten, nach Kultivierung unter basalen- und serumreduzierten Bedingungen, wurde ein kommerzieller Assay verwendet (*Quantikine ELISA Kit, R&D*). Die ermittelten TGF- β 1 Konzentrationen wurden anschließend jeweils auf die DNA-Konzentration der Zellen normiert.

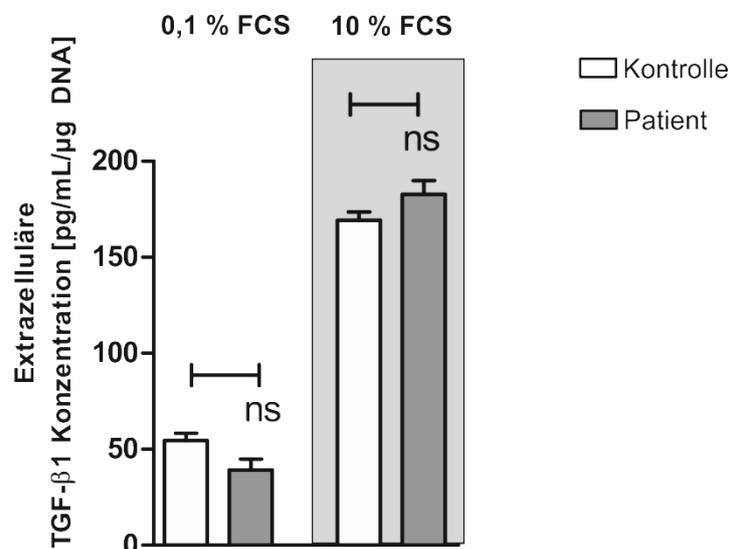


Abbildung 3.20: Quantifizierung der TGF- β 1 Proteinkonzentration im ZKÜ von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten. Kontroll- ($n = 2$) und Patienten-Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder in Standardmedium oder unter serumreduzierten Bedingungen (0,1 % FCS) für 72 h weiterkultiviert. Danach wurde der ZKÜ gesichert und das latente TGF- β 1 durch Ansäuerung aktiviert. Nach der Neutralisierung wurde die TGF- β 1 Konzentration der Proben in Doppelbestimmung mit dem *Quantikine ELISA Kit* bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Umsetzung eines Substrates durch die an den sekundären TGF- β 1 Antikörper gebundene Peroxidase und der photometrischen Quantifizierung des Produktes. Die bei 450 nm gemessene Absorption ist dabei proportional zur TGF- β 1 Konzentration der Probe. Durch das Mitführen einer Standardreihe konnte die TGF- β 1-Konzentration [pg/mL] der Proben bestimmt und auf den DNA-Gehalt [ng/μL] der Proben normiert werden. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und zwei technische Replikate (ns = nicht signifikant).

Die im ZKÜ bestimmten TGF- β 1 Proteinkonzentrationen waren bei den Patienten-Fibroblasten unter basalen Bedingungen (10 % FCS) 1,1-fach höher als die der Kontrollzellen, wobei der Unterschied nicht signifikant war. Im Vergleich zu den Kontrollzellen waren die TGF- β 1 Konzentrationen im ZKÜ der Patientenzellen unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen 1,4-fach niedriger, wobei der Unterschied nicht signifikant war (Abb. 3.20).

3.4.5 Wundheilungs- und Kontraktionsassay

Myofibroblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und weisen, im Vergleich zu undifferenzierten Fibroblasten, eine erhöhte Kontraktilität auf [144]. Um Aussagen über die Myofibroblasten-Differenzierung von Kontroll- und Patientenfibroblasten treffen zu

können, wurden Wundheilungs- und Kontraktionsassays nach TGF- β 1 Induktion der Zellen durchgeführt.

Für den Wundheilungsassay wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze eine artifizielle Wunde in den Zellmonolayer eingefügt und die Migration der Zellen über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Unter Serumentzug schlossen die Kontrollzellen die künstliche Wunde innerhalb von 60 h. TGF- β 1 induzierte Kontrollzellen migrierten anfangs sehr viel schneller in die Wunde und erreichten nach 72 h eine 100%ige Konfluenz. Die Patienten-Fibroblasten füllten die initial eingefügte Wunde zu keinem Zeitpunkt und unter keiner der angewandten Kultivierungsbedingungen vollständig. Unter Serumentzug erreichten die Patientenzellen nach 36 h eine Konfluenz von 61,5 %, innerhalb der folgenden 36 h stieg diese nur leicht auf 68,4 % an. Durch TGF- β 1 Induktion migrierten die Zellen schneller in den Bereich der artifiziellen Wunde, was nach 12 h zu einer Konfluenz in diesem Bereich führte, die mit der der unbehandelten Kontrollzellen zum selben Zeitpunkt vergleichbar war (45 %). Im weiteren Verlauf nahm die Konfluenz der induzierten Patienten-Fibroblasten im Vergleich zu den nicht induzierten Kontrollzellen nur langsam zu, wodurch nach 36 h eine Konfluenz von 77,4 % und nach 72 h eine Konfluenz von 86,2 % erreicht wurde (Abb. 3.21 a).

Für die Bestimmung der Kontraktionsfähigkeit wurden die Zellen auf einer dreidimensionalen Kollagenmatrix ausgesät und entweder serumreduziert kultiviert oder mit TGF- β 1 behandelt. Die Änderung der Gelfläche wurde über einen Zeitraum von insgesamt 168 h dokumentiert. Im zeitlichen Verlauf verminderte sich die Gelfläche bei den Kontrollen von 100 % auf 81,4 % (serumreduziert) bzw. 69,9 % (TGF- β 1 induziert). Die unter serumreduzierten Bedingungen kultivierten Patientenzellen kontrahierten über die gesamten 168 h des Assays nicht. Nach Induktion mit TGF- β 1 reduzierte sich die Fläche des Gels auf 78,5 % und war dadurch mit der der nicht induzierten Kontrollzellen vergleichbar (Abb. 3.21 b).

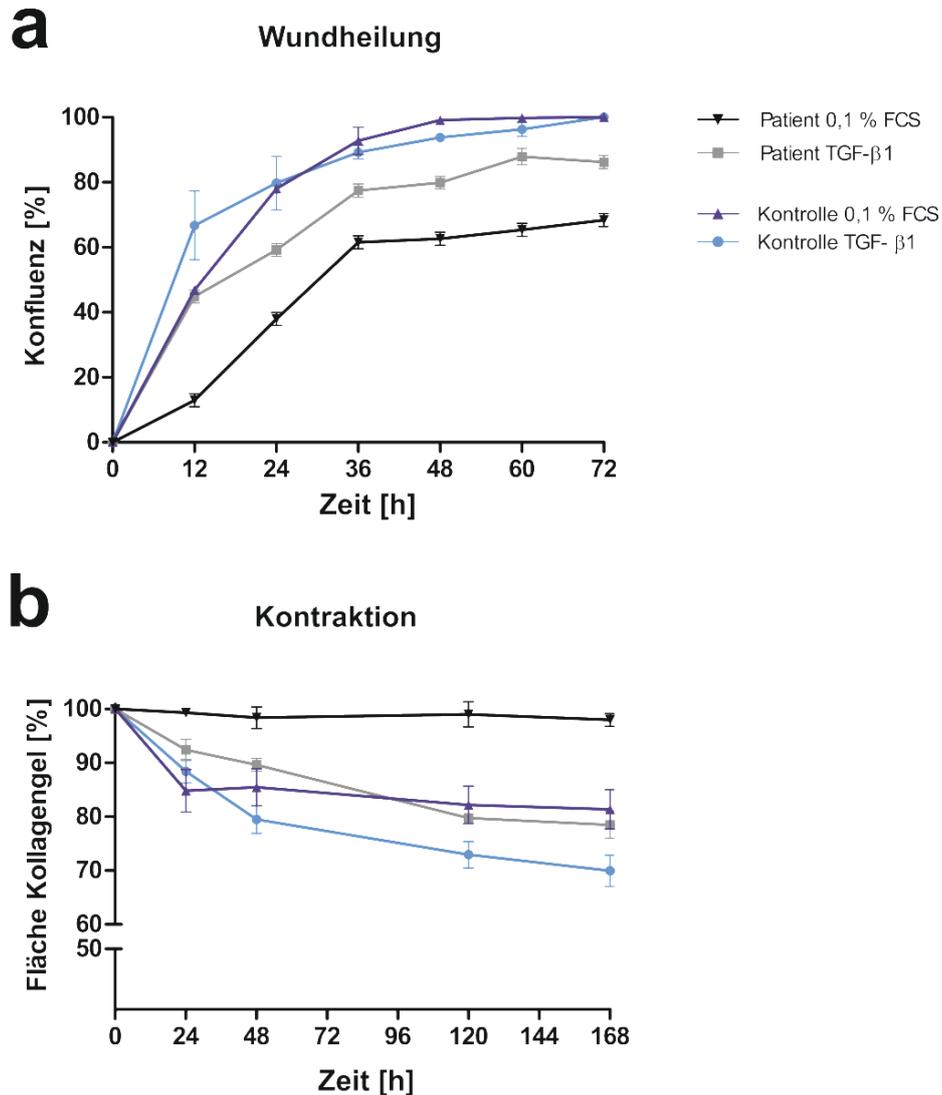


Abbildung 3.21: Wundheilungs- und Kontraktionsassay von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten. Für den Wundheilungsassay (a) wurden jeweils 1×10^6 Kontroll- ($n=2$) und Patienten-Fibroblasten in einer 60×15 mm Zellkulturschale ausgesät. Danach wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze eine artifizielle Wunde in den Zellmonolayer eingefügt und die Zellen für 24 h unter serumreduzierten Bedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellen entweder mit TGF- β 1 oder einem äquivalenten Volumen Wasser behandelt und die Migration der Zellen im Bereich der artifizierten Wunde für 72 h dokumentiert. Die Konfluenzen im Bereich der ursprünglich eingefügten Wunde wurden für verschiedene Zeitpunkte mit *ImageJ* quantifiziert. Für den Kontraktionsassay (b) wurden die Zellen auf einer Kollagenmatrix ausgesät. Nach einer Kultivierung von 24 h unter serumreduzierten Bedingungen wurden die Zellen entweder mit TGF- β 1 induziert oder mit einem äquivalenten Volumen Wasser behandelt. Die Gele wurden zu verschiedenen Zeitpunkten über einen Zeitraum von insgesamt 168 h fotografiert und die Gelflächen mittels *ImageJ* quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate.

3.4.6 Vergleich der zellulären Seneszenz

Um vergleichende Aussagen über die zelluläre Seneszenz der Kontroll- und Patientenfibroblasten tätigen zu können, wurden zwei Seneszenz-Assays durchgeführt (quantitativ und qualitativ), die beide auf dem Aktivitätsnachweis der Seneszenz-assoziierten (SA) β -Galaktosidase basieren.

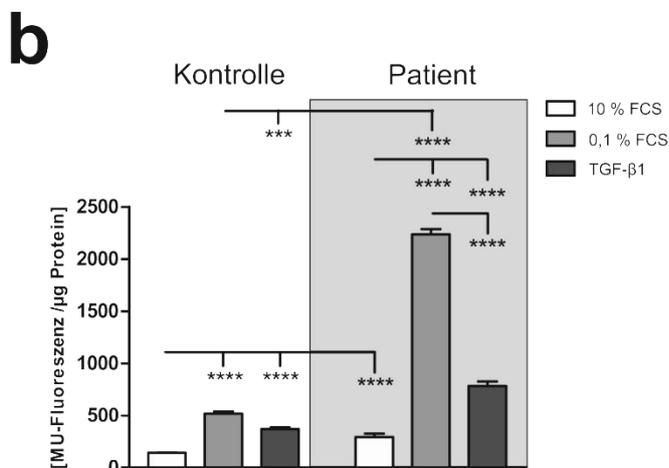
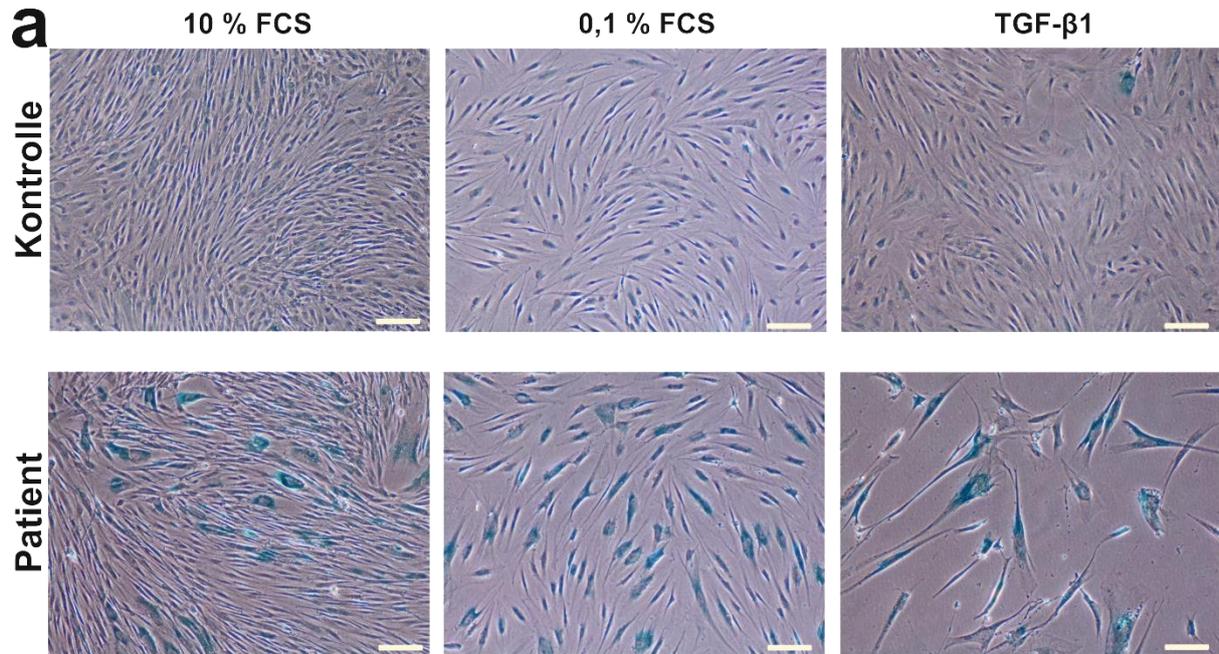


Abbildung 3.22: Qualitative und quantitative Bestimmung der zellulären Seneszenz von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten. Die Kontroll- (n=2) und Patienten-Fibroblasten wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder in Standard- oder serumreduziertem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Die unter serumreduzierten Bedingungen kultivierten Fibroblasten wurden am nächsten Tag entweder mit TGF- β 1 oder einem äquivalenten Volumen Wasser behandelt. Für den qualitativen Seneszenzassay (a) wurden die Zellen nach 72 h mit einer 3%igen Formaldehyd-Lösung fixiert und mit einer Färbelösung überschichtet, die das (SA) β -Galaktosidase-Substrat X-Gal (1 mg/mL) enthielt. Die Zellen wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert und anschließend mikroskopiert, wobei seneszente Zellen blau gefärbt waren. Für den quantitativen Assay (b) wurden die Zellen zunächst identisch zum qualitativen Assay kultiviert. Nach Lyse und Zentrifugation wurde der Überstand mit einem Reaktionspuffer verdünnt, der das (SA) β -Galaktosidase-Substrat MUG enthielt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde die Absorption der Zellen bei 465 nm gemessen und auf den Proteingehalt der Zellen normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und vier technische Replikate (***) = p<0,001; **** = p<0,0001). Maßstab = 100 μ m.

Der qualitative Seneszenz-Assay basiert auf der SA β -Galaktosidase katalysierten Hydrolyse des Substrats X-Gal, wodurch bläuliche Präzipitate entstehen. Diese können mikroskopisch detektiert und dadurch Rückschlüsse auf die zelluläre Seneszenz der Zellen gezogen werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen bildeten die Patientenzellen während aller Kultivierungsbedingungen eine stärkere zelluläre Seneszenz aus. Dabei waren die

Unterschiede zwischen Kontroll- und Patientenzellen unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen und nach Behandlung mit TGF- β 1 am größten. Die Morphologie der Patientenzellen unterschied sich zusätzlich insbesondere nach TGF- β 1-Induktion von der der Kontrollzellen und war durch vergrößerte, längliche Zellkörper charakterisiert. Auch die Zelldichte der Patientenzellen war nach der Zytokinbehandlung, im Vergleich zu den Kontrollzellen stark vermindert (Abb. 3.22 a).

Im quantitativen Seneszenz-Assay wird der SA β -Galaktosidase katalysierte Umsatz des Substrats 4-Methylumbelliferyl β -D-Galaktopyranosid (MUG) zu 7-Hydroxyl-4-Methylcoumarin spektralphotometrisch bei 465 nm nachgewiesen, wobei die Bildung des Produkts proportional zur zellulären Seneszenz ist. Die Ergebnisse dieses Tests stimmten mit denen des qualitativen Seneszenz-Assays überein, da die Patientenzellen unter allen Kultivierungsbedingungen höhere zelluläre Seneszenzen aufwiesen.

Im Vergleich zur Kultivierung unter Standardbedingungen nahm die Fluoreszenz der Kontrollzellen unter serumreduzierten Kultivierungsbedingungen 3,6-fach zu. Im Vergleich zur serumreduzierten Kultivierung nahm das Fluoreszenzsignal nach TGF- β 1-Behandlung zwar 0,7-fach ab, war aber dennoch höher als unter basalen Bedingungen. Im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten war die zelluläre Seneszenz der Patienten-Fibroblasten während aller Behandlungen erhöht. Durch die Kultivierung der Zellen unter serumreduzierten Bedingungen erhöhte sich die zelluläre Seneszenz 7,6-fach im Vergleich zu der Seneszenz unter basalen Bedingungen. Im Vergleich zur Kultivierung unter serumreduzierten Bedingungen führte die Induktion mit TGF- β 1 zwar zu einer 0,4-fach- verminderten zellulären Seneszenz der Patienten-Fibroblasten, diese war jedoch signifikant höher (2,7-fach) als die der induzierten Kontrollzellen (Abb. 3.22 b).

3.5 Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten *XYLT1* knockouts in neonatalen NHDF

Durch den Transfer aktivierter Xylose von UDP-Xylose auf ein PG *core*-Protein katalysiert die XT-I den initialen Schritt der PG-Biosynthese. Veränderte XT-I Aktivitäten stehen daher im Zusammenhang mit diversen fibrotischen Erkrankungen, wie beispielsweise der systemischen Sklerodermie und der Bildung hypertropher Narben [76]. Die zuvor charakterisierten XT-I defizienten Patienten-Fibroblasten wiesen *compound* heterozygote *XYLT1* Mutationen auf, durch die auf einem der Allele noch andere Gene heterozygot mutiert wurden. Um die Auswirkungen einer ausschließlichen XT-I Defizienz analysieren zu können, sollte im letzten Teil dieser Arbeit ein CRISPR/Cas9 vermittelter *XYLT1* knockout in neonatalen NHDF durchgeführt werden.

3.5.1 Transfektion und FACS-Isolierung der neonatalen NHDF

Zunächst wurden 1×10^5 neonatale NHDF (M1FS) pro Kavität einer 12-Kavitäten Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen, unter Verwendung von *Lipofectamine LTX*, mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) transfiziert. Der Vektor enthielt, neben Cas9- und GFP-kodierenden Sequenzen, die zuvor klonierte gRNA-Sequenz zur komplementären Bindung im Exon 9 des *XYLT1* Gens (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Sequenz der komplementär im Exon 9 des *XYLT1* Gens bindenden gRNA (antisense-Strang).

Gen	Exon	gRNA (5' → 3')	PAM-Sequenz (5' → 3')
<i>XYLT1</i>	9	CTGCAGGGTAGTCCCGTAC	AGG

Am Fluoreszenzmikroskop wurde 24 h nach der Transfektion, anhand der GFP-Expression der Zellen, eine Transfektionseffizienz von etwa 30 % bestimmt (Abb. 3.23).

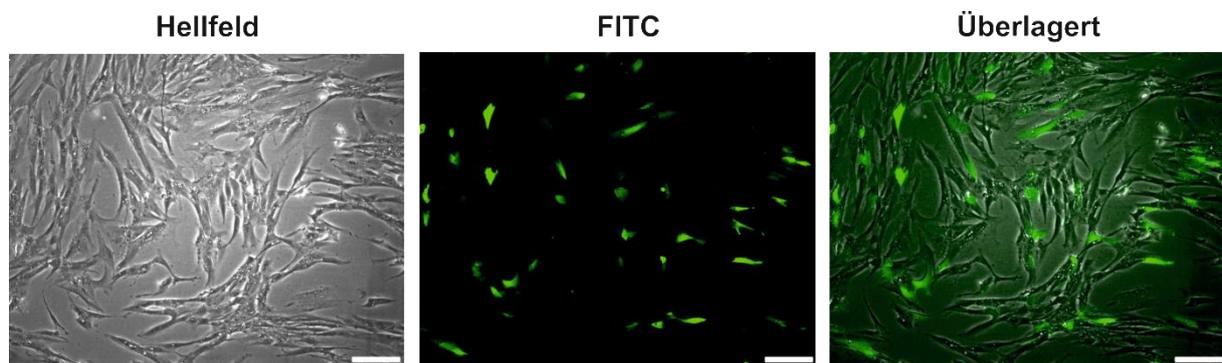


Abbildung 3.23: Bestimmung der Transfektionseffizienz nach erfolgreicher Transfektion neonataler NHDF mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). In eine Kavität einer 12-Kavitätenplatte wurden 1×10^5 M1FS-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit $1,5 \mu\text{g}$ des Plasmids PX458 transfiziert (*Lipofectamine LTX*). Neben der im Exon 9 des *XYLT1* Gens bindenden gRNA kodierte der Vektor u.a. für GFP, wodurch die Transfektionseffizienz nach 24 h visuell am Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden konnte. Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen enzymatisch vom Boden der Kavität abgelöst, das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet in PBS aufgenommen und die Zellsuspension für die fluoreszenzbasierte Separierung am *FACS*-Gerät (*S3e Cell Sorter* (BioRad, USA)) eingesetzt. Während der Probenmessung wurde die Hauptzellpopulation manuell innerhalb eines Dotplot-Diagrammes markiert, in dem die *SSC* (*side scatter*, Seitenstreuung) gegen die *FSC* (*forward scatter*, Vorwärtsstreuung) aufgetragen war (Abb. 3.24 a). Die *SSC* gilt dabei als ein Maß für die Granularität von Zellen, während die *FSC* ein Maß für die Zellgröße darstellt. In einem Histogramm wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der im Dotplot-Diagramm ausgewählten Zellpopulation dargestellt. Für den Sortiervorgang wurden nur Zellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität (Abb. 3.24 b, gelber Kasten) berücksichtigt, wodurch insgesamt 10.715 Zellen isoliert wurden.

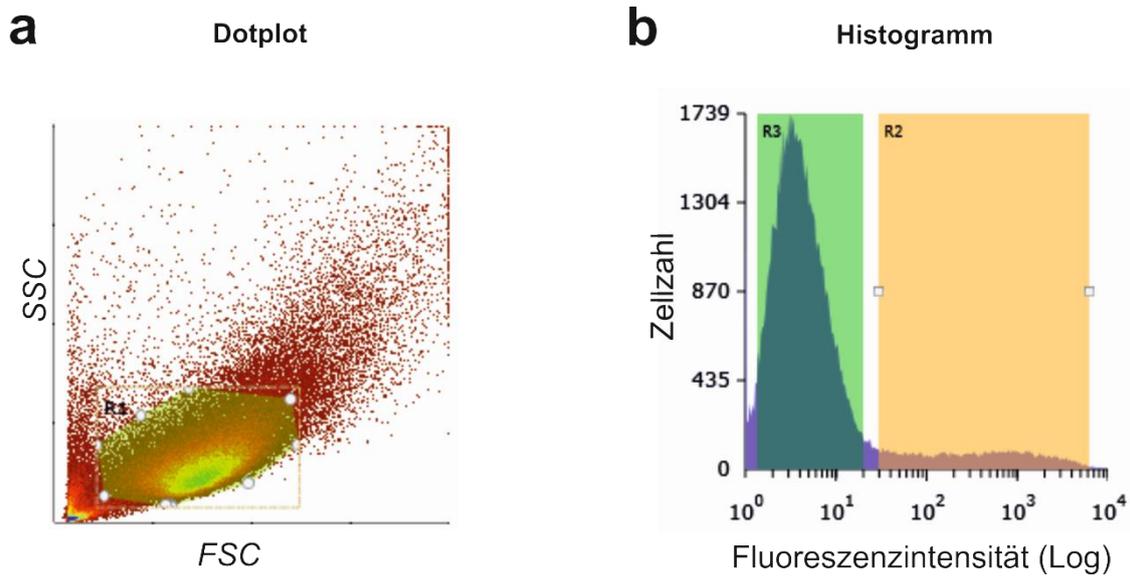


Abbildung 3.24: Dotplot und Histogramm zur Selektion der zu isolierenden, GFP-positiven M1FS-Zellpopulation am FACS-Gerät. In einer Kavität einer 12-Kavitätenplatte wurden 1×10^5 M1FS-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit $1,5 \mu\text{g}$ des Plasmids PX458 transfiziert (*Lipofectamine* LTX). Neben der im Exon 9 des *XYLT1* Gens bindenden gRNA kodierte der Vektor u.a. für GFP, wodurch 48 h nach der Transfektion transfizierte von nicht transfizierten Zellen am FACS-Gerät fluoreszenzbasiert separiert werden konnten. Im Dotplot-Diagramm wurde die gemessene Seitenstreuung (SSC), als Maß der Granularität, gegen die Vorwärtsstreuung (FSC), als ein Maß der Zellgröße, aufgetragen und die zu isolierende Zellpopulation manuell markiert (a). Im daraus resultierenden Histogramm wurde die Fluoreszenzverteilung der ausgewählten Zellpopulation dargestellt. Zellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität wurden erneut manuell markiert (b, gelber Kasten) und isoliert. Insgesamt wurden 10.715 Zellen isoliert und in einem vorgelegten Volumen von $500 \mu\text{L}$ Zellkulturmedium aufgenommen.

Die isolierten Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und in einer Kavität einer 24-Kavitätenplatte ausgesät. Für einen Großteil der FACS-separierten M1FS-Zellen konnte kurz nach dem Aussäen eine starke Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3.25).

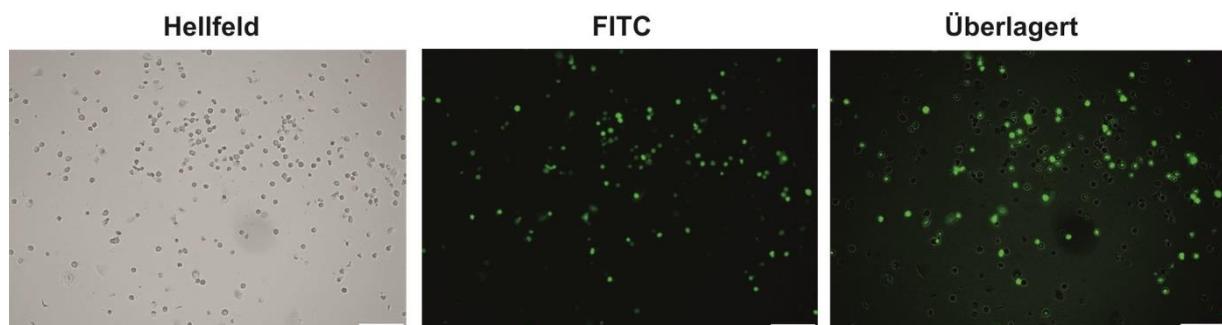


Abbildung 3.25: Mit dem Plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) transfizierte neonatale NHDF nach der fluoreszenzbasierten Isolierung am FACS-Gerät. Durch die fluoreszenzbasierten Separierung der M1FS-Zellen am FACS-Gerät wurden 10.715 Zellen separiert und in einem Volumen von $500 \mu\text{L}$ Zellkulturmedium aufgenommen. In einer Kavität einer 24-Kavitätenplatte wurden weitere $500 \mu\text{L}$ Standard Zellkulturmedium vorgelegt und die Zellsuspension hinzugegeben. Unmittelbar nach dem Aussäen wurden die Zellen mikroskopiert und die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenzmikroskop (FITC-Kanal) detektiert. Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

3.5.2 Zellvereinzlung und Mutationsnachweis transfizierter NHDF

Nach der Isolierung wurden die Zellen für zwei Wochen in Standardmedium kultiviert und danach vereinzelt. Dazu wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und eine Suspension mit einer Konzentration von 5 Zellen/mL angesetzt. Pro Kavität einer 96-Kavitätschale wurden 200 µL der Suspension ausgesät und die restliche Zellsuspension für die DNA-Isolierung eingesetzt.

Nach Isolierung und Aufreinigung wurde die aus den transfizierten M1FS-Zellen isolierte DNA in einer PCR als *template* für die Amplifizierung des zur gRNA komplementären Bereiches im Exon 9 des *XYLT1* Gens eingesetzt. Für die Heteroduplex-Bildung wurden die PCR-Amplifikate denaturiert und sukzessiv abgekühlt. Durch die anschließende Inkubation mit der T7-Endonuklease entstanden DNA-Fragmente, die nach Auftrennung im Agarosegel detektiert wurden. Als Negativkontrolle wurde aus untransfizierten M1FS-Zellen isolierte DNA eingesetzt und der zur gRNA-komplementäre Bereich ebenfalls amplifiziert.

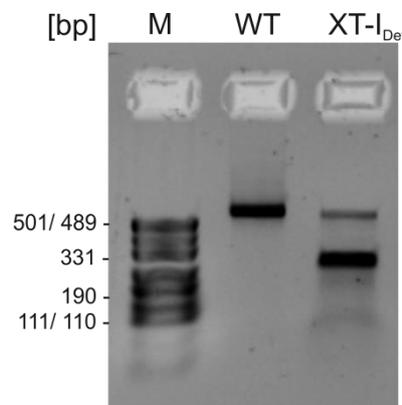


Abbildung 3.26: T7-Endonuklease Assay zur Bestimmung der Mutationsrate nach Transfektion von M1FS-Zellen mit dem Plasmid PX458. M1FS-Zellen wurden mit dem Plasmid PX458 transfiziert, auf dem u.a. eine komplementär im Exon 9 des *XYLT1* Gens bindende gRNA-Sequenz kodiert war. 48 h nach der Transfektion wurde die genomische DNA der Zellen isoliert und der zur gRNA komplementäre Bereich im Genom in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Für die Heteroduplex-Bildung wurden 200 µg Amplifikat erhitzt und danach sukzessive auf eine Temperatur von 25 °C abgekühlt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C mit der T7-Endonuklease wurden die Proben auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle diente ein PCR-Amplifikat genomischer DNA, die aus nicht transfizierten M1FS-Zellen isoliert und ebenfalls mit der T7-Endonuklease inkubiert wurden (Wildtyp, WT). Im Gegensatz zu den WT-Amplifikaten, für die lediglich ein etwa 558 bp großes Produkt detektiert wurde, wurden für die aus den transfizierten M1FS-Zellen (*knockout*, XT-I_{Def}) zwei weitere Fragmente einer Größe von etwa 331 und 190 bp im Agarosegel detektiert. Für das etwa 331 bp große Fragment wurde mittels *ImageJ* die höchste Intensität bestimmt (80 % der Gesamtintensität aller Banden). M = Marker.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (WT), für die nur ein etwa 558 bp großes Produkt nachgewiesen werden konnte, wurden für die aus den transfizierten Zellen (XT-I_{Def}) isolierte DNA zwei zusätzliche Produkte nach Inkubation mit der T7-Endonuklease im Agarosegel detektiert (331 + 190 bp). Durch Quantifizierung der einzelnen Bandenintensitäten (*ImageJ*) wurde eine Mutationsrate von 80 % berechnet (Abb. 3.26).

Einen Tag nach der Zellvereinzellung wurden die Zellkulturplatten mikroskopiert, Kavitäten, die einzelne Zellen enthielten, markiert und das Wachstum der Zellen regelmäßig verfolgt. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen sukzessive passagiert, bis sie schließlich konfluent auf einer 100 x 20 mm Zellkulturschale wuchsen. Von den anfangs 118 detektierten Einzelklonen sind nach etwa vier Wochen neun (7,6 %) konfluent gewachsen und konnten geerntet werden. Ein Teil der Zellen wurde kryokonserviert und der restliche Teil zur Isolierung der genomischen DNA lysiert. Zum Nachweis möglicher Mutationen wurde der zur gRNA komplementäre Bereich im Exon 9 des *XYLT1* Gens amplifiziert und das gereinigte Amplifikat sequenziert. In Abbildung 3.26 ist exemplarisch das aus der DNA-Sequenzierung von Klon 7 resultierende Chromatogramm dargestellt, das identisch zu denen der weiteren acht Klone war. Im 5`-Bereich war die Basenabfolge eindeutig bestimmbar und identisch zu der der Referenz-Sequenz (*genbank accession ID*: NG_015843.2). Ab drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz (blaue Umrandung) und innerhalb der zur gRNA komplementären Sequenz (rote Umrandung) im Exon 9 des *XYLT1* Gens wurden sich überlagernde Signale detektiert, wodurch die Sequenzabfolge nicht mehr eindeutig bestimmbar war (Abb. 3.27).

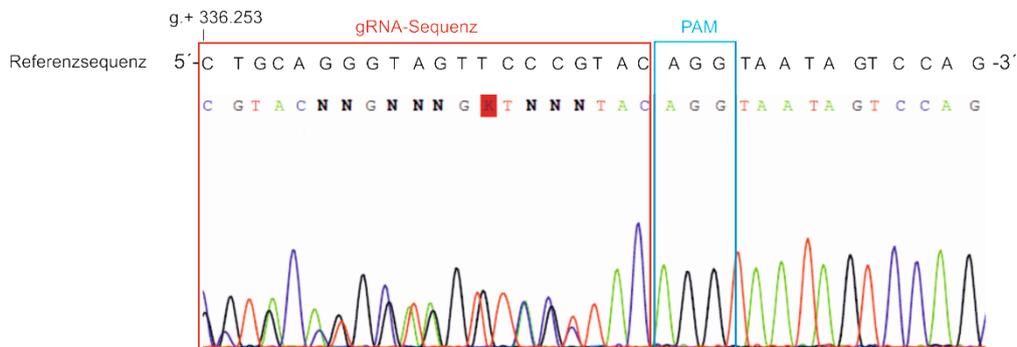


Abbildung 3.27: Vergleich der DNA-Sequenz des mittels CRISPR/Cas9-System generierten Klon 7 mit der Referenz-Sequenz im zur gRNA komplementären Bereich innerhalb von Exon 9 des *XYLT1* Gens. Die dargestellte Sequenz beginnt bei Base g.+ 336.208 (*genbank accession ID*: NG_015843.2) in der aus M1FS-Zellen isolierten genomischen DNA. Hervorgehoben sind die gRNA-Sequenz zur komplementären Bindung im Exon 9 des *XYLT1* Gens (rote Umrandung) und die für die Cas9-Bindung essenzielle PAM-Sequenz (blaue Umrandung).

Zur Separierung der Allele und einer damit verbundenen, besseren Charakterisierung der heterozygoten Mutationen (Klon 7), wurde eine TA-Klonierung durchgeführt.

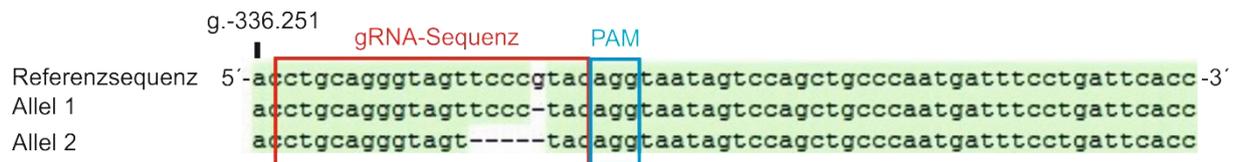


Abbildung 3.28: Sequenz-Alignment der Allel-spezifischen Sequenzen im Bereich der zur gRNA komplementären Sequenz im Exon 9 des *XYLT1* Gens von Klon 7 mit der Referenzsequenz. Die beiden Allele von Klon 7, der nach Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems Mutationen im Exon 9 des *XYLT1* Gens aufwies, wurden mittels TA-Klonierung separiert und sequenziert. Die dargestellten Sequenzen beginnen an Position g.-336.251 (*genbank accession number* NG_015843.2) in der aus den transfizierten M1FS-Zellen isolierten genomischen DNA (Exon 9). Hervorgehoben sind die gRNA-Sequenz zur komplementären Bindung im Exon 9 des *XYLT1* Gens (rote Umrandung) und die für die Cas9-Bindung essenzielle PAM-Sequenz (blaue Umrandung).

Aus dem *Alignment* der durch die TA-Klonierung identifizierten Sequenzen mit der Referenzsequenz wurde ersichtlich, dass die Cas9-Endonuklease den DSB drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz einfügte (Abb. 3.27, 3.28). In Folge fehlerhafter DNA-Reparaturmechanismen entstanden im Genom der neonatalen M1FS-Zellen zwei unterschiedliche Mutationen, die durch die Deletion von einer (Allel 1) bzw. von fünf (Allel 2) Basen charakterisiert waren (Abb. 3.28).

Tabelle 3.8: Spezifizierung der CRISPR/Cas9-vermittelten Mutationen im Exon 9 des *XYLT1* Gens und deren Auswirkung auf die Proteinbiosynthese.

	Deletion [bp]	Art der Mutation
Klon 7	1	Frameshift (p. (Tyr617fs))
	5	Frameshift (p. (Tyr617fs))

Beide Mutationen führten zu einer DNA-Leserasterverschiebung (*frameshift*-Mutation), wodurch ein frühzeitiges Stopp-Codon und folglich ein verkürztes XT-I Protein entstand (Tab. 3.8).

3.5.3 Erste Charakterisierung der neonatalen NHDF CRISPR-*XYLT1* knockout Zellen

3.5.3.1 Vergleich der Genexpression und extrazellulären XT-Aktivität

Um mögliche Auswirkungen der charakterisierten *frameshift*-Mutationen im Exon 9 des *XYLT1* Gens auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine qPCR-Analyse der Gene *XYLT1*, *XYLT2* und *ACTA2* durchgeführt. Da alle generierten Klone dieselbe Mutation aufwiesen, wurde die mRNA-Analyse für alle Klone (XT-I_{Def}) durchgeführt und die jeweils berechneten relativen Genexpressionen für jedes analysierte *target* gemittelt und mit denen der M1FS-Wildtypzellen verglichen (Abb. 3.29).

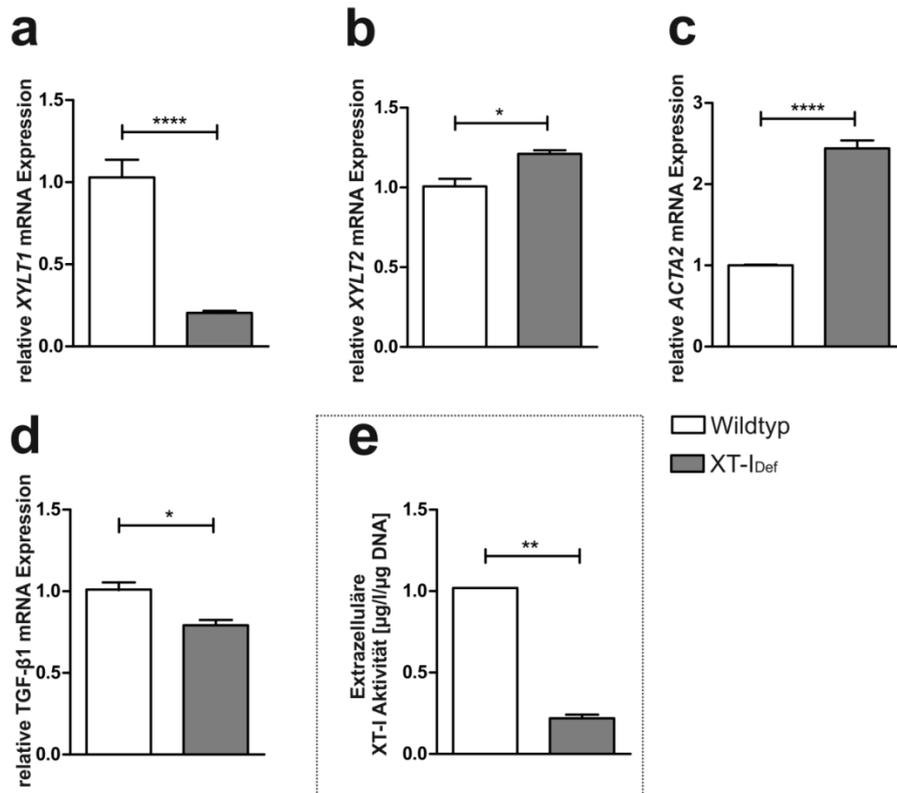


Abbildung 3.29: Vergleich der basalen, relativen mRNA-Expressionen und extrazellulären XT-Aktivität von Wildtyp- und XT-I defizienten M1FS-Zellen. Die Wildtyp- und XT-I defizienten (XT-I_{Def}) M1FS Zellen (n = 9) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h mit Standard-Zellkulturmedium kultiviert. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden die relativen mRNA-Expressionslevel der Gene *XYLT1* (a), *XYLT2* (b), *ACTA2* (c) und *TGF-β1* (d) mittels qPCR bestimmt. Die extrazellulären XT-Aktivitäten (e) wurden nach 72 h im MS XT-I Test bestimmt. Für die relative Quantifizierung der Proben wurden Standards vermessen, die das xylosylierte Peptid KE-74303 in bekannten Konzentrationen enthielten. Die daraus resultierenden Werte [µg/L] wurden auf die DNA-Konzentration normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je neun biologische und drei (Genexpression) bzw. zwei (XT-Aktivität) technische Replikate (* = p<0,1; ** = p<0,01; **** = p<0,0001).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen wiesen die M1FS-Klone eine 0,1-fach verminderte *XYLT1*-Genexpression (Abb. 3.29 a) auf. Im Gegensatz dazu wurden, vergleichend zum Wildtyp, für die Gene *XYLT2* (Abb. 3.29 b, 1,3-fach) und *ACTA2* (Abb. 3.29 c, 3,6-fach) jeweils erhöhte mRNA-Expressionslevel nachgewiesen. Die *TGF-β1* mRNA-Expression der Patientenzellen war vergleichend zu den Kontrollzellen 0,8-fach vermindert (Abb. 3.29 d). Zusätzlich wurde die XT-I Aktivität im Zellkulturüberstand mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten MS XT-I Tests quantifiziert. Im Vergleich zu den Wildtyp-Fibroblasten war die extrazelluläre XT-I Aktivität in den XT-I_{Def}-Zellen 0,3-fach reduziert (Abb. 3.29 e).

3.5.3.2 Vergleichende Quantifizierung der TGF-β1 Proteinexpressionen im ZKÜ

Neben der XT-I Aktivität wurde zusätzlich die *TGF-β1* Konzentration auf Proteinebene quantifiziert. Die ermittelten Werte der CRISPR-Klone wurden gemittelt und mit denen der Wildtypzellen verglichen. Die Zellen wurden für 72 h mit Standard Zellkulturmedium kultiviert und die *TGF-β1* Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt (*Quantikine*

ELISA Kit, R&D). Die ermittelten Konzentrationen wurden anschließend jeweils auf die DNA-Konzentration der Zellen normiert.

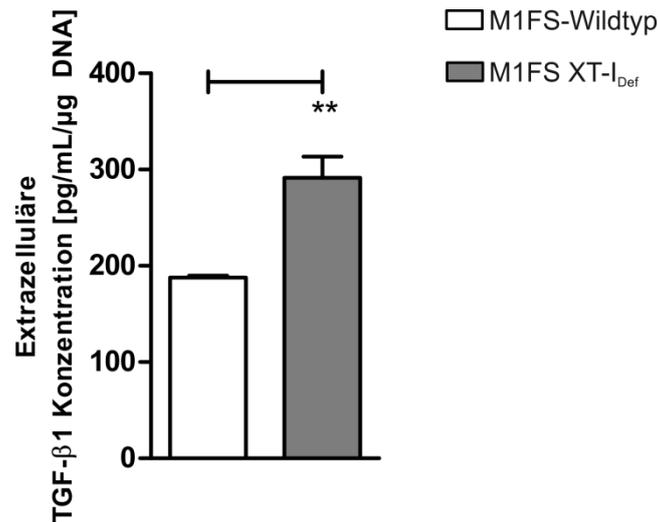


Abbildung 3.30: Quantifizierung der TGF-β1 Proteinkonzentration im ZKÜ von M1FS Wildtypzellen und XT-I defizienten M1FS CRISPR-Klonen. M1FS-Wildtypzellen und XT-I defiziente M1FS CRISPR-Klone (n = 9) wurden in einer Zelldichte von 50 Zellen/mm² ausgesät. Die Zellen wurden für 72 h in Vollmedium kultiviert, anschließend der ZKÜ gesichert und das latente TGF-β1 durch Ansäuerung aktiviert. Nach der Neutralisierung wurde die TGF-β1 Konzentration der Proben in Doppelbestimmung mit dem *Quantikine ELISA Kit* bestimmt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Umsetzung eines Substrates durch die an den sekundären TGF-β1 Antikörper gebundene Peroxidase und der photometrischen Quantifizierung des dabei entstandenen Produktes. Die bei 450 nm gemessene Absorption ist dabei proportional zur TGF-β1 Konzentration der Probe. Durch das Mitführen einer Standardreihe wurde die TGF-β1-Konzentration [pg/mL] der Proben bestimmt und auf den DNA-Gehalt [ng/μL] der Proben normiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler für je drei biologische und drei technische Replikate (** = p<0,01).

Im Vergleich zu den Wildtypzellen waren die im ZKÜ bestimmten, gemittelten TGF-β1 Proteinkonzentrationen der XT-I defizienten (XT-I_{Def}) CRISPR-Klone basal signifikant 1,6-fach erhöht (Abb. 3.30).

4. Diskussion

Obwohl Erkrankungen, die mit Fibrosen assoziiert werden, als eine der Hauptursachen der weltweiten Mortalität und Morbidität gelten [145, 146], konnte bisher keine effiziente, anti-fibrotische Therapie entwickelt werden [147]. Für die Entwicklung möglicher Therapien wurden bisher Moleküle wie Zytokine (u.a. TGF- β 1 [148] und Interleukine [149, 150]), Integrine [151] und Matrix-Metalloproteasen (MMP) [152, 153] als mögliche zu inhibierende *targets* in Betracht gezogen. In neueren Studien werden mikro-RNAs (miRNAs), u.a. miRNA-29 [154, 155] und miRNA-101 [156], als *targets* zur Entwicklung neuer Therapieformen diskutiert, da diese die Expression diverser ECM-assoziiierter Gene regulieren.

Die XT-Isoformen katalysieren den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PG-Biosynthese, weshalb veränderte XT-Serumaktivitäten im Zusammenhang mit ECM-assoziierten Erkrankungen stehen [52, 157]. Eine erhöhte Enzymaktivität trägt zur Akkumulation von ECM-Komponenten und zur Bildung fibrotischen Gewebes bei [52, 56, 136]. Dadurch ist die XT-Aktivität ein Biomarker manifestierter fibrotischer Erkrankungen und ein mögliches anti-fibrotisches *target*. [57, 76, 136, 139]. In dieser Arbeit sollte die inhibitorische Wirkung verschiedener Moleküle auf die XT-Aktivität untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen einer verminderten XT-Aktivität in unterschiedlichen Zelltypen untersucht und erstmals XT-I defiziente NHDF mittels CRISPR/Cas9 *gene-editing* generiert werden, die ein optimales Modell für die funktionale Charakterisierung der XT-I darstellen würden.

4.1 Potenzial von UDP und verschiedenen GAG zur Inhibition der XT-Aktivität

Bisherige Studien zur Inhibition der XT-Aktivität fokussieren sich ausschließlich auf zellfreie Systeme [45, 137]. Eine intrazelluläre Inhibition ist von Faktoren wie der Halbwertszeit der inhibierenden Moleküle und deren Transport in die Zelle abhängig, wodurch die Identifizierung geeigneter Inhibitoren gegenüber zellfreien Systemen erschwert wird. In einem zellfreien System konnten Casanova *et al.* zeigen, dass das Nukleotid UDP und die GAG Heparin und DS eine konzentrationsabhängige, inhibitorische Wirkung auf die XT-Aktivität haben [137]. Aufbauend auf diesen Arbeiten sollte im ersten Teil dieser Arbeit eruiert werden, ob die genannten Moleküle zusätzlich das Potenzial haben, die XT-Aktivität kultivierter NHDF zu inhibieren.

4.1.1 Einfluss einer UDP-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur UDP-Xylose, dem natürlichen Substrat der XT, zogen Casanova *et al.* Uridin-haltige Nukleotide als potenzielle XT-Inhibitoren in Betracht.

Die XT-Aktivität konnte im zellfreien System auch durch UMP und UTP reduziert werden, die UDP-vermittelten Effekte waren jedoch am stärksten [137]. UDP-Konzentrationen von 1 mg/ml und 10 mg/mL inhibierten die Enzymaktivität nahezu vollständig. Um die Zellen mit möglichst geringen Konzentrationen zu behandeln, wurde in dieser Arbeit eine UDP-Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von NHDF mit UDP nach 48 h zu einer Reduktion der extrazellulären XT-Aktivität führt, wohingegen intrazellulär ein Anstieg der Enzymaktivität nachgewiesen wurde (s. Abb. 3.1 a). Durch die zeitabhängige Sekretion der XT [45] wurden nach 72 h sowohl intrazellulär als auch extrazellulär erhöhte XT-Aktivitäten nachgewiesen (s. Abb. 3.1 b). Die UDP-Behandlung hatte u.a. eine verminderte *XYLT2* Genexpressionen zur Folge, wohingegen sich die *XYLT1* mRNA Expression nicht von der der Kontroll-Fibroblasten unterschied. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Nukleotid aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur UDP-Xylose im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden wurde und dieses blockierte, woraus ein reduzierter Substratumsatz resultierte. Nach Nukleotid-Behandlung wurden anti-fibrotische Effekte, die durch verminderte Expressionen ECM-assoziiierter Gene (u.a. *ACAN* und *COL1A1*) charakterisiert waren, detektiert. Die mRNA-Level der Gene *B3GALT6* und *B4GALT7* waren ebenfalls erniedrigt. Die Gene kodieren für die Enzyme GalT-I und GalT-II, die jeweils ein Gal-Molekül auf die an das *core*-Protein gebunden Xylose im Tetrasaccharid-Linker übertragen. Die reduzierten Expressionen könnten daher durch eine verminderte Verfügbarkeit xylosylierter PG *core*-Proteine begründet sein (s. Abb. 3.2 a-g).

Interessanterweise wiesen UDP-behandelte NHDF auch signifikant verminderte *UXS1*-Genexpressionen auf (s. Abb. 3.2 k). Das Enzym katalysiert die Decarboxylierung von UDP-GlcA zu UDP-Xylose, wodurch die intrazelluläre, kompensatorische XT-Induktion hypothetisch auf einen Substratmangel zurückgeführt werden kann. Ein siRNA-vermittelter *UXS1-knockdown* in NHDF bestätigte diese Hypothese und zeigte, dass sowohl die extrazelluläre XT-Aktivität (s. Abb. 3.4 d) als auch die *XYLT1* mRNA Expression (s. Abb. 3.4 b) nach erfolgreicher Durchführung des *knockdowns* erhöht und die intrazelluläre Xylose-Konzentration (s. Abb. 3.4 e) erniedrigt war. Die XT-II scheint keinen kompensatorischen Einfluss zu haben, da sich die *XYLT2* mRNA-Level nach dem *UXS1-knockdown* nicht von denen der Kontrollzellen unterschieden (s. Abb. 3.4 c). Auch der *UXS1 knockdown* führte zu verminderten Expressionen ECM-assoziiierter Gene wie *COL1A1* und *ACAN* (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt mit vorherigen Studien überein, in denen verminderte mRNA-Level ECM-assoziiierter Gene bei homozygoten *uxs1^{-/-}* Zebrafisch-Mutanten nachgewiesen wurden [158].

Während bekannt ist, dass UDP extrazellulär an Purinrezeptoren bindet [159, 160], ist eine direkte Internalisierung des Nukleotids bisher nicht beschrieben worden. Um den UDP-Wirkmechanismus zu analysieren, wurde die *NT5E* Genexpression nach UDP-Behandlung der NHDF bestimmt. *NT5E* kodiert für ein Protein der Plasmamembran, das den Abbau von Nukleotiden zu den membranpermeablen Nukleosiden katalysiert [161, 162]. NHDF, die mit UDP behandelt wurden, wiesen erhöhte *NT5E*-Genexpressionen auf (s. Abb. 3.2 h), was einen Hinweis darauf gibt, dass das Enzym den Abbau des extrazellulären Nukleotids UDP zu Uridin katalysiert. Auch in vorherigen Studien wurden erhöhte *NT5E*-Expressionen mit anti-fibrotischen Effekten in Zusammenhang gebracht. *Nt5e*^{-/-} Mäuse wiesen Fibrosen und Entzündungen auf und exprimierten vermehrt pro-fibrotische Mediatoren [163]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass durch *NT5E*-Katalyse auf T-Zellen synthetisiertes Adenin kardiale Fibrosen inhibieren kann und zusätzlich entzündungshemmend wirkt [164]. Während es bisher noch keine Studien bezüglich eines anti-fibrotischen Einflusses von UDP auf die Homöostase der ECM gibt, ist die anti-fibrotische und anti-inflammatorische Wirkung des Nukleosids Uridin beschrieben. Cicko *et al.* konnten zeigen, dass Uridin die Manifestation von Lungenfibrosen bei Mäusen reduziert, was u.a. durch verminderte *TGF-β1*- und *COL1A1* Expressionen der isolierten primären Lungenfibroblasten belegt wurde [165]. Darüber hinaus wurden anti-inflammatorische Effekte des Uridins in einem Tiermodell zur Inflammation der Lunge postuliert [166].

Um auszuschließen, dass die beschriebenen Effekte auf eine toxische Wirkung des UDP zurückzuführen sind, wurde ein Assay zur Bestimmung der Viabilität und Proliferation der NHDF durchgeführt. Es konnten nur marginale Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3), wodurch eine von UDP ausgehende Toxizität ausgeschlossen werden kann. Die orale Uridin-Aufnahme gilt als unbedenklich und wird bspw. in der HIV-Therapie, zur Reduktion toxischer Einflüsse einiger Chemotherapien, eingesetzt [167, 168].

Zusammenfassend lässt sich ein hypothetischer Mechanismus beschreiben, der nach UDP-Behandlung von NHDF intrazellulär zu einer Induktion der XT-Aktivität führt. Extrazellulär inhibiert das Nukleotid die XT innerhalb der ersten 48 h, was mit den Ergebnissen aus einer zellfreien Studie übereinstimmt [137]. Verminderte *UXS1*-Expressionen führen zu einer reduzierten UDP-Xylose Synthese und zu einer kompensatorischen XT-Induktion. Durch die verminderten Substratkonzentrationen ist die PG-Biosynthese gehemmt, was eine verminderte PG core Expression zur Folge hat. Durch eine sukzessive Sekretion der XT konnten nach 72 h auch extrazellulär erhöhte Enzymaktivitäten nachgewiesen werden (Abb. 4.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass UDP zwar eine anti-fibrotische Wirkung auf die ECM-Homöostase hat, die XT intrazellulär jedoch nicht inhibiert.

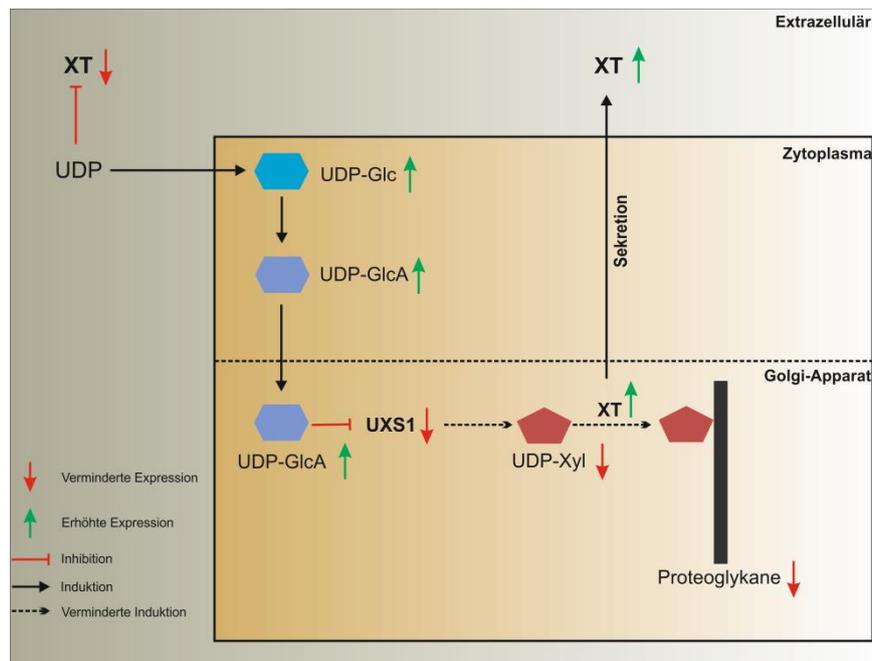


Abbildung 4.1 [169]: Hypothetischer Mechanismus zur UDP-vermittelten XT-Aktivitätserhöhung in NHDF. Extrazellulär inhibiert UDP die XT-Aktivität innerhalb der ersten 48 h. Intrazellulär konnten in diesem Zeitraum verminderte *UXS1*-Level und eine dadurch bedingte Abnahme der UDP-Xylose Konzentration nachgewiesen werden. Diese Effekte könnten auf eine Substratinhibition der *UXS1* durch UDP-GlcA zurückzuführen sein. Eine reduzierte UDP-Xylose Konzentration führte letztlich zur kompensatorischen Induktion der intrazellulären XT-Aktivität. Aufgrund verminderter Substratkonzentrationen wurden zusätzlich verminderte PG-Level detektiert. Aufgrund einer sukzessiven XT-Sekretion wurden zum späteren Zeitpunkt (72 h nach UDP-Behandlung) extrazellulär erhöhte XT-Aktivitäten nachgewiesen.

4.1.2 Einfluss einer GAG-Behandlung auf die Expression der XT und anderer ECM-assoziiierter Moleküle kultivierter NHDF

Durch die Katalyse des initialen Schritts der PG-Biosynthese hat die XT einen direkten Einfluss auf die GAG-Synthese. GAG könnten daher, in Form einer Endprodukthemmung, eine inhibitorische Wirkung auf die XT ausüben. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Heparin die XT-Aktivität in zellfreien Systemen reduziert [45, 137]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Heparin in einer Konzentration von 1 mg/mL auf kultivierte NHDF getestet. Die mit Heparin behandelten Zellen wiesen sowohl nach 48 als auch nach 72 h reduzierte intra- und extrazelluläre XT-Aktivitäten auf (s. Abb. 3.5 a). Auf mRNA-Ebene wurden keine Unterschiede bezüglich der *XYLT*-Expressionen behandelter und unbehandelter NHDF detektiert (s. Abb. 3.6 a, b). Auch die *B3GALT6*- und *B4GALT7*-Genexpressionen unterschieden sich nicht (s. Abb. 3.6 c, d). Diese Ergebnisse lassen eine posttranslationale Inhibition der XT durch exogenes Heparin vermuten, wobei Interaktionen zwischen der XT und Heparin bereits in vorherigen institutseigenen Arbeiten nachgewiesen wurden [170]. Eine derartige Wechselwirkung könnte zu einer Strukturänderung des Proteins geführt haben, was Auswirkungen auf das aktive Zentrum und somit auf die Aktivität der XT gehabt haben könnte [170, 171]. Die intrazelluläre Wirkung könnte durch eine

Internalisierung des exogenen Heparins erklärt werden, die bereits für Endothelzellen beschrieben wurde [172, 173]. Auf mRNA-Ebene führte eine Behandlung von NHDF mit Heparin nach 48 h zu einer signifikant erhöhten *COL1A1* Expression (s. Abb. 3.6 f). Ferrao *et al.* konnten ebenfalls eine erhöhte Kollagen Typ-I Synthese nach Heparin-Behandlung von Fibroblasten nachweisen [174]. Heparin könnte dabei indirekt über die Stimulierung der *TGF-β1* Expression einen Einfluss auf die *COL1A1* Expression ausüben. TGF-β1 induziert die Myofibroblasten-Differenzierung und dadurch bedingt die Synthese von ECM-Komponenten, wie beispielsweise Kollagenen [175, 176].

Neben Heparin wurde das GAG DS als möglicher XT-Inhibitor analysiert. Dem GAG wird eine synergistische Wirkung in Kombination mit Glukosamin bei der Behandlung der Osteoarthritis zugesprochen, da diese und weitere degenerative Erkrankungen durch einen Verlust von GAG im Knorpelgewebe ausgelöst werden [177, 178]. Im zellfreien System konnte gezeigt werden, dass DS die XT-Aktivität konzentrationsabhängig inhibiert [137].

Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen NHDF, die mit 1 mg/mL DS behandelt wurden, nach 48 h signifikant verminderte intra- und extrazelluläre XT-Aktivitäten auf (s. Abb. 3.5 b). Nach 72 h war die Reduktion der Aktivitäten in den behandelten Zellen geringer als nach 48 h. Die schwächeren Effekte könnten durch einen sukzessiven lysosomalen Abbau des internalisierten DS erklärt werden [179]. Extrazellulär könnte das GAG, ähnlich wie Heparin, reversibel an die XT binden und die Enzymaktivität dadurch inhibieren. Die DS-Behandlung führte zu einer verminderten *XYLT1*-Expression (s. Abb. 3.7 a), wohingegen sich die *XYLT2* Genexpression nicht von der der Kontrollzellen unterschied (s. Abb. 3.7 d). Vorherige Arbeiten zeigten, dass DS auch auf Proteinebene eine schwache inhibitorische Wirkung auf die XT-II [137] im Vergleich zur XT-I [45] hat. Auf transkriptioneller Ebene hatte die DS-Behandlung den größten inhibitorischen Effekt auf die *ELN* Expression (s. Abb. 3.7 c). Dies stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Arbeiten überein, die eine inhibitorische Wirkung des DS auf die Elastinsynthese in Fibroblasten postulieren [180, 181].

Für die GAG Heparin und DS konnte zusammenfassend eine inhibitorische Wirkung auf die XT-Aktivität kultivierter NHDF nachgewiesen werden. Die Effekte auf Proteinebene waren dabei nach Heparin-Behandlung stärker, was mit den Ergebnissen aus zellfreien Studien übereinstimmt [137, 171]. Im Rahmen eines WST-I Assays konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Behandlung von NHDF mit den beiden GAG keinen Einfluss auf die Viabilität und Proliferation der Zellen hat (s. Abb. 3.8). Für die Beurteilung der Relevanz der beiden GAG bezüglich der Entwicklung einer anti-fibrotischen Therapie bedarf es weiterer Studien. Dazu gehören Untersuchungen über die Internalisierung der GAG und mögliche Einflüsse der Behandlung auf andere Stoffwechselwege.

4.2 Auswirkungen einer XT-Defizienz auf die ECM-Homöostase und Viabilität von HEK293-Zellen

Nachdem im ersten Teil eine XT-Inhibition durch exogene Moleküle evaluiert wurde, sollte die XT-Expression im weiteren Verlauf durch einen *XYLT2 knockdown* und *knockout* in HEK293-Zellen inhibiert werden. Roch *et al.* quantifizierten in einer vorherigen Studie die *XYLT*-Genexpressionen in unterschiedlichen Zelltypen und konnten zeigen, dass immortalisierte HEK293 Zellen eine nachweisbare *XYLT2*-, aber keine detektierbare *XYLT1*-Genexpression aufweisen [47]. Durch die Defizienz beider Isoformen könnte die Relevanz der XT weiter analysiert werden und weitere Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob sich eine XT-Inhibition für die Entwicklung einer anti-fibrotischen Therapie eignet.

4.2.1 siRNA-vermittelter *XYLT2 knockdown* in HEK293-Zellen

Um die Auswirkungen verminderter Transkriptionslevel beider XT-Isoformen zu analysieren, wurde zunächst ein siRNA-basierter *knockdown* des *XYLT2*-Gens in HEK293-Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit einer siRNA transfiziert, die an keine humane mRNA bindet. Die Transfektion mit der *XYLT2* siRNA führte dazu, dass sich einige der HEK-Zellen nach 24 h in Suspension befanden. Innerhalb der ersten 72 h nach Transfektion war die Zellzahl der *XYLT2 knockout* Zellen, im Vergleich zu den mit der Kontroll siRNA-transfizierten Zellen, vermindert und die Zellen wuchsen, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, weitestgehend vereinzelt. Die Kontrollzellen bildeten bereits nach 24 h Zell-Zell Kontakte aus, wodurch im weiteren Verlauf größere Zellverbände entstanden. 72 h nach der *XYLT2* siRNA-Transfektion wurden vereinzelt Zellen detektiert, die einen seneszenten Phänotyp aufwiesen (s. Abb. 3.9). Seneszenzen in immortalisierten HEK293-Zellen wurden bereits beschrieben, wobei jeweils ein Anstieg des oxidativen Stresses für die Induktion der Seneszenz verantwortlich war [182, 183]. Die zelluläre Seneszenz ist der Verlust der Teilungsfähigkeit von Zellen und tritt u.a. in Folge von DNA-Schädigungen, erhöhtem oxidativen Stress und einer veränderten Gewebemöostase auf [184], wobei diese u.a. durch abnorme Zusammensetzungen und Konzentrationen von PG bedingt sein kann. Der beobachtete seneszente Phänotyp könnte dementsprechend aus einer veränderten PG-Biosyntheserate, in Folge verminderter XT-Expressionen, resultieren. Erst 96 h nach Transfektion der *XYLT2* siRNA bildeten die Zellen Morphologien aus, die der der Kontrollzellen ähnelten. Da die siRNA nach einiger Zeit hydrolysiert wird und die Bindung daher reversibel ist [185, 186], können Effekte, die auf den *knockdown* des jeweiligen Gens zurückzuführen sind, nur innerhalb eines kurzen Zeitraums detektiert werden. Abhängig vom Zelltyp können dies wenige Tage (< 1 Woche) bei sich schnell teilenden Zellen, bis hin zu mehreren Wochen bei sich langsam teilenden Zellen sein [187]. Da HEK293-Zellen eine

hohe Proliferationsrate aufweisen, wurde der *XYLT2 knockdown* vermutlich nach wenigen Tagen aufgehoben (s. Abb. 3.9).

Nach dem *knockdown* wurden die mRNA-Expressionen ECM-assoziiierter Gene gemessen und die extrazelluläre XT-Aktivität bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurden nach dem *knockdown* um 70 % verminderte *XYLT2* mRNA Level detektiert (s. Abb. 3.10 a), wobei die prozentuale Reduktion vergleichbar mit der anderer siRNA-Studien ist [188, 189]. In einer Studie von Reynolds *et al.* wurden für den *knockdown* zweier Gene 90 siRNAs verwendet und die jeweilige Reduktion der mRNA-Level quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche siRNA-vermittelte Reduktion der mRNA-Level bei 62 % liegt [190]. Die meist unvollständigen Transkript-Reduktionen sind u.a. auf posttranskriptionale Modifikationen zurückzuführen [191]. In einer Studie von 2006 zeigten Pönighaus *et al.*, dass CHO-Zellen, die nur die XT-I (pgsA-745-XT-I) oder die XT-II (pgsA-745-XT-II) exprimieren, eine vergleichbare GAG-Synthese aufweisen und vermuteten, dass die Defizienz einer XT-Isoform durch die jeweils andere Isoform kompensiert werden kann [140]. Nach dem *XYLT2 knockdown* waren jedoch keine quantifizierbaren *XYLT1* mRNA-Level in den HEK-Zellen nachweisbar. Die nach dem *knockdown* detektierte Induktion der extrazellulären XT-Aktivität (s. Abb. 3.10 e) basierte auf vergleichbar niedrigen *dpm*-Werten und könnte durch eine erhöhte XT-Freisetzung apoptotischer Zellen zu erklären sein. Neben verminderten *XYLT2* Expressionen führte der *knockdown* in HEK293-Zellen zu erhöhten Expressionen der ECM-assoziierten Gene *ACAN*, *ELN* und *FN1* (s. Abb. 3.10 b-d). Dies wurde nicht erwartet, da XT-Defizienzen bisher nur im Zusammenhang mit verminderten Genexpressionen ECM-assoziiierter Gene beschrieben wurden. Eames *et al.* zeigten beispielsweise, dass homozygote *frameshift* Mutationen im *xylt1* Gen von Zebrafischen zu einer stark verminderten PG-Biosynthese führte [192]. Auch bei durch *XYLT1*-Mutationen ausgelösten humanen skeletalen Dysplasien wurden reduzierte PG-Expressionen beschrieben. Bui *et al.* konnten diesbezüglich zeigen, dass Fibroblasten zweier DBSD-Patienten signifikant verminderte PG-Level aufwiesen und dass sich die Zusammensetzung der sekretierten PG von denen der Kontrollen unterschied [65]. Condac *et al.* [67] konnten wiederum zeigen, dass *Xylt2^{-/-}* Mäuse polyzystische Lebern und Nieren entwickeln, was u.a. mit einer abnormen ECM-Homöostase assoziiert ist [193, 194]. Zellen von Patienten, die an einer autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) leiden, weisen u.a. verminderte PG-Level [195] und erhöhte Fibronektin-Expressionen [196] auf. Bisher existiert noch kein Zellkulturmodell, bei dem die Expressionen beider XT-Isoformen reduziert ist, weshalb die detektierte Induktion ECM-assoziiierter Gene nach einem *XYLT2 knockdown* in HEK293-Zellen final nicht erklärt werden kann. Vorstellbar ist die Aktivierung posttranskriptionaler, kompensatorischer Mechanismen in Folge verminderter Expressionen beider XT-Isoformen.

4.2.2 CRISPR/Cas9 vermittelter *XYLT2* knockout in HEK293-Zellen

Die Ergebnisse des siRNA-vermittelten *XYLT2* knockdowns ließen vermuten, dass reduzierte Expressionen beider XT-Isoformen entscheidende Auswirkungen auf die Proliferation und Viabilität von HEK293-Zellen haben. Durch die Hydrolyse und die dadurch bedingte Reversibilität der siRNA-Bindung werden durch den knockdown bedingte Effekte meist nur über einen bestimmten Zeitraum beobachtet. Daher wurde im weiteren Verlauf ein CRISPR/Cas9 vermittelter *XYLT2* knockout in HEK293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die HEK293-Zellen mit dem Plasmid PX458 transfiziert, auf dem neben der Cas9- und der GFP-Sequenz u.a. eine zuvor in den Vektor klonierte gRNA-Sequenz kodiert war. Für den knockout wurden *in silico* zwei gRNAs konzipiert, die jeweils komplementär in den Exons 2 oder 9 des *XYLT2* Gens binden sollten (s. Tab. 3.1) und geringe *off-target* Effekte aufwiesen. Die *off-target* Sequenzen mit den höchsten Sequenzhomologien differierten sich in vier (gRNA Exon 2) bzw. in drei (gRNA Exon 9) Basen von den gRNA (*on-target*) Sequenzen, wobei die Unterschiede alle innerhalb der *seed*-Region lagen. Eine Studie zeigte, dass vor allem die 8-14 Basen *upstream* der PAM-Sequenz (3'-Bereich der gRNA, *seed region*) wichtig für die Cas9-Bindung sind und dass Basenfehlpaarungen in diesem Bereich zu einer stark verminderten Effizienz des Systems führen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass potenzielle *off-target* Bereiche, die sich in drei oder mehr Nukleotiden von der *on-target* Sequenz unterscheiden, mit einer geringen Wahrscheinlichkeit von der gRNA gebunden werden [122]. Die beiden gRNA-Sequenzen wurden so konzipiert, dass sie am 5'-Ende mit zwei Guanin-Basen beginnen, da gezeigt werden konnte, dass dies die Wahrscheinlichkeit für *off-target* Effekte reduziert [197]. Auch die Menge an transfiziertem Plasmid hat einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit möglicher *off-target* Effekten [198], weshalb in dieser Arbeit geringe Mengen des Plasmids (1,5 µg) für einen Transfektionsansatz eingesetzt wurden [199, 200]. Neben der DNA-Menge mussten für die Optimierung der Methode das Transfektionsreagenz, die gRNA-Sequenz und die Inkubationszeiten variiert werden.

24 h nach der Transfektion der Zellen wurden, anhand der GFP-Expression, Transfektionseffizienzen von etwa 60 % bestimmt (s. Abb. 3.11) und die Zellen vereinzelt. Von den anfangs detektierten Einzelklonen sind lediglich 7,2 % (Exon 2) bzw. 8,8 % (Exon 9) bis zur Konfluenz auf einer 100 x 20 mm Zellkulturschale gewachsen. In einer vorherigen Arbeit wurde ein erfolgreicher *knockout* des *ABCC6*-Gens in HEK293-Zellen mittels CRISPR/Cas9-System etabliert, wobei etwa 20 % der ursprünglichen Einzelklone proliferierten [201]. 66,6 % (Exon 2) bzw. 88,8 % (Exon 9) der HEK293-Einzelklone wiesen keine *XYLT2*-Mutationen auf. Dabei handelte es sich höchstwahrscheinlich um Zellen, die aus nicht-transfizierten Einzelklonen hervorgingen, da das CRISPR/Cas9-System nach erfolgreicher Transfektion generell eine hohe Effizienz aufweist und zu hohen Mutationsraten führt [202, 203]. Um nur transfizierte Zellen zu vereinzeln sollten die Zellen bei einer

erneuten Anwendung des Systems am Durchflusszytometer fluoreszenzbasiert isoliert werden [204, 205]. Die restlichen Klone wiesen allesamt Mutationen im Bereich der zur gRNA-komplementären Sequenz im Genom auf. Durch eine TA-Klonierung wurden die einzelnen Allele voneinander separiert, um die Mutationen zu charakterisieren. Während für zwei Klone (Klon 2, Exon 2 und Klon 1, Exon 9) jeweils zwei Allele nachgewiesen werden konnten, wurden in der TA-Klonierung drei Allele von Klon 1 (Exon 2) separiert (s. Abb. 3.13). Eine Aneuploidie wurde bereits bei HEK293-Zellen beschrieben, wobei diese sich auf einzelne Chromosomen zu beschränken scheint. So konnte gezeigt werden, dass HEK293-Zellen triploid für das X-Chromosom und jeweils tetraploid für die Chromosomen 17 und 22 sind [206, 207]. Das *XYLT2* Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 17 lokalisiert (17q21.33).

Die CRISPR/Cas9-vermittelten Mutationen in den HEK293-Zellen waren allesamt Deletionen variabler Länge (zwischen 4 und 16 bp). Die Heterogenität der Mutationen nach Anwendung des Systems geht aus vielen Publikationen hervor, wobei meist Deletions-Mutationen beschrieben werden [208–211]. In einer großen *in vivo* Studie wurden in ca. 700 Mäusen 17 unterschiedliche Positionen im murinen Genom CRISPR/Cas9-vermittelt mutiert. Die dadurch entstandenen Deletionen hatten im Mittel einen Verlust von 9 bp zur Folge, allerdings wurden auch Deletionen von bis zu 600 bp detektiert [212].

Die in dieser Arbeit generierten heterozygoten Mutationen in den Exons 2 und 9 des *XYLT2* Gens führten teilweise zu einer Verschiebung des Leserasters, wobei für jeden Klon jeweils auch eine *in-frame* Mutation (p.Gly195_Ala201del (Klon 1 und 2, Exon 2) und p.Gln639_Ala640del (Klon 1, Exon 9)) nachgewiesen werden konnte. Diese führten zur Deletion von sieben (Exon 2) bzw. zwei (Exon 9) AS im Bereich der katalytischen Domäne des XT-II Proteins [52]. Patienten mit homozygoten *XYLT2 missense* (p.Arg563Gly, p.Leu605Pro, p.Met237Arg) [83, 84] oder *frameshift* (p.Val232Glyfs*54, p.Ala174Profs*35Arg, p.Glu854Alafs*101) [50, 84] Mutationen im Bereich der katalytischen Domäne des XT-II Proteins weisen ein Spondylo-okuläres Syndrom auf. Auf zellulärer Ebene führten die Mutationen zu verminderten XT-Enzymaktivitäten und einer Verminderung der PG-Biosynthese [84]. Zusätzlich wurde eine homozygote *nonsense*-Mutation beschrieben, die zur Bildung eines Stopp-Codons im *XYLT2*-Gen führte (p.Arg730*) [83]. Die in dieser Arbeit generierten *frameshift* Mutationen führten ebenfalls zur Bildung von frühzeitigen Stopp-Codons und der Bildung verkürzter XT-II Proteine (p.Ala194Profs*10 (Klon 1, Exon 2), p.Leu197Glnfs*14 (Klon 2, Exon 2) und p.Ser641Glyfs*64 (Klon 1, Exon 9)). Im Gegensatz zu den *XYLT2* siRNA behandelten Zellen wiesen die Klone, die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutationen in den Exons 2 und 9 aufwiesen, keine verminderten *XYLT2*-Transkriptionslevel auf (Klon 1, Exon 2, s. Abb. 3.14). Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen,

dass für jeden Klon jeweils eine *in-frame* Mutation detektiert wurde und dies zu keiner vollständigen Termination der XT-II Proteinsynthese führte.

Die Ergebnisse des siRNA basierten *XYLT2 knockdowns* und des CRISPR/Cas9-vermittelten *XYLT2 knockouts* in HEK293-Zellen geben einen wichtigen Hinweis darauf, dass Zellen verminderte Expressionen beider XT-Isoformen nicht kompensieren können und dies zur verstärkten Seneszenz oder Apoptose der Zellen führt. Dadurch, dass jeder der generierten Klone mindestens eine *in-frame* Mutation aufwies, konnte kein vollständiger CRISPR/Cas9-vermittelter *knockout* des *XYLT2* Gens erzielt werden. Dies wurde dadurch bestätigt, dass proliferative Einzelklone keine verminderten *XYLT2* Genexpressionslevel zeigten. Möglicherweise wurden in den nicht proliferativen Zellen CRISPR/Cas9-vermittelte Mutationen eingefügt, die zu einem kompletten *XYLT2 knockout* oder zu Leserasterverschiebungen auf beiden Allelen geführt haben, woraus eine zelluläre Seneszenz bzw. Apoptose der Zellen resultierte.

4.3 Entwicklung eines XT-I spezifischen UPLC MS/MS XT-Aktivitätstests

Für die Quantifizierung der XT-Aktivität wurden bisher ein radiochemischer (RC) und ein eindimensionaler MS XT-Test verwendet. Während das im RC-Assay als Akzeptor eingesetzte Seidenfibroin primär XT-I spezifisch xylosyliert wird [213, 214], wird das bisher im MS-Test verwendete K1-Peptid spezifischer von der XT-II umgesetzt [137, 214]. Aus ökonomischen Gründen, zur Vermeidung radiochemischer Arbeiten und aufgrund höherer Sensitivitäten und Selektivitäten sollte der RC XT-Assay durch einen XT-I spezifischen, zweidimensionalen MS-Aktivitätstest ersetzt werden. Ein Isoform-spezifischer Assay ist essenziell, um die Funktionalität und Relevanz beider XT charakterisieren zu können.

4.3.1 Identifizierung eines XT-I spezifischen Akzeptorpeptids

LC-(*liquid chromatography*) MS Anwendungen bieten viele Vorteile gegenüber herkömmlichen biochemischen Assays. Durch die vorherige chromatographische und hochauflösende Auftrennung und Separierung der Moleküle eines Stoffgemisches wird eine hohe Selektivität bei der massenspektrometrischen Messung erreicht [215, 216]. Die hohe Sensitivität moderner Massenspektrometer erlaubt zusätzlich den Nachweis gering konzentrierter Analyten, was eine Grundvoraussetzung in der klinischen Diagnostik darstellt [217, 218]. LC-MS Methoden zeichnen sich darüber hinaus durch eine hohe Intra- und Inter-Assay Reproduzierbarkeit und eine hohe Automatisierbarkeit aus, was eine serielle Quantifizierung vieler Proben bei vergleichsweise geringem Arbeitsaufwand erlaubt [219–222].

2006 haben Kuhn *et al.* einen eindimensionalen HPLC (*high pressure liquid chromatography*) MS/MS Test zur Bestimmung der XT-Aktivität im Serum entwickelt. Als Akzeptor wurde dabei

das von Bikunin abgeleitete, 12 AS lange K1-Peptid verwendet, welches neben dem essenziellen G-S-G Motiv [46] N (Biotinyl)- und C (Fluorescein)-terminale Modifikationen aufwies (Bio-Bik-F). Diese Modifizierungen haben sich auch in der vorliegenden Arbeit als essenziell erwiesen, da unmodifizierte oder nur einfach-modifizierte Peptide massenspektrometrisch nicht detektiert werden konnten. Auch durch eine direkte Injizierung der Peptide in das Massenspektrometer, ohne eine vorherige chromatographische Auftrennung, konnten diese nicht nachgewiesen werden, was für eine Degradierung oder Akkumulation der Peptide während der Inkubation oder der Aufreinigung spricht. Eine Studie aus dem Jahr 2010 zeigte, dass kurze und unmodifizierte synthetische Peptide bei 37 °C innerhalb von < 2 h vollständig abgebaut werden. Eine N-terminale Acetylierung und C-terminale Amidierung sorgte für eine höhere Stabilität der Peptide [223]. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die N- und C-terminalen Modifikationen für die Stabilisierung der Peptide essenziell sind. Als Enzymsubstrat setzten Kuhn *et al.* das natürliche Substrat der XT, die UDP-Xylose, ein. In einer Weiterentwicklung dieses Tests wurde das natürliche Substrat durch eine azidierte UDP-Xylose (UDP-XylAz) ersetzt, was zu einer XT-I spezifischen Xylosylierung des Bio-Bik-F Peptids führte, da die XT-II das Azid nicht umsetzte. Ein Nachteil der Studie ist, dass für die Bestimmung der Isoform-spezifischen Xylosylierung nur XT-II-, aber keine XT-I Vollängenproteine verwendet wurden [224]. Es könnte durchaus sein, dass das Vollängenprotein eine andere Substratspezifität aufweist. Im Vergleich zur UDP-Xylose führte die Verwendung des UDP-XylAz zu verminderten Sensitivitäten, wodurch der Test unter Verwendung des modifizierten Substrats zum Nachweis geringer XT-I Aktivitäten nicht geeignet ist.

In dieser Arbeit sollte ein XT-I spezifischer zweidimensionaler UPLC MS-Aktivitätstest unter Verwendung von Vollängenproteinen beider XT-Isoformen entwickelt werden. Im Vergleich zur von Kuhn *et al.* verwendeten HPLC-Aufreinigung bietet die UPLC-Methode vor allem die Vorteile einer schnelleren und noch hochauflösenderen Separierung [225, 226]. Durch den vergleichsweise geringen Umsatz des UDP-XylAz und der daraus verminderten Sensitivität wurde als Substrat UDP-Xylose verwendet und zunächst die Isoform-spezifische Xylosylierung von Peptiden getestet, die vom Bio-Bik-F abgeleitet sind. Zur Generierung Isoform-spezifischer ZKÜ wurden XT-defiziente CHO-Zellen (CHO pgsA-745) [227] mit einem Plasmid transfiziert, das entweder für das XT-I- oder XT-II Vollängenprotein kodiert [140]. Nach Inkubation der zu testenden Peptide mit dem jeweils spezifischen ZKÜ und der UDP-Xylose erfolgte der Nachweis des xylosylierten Peptids direkt über die Quantifizierung der integrierten Peakfläche. In publizierten Vorarbeiten wurden unter Verwendung weniger selektiver und sensitiver Assays bereits potenzielle Akzeptoren hinsichtlich einer Substratspezifität untersucht [47, 141]. Roch *et al.* haben dabei vom Bikunin abgeleitete Peptide im RC XT-Aktivitätsassay getestet, wobei als Enzymquelle ebenfalls XT-I und XT-II

spezifische ZKÜ von CHO-Zellen und als Substrat UDP-Xylose verwendet wurde. Die spezifische XT-Aktivität wurde dabei für alle Peptide durch die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) ermittelt. Der massenspektrometrische Test bietet den Vorteil des selektiven und sensitiven direkten Nachweises des xylosylierten Peptids und bedarf keiner Berechnung etwaiger Parameter. Roch *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen innerhalb des G-S-G Motivs zu einer stark verminderten Aktivität beider XT-Isoformen führte [47]. Nach Substitution des Glycins an fünfter Position im K1-Peptid durch ein Arginin (P2), was zum Verlust des G-S-G-Erkennungsmotivs [228] führte, konnte im Rahmen dieser Arbeit für das entstandene Peptid massenspektrometrisch ebenfalls keine Xylosylierung nachgewiesen werden (s. Tab. 3.4). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das unmodifizierte K1-Peptid stärker von der XT-II als von der XT-I xylosyliert wird. Auch die Peptide, die durch eine Deletion des N-terminalen Glutamins (-1N) oder die zusätzliche Deletion des C-terminalen Lysins (K3) entstanden, wurden besser von der XT-II umgesetzt. Die Substitution der drei AS, die sich unmittelbar vor dem G-S-G-Motiv befanden, resultierte zwar in einem Peptid (P1), das spezifischer von der XT-I xylosyliert wurde, allerdings war der innerhalb von 24 h quantifizierte Gesamtumsatz äußerst gering. Unter Verwendung eines solchen Peptids wäre der Nachweis geringer XT-I Aktivitäten nicht möglich. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Roch *et al.* überein, die die Isoform-Spezifität des P1-Peptids im RC XT-Aktivitätstest zeigten.

Da sich keines der vom K1-Peptid abgeleiteten Peptide als optimaler Akzeptor für den zu entwickelnden MS XT-I Aktivitätstest eignete, wurden als nächstes Peptide getestet, die laut einer Publikation von Briggs *et al.* XT-I spezifisch xylosyliert werden [141]. Die Peptide entstammten einer Peptidbibliothek, die durch die sukzessive Substitution aller 12 AS des verkürzten Bikunin-Moleküls (QEEEGSGGGQGG) durch alle 20 proteinogenen AS entstand. Die daraus resultierenden 240 Peptide wurden von den Autoren der Publikation unter Verwendung eines Lumineszenz-Aktivitätstests auf ihre XT-I Spezifität getestet. Insgesamt sechs Akzeptorpeptide, die im Lumineszenzassay die größte XT-I Spezifität zeigten, wurden in dieser Arbeit mit den N- und C-terminalen Modifizierungen synthetisiert und im MS XT-Test auf ihre Isoform-Spezifität getestet (s. Tab. 3.4). Die Ergebnisse des MS XT-Tests stimmten dabei größtenteils nicht mit den von Briggs *et al.* publizierten Angaben überein. Während die Hälfte der sechs getesteten Peptide Isoform-unspezifisch xylosyliert wurde, wurden zwei Peptide spezifischer von der XT-II umgesetzt. Lediglich die Substitution jeweils eines Glutamats durch ein Serin an dritter und vierter Position im Bikunin-Peptid führte zu einer deutlich spezifischeren XT-I Xylosylierung. Darüber hinaus konnte ein hoher Gesamtumsatz des Peptids innerhalb von 24 h detektiert werden, weshalb dieses Peptid (KE-74303) als möglicher Akzeptor des zu entwickelnden XT-I MS XT-Tests in Betracht gezogen und dessen Xylosylierung weiter charakterisiert werden sollte. Die Substitution von

jeweils nur einem Glutamat durch ein Serin führte interessanterweise zu keiner Isoform-spezifischen Umsetzung des jeweils entstandenen Peptids, während eine Substitution des Glutamats an dritter Position durch ein Prolin zu einer deutlichen XT-II Spezifität des entstandenen Peptids führte. Diese Ergebnisse ließen, bzgl. der AS-Sequenz, kein eindeutiges Muster der Isoform-spezifischen Xylosylierung erkennen und zeigten darüber hinaus unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Assays auf.

Der von Briggs *et al.* verwendete Lumineszenz-Assay basiert auf der Quantifizierung des von UDP-Xylose abgespaltenen UDP und lieferte daher lediglich einen indirekten Nachweis der XT-Aktivität. Die als Enzymquelle verwendeten Überstände stammten von HEK293-F Zellen, die zuvor mit einem Vektor transfiziert wurden, der die *XYLT1*-Gensequenz enthielt, die für die AS 232-959 der humanen XT-I kodierte. Das translatierte Protein enthielt N-terminal einen His-tag und konnte mittels Affinitätschromatographie aus dem Zellkulturüberstand isoliert werden. Demzufolge wurde auch in diesem Assay für die Bestimmung der Enzymaktivität nur eine verkürzte Variante der XT-I eingesetzt. Für den massenspektrometrischen Nachweis der Isoform-spezifischen Xylosylierung wurden in dieser Arbeit Vollängenproteine beider XT-Isoformen verwendet, wobei der Nachweis des xylosylierten Peptids jeweils direkt über die Quantifizierung der integrierten Peakfläche realisiert wurde. Im Lumineszenzassay werden unspezifisch alle UDP-Moleküle quantifiziert, wodurch der Assay nur mit aufgereinigten Überständen durchgeführt werden kann. Die spezifische Quantifizierung der XT-Aktivität in biologischen Flüssigkeiten wie Lysaten und ZKÜ ist daher mit diesem Assay nicht möglich.

4.3.2 Validierung des XT-I spezifischen MS XT-Aktivitätstests unter Verwendung des Peptids KE-74303

Für die Validierung des spezifischen MS XT-I Aktivitätstests wurde im Folgenden das Peptid KE-74303 verwendet. Zunächst wurde der Reaktionsansatz für verschiedene Zeiten inkubiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Peptid nach einer Inkubationszeit von 24 h am spezifischsten von der XT-I xylosyliert wurde und sich die Verhältnisse der Isoform-spezifischen Umsetzung nach 41 h angleichen (s. Tab. 3.5). Während die Enzymaktivitäten beider XT-Isoformen unter Verwendung der UDP-Xylose als Substrat nahezu identisch sind [224], könnte die XT-I spezifischere Xylosylierung auf eine höhere Affinität zum Akzeptor-Peptid zurückzuführen sein. Eine starke XT-I katalysierte Xylosylierung innerhalb der ersten 24 h könnte im weiteren Verlauf zu verminderten Substrat- und Akzeptorkonzentrationen geführt haben, wodurch sich die Xylosylierungsraten beider XT-Isoformen nach 41 h angleichen. Diese Argumentation wird dadurch bekräftigt, dass die integrierte Peakfläche des XT-I xylosylierten Peptids innerhalb dieses Zeitraums nicht zunahm. Im Gegensatz dazu wurden bzgl. der XT-II katalysierten Reaktion nach 41 h höhere Peakflächen detektiert als

nach 24 h (s. Tab. 3.5). Zur Testung der Linearität wurden von dem verdünnten Reaktionsansatz nach einer Inkubationszeit von 24 h verschiedene Volumina injiziert und danach die jeweilige integrierte Peakfläche des xylosylierten Peptids quantifiziert. Es zeigte sich, dass der Assay bis zu einem Injektionsvolumen von mindestens 10 μL linear ist (s. Abb. 3.16).

4.3.3 Methodenvergleich zur Bestimmung der XT-I Aktivität

Abschließend wurde das Peptid KE-74303 für die Quantifizierung der XT-I Aktivität verschiedener ZKÜ eingesetzt und die resultierenden Werte mit denen des RC XT-Aktivitätstests verglichen (s. Tab. 3.6). Die Überstände stammten dabei von XT-I defizienten Fibroblasten (XT_{Def}) und zwei Kontrollzelllinien, die jeweils unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die im jeweiligen Test ermittelten Werte für die Zelllinien zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die anhand der Werte des RC-Tests ermittelten Verhältnisse zwischen den beiden Kontrollzellen stimmten für alle Bedingungen mit denen des MS XT-Tests überein. Im Vergleich zum MS XT-Test waren die für den RC-Assay berechneten Verhältnisse zwischen den Kontroll- und XT-I defizienten Zellen größtenteils höher, wobei die Unterschiede vor allem nach der Induktion mit TGF- β 1 deutlich wurden. Die induktiven Effekte berechneten sich für jede Zelllinie über das Verhältnis der XT-Aktivität nach TGF- β 1 Induktion zu der nach einer serumreduzierten Kultivierung. Sowohl im RC- als auch im MS XT-Aktivitätstest konnten dabei keine induktiven Effekte für die XT-I defizienten Zellen nachgewiesen werden. Für die Kontrollzellen konnten durch beide Tests induktive Effekte gezeigt werden, wobei die im RC-Test ermittelten Effekte allesamt stärker waren. Kuhn *et al.* haben bereits eine nur mäßige Korrelation zwischen dem RC XT-Aktivitätstest und dem bisher verwendeten MS XT-Test bestimmt [139], wobei dabei das XT-II spezifische K1-Peptid als Akzeptor verwendet wurde, was einen direkten Vergleich mit dem XT-I spezifischen Test erschwert. Der RC XT-Aktivitätstest basiert auf der XT katalysierten Xylosylierung eines Akzeptor-Moleküls mit radioaktiver UDP-[¹⁴C]-Xylose, wobei die Menge an kovalent gebundener [¹⁴C]-Xylose proportional zur XT-Aktivität ist [133]. Das in dem Assay als Akzeptor verwendete Seidenfibroin besteht zu 60 % aus der repetitiven AS-Sequenz G-S-G-A-G-A-G-A, die das für die Xylosylierung essenzielle G-S-G Motiv aufweist [229]. Die XT-Aktivität wird beim RC-Test am Szintillationsmessgerät indirekt über die Zerfälle pro Minute berechnet. Beim MS XT-Aktivitätstests wird das xylosylierte Molekül hingegen direkt über das berechnete Masse-zu-Ladung (m/z)-Verhältnis nachgewiesen. In den meisten biologischen Flüssigkeiten können sich noch andere potenzielle Akzeptoren befinden, auf die die radioaktive UDP-[¹⁴C]-Xylose übertragen werden kann. Im RC-Assay kann jedoch nicht zwischen dem xylosylierten Seidenfibroin und anderen xylosylierten Molekülen aus der Reaktionsmatrix, wie bspw. PG, unterschieden werden. Im Gegensatz dazu kann im massenspektrometrischen Assay selektiv das eingesetzte

synthetische Peptid identifiziert und dessen Xylosylierung quantifiziert werden. Das im RC XT-Aktivitätstest als Akzeptor verwendete Seidenfibroin hat darüber hinaus eine unbekannte Länge und dementsprechend undefiniert viele Xylosylierungsstellen. Es ist schwer zu beurteilen, wie sich das Molekül in Lösung verhält und ob mögliche Sekundär- oder Tertiärstrukturen gebildet werden, die die Xylosylierung evtl. beeinflussen könnten (sterische Hinderung) [230, 231].

Durch die Katalyse des initialen Schritts der PG-Biosynthese ist die XT-I ein zentrales Enzym der Bindegewebs-Homöostase. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Gelenk- und Bindegewebserkrankungen erhöhte XT-I Aktivitäten in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten aufweisen [54–56, 232, 233], wodurch ein sensitiver Nachweis der XT-I Aktivität von hoher diagnostischer Bedeutung ist. Auch in anderen Arbeiten wird der massenspektrometrische Nachweis von diagnostisch relevanten Molekülen innerhalb der klinischen Routinemessungen aufgrund einer höheren Spezifität und Sensitivität gegenüber anderen Nachweismethoden bevorzugt [234].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein zweidimensionaler MS XT-I Aktivitätstest entwickelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das G-S-G Motiv essenziell für die Xylosylierung ist und dass Substitutionen im N-terminalen Bereich des bisher verwendeten XT-II spezifischeren K1-Peptids zu einer erhöhten XT-I Spezifität führen. Im Vergleich zu dem Lumineszenz- und RC- Assay ist der MS XT-I Aktivitätstest selektiver, sensitiver, günstiger und einfacher durchführbar [213]. Darüber hinaus können mehr Proben in kürzerer Zeit vermessen werden (Hochdurchsatz).

4.4 Charakterisierung der ECM-Homöostase und Myofibroblasten-Differenzierung dermalen Fibroblasten eines Patienten mit einer *XYLT1*-Defizienz assoziierten skeletalen Dysplasie

Die Phänotypen und die zugrundeliegenden genetischen Ursachen skelettaler Erkrankungen sind sehr heterogen [235, 236]. Dies wird am Beispiel der skelettalen Dysplasien erkennbar, von denen über 450 unterschiedliche Typen bekannt und die genetischen Ursachen meist geklärt sind [79]. Pathologische Mutationen betreffen dabei oft Gene, die an der Homöostase der ECM beteiligt sind. *Osteogenesis-imperfecta* wird z.B. durch Mutationen im *COL1A1*-Gen verursacht [237, 238], wohingegen einige Chondrodystrophien und Osteoarthritis (OA) auf Mutationen in Genen zurückzuführen sind, die für unterschiedliche PG *core*-Proteine kodieren [239, 240]. Eine verminderte PG-Biosynthese wurde während der frühen Phase der OA beobachtet, was letztendlich zu einer Degradierung des Knorpelgewebes [241] und einer erhöhten XT-Aktivität im Serum führt [178, 232, 242]. Eames *et al.* zeigten in *in vivo* Studien, dass Zebrafischlarven mit homozygoten *xylt1 frameshift* Mutationen verminderte PG-Level

aufwiesen und dies zu einer frühzeitigen perichondralen Ossifikation führte, wodurch die essenzielle Rolle der XT-I bei der Regulation der Knochenbildung aufgezeigt wurde [192].

4.4.1 Vergleich der Genexpressionen verschiedener ECM-assoziiierter Gene und der XT-Aktivitäten

PG spielen eine wichtige Rolle bzgl. der Homöostase und Integrität der ECM. Das PG Dekorin reguliert die Bildung von Kollagenfibrillen und die Aktivität des Zytokins TGF- β 1 [44, 243]. Die PG-Biosynthese wird durch die Übertragung aktivierter Xylose von UDP-Xylose auf einen Serinrest im PG *core*-Protein initiiert, wobei diese Reaktion von der XT katalysiert wird. Einige skeletale Dysplasien stehen im Zusammenhang mit Mutationen im *XYLT1*-Gen [20, 65, 244]. In den jeweiligen Publikationen werden die zugrundeliegenden *XYLT1*-Mutationen und deren Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese zwar charakterisiert, die Auswirkungen der *XYLT1*-Defizienz auf Prozesse wie die Myofibroblasten-Differenzierung werden hingegen nicht thematisiert, obwohl die XT stark mit der Manifestation fibrotischer Erkrankungen assoziiert ist [76]. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit erstmals die Myofibroblasten-Differenzierung von Fibroblasten eines skeletalen Dysplasie Patienten charakterisiert, der *compound* heterozygote *XYLT1*-Mutationen aufwies [66]. Die Mutationen führten auf einem Allel zur Deletion von 3,3 Mb auf Chromosom 16 (arr[hg19] 16p13.11p12.3(15,355,329–18,692,057) \times 1) und auf dem zweiten Allel zu einer 18 bp Deletion innerhalb der Spleißstelle von Intron 7 und Exon 8 des *XYLT1*-Gens. Bedingt durch die Mutationen wurden vier verkürzte, alternative Transkripte gebildet. Durch die zusätzlich untypischen Symptome, u.a. ein vorgewölbtes Abdomen, Tachypnoe und eine interkostale Retraktion, konnte eine *XYLT1*-basierte skeletale Dysplasie erstmals nicht der DBSD Typ2 zugeordnet werden. Die Patienten-Fibroblasten wurden nicht näher charakterisiert und es wurde über keine Wundheilungsstörung des Patienten berichtet.

Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen die Patienten-Fibroblasten verminderte Basalexpressionen ECM-assoziiierter Gene auf (s. Abb. 3.17). Durch die *compound*-heterozygoten *XYLT1*-Mutationen waren die basalen *XYLT1*- und *DCN* mRNA-Level der Patienten-Fibroblasten stark vermindert. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorheriger Publikationen überein, bei denen stark verminderte PG-Level mit homozygoten *frameshift* Mutationen im *XYLT1*-Gen assoziiert waren [65, 192]. In einer weiteren Publikation konnte gezeigt werden, dass *Missense*-Mutationen im murinen *Xylt1*-Gen ebenfalls zu verminderten XT- und PG-Expressionen führten und die Mäuse Wachstumsstörungen aufwiesen [245]. Unter Verwendung des in dieser Arbeit entwickelten MS Tests zum Isoform-spezifischen Nachweis der XT-I Aktivität wurden für alle untersuchten Kultivierungsbedingungen verminderte intra- und extrazelluläre XT-I Aktivitäten in den Patientenzellen nachgewiesen. In vergangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von NHDF mit dem

Zytokin TGF- β 1 zu einer Induktion der *XYLT1* mRNA-Expression und daraus folgend zu erhöhten XT-Aktivitäten führt [246, 247]. Im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte die XT-Aktivität und die *XYLT1*-Expression in den Patienten-Fibroblasten nach TGF- β 1-Behandlung nur geringfügig induziert werden.

Interessanterweise wurden die verminderten Expressionen der XT-I nicht durch erhöhte *XYLT2* Expressionen kompensiert. Ähnliches wurde nach dem in dieser Arbeit durchgeführten *XYLT2 knockdown* in HEK293-Zellen festgestellt. Dabei führten verminderte *XYLT2* mRNA-Level ebenfalls zu keiner kompensatorisch erhöhten *XYLT1*-Genexpression. Für andere Proteine konnte gezeigt werden, dass reduzierte Expressionen einer Isoform zu kompensatorischen Expressionsänderungen der anderen Isoformen führt. In einem Mausmodell konnte bspw. gezeigt werden, dass die Defizienz einer oder zweier Isoformen des Cyclin-D (insgesamt gibt es drei murine Isoformen) zu einer kompensatorischen Induktion der anderen Isoformen führte [248, 249]. Erst der *knockdown* aller drei Isoformen hatte die Ausbildung eines pathologischen Phänotyps zur Folge [250]. Während in den Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur lediglich eine XT-Isoform nachgewiesen werden konnte, exprimieren alle höheren Organismen zwei XT-Isoformen [140].

Im Vergleich zu den Kontrollen waren die basalen mRNA-Level des Myofibroblasten-Markers *ACTA2* in den Patientenzellen signifikant vermindert (s. Abb. 3.17 d). Die TGF- β 1 Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung führte in den Kontrollzellen zu einer stark erhöhten *ACTA2*-Expression, während in den Patientenzellen kein induktiver Effekt detektiert wurde (s. Abb. 3.18 d). Auch auf Proteinebene wurden in den Patientenzellen sowohl mittels Immunfluoreszenz-Analyse als auch im quantitativen Western Blot stark verminderte α -SMA Proteinkonzentrationen nachgewiesen (s. Abb. 3.19). Ein Zusammenhang zwischen veränderten XT-I und α -SMA Expressionen wurde bereits zuvor beschrieben. Faust *et al.* detektierten nach einer TGF- β 1 vermittelten Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung gleichzeitig erhöhte XT-I und α -SMA Expressionen in NHDF und schlugen die XT-I daraufhin als Myofibroblasten-Marker vor [76]. Die heterozygote 3,3 Mb-Deletion auf einem Allel umfasste u.a. auch das *MYH11*-Gen, welches für das Glattmuskel Myosin-11 Protein kodiert und an der Kontraktion von Glattmuskelzellen beteiligt ist [251, 252]. Um auszuschließen, dass die heterozygote Deletion an den beschriebenen Effekten beteiligt ist, wurde die *MYH11* mRNA-Expressionen in den Patienten- und Kontrollzellen vergleichend quantifiziert. Sowohl in den Patienten- als auch in den Kontrollfibroblasten konnten in keinem Fall quantifizierbare *MYH11* mRNA-Level nachgewiesen werden, wodurch es unwahrscheinlich ist, dass die heterozygote *MYH11* Deletion für die beschriebenen Effekte verantwortlich ist.

Zusammenhänge zwischen einer verminderten ECM-Homöostase und einer daraus resultierenden Reduktion der α -SMA Expression sind auch bei anderen Krankheitsbildern bekannt. Bei Patienten mit thorakalen Aortenaneurysmen mit Dissektion (TAAD) konnte gezeigt werden, dass die sich in der Adventitia befindenden Fibroblasten eine verminderte ECM-Produktion aufweisen [253, 254]. Unter physiologischen Bedingungen differenzieren diese Zellen bei Verletzungen der Aorta zu Myofibroblasten, um die Aorten-Remodellierung zu unterstützen [255]. Suh *et al.* konnten zeigen, dass adventitielle Fibroblasten von zehn verschiedenen TAAD-Patienten nach TGF- β 1-Induktion im Vergleich zu Kontrollzellen ebenfalls eine stark verminderte α -SMA Expression und Myofibroblasten-Differenzierung aufwiesen [255]. In der Studie bildeten aber sowohl die Patienten- als auch die Kontrollfibroblasten einen Myofibroblasten typischen Phänotyp aus. Im Gegensatz zu den charakterisierten Fibroblasten des TAAD-Patienten zeigten die Fibroblasten des skeletalen Dysplasie-Patienten während keiner Kultivierungsbedingung den für Myofibroblasten typischen Phänotyp. Dieser ist durch eine spindelförmige Morphologie, fokale Adhäsionen und die für Myofibroblasten charakteristische Inkorporation des α -SMA in den Stressfasern charakterisiert [256]. Ein weiterer wichtiger Aspekt in dem Zusammenhang ist, dass TAAD oft in Verbindung mit anderen genetischen Syndromen (u.a. Marfan Syndrom, Loeys-Dietz Syndrom, Ehlers-Danolos Syndrom) auftritt, die das Bindegewebe und das Skelett betreffen. Der genetische Hintergrund für die Manifestation der TAAD-Erkrankung ist ebenfalls sehr divers. Es gibt einige Publikationen, die Mutationen im *ACTA2*-Gen als Auslöser der Krankheit identifizierten [257–261], aber auch *BGN* [262] und *MYH11*-Mutationen [263] stehen im Zusammenhang mit der Erkrankung.

Von den quantifizierten Genexpressionen war die TGF- β 1 Genexpression, im Vergleich zu den Kontrollen, basal in den Patientenzellen erhöht (s. Abb. 3.17 c). Auch auf Proteinebene wurden tendenziell höhere basale TGF- β 1 Konzentrationen im ZKÜ der Patientenzellen bestimmt (s. Abb. 3.20). TGF- β 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [264], wodurch die nachgewiesenen, erhöhten TGF- β 1 Expressionen darauf zurückzuführen sein könnten, dass die Myofibroblasten-Differenzierung induziert wird, um somit u.a. einer verminderten *ACTA2* Expression entgegenzuwirken. Zusätzlich könnte es sich um einen kompensatorischen Effekt infolge verminderter *XYLT1*-Expressionen handeln, da das Zytokin die *XYLT1* Genexpression reguliert [246]. Mehrere Studien deuten auf eine wichtige Bedeutung von TGF- β 1 während der Ossifikation hin. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass *Tgf β 1^{-/-} knockout* Mäuse eine verminderte Mineralisierung und ein vermindertes Knochenwachstum aufwiesen [265]. Erhöhte TGF- β 1 Konzentrationen konnten während der physiologischen Heilung von Knochenfrakturen in Patientenseren [266] und während verschiedener Chondrodysplasien [267] nachgewiesen

werden, was ebenfalls auf eine wichtige Beteiligung des Moleküls an der Knochenbildung schließen lässt.

Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen die Patientenzellen eine verminderte basale *DCN* Genexpressionen auf. Dies könnte mit der erhöhten TGF- β 1 Expressionen der Patienten-Fibroblasten in Zusammenhang stehen, da das PG Decorin an das Zytokin binden und dadurch dessen Aktivität regulieren kann [43]. Die verminderten *DCN*-Expressionen könnten zu einer reduzierten TGF- β 1 Bindung geführt haben, wodurch das Zytokin in geringerem Maße in der ECM zurückgehalten wurde. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass überschüssiges und nicht gebundenes TGF- β 1 in *Dcn*^{-/-} *knockout* Mäusen an Rezeptoren auf Stromazellen des Knochenmarks bindet und dadurch eine erhöhte Signaltransduktion initiiert. Die daraus resultierende, erhöhte Aktivität des TGF- β Signalweges stand dabei im Zusammenhang mit der Induktion der Apoptose, einer dadurch verminderten Bildung von Osteoprogenitorzellen und einer letztendlich reduzierten Knochenbildung [268].

4.4.2 Weiterführende Charakterisierung der Myofibroblasten-Differenzierung

Die verminderte Expression des α -SMA und die fehlende Ausbildung des typischen Myofibroblasten-Phänotyps nach TGF- β 1 Induktion gaben einen ersten Hinweis auf eine abnorme Myofibroblasten-Differenzierung der Patientenzellen. Um dies genauer beurteilen zu können, wurden Wundheilungs- und Kontraktionsassays durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen migrieren aktivierte Myofibroblasten in den Bereich der Wunde und lösen, u.a. durch die Ausschüttung von Zytokinen, eine Entzündungsreaktion aus [269, 270]. Die Patientenzellen konnten die initial in den Zellmonolayer eingefügte Wunde während keiner der getesteten Kultivierungsbedingungen innerhalb von 72 h schließen, wobei eine TGF- β 1 Behandlung der Zellen zu einer erhöhten Konfluenz führte. Die Kontrollzellen schlossen die Wunde während der getesteten Zellkulturbedingungen hingegen vollständig. Die Kontraktilität von Myofibroblasten ist im Rahmen der Wundheilung essenziell und trägt maßgeblich zum Wundverschluss bei [271]. Hinz *et al.* konnten 2001 zeigen, dass Myofibroblasten, durch die Ausbildung von Stressfasern, im Vergleich zu undifferenzierten Fibroblasten eine höhere Kontraktilität ausüben [272]. Während die Kontrollzellen bereits unter serumreduzierten Bedingungen kontrahierten, konnte die Kontraktilität durch TGF- β 1 Induktion erhöht werden. Im Gegensatz dazu kontrahierten die serumreduziert kultivierten Patientenzellen überhaupt nicht und die Supplementierung des Mediums mit TGF- β 1 führte lediglich zu einer Kontraktilität, die mit der der nicht-induzierten Kontrollzellen vergleichbar war (s. Abb. 3.21). In einer vorherigen Arbeit verglichen Rockey *et al.* die Kontraktions- und Migrationsfähigkeit von *Acta2*^{+/-}-Wildtyp und *Acta2*^{-/-}-defizienten murinen Fibroblasten. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit generierten Daten konnte in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden, dass die defizienten Zellen eine verminderte Kontraktilität und

Migration aufweisen [273]. Zusätzlich zu der reprimierten α -SMA Expression zeigt die verminderte Wundheilungs- und Kontraktionsfähigkeit der Patientenzellen eine abnorme Myofibroblasten-Differenzierung der Zellen auf.

4.4.3 Vergleich der zellulären Seneszenz

Ähnlich der Apoptose wird die zelluläre Seneszenz eingeleitet, um die Replikation beschädigter Zellen zu verhindern. Während die Apoptose den Zelltod einleitet, weisen senescente Zellen eine persistente Proliferationsinhibition und einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) auf [274]. In der finalen Phase der Wundheilung wird die zelluläre Seneszenz in Myofibroblasten eingeleitet, um eine Persistenz der Zellen und eine damit verbundene Manifestation fibrotischen Gewebes zu verhindern [275, 276]. Skeletale Dysplasien wurden bereits zuvor mit der Manifestation zellulärer Seneszenz assoziiert. Das Hutchinson-Gilford Progerie Syndrom zählt zu den skeletalen Dysplasien [277] und ist durch ein vermindertes Wachstum, eine ECM-Dysfunktion und eine verfrühte Alterung der Patienten charakterisiert [278]. Auslöser der Erkrankung sind Mutationen im *Lamin-A/C* (*LMNA*)-Gen, einem Regulator der Gentranskription. Dadurch bedingt kommt es u.a. zu einer erhöhten Expression von ECM-Komponenten und einer gleichzeitig verminderten Expression von Enzymen, die für die Remodellierung der ECM verantwortlich sind [279–281]. Die hier charakterisierten Patientenzellen zeigten ebenfalls eine höhere zelluläre Seneszenz, wobei diese während der serumreduzierten Kultivierung am höchsten war. Die Behandlung mit TGF- β 1 führte zu einer stark verminderten Zelldichte und einer verminderten Adhärenz der Patientenzellen. Jürgensmeier *et al.* wiesen einen durch TGF- β 1 induzierten, zytotoxischen Effekt bei transformierten Zellen nach. Dabei führte eine exogene TGF- β 1 Behandlung transformierter Zellen zu einer erhöhten Apoptose, während die Behandlung keinen Einfluss auf untransformierte Zellen hatte [282]. Während der genaue Wirkmechanismus in dieser Studie nicht aufgeklärt werden konnte, lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass exogenes TGF- β 1 die Apoptose in den Patientenzellen erhöht haben könnte. Generell wurden veränderte Morphologien der Patientenzellen während der serumreduzierten Kultivierung und nach TGF- β 1 Induktion detektiert, die durch vergrößerte, elongierte Zellen charakterisiert waren (s. Abb. 3.22). Diese Zellmorphologien wurden bereits in früheren Arbeiten mit einer zellulären Seneszenz von Fibroblasten assoziiert [283]. Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse geben erstmals einen Hinweis darauf, dass eine verminderte XT-I Expression mit einer erhöhten zellulären Seneszenz dermalen Fibroblasten assoziiert ist.

Bei den bisherigen Charakterisierungen skeletaler Dysplasien, die auf *XYLT1*-Mutationen zurückzuführen sind, wurde sich primär auf das Knochen- und Knorpelgewebe fokussiert. Einflüsse auf die Dermis der Patienten, z.B. in Form von Wundheilungsstörungen, wurden

hingegen nicht evaluiert. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass dermale Fibroblasten eines Patienten, der an einer XT-I-Defizienz bedingten skeletalen Dysplasie litt, eine veränderte Myofibroblasten-Differenzierung aufweisen. Dies ist die erste Charakterisierung der Myofibroblasten-Differenzierung bei einer vorliegenden XT-I Defizienz. Vorherige Studien analysierten die Myofibroblasten-Charakteristika nach Induktion der XT-Aktivität [76]. Die abnorme Differenzierung der Patienten-Fibroblasten war durch reprimierte α -SMA Expressionen und verminderte Wundheilungs- und Kontraktionsfähigkeiten der TGF- β 1 induzierten Zellen charakterisiert. Darüber hinaus wurden verminderte relative Expressionen nahezu aller quantifizierter ECM-assoziiertes Gene und eine gleichzeitig erhöhte TGF- β 1 Expression beobachtet. Das Zytokin ist ein Induktor der Myofibroblasten-Differenzierung, weshalb eine erhöhte Expression bisher mit induzierten α -SMA Expressionen assoziiert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die XT-I nicht nur ein Marker der Myofibroblasten-Differenzierung ist, sondern möglicherweise zusätzlich an deren Regulation beteiligt ist.

4.5 Generierung eines CRISPR/Cas9-vermittelten *XYLT1* knockouts in neonatalen NHDF

Die charakterisierten Patientenzellen wiesen eine XT-I Defizienz auf, die auf *compound* heterozygote Mutationen im *XYLT1*-Gen zurückzuführen war. Die heterozygote 3,3 Mb Deletion auf Chromosom 16 betraf noch weitere Gene, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies einen Einfluss auf die Ausbildung der beschriebenen Effekte hatte. Aus diesen Gründen sollte im letzten Teil dieser Arbeit erstmals ein CRISPR/Cas9-vermittelter *knockout* des *XYLT1* Gens in primären neonatalen NHDF durchgeführt werden, um ein optimales Modellsystem zur besseren Charakterisierung der XT-I zu etablieren. Aufgrund der mit dem *gene-editing* primärer Zellen verbundenen hohen Optimierungsarbeiten, war die Generierung von *XYLT1* *knockout* Klonen das primäre Ziel dieser Arbeit, um diese in Folgestudien näher charakterisieren zu können. Primäre Zellen werden bevorzugt für *in vitro* Studien verwendet, da sie die *in vivo* Bedingungen besser widerspiegeln als immortalisierte oder transformierte Zellen [284]. Da Fibroblasten und deren Differenzierung zu Myofibroblasten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Manifestation von Fibrosen spielen, wird dieser Zelltyp häufig für *in vitro* Studien zu Fibrosen verwendet [285–288]. Ein gezielter *knockout* des *XYLT1*-Gens in diesen Zellen könnte daher in Folgeprojekten weitere wichtige Erkenntnisse zur Rolle der XT-I während fibrotischer Erkrankungen liefern.

4.5.1 Transfektion und FACS-Isolierung der neonatalen NHDF

Ein großer Nachteil der primären Zellen in Bezug auf das *gene-editing* ist, dass sie schwerer zu transfizieren sind als die meisten immortalisierten Zellen und das Einbringen größerer

Moleküle (z.B. Plasmide) viel Etablierungsarbeit erfordert [284]. Für die Transfektion von primären Zellen wird oft die Elektroporation angewandt, wobei durch einen elektrischen Puls temporär Poren in der Zellmembran entstehen, durch die die zu transfizierenden Moleküle in die Zelle gelangen [289]. Diese Methode wird vor allem für den effizienten Transfer kleiner Plasmide (bis zu 3,5 kb) verwendet. Die Elektroporation größerer Plasmide (6-16 kb) ist meist ineffizient und resultiert in einer verminderten Viabilität der Zellen [290]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst versucht, die neonatalen NHDF mittels Elektroporation mit dem etwa 9,3 kb großen pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)-Plasmid zu transfizieren. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben konnten auf diese Weise nur wenige Zellen mit dem Plasmid transfiziert werden. Aus diesen Gründen wurde die Lipofektion der Zellen etabliert, wobei sich die Verwendung des Reagenzes *Lipofectamine LTX* als am geeignetsten herausstellte. Dieses Reagenz wurde bereits in anderen CRISPR/Cas9-Studien für die Lipofektion primärer Zellen mit größeren Plasmiden verwendet [291, 292]. Die zur Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems essenzielle gRNA wurde so konzipiert, dass sie spezifisch im Exon 9 des *XYLT1* Gens bindet und sich in jeweils vier Basen von den ersten dreizehn ermittelten *off-target* Sequenzen unterschied, die *in silico* die höchste Sequenzähnlichkeit aufwiesen (s. Tab. 3.7). Die Sequenzunterschiede zeigten sich größtenteils in der *seed*-Region (8-14 Basen *upstream* der PAM-Sequenz), wobei vor allem Mutationen in diesem Bereich zu einer verminderten Effizienz des CRISPR/Cas-Systems führen [116, 198]. Für die Identifizierung möglicher *off-target* Sequenzen wurden nur Sequenzen in Betracht gezogen, auf die am 3'-Ende eine PAM-Sequenz der Form NGG (Bindung der aus *S. pyogenes* isolierten Cas9) folgte. Die gRNA wurde in den zu transfizierenden Expressionsvektor PX458 kloniert, wobei deren Expression unter der Kontrolle des U6 RNA Polymerase III Promoters stand [122]. Da dieser zur Initiierung der Transkription eine Guanin (G) Base benötigt [293–295], wurde der 20 nt langen gRNA am 5'-Ende ein zusätzliches G angefügt. Durch eine Vielzahl von Optimierungsversuchen bzgl. des Transfektionsreagenzes, der eingesetzten Plasmid-Menge und der Inkubationszeiten, konnten die primären NHDF letztendlich mit einer Effizienz von etwa 30 % mit dem Plasmid PX458 transfiziert werden (s. Abb. 3.23). Für die Transfektion primärer Zellen stellt dies einen hohen Wert dar [296–298].

Insgesamt 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fluoreszenzbasiert am FACS-Gerät isoliert und transfizierte Zellen erfolgreich von nicht-transfizierten Zellen separiert (s. Abb. 3.25). Neben der Transfektion stellt die Isolierung der Zellen am Durchflusszytometer einen zusätzlichen Stress für die Zellen dar [299]. In einer Studie von Binek *et al.* wurde gezeigt, dass die FACS-Isolierung muriner Makrophagen zu einem temporär veränderten Metabolismus und einem Anstieg des zellulären Stresses führte, der dem während einer Entzündungsreaktion ähnelte. Darüber hinaus wurden nach Anwendung

der Methode erhöhte ADP-Ribose Konzentrationen detektiert, ein Metabolit, der in Folge von Zellschädigungen sekretiert wird. Die beschriebenen Effekte wurden primär auf die physikalische Einwirkung auf die Zellen während des Isoliervorgangs zurückgeführt [300]. Um den zusätzlichen Stress der im Rahmen dieser Arbeit transfizierten Zellen kompensieren zu können, wurden die NHDF nach der Isolierung zunächst für zwei Wochen in Standard Zellkulturmedium kultiviert und währenddessen nicht passagiert.

4.5.2 Zellvereinzelung und Mutationsnachweis transfizierter neonataler NHDF

Die erschwerte Zellvereinzelung primärer Zellen stellt einen weiteren Grund dar, weshalb in CRISPR/Cas-basierten *in vitro* Studien häufig immortalisierte oder transformierte Zelllinien verwendet werden [301]. Im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien haben primäre Zellen eine limitierte Teilungsaktivität und verminderte Teilungsraten [302, 303]. HEK293-Zellen wurden durch die stabile Transfektion des E1-Gens aus dem Adenovirus Typ 5 immortalisiert, was u.a. zu einer erhöhten p53-Degradation führt, einem Protein, das die Apoptose und den Zellzyklusarrest einleitet [304–307]. Nach Vereinzelung der NHDF wurde, zur Bestimmung der Mutationsrate, ein T7-Endonuklease Assay durchgeführt. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden neben dem ungeschnittenen Hauptfragment zwei weitere Produktbanden im Agarosegel detektiert. Durch die Berechnung der Bandenintensitäts-Verhältnisse zwischen fragmentierten und nicht-fragmentierten Amplifikaten [308] wurde eine Mutationsrate von 80 % berechnet (s. Abb. 3.26). Dies war ein erster Nachweis dafür, dass das System in den Zellen zwar funktional war, aber nicht alle Allele Mutationen im zur gRNA komplementären Bereich im Exon 9 des *XYLT1* Gens aufwiesen. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Ergebnisse auf die niedrige Sensitivität des T7-Assays zurückzuführen sind. Studien zeigten, dass im T7-Assay häufig einzelne Basenmutationen nicht detektiert werden [309] und dass das Enzym nur Heteroduplex-Fehlpaarungen erkennt. Wildtyp- und homozygot mutierte DNA-Stränge (Homoduplexe) werden von dem Enzym nicht erkannt [310].

Von 118 isolierten Einzelklonen sind lediglich 9 (7,6 %) bis zur Konfluenz auf einer 100 x 20 mm Zellkulturschale gewachsen. Die Zellen wurden geerntet, deren DNA isoliert und der zur gRNA komplementäre Bereich amplifiziert. Die Sequenzierung der aufgereinigten Amplifikate ergab, dass alle neun Klone identische Mutationen aufwiesen und daher vermutlich aus demselben Ursprungsklon hervorgingen. Aus dem Chromatogramm der Sequenzierung ging hervor, dass die Cas9-Endonuklease den Doppelstrang drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz geschnitten hat. Ab dieser Position wurden sich überlagernde Signale detektiert, wodurch die weitere Sequenz nicht mehr eindeutig bestimmbar war (s. Abb. 3.27). Dies entspricht den Erwartungen, da aus vielen Publikationen hervorgeht, dass das Enzym die DNA an dieser Position relativ zur PAM-Sequenz schneidet [311–313].

Die Allel-spezifische Sequenzierung nach Durchführung der TA-Klonierung bestätigte, dass die DNA auf beiden Allelen drei Basen *upstream* der PAM-Sequenz geschnitten wurde und darüber hinaus beide Allele unterschiedliche Mutationen im zur gRNA komplementären Bereich aufwiesen (s. Abb. 3.28). Durch die Deletion von einer bzw. von fünf Basen kam es dabei auf beiden Allelen zu einer Veränderung des Leserasters (*frameshift*) und zur unmittelbaren Bildung je eines Stopp-Codons (p.Tyr617fs). Die Mutationen führten zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese an Position 617 (Tyrosin), woraus ein um 255 AS verkürztes XT-I Protein resultierte (s. Tab. 3.8).

Wie bei den bereits zuvor beschriebenen *XYLT2* Mutationen in den Exons 2 und 9 (s. 4.2) befanden sich die beschriebenen *XYLT1* Mutationen im Exon 9 ebenfalls in dem für die katalytische Domäne des Enzyms kodierenden Bereich [52]. Es konnte gezeigt werden, dass homozygote *missense* Mutationen innerhalb der katalytischen Domäne des XT-I Proteins (p.R481W) zu verminderten PG-Leveln führen und die betroffenen Patienten u.a. an Kleinwuchs und Gesichtsanomalien leiden. Entgegen der Erwartungen konnte jedoch keine veränderte XT-Aktivität im Serum der Patienten nachgewiesen werden. Die sich zu den Kontrollen nicht unterscheidenden XT-Aktivitäten wurden dabei auf die verwendeten, nur bedingt Isoform-spezifischen Assays (radiochemischer- und HPLC XT-Assay) zurückgeführt. Dies unterstreicht erneut die Relevanz eines, wie im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, Isoform-spezifischen XT-Tests. Diese und eine weitere *missense* Mutation (p.Arg598Cys) führten darüber hinaus zu einer subzellulären De-Lokalisation des Enzyms. Während das Protein normalerweise im Golgiapparat lokalisiert ist, ergaben Immunfluoreszenzanalysen, dass die XT-I bei den betroffenen Patienten diffus im Zytoplasma de-lokalisiert ist [20, 65]. In einer Studie aus dem Jahr 2017 wurde eine *XYLT1* Mutation eines an DBSD Typ 2 erkrankten Patienten charakterisiert. Dabei führte eine homozygote Duplikation einer einzelnen Base (c.2169dupA) im *XYLT1* Gen zu einer *frameshift* Mutation und letztendlich zur Bildung eines frühzeitigen Stopp-Codons (p.(Val724Serfs*10)) innerhalb der katalytischen Domäne des Enzyms. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation dazu führte, dass das Enzym im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wurde und folglich nicht im Golgiapparat lokalisiert war [314]. Die Mutationen führten somit zur keiner vollständigen Degradierung, sondern zur Bildung verkürzter XT-I Proteine.

4.5.3 Erste Charakterisierung der neonatalen NHDF CRISPR *XYLT1* knockout Zellen

Um mögliche Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten heterozygoten *frameshift* Mutation im Exon 9 des *XYLT1* Gens von neonatalen NHDF zu ermitteln, wurden Analysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Im Vergleich zu den Kontrollen waren sowohl die *XYLT1*- Genexpression als auch die XT-I Enzymaktivität durch den *knockout* des Gens stark

vermindert (s. Abb. 3.29 a, e). Ein Grund dafür, dass generell noch mRNA und eine schwache Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden konnte könnte sein, dass sich das frühzeitige Stopp-Codon im hinteren Bereich des Gens (Exon 9 von 12) befand und dadurch ein Großteil des Gens transkribiert und translatiert wurde. Verkürzte mRNA-Transkripte werden durch den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) Mechanismus erkannt und frühzeitig abgebaut, um die Synthese verkürzter Proteine zu verhindern [315]. Um einen möglichst vollständigen *knockout* zu generieren sollte in Folgearbeiten ein DSB in einem früheren Exon des *XYLT1*-Gens fokussiert werden. In weiterführenden Arbeiten sollte die im Zellkulturüberstand der Klone ermittelte TGF- β 1 Proteinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Dies stimmt mit den Ergebnissen der zuvor charakterisierten XT-defizienten Fibroblasten des Patienten überein. Auch für die Gene *XYLT2* und *ACTA2* wurden erhöhte mRNA-Level in den *XYLT1 knockout* Zellen nachgewiesen (s. Abb. 3.29 b, c). Trotz der vergleichsweise gering erhöhten Genexpression konnte erstmals im Rahmen dieser Arbeit eine kompensatorische Induktion einer XT-Isoform in Folge einer verminderten Expression der anderen Isoform beobachtet werden. Bereits in vorherigen Studien wurde gezeigt, dass es bzgl. der Kompensation einer verminderten Genexpression Unterschiede macht, ob diese aus dem *knockout* oder dem *knockdown* des betreffenden Gens resultiert. Während ein *knockdown* des *egfl7* Gens (endotheliales ECM-Gen) im Zebrafisch zu schweren vaskulären Defekten im Organismus führte, führte ein *knockout* des Gens zu keinen derartigen Defekten. In der Studie wurde dies u.a. auf eine kompensatorisch erhöhte Expression anderer ECM-Proteine in den *knockout* Mutanten zurückgeführt, wohingegen keine kompensatorischen Effekte nach Durchführung des *knockdowns* detektiert wurden [316]. In murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) führte ein *γ -Actin knockout* zu einer kompensatorischen Induktion der *Acta2* Genexpression, wohingegen aus einem *knockdown* des Gens keine kompensatorischen Effekte resultierten [317]. In einer Humanstudie wurden Individuen identifiziert, die einen kompletten Gen *knockout* aufwiesen, aber keine Erkrankung zeigten [318, 319]. Diese Beispiele zeigen zusätzlich, dass reduzierte Expressionen oder der *knockout* eines Gens teilweise durch eine erhöhte Expression anderer Gene kompensiert werden kann, wobei die genauen Mechanismen noch weiter erforscht werden müssen. Zusätzlich ist es abhängig vom Organismus und dem betreffenden Gen, ob und in welcher Form ein Defekt kompensiert wird [320]. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen XT-I defizienten Patientenfibroblasten exprimierten die CRISPR-Klone erhöhte *ACTA2* mRNA Level. Der Grund dafür ist durch die ersten Charakterisierungen der Zellen nicht auszumachen, weshalb weitere Experimente, u.a. die Analyse der Myofibroblasten-Differenzierung, folgen müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals neonatale NHDF generiert werden, die heterozygote *frameshift* Mutationen im Exon 9 des *XYLT1* Gens und dadurch bedingt

verminderte Expressionen des Enzyms auf mRNA- und Proteinebene aufweisen. Nachdem bereits eine erste Charakterisierung der Zellen durchgeführt wurde, sollen weitere Analysen folgen, um die Auswirkungen einer alleinigen *XYLT1*-Defizienz in NHDF zu evaluieren.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die GAG Heparin und DS das Potenzial haben, die XT-Aktivität kultivierter NHDF intra- und extrazellulär zu inhibieren. Darauf aufbauend sollte in weiterführenden Arbeiten der genaue Wirkmechanismus und die Auswirkungen auf weitere zelluläre Prozesse, wie bspw. die Myofibroblasten-Differenzierung, eruiert werden. Erst dann können Aussagen darüber getroffen werden, ob und inwiefern beide Moleküle für die Entwicklung einer zukünftigen anti-fibrotischen Therapie geeignet sein könnten. Für die Identifizierung weiterer potenzieller XT-Inhibitoren könnten Molekülbibliotheken verwendet werden.

Weiterführend konnte erstmals gezeigt werden, dass immortalisierte HEK293-Zellen eine Defizienz beider XT-Isoformen nicht kompensieren können und einen seneszenten Phänotypen ausbilden. Die visuell bestimmte Seneszenz sollte durch weitere qualitative und quantitative Seneszenz-Assays verifiziert werden, um den in dieser Arbeit erstmals aufgezeigten möglichen Zusammenhang zwischen veränderten XT-Expressionen und zellulärer Seneszenz näher zu untersuchen. Durch die Anwendung weiterer zellbiologischer Methoden könnte eruiert werden, ob die XT-defizienten Zellen ein verändertes Sekretom aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *XYLT1 knockout* in neonatalen NHDF erfolgreich etabliert werden. Während für die Klone bisher u.a. verminderte *XYLT1*-Genexpressionen und XT-I Proteinexpressionen nachgewiesen wurden, sollten die Zellen im weiteren Verlauf umfassend charakterisiert werden. Methodisch sollte der Fokus auf den in dieser Arbeit durchgeführten Assays zur Untersuchung der Myofibroblasten-Differenzierung liegen. Erzielte Ergebnisse könnten mit Wildtyp- und den in dieser Arbeit charakterisierten Patienten-Fibroblasten verglichen werden. Dadurch ließen sich final Aussagen darüber tätigen, inwiefern die analysierte abnorme Myofibroblasten-Differenzierung der Patientenzellen auf die *compound* heterozygoten *XYLT1* Mutationen zurückzuführen ist. Aufbauend auf und vergleichend zu den Studien in den HEK293-Zellen sollten weitere CRISPR/Cas9-basierte NHDF-Klone generiert werden, die sowohl einen *XYLT2 knockout* als auch einen *knockout* beider XT-Isoformen aufweisen. Mit Hilfe dieser Klone könnte die Funktion und Relevanz der beiden humanen Isoformen genauer eruiert und der Grund für die Existenz zweier humaner Isoenzyme näher beleuchtet werden. Darüber hinaus könnte ein *knockout* beider *XYLT*-Gene in anderen Zelltypen etabliert werden. Bspw. könnte durch

einen *knockout* in Osteoblasten die Rolle der XT während der Ossifikation näher charakterisiert werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte sensitive und XT-I spezifische UPLC-MS/MS Aktivitätstest wurde bereits erfolgreich für die Quantifizierung generierter Zellkulturproben verwendet. Durch die klinische Relevanz der XT-I bei fibrotischen Erkrankungen sollte der Assay im weiteren Verlauf für die Quantifizierung der Enzymaktivität in Körperflüssigkeiten wie Seren oder Plasmen optimiert werden. Durch die Identifizierung eines geeigneten Akzeptorpeptids sollte im weiteren Verlauf ergänzend ein XT-II spezifischer UPLC-MS/MS Aktivitätstest entwickelt werden. Eine differenzierte Quantifizierung der XT-I- und XT-II Aktivität könnte zusätzlich dazu beitragen, die Koexistenz beider XT-Isoformen näher aufzuklären.

5. Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten primären dermalen Fibroblasten (NHDF und die Patientenzelllinie MR364) und immortalisierten HEK293T-Zellen werden in Zellkulturschalen (58 cm²) bei 37 °C im CO₂-Inkubator (5 % CO₂) steril kultiviert. Das verwendete DMEM-Kultivierungsmedium wird für die Standardkultivierung mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Antibiotikum/Antimykotikum (AB/AM) und 2 % L-Glutamin supplementiert und alle 3-4 Tage gewechselt.

5.1.1.1 Passagieren und Aussäen adhärenter eukaryotischer Zellen

Die adhärent wachsenden eukaryotischen Zellen werden ab Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz passagiert. Die Zellen werden zunächst mit 5 mL PBS gewaschen und anschließend vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Dazu werden 5 mL einer 1%igen Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben und die Zellkulturschale 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das erfolgreiche Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert und 5 mL Zellkulturmedium zu der Zellsuspension gegeben. Nach der Zentrifugation (5 min, 1.100 x g) wird der Überstand abgenommen und das Zellpellet in einem adäquaten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wird entweder direkt ausgesät oder für die Bestimmung der Zellzahl eingesetzt.

5.1.1.2 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Für die manuelle Zellzahlbestimmung wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Jedes der vier Eckquadrate weist eine Fläche von 0,1 mm² auf und lässt sich wiederum in 16 kleinere Quadrate unterteilen. Für die Zellzahlbestimmung wird ein Deckglas auf die Zählkammer gelegt und 20 µL der zuvor mit Trypanblau verdünnten Zellsuspension (Verhältnis: 1:1) in die Zählkammer pipettiert. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert durch geschädigte Zellmembranen, was zu einer Blaufärbung toter Zellen führt. Unter dem Mikroskop werden die vitalen Zellen innerhalb der vier Eckquadrate gezählt und anschließend die mittlere Zellzahl pro Eckquadrat berechnet. Die Multiplikation der gemittelten Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor (hier: 2) und dem Kammerfaktor (hier: 10⁴) ergibt die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension.

5.1.1.3 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryotischer Zellen

Für eine langfristige, sichere Lagerung von Zellkulturen werden diese kryokonserviert. Dazu wird zunächst ein Kryomedium (80 % FCS, 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) hergestellt und bei 4 °C vorgekühlt. DMSO wirkt der Eiskristallbildung, und einer daraus resultierenden Schädigung der Zellen, während der Kryokonservierung entgegen. Anschließend werden die

kultivierten Zellen zunächst, wie unter 5.1.1.1 beschrieben, vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und das Zellpellet in einem adäquaten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. In einem Kryo-Röhrchen werden 500 μL der Zellsuspension mit 500 μL Kryomedium vereint und in einem Metallblock ü.N. bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag erfolgt die Umlagerung der Röhrchen in flüssigen Stickstoff.

Für die Revitalisierung der Zellen wird ein Kryo-Röhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis gelagert. In einer Zellkulturschale werden 9 mL Kultivierungsmedium vorgelegt und 1 mL der Zellsuspension (langsam im Wasserbad erwärmt) hinzugefügt. Zur vollständigen Entfernung des DMSO werden die Zellen am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium weiterkultiviert.

5.1.1.4 Behandlung von NHDF mit UDP und Glykosaminoglykanen

Um den Einfluss von Uridin-Diphosphat (UDP) und der beiden GAG Heparin und DS auf adulte, primäre NHDF (F42A, M45D, M56D) zu analysieren, werden zunächst jeweils $2,3 \times 10^5$ Zellen in einer Zellkulturschale (58 cm^2) ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium durch 10 mL UDP- oder GAG-supplementiertes Zellkulturmedium ersetzt, wobei die Endkonzentration des jeweiligen Induktors 1 mg/mL beträgt. Die Kontrollzellen werden mit Zellkulturmedium kultiviert, das mit dem jeweils selben Volumen Wasser supplementiert wird. 48 h nach der Induktion werden die Zellen enzymatisch vom Boden der Zellkulturschale abgelöst, die Zellsuspension zentrifugiert (siehe 5.1.1.1) und das Zellpellet in 1 mL PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation ($1.500 \times g$, 3 min) wird der Überstand abgenommen und das Pellet in Lysepuffer (350 μL RA-1 Puffer + 3,5 μL β -ME) resuspendiert. Das Lysat kann bis zur Isolierung der Gesamt-RNA bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Pro Zelllinie werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.1.1.5 UDP-Xylose Assay

In jede Kavität einer 12-Kavitätenschale werden NHDF in einer Zelldichte von 50 Zellen/ mm^2 ausgesät und, wie unter 5.1.1.4 beschrieben, mit 1 mg/mL UDP behandelt. 48 h nach der Induktion werden die Zellen in CHAPS-Puffer lysiert und die Lysate im Ultraschallbad (Biorupter Plus, Diagenode, Liege, Belgien) inkubiert (10 Zyklen, jeweils 30 s An/15 s Aus). Danach werden 50 μL der Zelllysate mit 450 μL einer Färbelösung (100 mL of Essigsäure, 0,5 g Phloroglucin, 10 mL Salzsäure) homogenisiert, für 4 min bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und die Absorption der Proben bei 554 nm bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wird eine Xylose-Standardreihe mitgeführt. Die Xylose-Konzentrationen werden auf die im BCA-Assay ermittelten Proteinkonzentrationen der Proben normiert.

5.1.1.6 Induktion von Fibroblasten mit TGF- β 1

Zur Induktion der Myofibroblasten-Differenzierung werden 50 Zellen/mm² (58 cm² Schale) in Zellkulturmedium ausgesät und das Medium am nächsten Tag durch serumreduziertes Kultivierungsmedium (0,1 % FCS) ersetzt. Nach weiteren 24 h wird das Medium durch 6 mL TGF- β 1-supplementiertes Induktionsmedium (0,1 % FCS, 5 ng/mL TGF- β 1) ersetzt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Anschließend werden die Zellen für die RNA-Isolierung lysiert (5.1.1.4) und das Lysat bei -20 °C gelagert. Pro Zelllinie werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.1.1.7 Detergenz-vermittelte Lyse zur Bestimmung der intrazellulären XT-Aktivität

Zur Bestimmung der intrazellulären XT-Aktivität wird eine im Rahmen dieser Arbeit neu etablierte, Detergenz-vermittelte Lyse-Methode verwendet. Dazu werden die Zellen ausgesät und am nächsten Tag induziert (5.1.1.4 und 5.1.1.5), wobei das Volumen des Induktionsmediums auf 6 mL reduziert wird. 72 h nach der Induktion werden 2 mL des Überstandes für die Bestimmung der extrazellulären XT-Aktivität gesichert und bei -20 °C gelagert. Der restliche Zellkulturüberstand wird verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Der Zellrasen wird mit 750 μ L NP-40 Lysepuffer überschichtet und die Zellkulturschale für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und die Suspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert. Nach der Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) wird der Überstand gesichert und bis zur Bestimmung der intrazellulären XT-Aktivität bei -20 °C gelagert. Pro Zelllinie werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.1.1.8 Liposomen-vermittelte siRNA Transfektion

Für die Liposomen-vermittelte siRNA Transfektion von NHDF und immortalisierten HEK293T-Zellen werden die Zellen während des Aussäens transfiziert (reverse Transfektion). Für einen Transfektionsansatz werden 48 μ L einer 2,5 μ M siRNA-Stammlösung (finale Konzentration im Ansatz: 40 nM) und 10 μ L des Transfektionsreagenzes *Lipofectamine 2000* (ThermoFisher, San Diego, USA) in jeweils 500 μ L DMEM gelöst. Beide Lösungen werden für 5 min bei RT inkubiert, vereint und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Währenddessen werden 3 x 10⁵ Zellen/mm² in einer 60 x 15 mm Zellkulturschale ausgesät (antibiotikafreiem Zellkulturmedium). Das Endvolumen beträgt, zusammen mit dem Transfektionsansatz, 3 mL. Der Transfektionsansatz wird tropfenweise zu der Zellsuspension gegeben und die Zellen ü.N. inkubiert. Zur späteren Bestimmung der Transfektionseffizienz werden in einem separaten Ansatz Zellen mit einer FAM-markierte Kontroll-siRNA transfiziert, die an keine humane mRNA bindet. Nach 24 h wird das antibiotikafreie Medium durch Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Danach werden 2 mL Zellkulturüberstand gesichert (extrazelluläre XT-Aktivität) und

die Zellen für die RNA-Isolierung lysiert (siehe 5.1.1.4). Pro Zelllinie werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.1.1.9 Liposomen-vermittelte Plasmid-DNA Transfektion

Für die Lipofektion neonataler NHDF und immortalisierter HEK293T-Zellen mit dem Plasmid PX458 (Addgene, Watertown, USA) werden 1×10^5 Zellen pro Kavität einer 12-Kavitäten Zellkulturplatte in 1 mL Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag werden für einen Transfektionsansatz 1,5 µg Plasmid-DNA zu 200 µL serumreduziertem OptiMEM-Medium (ThermoFisher, San Diego, USA) gegeben und diese Lösung für 15 min bei RT inkubiert. Danach werden 3 µL des Transfektionsreagenzes *Lipofectamine LTX* (ThermoFisher, San Diego, USA) zu der Lösung pipettiert und der Ansatz für weitere 25 min bei RT inkubiert. Das Medium auf den zu transfizierenden Zellen wird währenddessen durch 1 mL antibiotikafreies Medium ersetzt und 200 µL des Transfektionsansatzes tropfenweise auf die Zellen gegeben. Der verwendete Vektor beinhaltet eine GFP-kodierende Sequenz, wodurch die Transfektionseffizienz nach 48 h am Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden kann.

5.1.1.10 Isolierung von NHDF am Durchflusszytometer

Für die Separierung von NHDF, die mit einem GFP-exprimierenden Plasmid transfiziert wurden (siehe 5.1.1.8), wird die Methodik des FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) angewandt. Dabei handelt es sich um eine Form der Durchflusszytometrie, bei der Einzelzellen in Suspension aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften analysiert und isoliert werden können.

48 h nach der Transfektion werden die Zellen trypsiniert und das Zellpellet in 2 mL PBS aufgenommen (siehe 5.1.1.1). Die Zellsuspension wird in ein 5 mL FACS-Röhrchen überführt und dabei durch einen integrierten Filter pipettiert. In ein zweites 5 mL FACS-Röhrchen werden 500 µL Zellkulturmedium vorgelegt und der fluoreszenzbasierte Sortiervorgang (FITC-Kanal (FL1): Anregung: 495 nm, Emission: 519 nm) gestartet. Das verwendete FACS-Gerät (*S3e Cell Sorter* (BioRad, USA)) injiziert sukzessive die bereitgestellte Zellsuspension und pipettiert eine definierte Zellzahl in das vorgelegte Zellkulturmedium. In einer 24-Kavitäten Platte werden pro Kavität 500 µL Zellkulturmedium vorgelegt und 500 µL der Zellsuspension hinzugegeben. Bis zur Vereinzellung werden die Zellen für zwei Wochen inkubiert, wobei in regelmäßigen Abständen (alle 3-4 Tage) ein Mediumwechsel durchgeführt wird.

5.1.1.11 Zellvereinzellung von NHDF

FACS-isolierte Zellen werden in 96-Kavitäten Zellkulturplatten vereinzelt. Dazu werden die isolierten Zellen (5.1.1.9) enzymatisch vom Boden der Kavität gelöst und das Zellpellet in Kultivierungsmedium resuspendiert (5.1.1.1). Nach Bestimmung der Zellzahl (5.1.1.2) wird

eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 5 Zellen/mL angesetzt, von der jeweils 200 μL in jede Kavität einer 96-Kavitäten Platte pipettiert werden (1 Zelle/Kavität). Das Wachstum der Zellen wird regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und die Zellen nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz auf eine 48-Kavitäten Platte transferiert. Nach diesem Prinzip werden die Zellen jeweils nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz auf nächst größere Kavitäten-Platten transferiert. Von den Zellen, die auf einer 100 x 20 cm Zellkulturschale konfluent gewachsen sind, wird ein Teil kryokonserviert (5.1.1.3). Der andere Teil der Zellsuspension wird zentrifugiert und das Zellpellet für die DNA-Isolierung in 50 μL RA1-Puffer resuspendiert.

5.1.1.12 Wundheilungsassay

Für den Wundheilungsassay werden 1×10^6 Fibroblasten in einer 60x15 mm Zellkulturschale (Sigma, St. Louis, USA) ausgesät. Am nächsten Tag wird, mit Hilfe einer 100 μL Pipettenspitze, eine artifizielle Wunde in den Zell-Monolayer eingefügt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach einer 24 h Inkubation unter Serumentzug werden die Zellen am nächsten Tag mit TGF- β 1 behandelt (siehe 5.1.1.5), um die Myofibroblasten-Differenzierung zu induzieren. Über einen Zeitraum von 72 h wird im Bereich der künstlichen Wunde mit Hilfe eines Zellanalyse-Systems (*JuLI BR live cell analyzer system*, NanoEnTek, Seoul, KOR) alle 2 h ein Foto der Zellen aufgenommen. Anhand der Fotos wird die Konfluenz zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Programm *ImageJ* quantifiziert. Als Kontrolle dienen Zellen, die über den gesamten Zeitraum in serumreduziertem Medium kultiviert wurden. Der Assay wird für jede Zelllinie und jede Bedingung dreimal wiederholt.

5.1.1.13 Kontraktionsassay

Zur Bestimmung der Kontraktionsfähigkeit von Fibroblasten wird ein Kollagen-Typ-I basierter Kontraktionsassay durchgeführt. Für die Bildung der Kollagen-Matrix werden pro Ansatz 100 μL PBS (10x), 483 μL Wasser und 16,7 μL NaOH (1 M) homogenisiert und in eine Kavität einer vorgekühlten 12-Kavitäten Zellkulturplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT) pipettiert. Danach werden 400 μL Kollagen Typ-I (5 mg/mL, Rattenschwanz, Ibidi, Gräfelfing) hinzugegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das polymerisierte Gel mit PBS gewaschen und $2,5 \times 10^5$ Zellen auf dem Gel ausgesät. Nach einer Inkubation ü.N. werden die Zellen gewaschen und ein Serumentzug durchgeführt. Nach weiteren 24 h werden die Zellen entweder mit TGF- β 1 induziert (siehe 5.1.1.5) oder weiter in serumreduziertem Medium kultiviert und die Gele mit Hilfe eines sterilen Skalpells vom Boden und den Seiten der Kavität abgelöst. Die Gelgrößen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fotografiert und mittels *ImageJ* quantifiziert. Für jede primäre Zelllinie und Bedingung werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.1.1.14 Zellproliferations- und Viabilitätsassay (WST-I)

Um Aussagen über die Zellproliferationsfähigkeit und die Viabilität eukaryotischer Zellen tätigen zu können, wird ein WST-I (*water soluble tetrazolium I*) Assay durchgeführt. Der Test basiert auf der durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase katalysierte Umsetzung des Tetrazoliums (hellrot) zu Formazan (dunkelrot, Absorption 450 nm). Die Katalyse findet nur in Zellen statt, die eine intakte Atmungskette aufweisen. Für den Assay werden 1.700 Zellen pro Kavität einer 96-Kavitätenplatte in 100 µL Standard-Zellkulturmedium ausgesät und ü.N. inkubiert. Danach werden die Zellen entweder mit TGF-β1 induziert (5.1.1.5), oder in Standardmedium bzw. unter Serumentzug (0,1 % FCS) kultiviert. Nach 44 h wird der Assay durch die Zugabe von 10 µL WST-I/ Kavität gestartet (t_0). Ab diesem Zeitpunkt wird die Absorption bei 450 nm (Referenz-Wellenlänge: 690 nm) stündlich, über einen Zeitraum von 4 h, mit dem *Tecan Reader infinite 200 Pro* (Tecan, Crailsheim) bestimmt. Für die Auswertung wird ein ermittelter Hintergrundwert (nur Medium + WST-I Reagenz) von den Proben subtrahiert. Für jede primäre Zelllinie und Behandlung werden drei biologische Replikate vermessen.

5.1.2 Kultivierung von *E.coli*

5.1.2.1 Transformation von *E.coli* TOP10

Für die Transformation werden die bei -80 °C gelagerten und chemisch kompetenten *E.coli* TOP10 Zellen (eigene Herstellung) zunächst für 15 min auf Eis aufgetaut. Anschließend werden jeweils 3 µL Plasmid-DNA oder Wasser (Negativkontrolle) zu 50 µL der Bakterienkultur gegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Ansatz erst für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad und dann sofort für 2 min auf Eis inkubiert (*heat-shock*). Durch die Temperaturerhöhung wird die bakterielle Zellmembran destabilisiert, wodurch die Permeabilität erhöht und die DNA-Aufnahme erleichtert wird. Durch die sofortige Abkühlung auf Eis werden die Zellmembranen wieder verschlossen. Nach Zugabe von 500 µL SOC-Medium (auf 37 °C vorgewärmt) wird der Transformationsansatz rotierend für 15 min bei 37 °C inkubiert. Von jedem Ansatz werden jeweils 50 und 75 µL auf antibiotikahaltige (75 µg/mL Ampicillin) Agarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

5.1.2.2 Ansetzen von *E.coli* TOP10 Übernachtskulturen

Für das Ansetzen einer bakteriellen Übernachtskultur werden zunächst 5 mL antibiotikahaltiges (75 µg/mL Ampicillin) LB-Medium in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen (Corning, NY, USA) vorgelegt. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wird eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte in das vorgelegte LB-Medium transferiert und ü.N. schüttelnd (200 *rpm*) bei 37 °C inkubiert. Um den Sauerstoffeintrag zu gewährleisten, wird der Deckel des Zentrifugenröhrchens nur leicht angedreht.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten

Für die Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Zelllysaten wird das *RNA Spin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Zunächst werden 353,5 µL des Zelllysates (siehe u.a. 5.1.1.4) auf eine Extraktionssäule gegeben, diese bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert und 50 µL des Eluates für die DNA-Normierung gesichert. Der restliche Durchfluss wird mit 350 µL 70%igem Ethanol homogenisiert, auf eine *NucleoSpin RNA II* Säule pipettiert und erneut bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss werden 350 µL MDB-Puffer auf die Säule gegeben, um die Säulenmembran zu entsalzen. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 x g, 1 min) werden 95 µL einer 1:10 in rDNase-Reaktionspuffer verdünnten rDNase-Lösung auf die Membran pipettiert und die Säule 15 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt dient dem enzymatischen Abbau kontaminierender DNA. Im Anschluss an die Inkubation wird die Membran dreimal gewaschen. Dazu werden zunächst 200 µL RA2-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 13.000 x g). Der Durchfluss wird verworfen und die Säule mit 600 µL RA3-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 13.000 x g) wird die Säule mit 250 µL RA3-Puffer gewaschen und für 2 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Um die Säulenmembran vollständig zu trocknen, wird die Säule nochmals bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert. Für die Elution der RNA werden 25 µL RNase-freies Wasser mittig auf die Säulenmembran pipettiert und die Säule für mindestens 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Säule zentrifugiert und die eluierte RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Alternativ kann die RNA bei -80 °C gelagert werden.

5.2.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben von isolierter mRNA in cDNA erfolgt mit dem *Superscript II Reverse Transcriptase Kit* der Firma *ThermoFisher* (Waltham, USA). Pro Ansatz wird 1 µg der isolierten RNA (5.1.1) mit 2 µL einer dNTP- (25 mM) und 2 µL einer Oligo-dT-Lösung (7 pmol) versetzt. Die Verwendung von Oligo-dT Primern garantiert, dass lediglich polyadenylierte RNA transkribiert wird. Nach der Zugabe von RNase-freiem Wasser wird der Reaktionsansatz (24 µL Gesamtvolumen) für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 8 µL des 5 x *First Strand Buffers* und 4 µL DTT wird der Reaktionsansatz bei 42 °C für 2 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2 µL der reversen Transkriptase und eine Inkubation für 50 min bei 42 °C. Zur Denaturierung des Enzyms wird der Reaktionsansatz final für 15 min auf 70 °C erhitzt. Die cDNA wird 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

5.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA aus Zelllysaten

Für die Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-DNA aus Zelllysaten wird das *NucleoSpin Blood Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die zuvor generierten Zelllysate

(u.a. 5.1.1.10) werden zunächst 1:1,5 mit 99,9%igem Ethanol verdünnt und das gesamte Volumen auf eine *NucleoSpin Blood* Säule pipettiert. Durch die Zentrifugation für 1 min bei 13.000 x g kommt es zur Bindung der DNA an die Silikamembran der Säule. In einem ersten Waschschrift werden 500 µL BW-Puffer auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. In einem zweiten Waschschrift werden 600 µL B5-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (1 min, 13.000 x g). Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt, um die Säulenmembran komplett zu trocknen. Im letzten Schritt wird ein adäquates Volumen DNase-freien Wassers mittig auf die Membran pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und die Säule für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Die isolierte DNA wird bei -20 °C gelagert.

5.2.4 Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus *E.coli* wird das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dabei werden zunächst 100 mL einer *E.coli* Übernachtskultur (5.1.2.2) für 15 min bei 6.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das bakterielle Zellpellet in 10 mL P1-Puffer resuspendiert. Für die alkalische Lyse der Zellen werden 10 mL P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)) hinzugefügt, das Reaktionsgefäß sechsmal invertiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Das Detergenz SDS denaturiert zelluläre Proteine und destabilisiert die Zellmembran. NaOH hingegen zerstört die Zellwand und denaturiert die genomische (gDNA)- und Plasmid-DNA. Nach der Inkubation werden 10 mL P3-Puffer zum Lysat pipettiert und das Reaktionsgefäß erneut sechsmal invertiert. Der Puffer enthält 1 M Potassiumacetat (pH 5,5), wodurch es zur Neutralisierung der Lösung und zur Renaturierung der Plasmid-DNA kommt. Die weitaus größere gDNA kann nicht renaturieren und bleibt einzelsträngig. Im nächsten Schritt wird die Lösung auf eine Säule transferiert und für 10 min bei RT inkubiert. Dabei kommt es zur Separierung der löslichen, doppelsträngigen Plasmid-DNA von den unlöslichen Komponenten (einzelsträngige gDNA, Proteine, SDS), die als Folge hydrophober Interaktionen ein Präzipitat bilden. Nach der Inkubation wird das Zellysate filtriert, mit 2,5 mL ER-Puffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um die Plasmid-DNA weiter aufzureinigen, wird das Lysat auf eine Aufreinigungssäule gegeben und bei RT inkubiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule zweimal mit jeweils 30 mL QC-Puffer gewaschen. Für die Elution werden 15 mL QN-Puffer mittig auf die Säulenmembran pipettiert und die Säule bei RT inkubiert. Für die Präzipitation der Plasmid-DNA wird das durch die Schwerkraft diffundierte Eluat mit 10,5 mL Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation der Lösung (5.000 x g, 4 °C, 60 min) wird der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet mit 5 mL Ethanol (70%ig) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 x g, 4 °C, 60 min) wird das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 500 µL TE-Puffer (Endotoxin-frei) gelöst. Die gereinigte Plasmid-DNA wird bei -20 °C gelagert.

5.2.5 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wird der *NanoDrop 2000* der Firma *ThermoFisher* (San Diego, USA) verwendet. Während DNA- und RNA-Moleküle ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweisen, absorbieren Proteine das meiste Licht im Wellenlängenbereich von 280 nm. Um die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung zu bestimmen, berechnet der *NanoDrop 2000* den Quotienten aus der Absorption bei 260 und 280 nm. Der Wert des Quotienten ist bei reinen DNA-Proben 1,8, bei reinen RNA-Proben hingegen 2,0. Niedrigere Werte deuten jeweils auf eine Kontamination mit Proteinen hin. Die Berechnung der Konzentration beruht auf dem Lambert Beerschen Gesetz:

$$A = E * b * c$$

A = Absorption

E = Extinktionskoeffizient [$\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

b = Schichtdicke der Küvette [cm]

c = Konzentration [mol L^{-1}]

5.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine PCR (*polymerase chain reaction*) lassen sich, unter Verwendung einer DNA-Polymerase und spezifischen Primern, gezielt DNA-Bereiche amplifizieren. Eine PCR lässt sich dabei in drei Schritte unterteilen, die zusammen einen PCR-Zyklus bilden:

1. Während der **Denaturierung** wird der Reaktionsansatz (Tab. 5.1) auf 95 °C erhitzt. Dadurch kommt es zur Spaltung des DNA-Doppelstranges unter Bildung zweier einzelsträngiger DNA-Moleküle.
2. Im zweiten Schritt kommt es zur komplementären **Hybridisierung** der verwendeten Primer mit der einzelsträngigen DNA. Die dabei verwendete Temperatur ist abhängig von der Primer- und der Zielsequenz. Eine optimale *Annealing*-Temperatur (s. Tab. 6.4) muss daher zuvor für jedes Primer-Paar, unter Anwendung einer Gradienten-PCR, bestimmt werden.
3. Während der **Elongation** kommt es zu einer sukzessiven Verlängerung des DNA-Tochterstranges bei einer Temperatur von 72 °C. Dabei inseriert die DNA-Polymerase, ausgehend von den freien 3' Hydroxylgruppen der Primer, ein jeweils zum Leitstrang komplementäres Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP).

Für jede PCR werden insgesamt 35 Zyklen durchgeführt, wobei die DNA-Menge nach jedem Zyklus exponentiell vervielfältigt wird.

Tabelle 5.1: Reaktionsansatz einer PCR-Reaktion zur Amplifizierung der DNA im Bereich der gRNA-Bindungsstelle.

Reagenz	Volumen [μL]
10 x PCR-Puffer	2,5
<i>Q-Solution</i>	5,0
dNTPs [25 mM]	0,25
<i>Forward Primer</i> [25 μM]	0,5
<i>Reverse Primer</i> [25 μM]	0,5
<i>Template-DNA</i>	5,0
<i>HotStar Taq DNA-Polymerase</i>	0,1
Wasser	11,15
Σ	25

Tabelle 5.2: Temperaturprofil einer PCR-Reaktion zur Amplifizierung der DNA im Bereich der gRNA-Bindungsstelle.

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
Initiale Denat.	15:00	95	1
Denaturierung	1:00	95	
<i>Annealing</i>	1:00	T_A	35
Elongation	1:00	72	
Finale Elongation	15:00	72	1

5.2.7 Quantitative *real-time* PCR

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression in Echtzeit wird eine *real-time* PCR (qPCR) durchgeführt, wobei das Prinzip dem der klassischen PCR (5.1.6) gleicht. Anders als bei der herkömmlichen PCR werden die für die qPCR verwendeten Primer Intron-überspannend konzipiert, um die Amplifizierung kontaminierender DNA zu verhindern. Das im Reaktionsansatz (Tab. X) enthaltene Fluorophor SYBR-Green absorbiert blaues ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) und emittiert grünes ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) Licht. Zusätzlich besitzt es die Fähigkeit, in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Das während der qPCR nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzsignal ist daher proportional zu der Menge an gebildetem PCR-Produkt.

Tabelle 5.3: Reaktionsansatz einer qPCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen [μL]
cDNA (1:10 verdünnt)	2,5
SYBR-Green mix	5
Primer forward [25 μM]	0,25
Primer reverse [25 μM]	0,25
Wasser	2
Σ	10

Neben dem Fluorophor beinhaltet der verwendete *SYBR-Green mix* u.a. die dNTPs und eine Taq-Polymerase. Die Ansätze werden mit Hilfe eines Pipettierroboters in eine weiße 384-Kavitäten Platte pipettiert und diese anschließend für 1 min bei 1.000 x g zentrifugiert.

Für die Amplifizierung wird ein *LightCycler 480 II* (Roche, Reinach, Schweiz) verwendet und das in Tab. 5.4 aufgeführte Temperaturprofil durchgeführt.

Tabelle 5.4: Temperaturprofil einer qPCR-Reaktion.

Reaktionsschritt	Zeit [min]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
Initiale Denat.	5:00	95	1
Denaturierung	0:10	95	
Annealing	0:15	T_A	45
Elongation	0:20	72	
Schmelzkurve	0:05	95	
	15:00	65-97	
Kühlen	300	4	1

Die *Annealing*-Temperatur (T_A) des jeweiligen Primerpaares wird mittels Gradienten-PCR bestimmt (s. Tab. 6.3) Bedingt durch geringe cDNA-Ausgangskonzentrationen werden während der ersten Zyklen kaum Änderungen im Fluoreszenzsignal detektiert. Nach dem Überschreiten eines Schwellenwertes (*cycle threshold*, C_T) steigt die DNA-Konzentration pro Zyklus exponentiell an. Die Höhe des C_T -Wertes ist dabei abhängig von der Expressionsstärke des untersuchten Gens. Im Anschluss an die Amplifikation wird eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um die Spezifität des gebildeten Produktes zu kontrollieren. Die relativen Genexpressionen der Proben werden unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt. Dabei werden die C_T -Werte der Referenzgene zunächst von den C_T -Werten eines Zielgens subtrahiert (ΔC_T). Danach werden die ΔC_T -Werte behandelte auf

die ΔC_T -Werte unbehandelter Zellen (Negativkontrollen) normiert ($\Delta\Delta C_T$) [321]. Als Referenzgene wurden in dieser Arbeit die drei Haushaltsgene $\beta 2M$, $GAPDH$ und $HPRT1$ verwendet.

5.2.8 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von überschüssigen PCR-Komponenten wird das gebildete PCR-Produkt unter Verwendung des *MSB Spin PCRapace* Kits der Firma *Strattec Biomedical* (Birkenfeld) gereinigt. Dazu werden 25 μL des PCR-Produkts zunächst mit 250 μL eines Bindungspuffers homogenisiert, die Lösung auf eine Reinigungssäule gegeben und für 4 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend werden 15 μL DNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert, die Säule 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Das gereinigte PCR-Produkt wird bei -20 °C gelagert.

5.2.9 Sanger-Sequenzierung gereinigter PCR-Produkte

Für die Sequenzierung der gereinigten PCR-Produkte wird die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Das Prinzip beruht auf dem zufälligen Einbau von Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs), die an ihrem 3'-Ende keine Hydroxygruppe besitzen. Dadurch ist es der verwendeten Polymerase nicht möglich, den DNA-Strang weiter zu verlängern und es kommt zum Kettenabbruch. Auf diese Weise werden Fragmente aller Längen gebildet, die sich mittels Kapillar-Gelelektrophorese (*3500 Genetic Analyzer* (ThermoFisher, San Diego, USA)) in einer Gelmatrix (POP7-Polymer) auftrennen lassen. Die vier ddNTPs sind dabei alle unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und können nach Laseranregung spezifisch detektiert werden.

Zur Synthese der Kettenabbruch-Fragmente wird eine PCR durchgeführt (Tab. 5.5), wobei der verwendete Premix u.a. die ddNTPs und die Polymerase enthält. Es werden insgesamt 30 Zyklen durchgeführt, wobei die *Annealing*-Temperatur (T_A) abhängig vom jeweils verwendeten Primer (*forward* oder *reverse*) ist. Nach der Amplifikation werden die endständig fluoreszenzmarkierten Fragmente mittels Sephadex-G50 Gelfiltration gereinigt. Dazu wird zunächst eine Säule mit 750 μL einer Sephadex-G50 Suspension beschickt und für 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und der Sequenzieransatz (20 μL) auf die entstandene Gelmatrix pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 min, 1.000 x g) wird der gereinigte Sequenzieransatz 1:1 mit HPLC-Wasser verdünnt.

Tabelle 5.5: Reaktionsansatz für eine Sequenzierreaktion.

Reagenz	Volumen [μL]
Gereinigtes Amplifikat	3
<i>BigDye Premix</i>	2
Primer (2,5 μM ; fwd o. rev)	1,5
BigDye Puffer (5x)	4
HPLC-Wasser	9,5
Σ	20

Tabelle 5.6: Temperaturprofil für eine Sequenzierreaktion.

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zyklen
Initiale	120	95	1
Denaturierung			
Denaturierung	10	95	
<i>Annealing</i>	10	T_A	30
Elongation	240	60	
Kühlen	300	4	1

Die Proben werden elektrophoretisch bei einer Spannung von 10 kV injiziert. Die anschließende Kapillargel-Elektrophorese wird für 90 min bei 50 $^{\circ}\text{C}$ und einer Spannung von 8,5 kV durchgeführt. Das resultierende Elektropherogramm wird mit der *Sequence-Analysis* Software (Perkin Elmer, USA) ausgewertet.

5.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren sind negativ geladene Moleküle, die im elektrischen Feld in Richtung der Anode migrieren. Die Geschwindigkeit verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Fragmentgröße, wodurch kurze Fragmente schneller durch das elektrische Feld migrieren als lange. Für die Erstellung eines 2%igen Agarosegels werden 2 g Agarose (Carl Roth, Karlsruhe) mit 100 mL TBE-Puffer versetzt und durch Erhitzen gelöst. Nach Zugabe von 10 μL Ethidiumbromid wird die Lösung in einen Gelträger gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung bei RT inkubiert. Das Ethidiumbromid kann in die DNA interkalieren und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht. 5 μL der zu analysierenden DNA-Probe werden mit 2 μL eines DNA-Ladepuffers versetzt und in eine Geltaschen des polymerisierten Agarosegels pipettiert. Zur späteren Bestimmung der Fragmentgrößen werden zusätzlich 3,5 μL eines DNA-Längenstandards (pUC19/MspI, MBBL, Bielefeld) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wird für 30 min bei einer Spannung von 120 V und einer

Stromstärke von 140 mA durchgeführt. Nach Anregung mit UV-Licht können die Fragmentgrößen bestimmt werden.

5.2.11 Klonierung von *XYLT*-spezifischen gRNA-Sequenzen in den Vektor PX458

Für die Klonierung von gRNA-Sequenzen in den Plasmidvektor pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458, Addgene, Watertown, USA) müssen zunächst spezifische *XYLT*-gRNA Sequenzen konzipiert werden. Dazu stehen unterschiedliche bioinformatische Programme zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit das Programm „*E-CRISP*“ verwendet wird. Nach Eingabe des Organismus (*Homo sapiens*) und des zu mutierenden Gens (*XYLT1* oder *XYLT2*) werden potentielle gRNA-Sequenzen und deren Bindungsstelle im Gen angezeigt. Wichtig bei der Wahl einer gRNA-Sequenz ist u.a., dass die Sequenz spezifisch ist und an keiner anderen Stelle im Genom (*off-target*) bindet.

Es werden jeweils zwei, im zentralen Bereich zueinander komplementäre, gRNA-Oligonukleotide (*sense* und *antisense*) konzipiert. Deren 5'-Überhänge sind komplementär zu den Überhängen, die durch den Verdau des Vektors PX458 mit dem Restriktionsenzym *BbsI* entstehen. Die gRNA-Oligonukleotide werden mit Wasser auf eine Konzentration von 100 μ M verdünnt und deren *Annealing* und Phosphorylierung in einer Reaktion durchgeführt. Der Reaktionsansatz (Tab. 5.7) wird zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert, dann für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend sukzessive (5 °C/ min) auf 25 °C abgekühlt.

Tabelle 5.7: Reaktionsansatz für das *Annealing* und die Phosphorylierung der gRNA-Oligonukleotide.

Reagenz	Volumen [μ L]
gRNA-Oligonukleotid <i>sense</i>	1
gRNA-Oligonukleotid <i>antisense</i>	1
T4 Ligationspuffer (10x)	1
T4 PNK (10 U/ μL)	0,5
Wasser	6,5
Σ	10

Die phosphorylierten Oligonukleotide werden 1:200 mit Wasser verdünnt und werden bei -20 °C gelagert.

Der Verdau und die Ligation werden ebenfalls in einer Reaktion (Tab. 5.8) durchgeführt. Dabei wird der Vektor PX458 durch das Restriktionsenzym *BbsI* verdaut und die zuvor phosphorylierten gRNA-Oligonukleotide komplementär im Bereich der Restriktionsschnittstelle in den Vektor ligiert.

Tabelle 5.8: Ansatz für die Verdau- und Ligationsreaktion.

Reagenz	Volumen [μL]
Vektor PX458 (100 ng)	x
Phosphorylierter Oligo-Duplex (1:200 Verdünnung)	2
Fast Digest Puffer (10x)	2
DTT (10 mM)	1
ATP (10 mM)	1
Fast Digest BbsI	1
T4 Ligase (400 U/μL)	0,5
Wasser	x
Σ	20

Der Reaktionsansatz wird zunächst für 5 min bei 37 °C und dann für weitere 5 min bei 23 °C inkubiert (insgesamt 6 Zyklen). Der die gRNA-Sequenz enthaltene Vektor PX458 kann bei -20° gelagert oder direkt für die Transformation (siehe 5.1.2.1) verwendet werden.

5.2.12 TA-Klonierung

Für den Allel-spezifischen Nachweis von Mutationen wird der *TA-cloning* Assay der Firma *ThermoFisher* (San Diego, USA) verwendet. Zunächst wird die zu analysierende genomische DNA (gDNA) isoliert (siehe 5.1.3) und deren Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 5.1.5). Unter Verwendung spezifischer Primer wird mittels PCR (siehe 5.1.6) der Bereich amplifiziert, in dem es zum CRISPR/Cas9-vermittelten DSB der DNA kommen soll. Nach dem elektrophoretischen Nachweis eines spezifischen PCR-Produktes (siehe 5.1.9) wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR 2.1 ligiert. Durch die Verwendung einer Taq-Polymerase weisen die PCR-Produkte am 3'-Ende Adenin Überhänge auf, wodurch es zur vereinfachten Ligation mit dem Vektor (enthält 3'-Thymin Überhänge) kommt. Nach Inkubation des Ligationsansatzes (Tab. 5.9) für 1 h bei RT werden 3 μL des Ansatzes für die Transformation von *E.coli Top10* Zellen verwendet (siehe 5.1.2.1). Von den Bakterienkolonien werden Übernachtskulturen angesetzt (5.1.2.2), deren Plasmid-DNA Endotoxin-frei isoliert (5.1.4) und anschließend für die Sequenzierung eingesetzt (siehe 5.1.8).

Tabelle 5.9: Ligationsansatz für die TA-Klonierung.

Reagenz	Volumen [μL]
PCR-Produkt	1
T4 DNA Ligasepuffer (5x)	2
pCR 2.1 Vektor [25 ng/ μL]	2
<i>ExpressLink</i> T4 DNA-Ligase (5 U)	1
Wasser	4
Σ	10

5.2.13 T7-Endonuklease Assay

Zum Nachweis von CRISPR/Cas9-vermittelten Mutationen wird der T7-Endonuklease Assay verwendet. Das Enzym erkennt Einzelstrangmutationen und schneidet die DNA im Bereich von Basenfehlpaarungen doppelsträngig.

Zur Durchführung des Assays werden Zellen, die mit dem Plasmid PX458 transfiziert wurden, geerntet und deren DNA isoliert. In der anschließenden PCR wird der zur gRNA komplementäre Bereich durch flankierende Primer amplifiziert und das Amplifikat gereinigt. Für einen Reaktionsansatz werden 200 ng des gereinigten Amplifikats mit 2 μL 10x Reaktionspuffer (NEBuffer 2, New England BioLabs, Ipswich, USA) gemischt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 19 μL gebracht. Für die Heteroduplex-Bildung wird der Reaktionsansatz im Thermocycler für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sukzessive auf eine Temperatur von 25 °C abgekühlt (Tab. 5.10).

Tabelle 5.10: Temperaturprofil für die Heteroduplex-Bildung.

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Rate
Initiale	120	95	/
Denaturierung	/	95-85	- 2 °C/s
Annealing	/	85-25	- 0,1°C/s

Anschließend werden 1 μL der T7-Endonuklease (10.000 U/mL, New England BioLabs, Ipswich, USA) zu jedem Reaktionsansatz pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 μL einer 0,25 M EDTA-Lösung wird die Reaktion abgestoppt und die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Intensitäten der detektierten Banden werden mit *ImageJ* quantifiziert. Als Kontrolle dient, mit jeweils denselben Primern amplifizierte, DNA aus nicht-transfizierten Zellen.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 BCA-Assay zur Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration

Der für die Quantifizierung der Gesamtproteine einer Lösung (Zelllysat, Zellkulturüberstand) eingesetzte Bicinchoninsäure (BCA)-Assay beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen durch proteinogene Aminosäuren. Die einwertigen Kupferionen bilden mit der BCA einen vierwertigen, violetten Komplex aus, der kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann. Das gemessene Signal verhält sich dabei proportional zur Proteinkonzentration.

Für die Durchführung des Assays werden 25 μL der zu analysierenden Probe (1:2 in Wasser verdünnt) in Doppelbestimmung pro Kavität einer farblosen 96-Kavitätenplatte pipettiert. Für die spätere Quantifizierung der Proben wird gleichzeitig eine BSA-Standardreihe (0, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 $\mu\text{g/mL}$) in Doppelbestimmung (jeweils 25 μL) mit aufgetragen. Zu jeder Probe (und jedem Standard) werden 200 μL einer Kupfersulfat/BCA-Lösung (Verhältnis: 1:50) pipettiert und gut gemischt. Die Platte wird mit Parafilm versiegelt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Absorbionsmessung bei 562 nm erfolgt mit dem *Tecan Reader infinite 200 PRO*. Die für die BSA-Standards ermittelten Werte werden über eine lineare Regression ausgewertet und für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben verwendet.

5.3.2 Radiochemischer XT-Aktivitätstest

Zur Quantifizierung der intra- und extrazellulären XT-Aktivität wird u.a. ein radiochemischer Assay verwendet. Das Prinzip beruht dabei auf der XT katalysierten Xylosylierung eines Akzeptor-Moleküls mit radioaktiver UDP- ^{14}C -Xylose, wobei die Menge an kovalent gebundener ^{14}C -Xylose proportional zur XT-Aktivität ist [214]. Das in dem Assay als Akzeptor verwendete Seidenfibroin enthält die repetitive AS-Sequenz G-S-G-A-G-A-G-A und damit das für die Xylosylierung essenzielle G-S-G Motiv. Für die Reaktion werden zunächst 250 μL der radioaktiv markierten Xylose (7,24 GBq/mmol) mit 950 μL Wasser und 50 μL MES-Puffer verdünnt. Neben dem Akzeptor und der verdünnten UDP- ^{14}C -Xylose enthält jeder Reaktionsansatz (Tab. 5.11) als Enzymquelle entweder Lysat (intrazelluläre XT-Aktivität) oder Zellkulturüberstand (extrazelluläre XT-Aktivität) (siehe 5.1.1.6).

Tabelle 5.11: Reaktionsansatz für den radiochemischen XT-Test.

Reagenz	Volumen [μL]
MES-Puffer	5
Mg/Mn-Lösung	5
UDP- ^{14}C -Xylose	10
Seidenfibroin (1 %, solvatisiert)	30
Lysat/Zellkulturüberstand	50
Σ	100

Die Reaktionsansätze (Doppelbestimmung) werden für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 90 μL jedes Ansatzes auf ein Nitrocelluloseplättchen pipettiert. Nach der Inkubation für 2 h bei RT werden die getrockneten Nitrocelluloseplättchen in Szintillations-Röhrchen transferiert und das Seidenfibroin durch die Inkubation mit 3 mL einer 10%igen Trichloressigsäure (TCA)- Lösung gefällt. Die Plättchen werden anschließend dreimal mit 5%iger TCA-Lösung (Inkubation: 10, 15 und 10 min) gewaschen und mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Während der Inkubation ü.N. bei RT werden die Nitrocelluloseplättchen aufgelöst und die entstandene Lösung kann für die Bestimmung der Zerfälle pro Minute (*decay per minute, dpm*) am Szintillationszähler eingesetzt werden. Die gemessenen dpm-Werte werden auf die DNA-Konzentration der Probe normiert.

5.3.3 Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis von α -SMA

Für die Quantifizierung der α -SMA Proteinexpression werden pro Kavität einer 12-Kavitäten Platte $1,95 \times 10^4$ Fibroblasten in Doppelbestimmung ausgesät. Im weiteren Verlauf werden die Zellen, wie unter 5.1.1.5 beschrieben, mit TGF- β 1 induziert und danach für weitere 120 h kultiviert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen und der Zellrasen mit 200 μL einer Aceton:Methanol Lösung (1:1) zur Fixierung für 10 min überschichtet. Nach Trocknung an der Luft werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen (2x) und unspezifische Bindestellen durch Zugabe von 200 μL einer BSA Lösung (1 % in PBS gelöst) blockiert. Die Platte wird für 1 h unter leichtem Schütteln (100 U/min) inkubiert und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach kommt es für 2 h bei RT und unter Schütteln zur Inkubation mit 200 μL der Primärantikörper-Lösung. Diese enthält den monoklonalen Primärantikörper (*mouse-anti-human smooth muscle actin Clone 1A4*) in einer 1:50 Verdünnung (in 0,1 % BSA/PBS). Nach gründlichem Waschen (2x) wird der Zellrasen mit 200 μL einer 1:75 Verdünnung (in 0,1 % BSA/PBS) des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (*goat-anti-mouse*) überschichtet. Die anschließende Inkubation erfolgt schüttelnd für 1 h im Dunkeln. Die Zellen werden dreimal gewaschen und für die Mikroskopie mit PBS überschichtet.

5.3.4 Western Blot Analyse zum quantitativen Nachweis von α -SMA

Für den quantitativen Nachweis der basalen α -SMA- Proteinexpression in Fibroblasten werden jeweils $2,3 \times 10^5$ Zellen in einer 100 x 20 mm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Zellkulturmedium durch frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 72 h kultiviert. Danach werden die Zellen mit 300 μ L eines speziellen Lysepuffers für Transmembranproteine überschichtet und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden mechanisch vom Boden der Schale gelöst und in die Suspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach der Homogenisierung werden die Zellen zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C), der Überstand gesichert und zur Bestimmung der Proteinkonzentration im BCA-Assay (siehe 5.3.1) eingesetzt.

Für die Separierung der Proteine wird eine Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Dafür wird für jede Probe zunächst der in Tab. 5.12 aufgelistete Reaktionsansatz pipettiert und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dieser Schritt dient der initialen Denaturierung der nativen Proteine.

Tabelle 5.12: Reaktionsansatz zur Vorbereitung der Zelllysate für die SDS-PAGE.

Komponente	Teile
Zelllysate (20 μ g)	4
Reduzierendes Agens (10x)	1
Tris-Glycin SDS-Probenpuffer (2x)	5

Der verwendete Probenpuffer enthält u.a. das Detergenz SDS, welches die Denaturierung unterstützt und, bedingt durch seine stark negative Ladung, die intrinsische Nettoladung (*net charge*) der Proteine maskiert. Dadurch werden die Proteine ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts voneinander getrennt. Die denaturierten Proben werden in die Taschen eines 8-16 % SDS- Polyacrylamidgels (Novex WedgeWell 8- 16 % Tris- Glycine Gel 1,0 mm, ThermoFisher, Dan Diego, USA) pipettiert und für 2 h bei 125 V (in SDS-Puffer) aufgetrennt. Zusätzlich werden auf jedes Gel 12 μ L eines Größenstandards aufgetragen (*HiMark Pre-Stained Protein Standard*).

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE voneinander separiert wurden, werden sie unter Verwendung eines Tank-Blot-Systems auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dazu wird der in Abb. 5.1 dargestellte Aufbau realisiert.

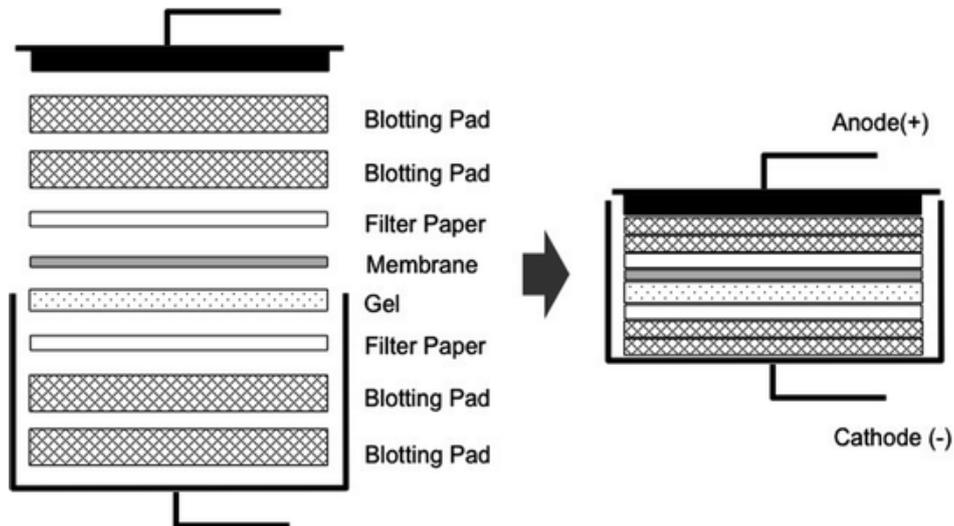


Abbildung 5.1 [322]: Schematischer Aufbau eines Tank-Blot-Systems für den Proteintransfer von einem Gel auf eine Membran mittels Western Blot.

Die verwendeten *blotting pads* werden in Transferpuffer getränkt. Dieser enthält u.a. 5 % Methanol, wodurch die Hydrophobizität der Proteine erhöht und deren Transfer erleichtert wird. Der Transfer erfolgt für 2 h bei 25 V. Nach dem Transfer der Proteine wird die Membran unter leichtem Schütteln für 1 h mit einer 5%igen BSA-Lösung inkubiert, um freie Bereiche auf der Membranoberfläche zu blockieren. Nachdem die Membran dreimal mit TBS-T Puffer (jeweils 10 min) gewaschen wurde, wird sie ü.N. (rotierend und bei 4 °C im Kühlschrank) mit der Primärantikörper-Lösung inkubiert. Für das Ansetzen der Lösung wird der verwendete, monoklonale α -SMA Antikörper (*mouse-anti-human smooth muscle actin Clone 1A4*) 1:2000 in TBS-T Puffer (enthält 2,5 % BSA) verdünnt. Am nächsten Tag wird die Membran erneut dreimal gewaschen (TBS-T, jeweils 10 min) und anschließend mit der Sekundärantikörper-Lösung (*Horse anti mouse IgG-HRP polyclonal*, 1:2000 in TBS-T Puffer) rotierend für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen (TBS-T, jeweils 10 min) wird die Membran mit 1 mL einer Lösung bedeckt, die zu gleichen Teilen aus einer Luminol/Enhancer-Lösung und einem Peroxidasepuffer besteht. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation des Luminols unter Bildung eines chemilumineszenten Produktes, welches an der Geldokumentationsanlage detektiert werden kann.

5.3.5 Quantitativer Seneszenz-Assay

Zur Quantifizierung der zellulären Seneszenz wird ein bereits beschriebener [323], fluoreszenzbasierter Assay durchgeführt. Die Zellen werden dazu in geringer Zelldichte (50 Zellen/mm²) in einer 100 x 22 mm ausgesät und am nächsten Tag ein Serumentzug durchgeführt. Nach weiteren 24 h werden die Zellen entweder mit TGF- β 1 induziert oder weiter in serum-reduziertem Medium kultiviert. Nach 72 h werden die Zellen viermal mit PBS

gewaschen und mit 300 μL CHAPS-Lysepuffer überschichtet. Die Zellen werden mit einem Zellschaber mechanisch vom Boden der Schale gelöst, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert. 100 μL des Überstandes werden mit 100 μL Reaktionspuffer vermengt. Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 1:4 mit einer 400 mM Natriumcarbonat-Lösung verdünnt. Während der Reaktion wird das im Puffer enthaltene Fluorogen MUG durch das Seneszenz-assoziierte (SA) Enzym β -Galaktosidase hydrolysiert, wobei es zur Bildung des photometrisch nachweisbaren 7-Hydroxyl-4-Methylcoumarin kommt. 150 μL eines Reaktionsansatzes werden in Doppelbestimmung in eine schwarze 96-Kavitäten Platte pipettiert und im *Tecan Reader Infinite 200 PRO* vermessen (Anregung: 360 nm, Emission: 465 nm, Integration: 40 μs). Das gemessene Fluoreszenzsignal wird auf die im BCA-Test (5.3.1) gemessene Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand normiert.

5.3.6 Qualitativer Seneszenz-Assay

Um qualitative Aussagen über die Expression der SA- β -Galaktosidase tätigen zu können, wird ein ebenfalls bereits publizierter Test verwendet [324]. Dazu werden die Zellen in einer Zelldichte von 50 Zellen/ mm^2 in einer 6-Kavitäten Platte ausgesät (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT) und, wie zuvor beschrieben (siehe 5.1.1.5), kultiviert. 72 h nach der TGF- β 1 Induktion werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und unter Verwendung einer 3%igen Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach erneutem Waschen werden die Zellen mit einer Färbelösung überschichtet und ü.N. bei 37 °C und ohne CO_2 inkubiert. Bei pH 6,0 wird die X-Gal Hydrolyse ausschließlich durch die SA β -Galaktosidase katalysiert und es kommt zur Bildung bläulicher Präzipitate. Am nächsten Tag werden die Zellen unter Verwendung einer Farbkamera unter dem Lichtmikroskop analysiert (Nikon, Minato, Japan). Für jede primäre Zelllinie und Bedingung werden drei biologische Replikate ausgesät.

5.3.7 Immunassay zur Quantifizierung von aktiviertem TGF- β 1

Für den quantitativen Nachweis von aktiviertem TGF- β 1 im ZKÜ wird ein *Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)* der Firma *R&D Systems* (Minnesota, USA) verwendet. Der Test beruht auf der spezifischen Bindung von TGF- β 1 an immobilisierte, primäre Antikörper. Der anschließend verwendete sekundäre Antikörper ist an eine Peroxidase gebunden, die das hinzugegebene Farbstoffsubstrat (ein Chromogen) unter Bildung eines bei 450 nm nachweisbaren Produktes umsetzt. Die gemessene Absorption bei 450 nm ist dabei proportional zur TGF- β 1 Konzentration in der jeweiligen Probe.

Für die Generierung der verwendeten ZKÜ werden 50 Zellen/ mm^2 auf einer 100 x 20 mm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen entweder in Vollmedium oder unter Serumentzug (0,1 % FCS) weiterkultiviert. Nach 72 h wird der ZKÜ gesichert und 2,5-

fach mit dem im Kit enthaltenen *calibrator diluent* verdünnt. Für die Aktivierung des latenten TGF- β 1 werden 100 μ L ZKÜ mit 20 μ L 1 N HCl versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird durch die Zugabe von 20 μ L einer 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES-Lösung neutralisiert und direkt für den Assay eingesetzt. Neben dem ZKÜ (Doppelbestimmung) werden, zur Bestimmung der basalen TGF- β 1-Konzentrationen im Zellkulturmedium, serumreduziertes (0,1 % FCS) und Vollmedium in Doppelbestimmung mitgeführt. Für die spätere Quantifizierung wird zusätzlich eine zuvor angesetzte TGF- β 1-Standardreihe (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 0 pg/mL) aufgetragen. In jede verwendete Kavität, der den primären Antikörper enthaltenden 96-Kavitätenplatte, werden 50 μ L RD1-21 *diluent* und 50 μ L der zu analysierenden Probe pipettiert. Die Platte wird mit einer adhäsiven Folie versiegelt und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend werden die Kavitäten insgesamt viermal mit jeweils 400 μ L Waschpuffer gewaschen und überschüssiger Puffer entfernt. Nach Zugabe von jeweils 100 μ L TGF- β 1-Konjugat (enthält den Enzym-gekoppelten, sekundären Antikörper) wird die Platte erneut für 2h bei RT inkubiert und viermal gewaschen. Durch Zugabe von 100 μ L einer Substratlösung wird die durch die Peroxidase katalysierte Reaktion gestartet. Nach erneuter Inkubation bei RT (30 min im Dunkeln) wird die Reaktion durch Zugabe von 100 μ L einer Stopp-Lösung abgestoppt und die Absorption bei 450 nm am *Tecan Reader infinite 200 Pro* bestimmt. Die daraus berechneten TGF- β 1 Konzentrationen [pg/mL] werden auf den DNA-Gehalt [ng/ μ L] der jeweiligen Probe normiert.

5.4 Massenspektrometrische Methoden

5.4.1 Nachweis von XT-I spezifisch xylosylierten Peptiden

Für den sensitiven Nachweis von synthetischen Peptiden, die spezifisch von der XT-I xylosyliert werden, wird in dieser Arbeit eine massenspektrometrische (MS) Methode entwickelt. Nach einer Flüssigphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*) werden die Peptide mittels Flüssigchromatographie (*ultra performance liquid chromatography, UPLC*) aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch (MS/MS) analysiert.

5.4.1.1 Bestimmung der Produkt-Ionen

Für die Bestimmung der Produkt-Ionen von Peptiden wird 1 μ L einer Peptidlösung ($C_{\text{Peptid}} = 1 \text{ mg/L}$) direkt in das Massenspektrometer (Xevo TQ-S, Waters) injiziert. Für die automatisierte Identifizierung der Produkt-Ionen wird das in der *MassLynx*-Software integrierte *IntelliStart*-Programm verwendet. Als Ergebnis werden die für jeden Übergang (Vorläufer-Ion \rightarrow Produkt-Ion) optimalen Kollisionsenergien [eV] und Konus-Spannungen [V] ausgegeben (s. Tab. 11.1).

5.4.1.2 Probenvorbereitung

Ein Reaktionsansatz für den MS XT-I Test enthält, neben den Puffern (vgl. radiochemischer XT-Test, 5.3.2) nicht-radioaktive UDP-Xylose und das zu xylosylierende Peptid. Für die Identifizierung von Peptiden, die spezifisch von der XT-I xylosyliert werden, werden vergleichend CHO-pgsA Zellkulturüberstände (ZKÜ) verwendet, die jeweils nur eine XT-Isoform beinhalten (Tab. 5.13).

Tabelle 5.13: Reaktionsansatz für den massenspektrometrischen XT-Aktivitätstest.

Reagenz	Volumen [μL]
MES-Puffer	5
Mg/Mn-Lösung	5
UDP-Xylose (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	10
Synthetisches Peptid (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	30
XT-Isoform spez. ZKÜ	50
Σ	100

Der Reaktionsansatz wird für 24 h bei 37 C° inkubiert und die Proben anschließend denaturiert (10 min, 99 °C) und zentrifugiert (10 min, 13,000 x g). Der Überstand wird 1:4 mit Wasser verdünnt und für die Analyse eingesetzt.

5.4.1.3 Zweidimensionale online SPE-UPLC-MS/MS Methode

Das verwendete zweidimensionale (2D) UPLC-System (*Acquity UPLC H-class*, Waters) wird über zwei Pumpen betrieben. Für die Extraktion und Aufkonzentrierung der injizierten Probe (10 μL) wird eine 2,1 x 30 mm Extraktionssäule (*XBridge C8 DirectConnect HP* 10 μm , Waters) verwendet, die mit einer aus 30 % Methanol (v/v), 0,1 % Ameisensäure und 2 mmol/L Ammoniumacetat bestehenden Lösung äquilibriert wird (Tab. 5.14).

Tab. 5.14: Flussrate und Zusammensetzung der mobilen Phase für die Extraktionssäule.

Schritt	Zeit [min]	Flussrate [mL min^{-1}]	Lösung A [%]	Lösung B [%]	Gradient
1	∞	0,1	70	30	Isokratisch

0,6 min nach der Injektion wird das Ventil auf Position 2 gestellt und die angereicherte Probe auf eine 2,1 x 50 mm Chromatographiesäule (*Acquity UPLC BEH C18* 1,7 μm , Waters) eluiert (Tab. 5.15). Dazu wird sukzessive, in Form eines linearen Gradienten, die Zusammensetzung der mobilen Phase geändert (Tab. 5.16).

Tabelle 5.15: Automatisierte Ventil-Umschaltung.

Schritt	Zeit [min]	Ventil-Position
1	Initial	1
2	0,6	2
3	2,95	1

Tabelle 5.16: Gradient für die Elution der Probe auf die Analytensäule.

Schritt	Zeit [min]	Flussrate [mL min ⁻¹]	Lösung A [%]	Lösung B [%]	Gradient
1	Initial	0,35	1	99	Isokratisch
2	0,1	0,35	1	99	Isokratisch
3	0,6	0,35	70	30	Linear
4	1,2	0,35	1	99	Isokratisch
5	1,8	0,35	1	99	Isokratisch
6	3,0	0,35	1	99	Isokratisch

Nach der chromatographischen Auftrennung werden die Peptide im gekoppelten Massenspektrometer unter Anlegen einer Kapillarspannung von 1,5 kV ionisiert (ESI +) und anschließend im Massenanalysator (MS/MS) fragmentiert. Die Analyse der Proben erfolgte im MRM-Modus über die Integration der Peakfläche. Nach der Detektion der Peptide erfolgte die Analyse der Daten mit der in *MassLynx* integrierten *QuanLynx* Software.

6. Material

6.1 Chemikalien und Reagenzien

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane-sulfonate) (CHAPS)	Sigma, Taufkirchen
4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (MUG)	Sigma, Taufkirchen
4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galaktosid	Sigma, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
ATP	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Bicinchoninsäure	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Chondroitinsulfat B (Porcine Darmmukosa)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard pUC19/Mspl	MBBL, Bielefeld
dNTPs (100 mM)	Solis BioDyne, Tartu, EST
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr 0,5 mg/mL)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natriumsalz (180 USP Units/mg)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumferrocyanid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumferricyanid	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfatlösung	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumdichlorid	Serva, Heidelberg
Mangandichlorid	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Biomers, Ulm
Pepton aus Fleisch	Roth, Karlsruhe
Polysorbate 20 (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Roti Histofix 4 %	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Seide	Idee, Bielefeld
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Synthetische Peptide	KE-Biochem, Shanghai, CN
Szintillationsflüssigkeit Ready Flow III	Beckman Coulter, Krefeld
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe

TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
UDP-Dinatriumsalz	Sigma, Taufkirchen
UDP-[¹⁴ C]-Xylose (7,14 GBq/mmol)	Perkin Elmer, Foster City, USA
UDP-Xylose	CarboSource, Georgia, USA
Wasser (Ampuwa)	Fresenius-Kabi, Bad Homburg
Wasser (Aqua B. Braun)	B. Braun, Melsungen
Wasser (UPLC-Gradient-Grade)	Thermo Scientific, USA
<i>Water soluble tetrazolium salt (WST-I)</i>	Sigma, Taufkirchen
Xylenxyanol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

6.2 Puffer und Lösungen

6.2.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

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

6.2.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Ampicillin-Lösung	50 mg/mL Ampicillin in Wasser
Kryomedium	20 % DMSO 80 % FCS

6.2.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

MES-Puffer	500 mM MES 100 mM KF pH 6,5
Mg/Mn-Lösung	100 mM MgCl ₂ 100 mM MnCl ₂ 250 mM KCl
NP-40 Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM TRIS-HCl 1 % (v/v) NP-40 pH 7,8

BCA-Arbeitslösung	98 % Bikuninsäure 2 % Kupfersulfat
Färbelösung (qualitativer β-Galaktosidase-Assay)	5 mM Ferrocyanid 5 mM Ferricyanid 150 mM NaCl 2 mM MgCl ₂ 40 mM Zitronensäure/ Natriumphosphat-Puffer 1 mg/mL X-Gal
Reaktionspuffer (quantitativer β-Galaktosidase Assay)	40 mM Zitronensäure 40 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol 4 mM MgCl ₂ 1,7 mM MUG
Lysepuffer für Transmembranproteine	137,5 mM NaCl 50 mM Tris/HCl (pH 7,8) 8,7 % Glycerin 0,5 mM EDTA (pH 8) 5 % Protease Inhibitor 1 % NP-40 H ₂ O add. 50 mL

6.2.4 Kommerzielle Puffer und Lösungen

NuPAGE SDS Probenpuffer (4x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
NuPage Transferpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Tris-Acetat SDS Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Tris-Glycine SDS Laufpuffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Tris-Glycine SDS Probenpuffer (2x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Tris-Glycine Transferpuffer (25x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
BigDye Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

6.3 Zelllinien

Tabelle 6.1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp/ Entnahmeregion	Bezugsquelle
M1FS	Humane, dermale Fibroblasten (neonatal) Präputium	Coriell, Camden, USA
F42A	Humane, dermale Fibroblasten (adult) Abdominale Dermis (CC- 25U)	Cambrex Bio Science, Walkersville, USA
M45D	Humane, dermale Fibroblasten (adult) Faziale Dermis (PH10605A)	Genlantis, San Diego, USA
M56D	Humane, dermale Fibroblasten Faziale Dermis (PH10605A)	Genlantis, San Diego, USA
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen (immortalisiert)	DSMZ, Braunschweig

6.4 Zellkulturmedien und -zusätze

Antibiotikum/Antimykotikum (100 x)	PAN-Biotech, Aidenbach
DMEM (1 x, <i>high glucose</i>)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (200 mM)	PAN-Biotech, Aidenbach
Opti-MEM I	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
PBS (1 x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	PAN-Biotech, Aidenbach

6.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Top 10	Eigene Herstellung
-----------------------	--------------------

6.6 Nährmedien für *E.coli*

LB-Agar	10 g Pepton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 20 g Agar add. 1 L Aqua dest.
LB- Medium	10 g Pepton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt add. 1 L Aqua dest.
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glukose 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH 7,0

6.7 Rekombinante Proteine

Tabelle 6.2: Verwendete rekombinante Proteine.

Protein	Quelle	Hersteller
Kollagen Typ I (5 mg/mL)	Rattenschwanz	Ibidi, Planegg
TGF- β 1 (5 μ g)	HEK293	Miltenyi, Bergisch Gladbach

6.8 Enzyme und Enzympuffer

Fast-Digest Puffer (10 x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
T4 DNA-Ligasepuffer (5 x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
HotStart Taq DNA- Polymerase (5 U/ μ L)	Qiagen GmbH, Hilden
T7 Endonuklease I (10.000 U/ mL)	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer 2	New England Biolabs, Frankfurt
PCR- Puffer (10 x)	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

Q-Solution
T4 PNK (10 U/ μ L)
Fast Digest BbsI
T4 Ligase (400 U/ μ L)

Qiagen GmbH, Hilden
Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
New England Biolabs, Frankfurt

6.9 Antikörper

Maus-anti-Human α -Glattmuskelaktin
Antikörper, monoklonal [1A4]

Dako, Hamburg

Maus-anti Human GAPDH
Antikörper, monoklonal [6C5]

Abcam, Cambridge, UK

Ziege-anti-Maus IgG/ IgM,
FITC- Konjugat

Dianova, Hamburg

6.10 Oligonukleotide

6.10.1 Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR

Tabelle 6.3: Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR.

Gen/ Amplifikatgröße [bp]	Primer-Bezeichnung	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Annealing- Temperatur [°C]
ACAN 158	ACAN/7212U18	CACCCCATGCAATTTGAG	63
	ACAN/7352L18	GCCACTGTGCCCTTTTAA	
ACTA2 169	ACTA/E8/1412U18	GACCGAATGCAGAAGGAG	59
	ACTA/E9/1580L17	CGGTGGACAATGGAAGG	
B2M 137	β 2M/E1/84U22	TGTGCTCGCGCTACTCTCTCTT	63
	β 2M/E2/200L21	CGGATGGATGAAACCCAGACA	
B3GALT6 188	B3GALT6_1981U20	CCCCGCTGTGGTCTTTGTTG	63
	B3GALT6_2151L18	CGCCCCGTTTCTTCCTC	
B4GALT7 214	B4GALT7_30U18	CTCTCCGCACGATGTTCC	63
	B4GALT7_226L18	GTCTCCTGCCCTTGTTCC	
CD73 174	NT5E_fwd	CTCCTCTCAATCATGCCGCT	63
	NT5E_rev	TGGATTCCATTGTTGCGTTCA	
COL1A1 151	Col1A1_3908U17E49	GATGTGCCACTCTGACT	63
	Col1A1_4058L15E50	GGTTCTTGCTGATG	
DCN 102	hDCN/E1/572U16	CCTTCGCTGTCAATG	63
	hDCN/E2/656L18	GCAGGTCTAGCAGAGTTG	
ELN 252	ELN/E17+18/929U23	CCGCTAAGCAGCCAAGTATGA	59
	ELN/E20/1180L24	AGCTCCAACCCGTAAGTGGAAT	
FN1 291	hFN/E37/6807U17	CCCAGGGAAGATGTAGA	63
	hFN/E39/7080L18	CTCTCCCGAACCTTATG	

GAPDH 223	hGAPDH/E2+3/116U18 hGAPDH/E4/338L18	AGGTCGGAGTCAACGGAT TCCTGGAAGATGGTGATG	63
HPRT1 258	hHPRT1/E3/311U18 hHPRT1/E6/568L18	GCTGACCTGCTGGATTAC TGCGACCTTGACCATCTT	63
TGF-β1 331	hTGFβ1/E3/1404U17 hTGFβ1/E6/1734L18	GCGATACCTCAGCAACC ACGCAGCAGTTCTTCTCC	59
UXS1 110	UXS1_fwd UXS1_rev	CAACCGCAGGAGGATGAAGC CCTGGATAGACCTGTTGAGTAGAA	63
XYLT1 281	XYLT1_B_1886f XYLT1_B_2166_r	GAAGCCGTGGTGAATCAG CGGTCAGCAAGGAAGTAG	63
XYLT2 139	XYLT2_C_1350f XYLT2_C_1488r	ACACAGATGACCCGCTTGTGG TTGGTGACCCGCAGGTTGTTG	63

6.10.2 Oligonukleotide zur Amplifizierung CRISPR/Cas9 modifizierter Bereiche im Genom

Tabelle 6.4: Oligonukleotide zur Amplifizierung des zur jeweiligen gRNA komplementären Bereichs im Genom. Rot markiert sind die für die Cas9-Bindung essenziellen PAM-Sequenzen.

Gen	Exon	gRNA (5'→3')	Primer (5'→3')	Amplifikat [bp]	T _A [°C]
XYLT1	9	CTGCAGGGTAGTTCCCGTAC AGG	CGGAGCTAATTCGGGTCCAG GAAATGCCACGCACGCTAGG	558	59
XYLT2	2	GGCTGGGAGCCTCATGCCCA AGG	ACCACACGGAGATACAGGGA CTCTCATCCCACTGGATGCC	531	56
XYLT2	9	GGCGCAGTGACCAGGCCAGC CGG	CGCTTGAGATGTGGCTGATG GGTGTCTGTCCCTCTCTTCC	159	58

6.11 siRNA-Sequenzen

Tabelle 6.5: In dieser Arbeit verwendete siRNAs (ambion®, Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA).

Bezeichnung	Sequenz (sense/ antisense)	Ziel-mRNA
Kontroll siRNA	Nicht bekannt	Keine humane mRNA
ID: #		
UXS1-siRNA	GCAAUUCACUACUCCGUAtt	<i>UXS1</i> , Exon 15
ID: # s36964	UACGGAAGUAGUGAAUUGCtt	
XYLT2-siRNA	CCUGUAUUUCUAUGACGACTt	<i>XYLT2</i> , Exon 9
ID: # 112168	GUCGUCAUAGAAUACAGGtg	

6.12 Plasmide

pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	Addgene, Watertown, USA
pCR 2.1	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

6.13 Chromatographie- und Extraktionssäulen

2,1 x 30 mm XBridge C8 DirectConnect HP 10 µm	Waters, Eschborn
2,1 x 50 mm Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm	Waters, Eschborn

6.14 Kommerzielle Reaktionssysteme

BigDye <i>Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Human TGF-β1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Abingdon, UK
LightCycler 480 SYBR-Green I Master	Roche, Mannheim
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Lipofectamine LTX	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
MSB Spin PCRapace Kit	Stratec Biomedical AG, Birkenfeld
NucleoSpin Blood	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Superscript II Reverse Transcriptase Kit	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA

6.15 Verbrauchsmaterialien

Falcon-tube (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen	Nerbe, Winsen
Invitrolon PVDF Filterpapier- Sandwich, 0,45 µm Porengröße	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Kryoröhrchen	Roth, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocelluloseplättchen	Sartorius, Göttingen
Novex WedgeWell 8- 16 % Tris- Glycin Gel, 1,0 mm x 10 well	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Parafilm	Fleischhacker, Mannheim
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 200 µL	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Polystyrolplatte, schwarz	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt, Nürnbrecht
Receiver coloumn	Macherey-Nagel, Düren
Sequenzierplatten	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Spritzen (10 mL, 30 mL, 50 mL)	B. Braun, Melsungen
Sterile Einwegpipetten (5, 10, 205, 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Szinitillations-Röhrchen	Zinsser Analytik, Frankfurt
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 Kavitäten)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen

6.16 Geräte

ABI Prism 3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Agarose- Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Analysenwaage LC 2000	Sartorius, Göttingen
Automatikpipette	Eppendorf AG, Hamburg
Blot-System XCell II Blot Module	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Fluoreszenzmikroskop TE2000-S	Nikon GmbH, Düsseldorf
Gasbrenner fireboy eco	Integra, Biosciences, Fernwald
Geldokumentationsanlage Fusion SL	Peqlab, Erlangen
Gelelektrophorese-System	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
XCell SureLock Mini-Cell	
Inkubator	Biometra ADT Line, Göttingen
JuLi Br Live Cell Analyzer	NanoEnTek Inc., Waltham, USA
LightCycler 480 II	Roche, Mannheim
Lichtmikroskop Labovert	Leitz, Wetzlar
Magnetrührer RTCbasic	IKA Werke GmbH, Staufen
NanoDrop 2000	Thermo Scientific Scientific, San Diego, USA
Neubauer-Zählkammer improved	Brand, Wertheim
pH-Meter Five Easy Plus TM FEP20	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipettier-Roboter	LTF Labortechnik, Wasserburg
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
S3e Cell sorter	Biorad, Hercules, USA
Sicherheitswerkbank Bioair Safeflow 1.2	EuroClone S.p.A., Siziano, ITA
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Thermo Scientific Safe 2020	
Spannungsgerät PS3002	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Stickstofftank 500series chart	German Cryo, Jüchen
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
Tecan Reader Infinite 200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler Landgraf	Landgraf Laborsysteme, Langenhagen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Santorius, Göttingen
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, San Diego, USA
Xevo TQ S Tandem	Waters, Eschborn
Quadrupol Massenspektrometer	
Zentrifuge ROTIXA/ RP	Hettich Ag, Bäch
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich Ag, Bäch
Zentrifuge Eppendorf 5417	Eppendorf, Hamburg

6.17 Software und Datenbanken

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Clone Manager Suite 9	Scientific & Educat. Software, USA
Citavi	Swiss Academic Software, Wädenswil, CH
E-CRISPR	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/
Graphpad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	https://imagej.nih.gov/ij/
LightCycler 480 SQ 1.5.1	Roche, Mannheim

Magellan v7.1
NIS-Element AR 4.20.00
Pubmed

Tecan, Männedorf, CH
Nikon GmbH, Düsseldorf
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

7. Abkürzungen

°C	Temperatur in Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTA2	α -Glattmuskelaktin-Gen
ACTA2	α -Glattmuskelaktin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
Bp	Basenpaar
β 2M	β 2-Mikroglobulin-Gen
β -ME	β -Mercaptoethanol
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
c	centi
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CS	Chondroitinsulfat
CT	<i>cycle threshold</i>
Da	Dalton
DBSD	Desbuquois skeletale Dysplasie
DCN	Decorin-Gen
DCN	Decorin
Dest.	destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Phosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiotriol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzymklasse
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GalT	Galaktosyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase-Gen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GlcA	Glukuronsäure
GlcAT-I	Glukuronyltransferase-I
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
gRNA	<i>guide RNA</i>
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase I-Gen

HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IdoA	Iduronsäure
k	kilo
Kb	Kilobasen
KS	Keratansulfat
L	Liter
LB	Luria Bertani Medium
μ	mikro
m	Meter
m	milli
M	molar
MES	4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl
min	Minute
miRNA	microRNA
MS	Massenspektrometrie
n	nano
NHDF	<i>normal human dermal fibroblast</i>
NHEJ	<i>non homologous end joining</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PG	Proteoglykan
pH	<i>pondus hydrogenatus</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RC	radiochemisch
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
T	Thymin
T _A	<i>annealing temperature</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i>
<i>TGF-β1</i>	<i>transforming growth factor-β1-Gen</i>
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
UPLC	<i>ultra pressure liquid chromatography</i>
ü. N.	über Nacht
WST	<i>water soluble tetrazolium</i>
XT	Xylosyltransferase
Xyl	Xylose
<i>XYLT</i>	<i>Xylosyltransferase-Gen</i>
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8. Literatur

1. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123(24):4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820
2. Clause KC, Barker TH (2013) Extracellular Matrix Signaling in Morphogenesis and Repair. *Curr Opin Biotechnol* 24(5):830–833. doi:10.1016/j.copbio.2013.04.011
3. Spencer VA, Xu R, Bissell MJ (2010) Gene Expression in the Third Dimension: The ECM-nucleus Connection. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(1):65–71. doi:10.1007/s10911-010-9163-3
4. Harburger DS, Calderwood DA (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 2):159–163. doi:10.1242/jcs.018093
5. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* 119(Pt 19):3901–3903. doi:10.1242/jcs.03098
6. Xian X, Gopal S, Couchman JR (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* 339(1):31–46. doi:10.1007/s00441-009-0829-3
7. Halper J, Kjaer M (2014) Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* 802:31–47. doi:10.1007/978-94-007-7893-1_3
8. Ravikanth M, Soujanya P, Manjunath K, Saraswathi TR, Ramachandran CR (2011) Heterogeneity of fibroblasts. *J Oral Maxillofac Pathol* 15(2):247–250. doi:10.4103/0973-029X.84516
9. Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, Xu W, Lu S, Yuan M, Guo Q (2014) The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *Biomed Res Int* 2014. doi:10.1155/2014/648459
10. El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, Laurencin CT (2003) Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* 24(7):1213–1221
11. Cox TR, Erler JT (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 4(2):165–178. doi:10.1242/dmm.004077
12. Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(12):786–801. doi:10.1038/nrm3904
13. Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 61(2):198–223. doi:10.1124/pr.109.001289
14. Prydz K, Dalen KT (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113 Pt 2:193–205

15. Prydz K (2015) Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules* 5(3):2003–2022. doi:10.3390/biom5032003
16. Almeida R, Lavery SB, Mandel U, Kresse H, Schwientek T, Bennett EP, Clausen H (1999) Cloning and expression of a proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4-galactosyltransferase I. A seventh member of the human beta4-galactosyltransferase gene family. *J Biol Chem* 274(37):26165–26171
17. Bai X, Zhou D, Brown JR, Crawford BE, Hennet T, Esko JD (2001) Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). *J Biol Chem* 276(51):48189–48195. doi:10.1074/jbc.M107339200
18. Okajima T, Yoshida K, Kondo T, Furukawa K (1999) Human homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem* 274(33):22915–22918
19. Kitagawa H, Tone Y, Tamura J, Neumann KW, Ogawa T, Oka S, Kawasaki T, Sugahara K (1998) Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem* 273(12):6615–6618
20. Schreml J, Durmaz B, Cogulu O, Keupp K, Beleggia F, Pohl E, Milz E, Coker M, Ucar SK, Nürnberg G, Nürnberg P, Kuhn J, Ozkinay F (2014) The missing "link": an autosomal recessive short stature syndrome caused by a hypofunctional XYLT1 mutation. *Hum Genet* 133(1):29–39. doi:10.1007/s00439-013-1351-y
21. Malfait F, Kariminejad A, van Damme T, Gauche C, Syx D, Merhi-Soussi F, Gulberti S, Symoens S, Vanhauwaert S, Willaert A, Bozorgmehr B, Kariminejad MH, Ebrahimiadib N, Hausser I, Huysseune A, Fournel-Gigleux S, Paepe A de (2013) Defective initiation of glycosaminoglycan synthesis due to B3GALT6 mutations causes a pleiotropic Ehlers-Danlos-syndrome-like connective tissue disorder. *Am J Hum Genet* 92(6):935–945. doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.016
22. Oettingen JE von, Tan W-H, Dauber A (2014) Skeletal Dysplasia, Global Developmental Delay, and Multiple Congenital Anomalies in a 5 year-old boy– Report of the Second Family with B3GAT3 mutation and Expansion of the Phenotype. *Am J Med Genet A* 0(6):1580–1586. doi:10.1002/ajmg.a.36487
23. Okajima T, Fukumoto S, Furukawa K, Urano T (1999) Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. Identification and characterization of two mutations in galactosyltransferase I gene. *J Biol Chem* 274(41):28841–28844
24. Seidler DG, Faiyaz-UI-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SHE, Teebi AS, Kiesel L, Götte M (2006) Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *J Mol Med* 84(7):583–594. doi:10.1007/s00109-006-0046-4
25. Pomin VH, Mulloy B (2018) Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals (Basel)* 11(1). doi:10.3390/ph11010027

26. Yamada S, Sugahara K, Özbek S (2011) Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun Integr Biol* 4(2):150–158. doi:10.4161/cib.4.2.14547
27. Soares da Costa D, Reis RL, Pashkuleva I (2017) Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annu Rev Biomed Eng* 19:1–26. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044610
28. Goldoni S, Iozzo RV (2008) Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs. *Int J Cancer* 123(11):2473–2479. doi:10.1002/ijc.23930
29. Schaefer L, Iozzo RV (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 283(31):21305–21309. doi:10.1074/jbc.R800020200
30. Schaefer L, Schaefer RM (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339(1):237–246. doi:10.1007/s00441-009-0821-y
31. Zhang J-M, An J (2007) Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin* 45(2):27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
32. Frenkel SR, Saadeh PB, Mehrara BJ, Chin GS, Steinbrech DS, Brent B, Gittes GK, Longaker MT (2000) Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 105(3):980–990
33. Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S (1994) Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* 153(5):1936–1946
34. Kulkarni AB, Karlsson S (1993) Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 143(1):3–9
35. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG (2000) Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115(1):3–11. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00010.x
36. Zilberberg L, Todorovic V, Dabovic B, Horiguchi M, Couroussé T, Sakai LY, Rifkin DB (2012) Specificity of latent TGF- β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: role of fibrillins and fibronectin. *J Cell Physiol* 227(12):3828–3836. doi:10.1002/jcp.24094
37. Taylor AW (2008) Review of the activation of TGF- β in immunity. *J Leukoc Biol* 85(1):29–33. doi:10.1189/jlb.0708415
38. Chen Q, Sivakumar P, Barley C, Peters DM, Gomes RR, Farach-Carson MC, Dallas SL (2007) Potential role for heparan sulfate proteoglycans in regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) by modulating assembly of latent TGF-beta-binding protein-1. *J Biol Chem* 282(36):26418–26430. doi:10.1074/jbc.M703341200

39. Yang SNY, Burch ML, Tannock LR, Evanko S, Osman N, Little PJ (2010) Transforming growth factor- β regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: contribution to lipid binding and accelerated atherosclerosis in diabetes. *J Diabetes* 2(4):233–242. doi:10.1111/j.1753-0407.2010.00089.x
40. van Osch GJ, van der Veen SW, Buma P, Verwoerd-Verhoef HL (1998) Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. *Matrix Biol* 17(6):413–424
41. van der Kraan PM, Vitters EL, van den Berg WB (1992) Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. *Ann Rheum Dis* 51(5):643–647
42. Bassols A, Massagué J (1988) Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 263(6):3039–3045
43. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346(6281):281–284. doi:10.1038/346281a0
44. Ferdous Z, Wei VM, Iozzo R, Höök M, Grande-Allen KJ (2007) Decorin-transforming growth factor- interaction regulates matrix organization and mechanical characteristics of three-dimensional collagen matrices. *J Biol Chem* 282(49):35887–35898. doi:10.1074/jbc.M705180200
45. Müller S, Schöttler M, Schön S, Prante C, Brinkmann T, Kuhn J, Götting C, Kleesiek K (2005) Human xylosyltransferase I: functional and biochemical characterization of cysteine residues required for enzymic activity. *Biochem J* 386(Pt 2):227–236. doi:10.1042/BJ20041206
46. Kuhn J, Schnölzer M, Schön S, Müller S, Prante C, Götting C, Kleesiek K (2005) Xylosyltransferase I acceptor properties of fibroblast growth factor and its fragment bFGF (1-24). *Biochem Biophys Res Commun* 333(1):156–166. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.087
47. Roch C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2010) Differences in gene expression of human xylosyltransferases and determination of acceptor specificities for various proteoglycans. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):685–691. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.121
48. Wilson IBH (2002) 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(24):21207–21212. doi:10.1074/jbc.M201634200
49. Hwang H-Y, Olson SK, Brown JR, Esko JD, Horvitz HR (2003) The *Caenorhabditis elegans* genes *sqv-2* and *sqv-6*, which are required for vulval morphogenesis, encode glycosaminoglycan galactosyltransferase II and xylosyltransferase. *J Biol Chem* 278(14):11735–11738. doi:10.1074/jbc.C200518200

50. Munns CF, Fahiminiya S, Poudel N, Munteanu MC, Majewski J, Silience DO, Metcalf JP, Biggin A, Glorieux F, Fassier F, Rauch F, Hinsdale ME (2015) Homozygosity for frameshift mutations in *XYLT2* result in a spondylo-ocular syndrome with bone fragility, cataracts, and hearing defects. *Am J Hum Genet* 96(6):971–978. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.017
51. Götting C, Kuhn J, Zahn R, Brinkmann T, Kleesiek K (2000) Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol* 304(4):517–528. doi:10.1006/jmbi.2000.4261
52. Götting C, Kuhn J, Kleesiek K (2007) Human xylosyltransferases in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 64(12):1498–1517. doi:10.1007/s00018-007-7069-z
53. Pönighaus C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2010) Involvement of a cysteine protease in the secretion process of human xylosyltransferase I. *Glycoconj J* 27(3):359–366. doi:10.1007/s10719-010-9283-4
54. Götting C, Hendig D, Adam A, Schön S, Schulz V, Szliska C, Kuhn J, Kleesiek K (2005) Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J Mol Med* 83(12):984–992. doi:10.1007/s00109-005-0693-x
55. Götting C, Kuhn J, Sollberg S, Huerkamp C, Brinkmann T, Krieg T, Kleesiek K (2000) Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* 80(1):60–61. doi:10.1080/000155500750012612
56. Götting C, Sollberg S, Kuhn J, Weilke C, Huerkamp C, Brinkmann T, Krieg T, Kleesiek K (1999) Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 112(6):919–924. doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00590.x
57. Schöttler M, Müller S, Schön S, Prante C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2005) Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency. *Clin Biochem* 38(5):486–488. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.02.004
58. Albeiroti S, Soroosh A, La Motte CA de (2015) Hyaluronan's Role in Fibrosis: A Pathogenic Factor or a Passive Player? *Biomed Res Int* 2015:790203. doi:10.1155/2015/790203
59. Hendig D, Knabbe C, Götting C (2013) New insights into the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum and related soft tissue calcification disorders by identifying genetic interactions and modifiers. *Front Genet* 4. doi:10.3389/fgene.2013.00114
60. Izumi T, Tajima S, Nishikawa T (1995) Stimulated expression of decorin and the decorin gene in fibroblasts cultured from patients with localized scleroderma. *Arch Dermatol Res* 287(5):417–420. doi:10.1007/BF00373421
61. Westergren-Thorsson G, Cöster L, Akesson A, Wollheim FA (1996) Altered dermatan sulfate proteoglycan synthesis in fibroblast cultures established from skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 23(8):1398–1406

62. Götting C, Kuhn J, Kleesiek K (2008) Serum Xylosyltransferase Activity in Diabetic Patients as a Possible Marker of Reduced Proteoglycan Biosynthesis. *Diabetes Care* 31(10):2018–2019. doi:10.2337/dc08-0909
63. Shimomura H, Spiro RG (1987) Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes* 36(3):374–381
64. Schön S, Schulz V, Prante C, Hendig D, Szliska C, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2006) Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *J Med Genet* 43(9):745–749. doi:10.1136/jmg.2006.040972
65. Bui C, Huber C, Tuysuz B, Alanay Y, Bole-Feysot C, Leroy JG, Mortier G, Nitschke P, Munnich A, Cormier-Daire V (2014) XYLT1 Mutations in Desbuquois Dysplasia Type 2. *Am J Hum Genet* 94(3):405–414. doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.020
66. van Koningsbruggen S, Knoester H, Bakx R, Mook O, Knecht L, Cobben JM (2016) Complete and partial XYLT1 deletion in a patient with neonatal short limb skeletal dysplasia. *Am J Med Genet A* 170A(2):510–514. doi:10.1002/ajmg.a.37453
67. Condac E, Silasi-Mansat R, Kosanke S, Schoeb T, Towner R, Lupu F, Cummings RD, Hinsdale ME (2007) Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9416–9421. doi:10.1073/pnas.0700908104
68. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214(2):199–210. doi:10.1002/path.2277
69. Powanda MC, Moyer ED (1981) Plasma proteins and wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 153(5):749–755
70. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am J Surg* 176(2A Suppl):26S-38S
71. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M (2014) Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 6(265):265sr6. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
72. Gurevich DB, Severn CE, Twomey C, Greenhough A, Cash J, Toye AM, Mellor H, Martin P (2018) Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression. *EMBO J* 37(13). doi:10.15252/embj.201797786
73. Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200(4):500–503. doi:10.1002/path.1427
74. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U (2017) Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* 58(1-2):81–94. doi:10.1159/000454919

75. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5):349–363. doi:10.1038/nrm809
76. Faust I, Roch C, Kuhn J, Prante C, Knabbe C, Hendig D (2013) Human xylosyltransferase-I - a new marker for myofibroblast differentiation in skin fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 436(3):449–454. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.125
77. Jun J-I, Lau LF (2018) Resolution of organ fibrosis. *J Clin Invest* 128(1):97–107. doi:10.1172/JCI93563
78. Mizumoto S, Yamada S, Sugahara K (2015) Mutations in Biosynthetic Enzymes for the Protein Linker Region of Chondroitin/Dermatan/Heparan Sulfate Cause Skeletal and Skin Dysplasias. *Biomed Res Int* 2015:861752. doi:10.1155/2015/861752
79. Krakow D (2015) Skeletal Dysplasias. *Clin Perinatol* 42(2):301–319. doi:10.1016/j.clp.2015.03.003
80. Laccone F, Schoner K, Krabichler B, Kluge B, Schwerdtfeger R, Schulze B, Zschocke J, Rehder H (2011) Desbuquois dysplasia type I and fetal hydrops due to novel mutations in the CANT1 gene. *Eur J Hum Genet* 19(11):1133–1137. doi:10.1038/ejhg.2011.101
81. Kim O-H, Nishimura G, Song H-R, Matsui Y, Sakazume S, Yamada M, Narumi Y, Alanay Y, Unger S, Cho T-J, Park SS, Ikegawa S, Meinecke P, Superti-Furga A (2010) A variant of Desbuquois dysplasia characterized by advanced carpal bone age, short metacarpals, and elongated phalanges: report of seven cases. *Am J Med Genet A* 152A(4):875–885. doi:10.1002/ajmg.a.33347
82. Taylan F, Mäkitie O (2016) Abnormal Proteoglycan Synthesis Due to Gene Defects Causes Skeletal Diseases with Overlapping Phenotypes. *Horm Metab Res* 48(11):745–754. doi:10.1055/s-0042-118706
83. Taylan F, Costantini A, Coles N, Pekkinen M, Héon E, Şıklar Z, Berberoğlu M, Kämpe A, Kiykım E, Grigelioniene G, Tüysüz B, Mäkitie O (2016) Spondyloocular Syndrome: Novel Mutations in XYLT2 Gene and Expansion of the Phenotypic Spectrum. *J Bone Miner Res* 31(8):1577–1585. doi:10.1002/jbmr.2834
84. Taylan F, Yavaş Abalı Z, Jäntti N, Güneş N, Darendeliler F, Baş F, Poyrazoğlu Ş, Tamçelik N, Tüysüz B, Mäkitie O (2017) Two novel mutations in XYLT2 cause spondyloocular syndrome. *Am J Med Genet A* 173(12):3195–3200. doi:10.1002/ajmg.a.38470
85. Nakajima M, Mizumoto S, Miyake N et al (2013) Mutations in B3GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders. *Am J Hum Genet* 92(6):927–934. doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.003
86. Ritelli M, Dordoni C, Cinquina V, Venturini M, Calzavara-Pinton P, Colombi M (2017) Expanding the clinical and mutational spectrum of B4GALT7-spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 12(1):153. doi:10.1186/s13023-017-0704-3

87. Smith W, Ji HP, Mouradian W, Pagon RA (1999) Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity (SEMDJL): presentation in two unrelated patients in the United States. *Am J Med Genet* 86(3):245–252
88. Trejo P, Rauch F, Glorieux FH, Ouellet J, Benaroch T, Campeau PM (2017) Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Joint Laxity in Three Siblings with B3GALT6 Mutations. *Mol Syndromol* 8(6):303–307. doi:10.1159/000479672
89. Budde BS, Mizumoto S, Kogawa R, Becker C, Altmüller J, Thiele H, Rüschenhoff F, Toliat MR, Kaleschke G, Hämmerle JM, Höhne W, Sugahara K, Nürnberg P, Kennerknecht I (2015) Skeletal dysplasia in a consanguineous clan from the island of Nias/Indonesia is caused by a novel mutation in B3GAT3. *Hum Genet* 134(7):691–704. doi:10.1007/s00439-015-1549-2
90. Lodish H (2002) *Molecular cell biology*, 4. Aufl. Media connected. Freeman, New York, NY
91. Griffiths AJF (2000) *An introduction to genetic analysis*, 7. Aufl. Freeman, New York
92. Murken J (2011) *Taschenlehrbuch Humangenetik*. 96 Tabellen, 8. Aufl. Thieme, Stuttgart
93. Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835):366–374. doi:10.1038/35077232
94. Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422):709–715. doi:10.1038/362709a0
95. Mehta A, Haber JE (2014) Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(9). doi:10.1101/cshperspect.a016428
96. Jasin M, Rothstein R (2013) Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(11):a012740. doi:10.1101/cshperspect.a012740
97. Davis AJ, Chen DJ (2013) DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2(3):130–143. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02
98. Hardy S, Legagneux V, Audic Y, Paillard L (2010) Reverse genetics in eukaryotes. *Biol Cell* 102(10):561–580. doi:10.1042/BC20100038
99. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31(7):397–405. doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
100. Alkhnabashi OS, Shah SA, Garrett RA, Saunders SJ, Costa F, Backofen R (2016) Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics* 32(17):i576–i585. doi:10.1093/bioinformatics/btw454
101. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169(12):5429–5433

102. Karimi Z, Ahmadi A, Najafi A, Ranjbar R (2018) Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *Open Microbiol J* 12:59–70. doi:10.2174/1874285801812010059
103. Hille F, Charpentier E (2016) CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond , B, Biol Sci* 371(1707). doi:10.1098/rstb.2015.0496
104. Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M (2015) The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117:119–128. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.025
105. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819):1709–1712. doi:10.1126/science.1138140
106. Xiao Y, Ng S, Nam KH, Ke A (2017) How type II CRISPR-Cas establish immunity through Cas1-Cas2-mediated spacer integration. *Nature* 550(7674):137–141. doi:10.1038/nature24020
107. Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43(6):1565–1575
108. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, Engl)* 151(Pt 8):2551–2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0
109. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507(7490):62–67. doi:10.1038/nature13011
110. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading, Engl)* 155(Pt 3):733–740. doi:10.1099/mic.0.023960-0
111. S. Makarova K, Haft D, Barrangou R, J. J. Brouns S, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, J. M. Mojica F, I. Wolf Y, Yakunin AF, van der Oost J, V. Koonin E (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9(6):467–477. doi:10.1038/nrmicro2577
112. Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2013) crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol* 10(5):841–851. doi:10.4161/rna.24203
113. Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ (2018) Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application. *ACS Chem Biol* 13(2):357–365. doi:10.1021/acscchembio.7b00855
114. Golic KG (2013) RNA-Guided Nucleases: A New Era for Engineering the Genomes of Model and Nonmodel Organisms. *Genetics* 195(2):303–308. doi:10.1534/genetics.113.155093

115. Cubbon A, Ivancic-Bace I, Bolt EL (2018) CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability. *Biosci Rep* 38(5). doi:10.1042/BSR20180457
116. Wu X, Kriz AJ, Sharp PA (2014) Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol* 2(2):59–70. doi:10.1007/s40484-014-0030-x
117. Nishimasu H, Le Cong, Yan WX, Ran FA, Zetsche B, Li Y, Kurabayashi A, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2015) Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell* 162(5):1113–1126. doi:10.1016/j.cell.2015.08.007
118. Ding Y, Li H, Chen L-L, Xie K (2016) Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci* 7:703. doi:10.3389/fpls.2016.00703
119. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096):816–821. doi:10.1126/science.1225829
120. Zhang J-H, Adikaram P, Pandey M, Genis A, Simonds WF (2016) Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered* 7(3):166–174. doi:10.1080/21655979.2016.1189039
121. Boulikas T (1993) Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3(3):193–227
122. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8(11):2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
123. Campeau P, Chapdelaine P, Seigneurin-Venin S, Massie B, Tremblay JP (2001) Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther* 8(18):1387–1394. doi:10.1038/sj.gt.3301532
124. Lesueur LL, Mir LM, André FM (2016) Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Mol Ther Nucleic Acids* 5(3):e291-. doi:10.1038/mtna.2016.4
125. DeWitt MA, Corn JE, Carroll D (2017) Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods* 121-122:9–15. doi:10.1016/j.ymeth.2017.04.003
126. Farboud B, Jarvis E, Roth TL, Shin J, Corn JE, Marson A, Meyer BJ, Patel NH, Hochstrasser ML (2018) Enhanced Genome Editing with Cas9 Ribonucleoprotein in Diverse Cells and Organisms. *J Vis Exp* (135). doi:10.3791/57350
127. Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA (2014) Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res* 42(19):e147. doi:10.1093/nar/gku749
128. Minkenberg B, Wheatley M, Yang Y (2017) CRISPR/Cas9-Enabled Multiplex Genome Editing and Its Application. *Prog Mol Biol Transl Sci* 149:111–132. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.05.003
129. Haag AM (2016) Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Adv Exp Med Biol* 919:157–169. doi:10.1007/978-3-319-41448-5_7

130. Mallet CR, Mazzeo JR, Neue U (2001) Evaluation of several solid phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry on-line configurations for high-throughput analysis of acidic and basic drugs in rat plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15(13):1075–1083. doi:10.1002/rcm.346
131. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL (2003) *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*. *Clin Biochem Rev* 24(1):3–12
132. Ohno T, Sleighter RL, Hatcher PG (2016) Comparative study of organic matter chemical characterization using negative and positive mode electrospray ionization ultrahigh-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 408(10):2497–2504. doi:10.1007/s00216-016-9346-x
133. Fu Q, Chen Z, Zhang S, Parker SJ, Fu Z, Tin A, Liu X, van Eyk JE (2016) Multiple and Selective Reaction Monitoring Using Triple Quadrupole Mass Spectrometer: Preclinical Large Cohort Analysis. *Methods Mol Biol* 1410:249–264. doi:10.1007/978-1-4939-3524-6_15
134. Yang L, Amad M'a, Winnik WM, Schoen AE, Schweingruber H, Mylchreest I, Rudewicz PJ (2002) Investigation of an enhanced resolution triple quadrupole mass spectrometer for high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16(21):2060–2066. doi:10.1002/rcm.824
135. Gross JH (2013) *Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch*. Springer Spektrum, Berlin
136. Kuhn J, Gressner OA, Götting C, Gressner AM, Kleesiek K (2009) Increased serum xylosyltransferase activity in patients with liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 409(1-2):123–126. doi:10.1016/j.cca.2009.09.013
137. Casanova JC, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2008) Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II. *Biochem Biophys Res Commun* 365(4):678–684. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.206
138. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux A-F, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PEM (2016) HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37(6):564–569. doi:10.1002/humu.22981
139. Kuhn J, Prante C, Schön S, Götting C, Kleesiek K (2006) Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 52(12):2243–2249. doi:10.1373/clinchem.2006.071167
140. Pönighaus C, Ambrosius M, Casanova JC, Prante C, Kuhn J, Esko JD, Kleesiek K, Götting C (2007) Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 282(8):5201–5206. doi:10.1074/jbc.M611665200
141. Briggs DC, Hohenester E (2018) Structural Basis for the Initiation of Glycosaminoglycan Biosynthesis by Human Xylosyltransferase 1. *Structure* 26(6):801–809.e3. doi:10.1016/j.str.2018.03.014

142. Nizon M, Huber C, Leonardis F de, Merrina R, Forlino A, Fradin M, Tuysuz B, Abu-Libdeh BY, Alanay Y, Albrecht B, Al-Gazali L, Basaran SY, Clayton-Smith J, Désir J, Gill H, Grealley MT, Koparir E, van Maarle MC, MacKay S, Mortier G, Morton J, Sillence D, Vilain C, Young I, Zerres K, Le Merrer M, Munnich A, Le Goff C, Rossi A, Cormier-Daire V (2012) Further delineation of CANT1 phenotypic spectrum and demonstration of its role in proteoglycan synthesis. *Hum Mutat* 33(8):1261–1266. doi:10.1002/humu.22104
143. Faust I, Donhauser E, Fischer B, Ibold B, Kuhn J, Knabbe C, Hendig D (2017) Characterization of dermal myofibroblast differentiation in pseudoxanthoma elasticum. *Exp Cell Res* 360(2):153–162. doi:10.1016/j.yexcr.2017.09.001
144. Wrobel LK, Fray TR, Molloy JE, Adams JJ, Armitage MP, Sparrow JC (2002) Contractility of single human dermal myofibroblasts and fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 52(2):82–90. doi:10.1002/cm.10034
145. Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggar A, Duncan SR (2014) Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest* 124(11):4673–4677. doi:10.1172/JCI74368
146. Murtha LA, Schuliga MJ, Mabotuwana NS, Hardy SA, Waters DW, Burgess JK, Knight DA, Boyle AJ (2017) The Processes and Mechanisms of Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Front Physiol* 8. doi:10.3389/fphys.2017.00777
147. Rosenbloom J, Mendoza FA, Jimenez SA (2013) Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochim Biophys Acta* 1832(7):1088–1103. doi:10.1016/j.bbadis.2012.12.007
148. Zhang Y, Edgley AJ, Cox AJ, Powell AK, Wang B, Kompa AR, Stapleton DI, Zammit SC, Williams SJ, Krum H, Gilbert RE, Kelly DJ (2012) FT011, a new anti-fibrotic drug, attenuates fibrosis and chronic heart failure in experimental diabetic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 14(5):549–562. doi:10.1093/eurjhf/hfs011
149. Li X, Zhu L, Wang B, Yuan M, Zhu R (2017) Drugs and Targets in Fibrosis. *Front Pharmacol* 8. doi:10.3389/fphar.2017.00855
150. Iannitti RG, Napolioni V, Oikonomou V, Luca A de, Galosi C, Pariano M, Massi-Benedetti C, Borghi M, Puccetti M, Lucidi V, Colombo C, Fiscarelli E, Lass-Flörl C, Majo F, Cariani L, Russo M, Porcaro L, Ricciotti G, Ellemunter H, Ratclif L, Benedictis FM de, Talesa VN, Dinarello CA, van de Veerdonk FL, Romani L (2016) IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis. *Nat Commun* 7:10791. doi:10.1038/ncomms10791
151. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, Pellicoro A, Raschperger E, Betsholtz C, Ruminiski PG, Griggs DW, Prinsen MJ, Maher JJ, Iredale JP, Lacy-Hulbert A, Adams RH, Sheppard D (2013) Selective α v integrin depletion identifies a core, targetable molecular pathway that regulates fibrosis across solid organs. *Nat Med* 19(12). doi:10.1038/nm.3282
152. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA (2015) Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 53(5):585–600. doi:10.1165/rcmb.2015-0020TR

153. Meijer VE de, Sverdlov DY, Popov Y, Le HD, Meisel JA, Nosé V, Schuppan D, Puder M (2010) Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition curbs inflammation and liver injury but aggravates experimental liver fibrosis in mice. *PLoS ONE* 5(6):e11256. doi:10.1371/journal.pone.0011256
154. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35):13027–13032. doi:10.1073/pnas.0805038105
155. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M (2012) The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics* 44(4):237–244. doi:10.1152/physiolgenomics.00141.2011
156. Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, Feng S, Xie L, Lu C, Yuan Y, Zhang Y, Wang Y, Lu Y, Yang B (2012) MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation* 126(7):840–850. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.094524
157. Condac E, Dale GL, Bender-Neal D, Ferencz B, Towner R, Hinsdale ME (2009) Xylosyltransferase II is a significant contributor of circulating xylosyltransferase levels and platelets constitute an important source of xylosyltransferase in serum. *Glycobiology* 19(8):829–833. doi:10.1093/glycob/cwp058
158. Eames BF, Singer A, Smith GA, Wood ZA, Yan Y-L, He X, Polizzi SJ, Catchen JM, Rodriguez-Mari A, Linbo T, Raible DW, Postlethwait JH (2010) UDP xylose synthase 1 is required for morphogenesis and histogenesis of the craniofacial skeleton. *Dev Biol* 341(2):400–415. doi:10.1016/j.ydbio.2010.02.035
159. Burnstock G (2017) Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 8. doi:10.3389/fphar.2017.00661
160. Li S, Li J, Wang N, Hao G, Sun J (2018) Characterization of UDP-Activated Purinergic Receptor P2Y6 Involved in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Innate Immunity. *Int J Mol Sci* 19(7). doi:10.3390/ijms19072095
161. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276(1):121–144. doi:10.1111/imr.12528
162. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):673–694. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
163. Volmer JB, Thompson LF, Blackburn MR (2006) Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* 176(7):4449–4458

164. Quast C, Alter C, Ding Z, Borg N, Schrader J (2017) Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure. *Circ Heart Fail* 10(4). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003346
165. Cicko S, Grimm M, Ayata K, Beckert J, Meyer A, Hossfeld M, Zissel G, Idzko M, Müller T (2015) Uridine supplementation exerts anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in an animal model of pulmonary fibrosis. *Respir Res* 16:105. doi:10.1186/s12931-015-0264-9
166. Evaldsson C, Rydén I, Uppugunduri S (2007) Anti-inflammatory effects of exogenous uridine in an animal model of lung inflammation. *Int Immunopharmacol* 7(8):1025–1032. doi:10.1016/j.intimp.2007.03.008
167. Venhoff N, Lebrecht D, Deveaud C, Beauvoit B, Bonnet J, Müller K, Kirschner J, Venhoff AC, Walker UA (2010) Oral uridine supplementation antagonizes the peripheral neuropathy and encephalopathy induced by antiretroviral nucleoside analogues. *AIDS* 24(3):345–352. doi:10.1097/QAD.0b013e328335cdea
168. McComsey GA, Walker UA, Budhathoki CB, Su Z, Currier JS, Kosmiski L, Naini LG, Charles S, Medvik K, Aberg JA (2010) Uridine supplementation in the treatment of HIV lipotrophy: Results of ACTG 5229. *AIDS* 24(16):2507–2515. doi:10.1097/QAD.0b013e328335ea9bc
169. Fischer B, Ly T-D, Hendig D, Kuhn J, Pécheur E-I, Reungoat E, Knabbe C, Faust I (2019) First description of a compensatory xylosyltransferase I induction observed after an antifibrotic UDP-treatment of normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 512(1):7–13. doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.150
170. Casanova JC, Ambrosius M, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2009) Analysis of xylosyltransferase II binding to the anticoagulant heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 383(1):4–10. doi:10.1016/j.bbrc.2009.03.050
171. Götting C, Kuhn J, Tinneberg H-R, Brinkmann T, Kleesiek K (2002) High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol Hum Reprod* 8(12):1079–1086
172. Letourneur D, Caleb BL, Castellot JJ (1995) Heparin binding, internalization, and metabolism in vascular smooth muscle cells: I. Upregulation of heparin binding correlates with antiproliferative activity. *J Cell Physiol* 165(3):676–686. doi:10.1002/jcp.1041650327
173. Reilly CF, Fritze LM, Rosenberg RD (1986) Heparin inhibition of smooth muscle cell proliferation: a cellular site of action. *J Cell Physiol* 129(1):11–19. doi:10.1002/jcp.1041290103
174. Ferrao AV, Mason RM (1993) The effect of heparin on cell proliferation and type-I collagen synthesis by adult human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1180(3):225–230
175. Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM, Haralson MA (1992) Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am J Pathol* 140(1):45–55

176. Johnston EF, Gillis TE (2017) Transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) stimulates collagen synthesis in cultured rainbow trout cardiac fibroblasts. *J Exp Biol* 220(Pt 14):2645–2653. doi:10.1242/jeb.160093
177. Calamia V, Mateos J, Fernández-Puente P, Lourido L, Rocha B, Fernández-Costa C, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ (2014) A pharmacoproteomic study confirms the synergistic effect of chondroitin sulfate and glucosamine. *Sci Rep* 4:5069. doi:10.1038/srep05069
178. Venkatesan N, Barré L, Bourhim M, Magdalou J, Mainard D, Netter P, Fournel-Gigleux S, Ouzzine M (2012) Xylosyltransferase-I Regulates Glycosaminoglycan Synthesis during the Pathogenic Process of Human Osteoarthritis. *PLoS ONE* 7(3). doi:10.1371/journal.pone.0034020
179. Prabhakar V, Sasisekharan R (2006) The biosynthesis and catabolism of galactosaminoglycans. *Adv Pharmacol* 53:69–115. doi:10.1016/S1054-3589(05)53005-9
180. McGowan SE, Liu R, Harvey CS (1993) Effects of heparin and other glycosaminoglycans on elastin production by cultured neonatal rat lung fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 302(2):322–331
181. Hinek A, Mecham RP, Keeley F, Rabinovitch M (1991) Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *J Clin Invest* 88(6):2083–2094. doi:10.1172/JCI115538
182. Bahmani B, Amiri F, Mohammadi Roushandeh A, Bahadori M, Harati MD, Habibi Roudkenar M (2015) The Lcn2-engineered HEK-293 cells show senescence under stressful condition. *Iran J Basic Med Sci* 18(5):459–464
183. Fernández Larrosa PN, Ruíz Grecco M, Mengual Gómez D, Alvarado CV, Panelo LC, Rubio MF, Alonso DF, Gómez DE, Costas MA (2015) RAC3 more than a nuclear receptor coactivator: a key inhibitor of senescence that is downregulated in aging. *Cell Death Dis* 6(10):e1902-. doi:10.1038/cddis.2015.218
184. Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JHP, Richardson JB, Roberts S, Spector M (2016) Cellular senescence in aging and osteoarthritis: Implications for cartilage repair. *Acta Orthop* 87(Suppl 363):6–14. doi:10.1080/17453674.2016.1235087
185. Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(7):1927–1932. doi:10.1073/pnas.0306111101
186. Sahu S, Philip F, Scarlata S (2013) Hydrolysis Rates of Different Small Interfering RNAs (siRNAs) by the RNA Silencing Promoter Complex, C3PO, Determines Their Regulation by Phospholipase C β *. *J Biol Chem* 289(8):5134–5144. doi:10.1074/jbc.M113.531467
187. Bartlett DW, Davis ME (2006) Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34(1):322–333. doi:10.1093/nar/gkj439

188. Helmschrodt C, Höbel S, Schöniger S, Bauer A, Bonicelli J, Gringmuth M, Fietz SA, Aigner A, Richter A, Richter F (2017) Polyethylenimine Nanoparticle-Mediated siRNA Delivery to Reduce α -Synuclein Expression in a Model of Parkinson's Disease. *Mol Ther Nucleic Acids* 9:57–68. doi:10.1016/j.omtn.2017.08.013
189. Schuck S, Manninen A, Honsho M, Füllekrug J, Simons K (2004) Generation of single and double knockdowns in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):4912–4917. doi:10.1073/pnas.0401285101
190. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22(3):326–330. doi:10.1038/nbt936
191. Ladunga I (2006) More complete gene silencing by fewer siRNAs: transparent optimized design and biophysical signature. *Nucleic Acids Res* 35(2):433–440. doi:10.1093/nar/gkl1065
192. Eames BF, Yan Y-L, Swartz ME, Levic DS, Knapik EW, Postlethwait JH, Kimmel CB (2011) Mutations in *fam20b* and *xylt1* Reveal That Cartilage Matrix Controls Timing of Endochondral Ossification by Inhibiting Chondrocyte Maturation. *PLoS Genet* 7(8). doi:10.1371/journal.pgen.1002246
193. Calvet JP (1993) Polycystic kidney disease: primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int* 43(1):101–108
194. Paynter HE, Parnham A, Feest TG, Dudley CR (1997) Thoracic aortic dissection complicating autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 12(8):1711–1713
195. Carone FA, Makino H, Kanwar YS (1988) Basement membrane antigens in renal polycystic disease. *Am J Pathol* 130(3):466–471
196. Liu ZZ, Carone FA, Nakumara S, Kanwar YS (1992) Altered synthesis of proteoglycans by cyst-derived cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Am J Physiol* 263(4 Pt 2):F697-704. doi:10.1152/ajprenal.1992.263.4.F697
197. Zhang X-H, Tee LY, Wang X-G, Huang Q-S, Yang S-H (2015) Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids* 4:e264. doi:10.1038/mtna.2015.37
198. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31(9):827–832. doi:10.1038/nbt.2647
199. Højland Knudsen C, Ásgrímsdóttir ES, Rahimi K, Gill KP, Frandsen S, Hvolbøl Buchholdt S, Chen M, Kjems J, Febbraro F, Denham M (2018) A Modified Monomeric Red Fluorescent Protein Reporter for Assessing CRISPR Activity. *Front Cell Dev Biol* 6. doi:10.3389/fcell.2018.00054

200. Kornete M, Marone R, Jeker LT (2018) Highly Efficient and Versatile Plasmid-Based Gene Editing in Primary T Cells. *J Immunol* 200(7):2489–2501. doi:10.4049/jimmunol.1701121
201. Fischer B (2015) Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode zum Nachweis von organischen Pyrophosphaten und Generierung stabiler ABCC6-knockout-HEK293-Zellen (Masterarbeit)
202. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B (2013) Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 140(24):4982–4987. doi:10.1242/dev.099085
203. Yu Q-h, Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, Yang T, Xu J, Guo C, Yan P, Wang Q, Asmutola P (2017) CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. *Sci Rep* 7. doi:10.1038/s41598-017-12262-1
204. Pogson M, Parola C, Kelton WJ, Heuberger P, Reddy ST (2016) Immunogenomic engineering of a plug-and-(dis)play hybridoma platform. *Nat Commun* 7. doi:10.1038/ncomms12535
205. Adikusuma F, Pfitzner C, Thomas PQ (2017) Versatile single-step-assembly CRISPR/Cas9 vectors for dual gRNA expression. *PLoS ONE* 12(12). doi:10.1371/journal.pone.0187236
206. Fordjour F, Owiredu S, Muendlein H, Plange J, Morrell J, Han J, Gould S (2016) Creation of CD63-deficient HEK293 cell lines using a polycistronic CAS9/EGFP/HSVtk/PuroR expression vector. *Matters (Zür.)*. doi:10.19185/matters.201604000004
207. Lin Y-C, Boone M, Meuris L, Lemmens I, van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, van de Peer Y, Tavernier J, Callewaert N (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5:4767. doi:10.1038/ncomms5767
208. Kim YW, Kim A (2017) Deletion of transcription factor binding motifs using the CRISPR/spCas9 system in the β -globin LCR. *Biosci Rep* 37(4). doi:10.1042/BSR20170976
209. Cai Y, Chen L, Sun S, Wu C, Yao W, Jiang B, Han T, Hou W (2018) CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of Large Genomic Fragments in Soybean. *Int J Mol Sci* 19(12). doi:10.3390/ijms19123835
210. Au V, Li-Leger E, Raymant G, Flibotte S, Chen G, Martin K, Fernando L, Doell C, Rosell FI, Wang S, Edgley ML, Rougvie AE, Hutter H, Moerman DG (2018) CRISPR/Cas9 Methodology for the Generation of Knockout Deletions in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* 9(1):135–144. doi:10.1534/g3.118.200778
211. Xiao A, Zhang B (2016) Generation of Targeted Genomic Deletions Through CRISPR/Cas System in Zebrafish. *Methods Mol Biol* 1451:65–79. doi:10.1007/978-1-4939-3771-4_5

212. Shin HY, Wang C, Lee HK, Yoo KH, Zeng X, Kuhns T, Yang CM, Mohr T, Liu C, Hennighausen L (2017) CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nat Commun* 8. doi:10.1038/ncomms15464
213. Weilke C, Brinkmann T, Kleesiek K (1997) Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin Chem* 43(1):45–51
214. Brinkmann T, Weilke C, Kleesiek K (1997) Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem* 272(17):11171–11175
215. Jager NGL, Rosing H, Linn SC, Schellens JHM, Beijnen JH (2012) Importance of highly selective LC-MS/MS analysis for the accurate quantification of tamoxifen and its metabolites: focus on endoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 133(2):793–798. doi:10.1007/s10549-012-2000-1
216. Bowen CL, Licea-Perez H (2013) Development of a sensitive and selective LC-MS/MS method for the determination of urea in human epithelial lining fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 917-918:24–29. doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.035
217. Suzuki T, Tsukahara M, Akasaka Y, Inoue H (2017) A highly sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of glycyrrhizin and its active metabolite glycyrrhetic acid: Application to a human pharmacokinetic study after oral administration. *Biomed Chromatogr* 31(12). doi:10.1002/bmc.4032
218. Zhang Y, Shen L, Zhan Y, Xiao Q-Q, Yang J (2015) Development and Validation of a Sensitive LC–MS-MS Method for the Determination of Adefovir in Human Serum and Urine: Application to a Clinical Pharmacokinetic Study. *J Chromatogr Sci* 54(4):507–515. doi:10.1093/chromsci/bmv172
219. Homer NZM, Reynolds RM, Mattsson C, Bailey MA, Walker BR, Andrew R (2008) Quantitative analysis of RU38486 (mifepristone) by hplc triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(0):497–501. doi:10.1016/j.jchromb.2008.12.051
220. Rower JE, Bushman LR, Hammond KP, Kadam RS, Aquilante CL (2010) Validation of a LC/MS method for the determination of gemfibrozil in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 24(12):1300–1308. doi:10.1002/bmc.1440
221. Vogeser M, Kirchhoff F (2011) Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine. *Clin Biochem* 44(1):4–13. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.005
222. Casati S, Ravelli A, Angeli I, Durello R, Minoli M, Orioli M (2019) An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *J Chromatogr A* 1589:1–9. doi:10.1016/j.chroma.2018.12.048
223. Nguyen LT, Chau JK, Perry NA, Boer L de, Zaat SAJ, Vogel HJ (2010) Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS ONE* 5(9). doi:10.1371/journal.pone.0012684

224. Kuhn J, Götting C, Beahm BJ, Bertozzi CR, Faust I, Kuzaj P, Knabbe C, Hendig D (2015) Xylosyltransferase II is the predominant isoenzyme which is responsible for the steady-state level of xylosyltransferase activity in human serum. *Biochem Biophys Res Commun* 459(3):469–474. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.129
225. Grinias KM, Godinho JM, Franklin EG, Stobaugh JT, Jorgenson JW (2016) Development of a 45 kpsi Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography Instrument for Gradient Separations of Peptides Using Long Microcapillary Columns and Sub-2 μm Particles. *J Chromatogr A* 1469:60–67. doi:10.1016/j.chroma.2016.09.053
226. Huang H, Liu M, Chen P (2014) recent advances in ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of traditional chinese medicine. *Anal Lett* 47(11):1835–1851. doi:10.1080/00032719.2014.888727
227. Esko JD, Stewart TE, Taylor WH (1985) Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(10):3197–3201
228. Wen D, Foley SF, Hronowski XL, Gu S, Meier W (2013) Discovery and investigation of O-xylosylation in engineered proteins containing a (GGGGS) n linker. *Anal Chem* 85(9):4805–4812. doi:10.1021/ac400596g
229. Campbell P, Jacobsson I, Benzing-Purdie L, Rodén L, Fessler JH (1984) Silk--a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Anal Biochem* 137(2):505–516
230. Qi Y, Wang H, Wei K, Yang Y, Zheng R-Y, Kim IS, Zhang K-Q (2017) A Review of Structure Construction of Silk Fibroin Biomaterials from Single Structures to Multi-Level Structures. *Int J Mol Sci* 18(3). doi:10.3390/ijms18030237
231. Lefèvre T, Rousseau M-E, Pézolet M (2007) Protein Secondary Structure and Orientation in Silk as Revealed by Raman Spectromicroscopy. *Biophys J* 92(8):2885–2895. doi:10.1529/biophysj.106.100339
232. Schön S, Huet G, Prante C, Müller S, Christ R, Hagen F-W, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2006) Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 14(5):442–448. doi:10.1016/j.joca.2005.11.004
233. Kleesiek K, Reinards R, Okusi J, Wolf B, Greiling H (1987) UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase: a new marker of cartilage destruction in chronic joint diseases. *J Clin Chem Clin Biochem* 25(8):473–481
234. LEE Y-W (2013) Comparison between ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and a chemiluminescence immunoassay in the determination of cyclosporin A and tacrolimus levels in whole blood. *Exp Ther Med* 6(6):1535–1539. doi:10.3892/etm.2013.1325
235. Crawford BAL, Kam C, Donaghy AJ, McCaughan GW (2003) The heterogeneity of bone disease in cirrhosis: a multivariate analysis. *Osteoporos Int* 14(12):987–994. doi:10.1007/s00198-003-1495-z

236. Sanoudou D, Beggs AH (2001) Clinical and genetic heterogeneity in nemaline myopathy--a disease of skeletal muscle thin filaments. *Trends Mol Med* 7(8):362–368
237. Bardai G, Lemyre E, Moffatt P, Palomo T, Glorieux FH, Tung J, Ward L, Rauch F (2016) Osteogenesis Imperfecta Type I Caused by COL1A1 Deletions. *Calcif Tissue Int* 98(1):76–84. doi:10.1007/s00223-015-0066-6
238. Deyle DR, Khan IF, Ren G, Wang P-R, Kho J, Schwarze U, Russell DW (2011) Normal Collagen and Bone Production by Gene-targeted Human Osteogenesis Imperfecta iPSCs. *Mol Ther* 20(1):204–213. doi:10.1038/mt.2011.209
239. Hsueh M-F, Önerfjord P, Kraus VB (2014) Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. *Matrix Biol* 39:56–66. doi:10.1016/j.matbio.2014.08.012
240. Vertel BM (1995) The ins and outs of aggrecan. *Trends Cell Biol* 5(12):458–464
241. van den Berg WB (2011) Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthr Cartil* 19(4):338–341. doi:10.1016/j.joca.2011.01.022
242. McCoy SY, Falgowski KA, Srinivasan PP, Thompson WR, Selva EM, Kirn-Safran CB (2011) Serum Xylosyltransferase 1 Level Increases during Early Posttraumatic Osteoarthritis in Mice with High Bone Forming Potential. *Bone* 51(2):224–231. doi:10.1016/j.bone.2011.11.012
243. Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasuwan P, Sricholpech M, Boskey AL, Yamauchi M (2008) Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biol* 28(1):44–52. doi:10.1016/j.matbio.2008.11.003
244. Guo L, Elcioglu NH, Iida A, Demirkol YK, Aras S, Matsumoto N, Nishimura G, Miyake N, Ikegawa S (2017) Novel and recurrent XYLT1 mutations in two Turkish families with Desbuquois dysplasia, type 2. *J Hum Genet* 62(3):447–451. doi:10.1038/jhgp.2016.143
245. Mis EK, Liem KF, Kong Y, Schwartz NB, Domowicz M, Weatherbee SD (2014) Forward genetics defines Xylt1 as a key, conserved regulator of early chondrocyte maturation and skeletal length. *Dev Biol* 385(1):67–82. doi:10.1016/j.ydbio.2013.10.014
246. Prante C, Milting H, Kassner A, Farr M, Ambrosius M, Schön S, Seidler DG, Banayasy AE, Körfer R, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C (2007) Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling. *J Biol Chem* 282(36):26441–26449. doi:10.1074/jbc.M702299200
247. Riedel L, Fischer B, Ly T-D, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C, Faust I (2018) microRNA-29b mediates fibrotic induction of human xylosyltransferase-I in human dermal fibroblasts via the Sp1 pathway. *Sci Rep* 8. doi:10.1038/s41598-018-36217-2
248. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P (2002) Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev* 16(24):3277–3289. doi:10.1101/gad.1023602
249. Huard JM, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, Ross ME (1999) Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development* 126(9):1927–1935

250. Wang J, Wang Q, Cui Y, Liu ZY, Zhao W, Wang CL, Dong Y, Hou L, Hu G, Luo C, Chen J, Lu Y (2012) Knockdown of cyclin D1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and attenuates the invasive capacity of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 106(3):473–484. doi:10.1007/s11060-011-0692-4
251. Abrams J, Einhorn Z, Seiler C, Zong AB, Sweeney HL, Pack M (2016) Graded effects of unregulated smooth muscle myosin on intestinal architecture, intestinal motility and vascular function in zebrafish. *Dis Model Mech* 9(5):529–540. doi:10.1242/dmm.023309
252. Alhopuro P, Karhu A, Winqvist R, Waltering K, Visakorpi T, Aaltonen LA (2008) Somatic mutation analysis of MYH11 in breast and prostate cancer. *BMC Cancer* 8:263. doi:10.1186/1471-2407-8-263
253. Wu D, Shen YH, Russell L, Coselli JS, LeMaire SA (2013) Molecular Mechanisms of Thoracic Aortic Dissection. *J Surg Res* 184(2):907–924. doi:10.1016/j.jss.2013.06.007
254. Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD (2008) Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation* 117(2):242–252. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.690982
255. Suh JH, Yoon J-S, Kim HW, Jo KH (2011) Adventitial Fibroblast Abnormality in Thoracic Aortic Aneurysms and Aortic Dissections. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 44(6):406–412. doi:10.5090/kjtcs.2011.44.6.406
256. Mar PK, Roy P, Yin HL, Cavanagh HD, Jester JV (2001) Stress fiber formation is required for matrix reorganization in a corneal myofibroblast cell line. *Exp Eye Res* 72(4):455–466. doi:10.1006/exer.2000.0967
257. Disabella E, Grasso M, Gambarin FI, Narula N, Dore R, Favalli V, Serio A, Antoniazzi E, Mosconi M, Pasotti M, Odero A, Arbustini E (2011) Risk of dissection in thoracic aneurysms associated with mutations of smooth muscle alpha-actin 2 (ACTA2). *Heart* 97(4):321–326. doi:10.1136/hrt.2010.204388
258. Guo D-C, Pannu H, van Tran-Fadulu, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, Ahn C, Buja LM, Raman CS, Shete SS, Milewicz DM (2007) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet* 39(12):1488–1493. doi:10.1038/ng.2007.6
259. Hoffjan S, Waldmüller S, Blankenfeldt W, Kötting J, Gehle P, Binner P, Epplen JT, Scheffold T (2011) Three novel mutations in the ACTA2 gene in German patients with thoracic aortic aneurysms and dissections. *Eur J Hum Genet* 19(5):520–524. doi:10.1038/ejhg.2010.239
260. Morisaki H, Akutsu K, Ogino H, Kondo N, Yamanaka I, Tsutsumi Y, Yoshimuta T, Okajima T, Matsuda H, Minatoya K, Sasaki H, Tanaka H, Ishibashi-Ueda H, Morisaki T (2009) Mutation of ACTA2 gene as an important cause of familial and nonfamilial nonsyndromic thoracic aortic aneurysm and/or dissection (TAAD). *Hum Mutat* 30(10):1406–1411. doi:10.1002/humu.21081

261. Renard M, Callewaert B, Baetens M, Campens L, MacDermot K, Fryns J-P, Bonduelle M, Dietz HC, Gaspar IM, Cavaco D, Stattin E-L, Schrandt-Stumpel C, Coucke P, Loeys B, Paepe A de, Backer J de (2013) Novel MYH11 and ACTA2 mutations reveal a role for enhanced TGF β signaling in FTAAD. *Int J Cardiol* 165(2):314–321. doi:10.1016/j.ijcard.2011.08.079
262. Meester JAN, Vandeweyer G, Pintelon I, Lammens M, van Hoorick L, Belder S de, Waitzman K, Young L, Markham LW, Vogt J, Richer J, Beauchesne LM, Unger S, Superti-Furga A, Prsa M, Dhillon R, Reyniers E, Dietz HC, Wuyts W, Mortier G, Verstraeten A, van Laer L, Loeys BL (2017) Loss-of-function mutations in the X-linked biglycan gene cause a severe syndromic form of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Genet Med* 19(4):386–395. doi:10.1038/gim.2016.126
263. Pannu H, van Tran-Fadulu, Papke CL, Scherer S, Liu Y, Presley C, Guo D, Estrera AL, Safi HJ, Brasier AR, Vick GW, Marian AJ, Raman CS, Buja LM, Milewicz DM (2007) MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II. *Hum Mol Genet* 16(20):2453–2462. doi:10.1093/hmg/ddm201
264. Wang L, Qin W, Zhou Y, Chen B, Zhao X, Zhao H, Mi E, Mi E, Wang Q, Ning J (2017) Transforming growth factor β plays an important role in enhancing wound healing by topical application of Povidone-iodine. *Sci Rep* 7(1):991. doi:10.1038/s41598-017-01116-5
265. Chen G, Deng C, Li Y-P (2012) TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8(2):272–288. doi:10.7150/ijbs.2929
266. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, Hajdu S, Aharinejad S (2011) Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing☆. *Injury* 42(8):833–837. doi:10.1016/j.injury.2011.03.055
267. Le Goff C, Cormier-Daire V (2015) Chondrodysplasias and TGF β signaling. *Bonekey Rep* 4. doi:10.1038/bonekey.2015.9
268. Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen X-D, Young MF (2005) Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 280(34):30481–30489. doi:10.1074/jbc.M500573200
269. Bagalad BS, Mohan Kumar KP, Puneeth HK (2017) Myofibroblasts: Master of disguise. *J Oral Maxillofac Pathol* 21(3):462–463. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_146_15
270. Baum J, Duffy HS (2011) Fibroblasts and Myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol* 57(4):376–379. doi:10.1097/FJC.0b013e3182116e39
271. Li B, Wang JH-C (2009) Fibroblasts and Myofibroblasts in Wound Healing: Force Generation and Measurement. *J Tissue Viability* 20(4):108–120. doi:10.1016/j.jtv.2009.11.004
272. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G (2007) The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol* 170(6):1807–1816. doi:10.2353/ajpath.2007.070112

273. Rockey DC, Weymouth N, Shi Z (2013) Smooth Muscle α Actin (Acta2) and Myofibroblast Function during Hepatic Wound Healing. *PLoS ONE* 8(10). doi:10.1371/journal.pone.0077166
274. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 15(11):1139–1153. doi:10.15252/embr.201439245
275. Jun J-I, Lau LF (2016) CCN2 induces cellular senescence in fibroblasts. *J Cell Commun Signal* 11(1):15–23. doi:10.1007/s12079-016-0359-1
276. Meyer K, Hodwin B, Ramanujam D, Engelhardt S, Sarikas A (2016) Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *J Am Coll Cardiol* 67(17):2018–2028. doi:10.1016/j.jacc.2016.02.047
277. Gordon CM, Gordon LB, Snyder BD, Nazarian A, Quinn N, Huh S, Giobbie-Hurder A, Neuberg D, Cleveland R, Kleinman M, Miller DT, Kieran MW (2011) Hutchinson-Gilford progeria is a skeletal dysplasia. *J Bone Miner Res* 26(7):1670–1679. doi:10.1002/jbmr.392
278. Vidak S, Foisner R (2016) Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochem Cell Biol* 145(4):401–417. doi:10.1007/s00418-016-1411-1
279. Csoka AB, English SB, Simkevich CP, Ginzinger DG, Butte AJ, Schatten GP, Rothman FG, Sedivy JM (2004) Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell* 3(4):235–243. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00105.x
280. Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P (2016) Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: a premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev* 33:18–29. doi:10.1016/j.arr.2016.06.007
281. Hernandez L, Roux KJ, Wong ESM, Mounkes LC, Mutalif R, Navasankari R, Rai B, Cool S, Jeong J-W, Wang H, Lee H-S, Kozlov S, Grunert M, Keeble T, Jones CM, Meta MD, Young SG, Daar IO, Burke B, Perantoni AO, Stewart CL (2010) Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Dev Cell* 19(3):413–425. doi:10.1016/j.devcel.2010.08.013
282. Jürgensmeier JM, Schmitt CP, Viesel E, Höfler P, Bauer G (1994) Transforming growth factor beta-treated normal fibroblasts eliminate transformed fibroblasts by induction of apoptosis. *Cancer Res* 54(2):393–398
283. Waters DW, Blokland KEC, Pathinayake PS, Burgess JK, Mutsaers SE, Prele CM, Schuliga M, Grainge CL, Knight DA (2018) Fibroblast senescence in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 315(2):L162-L172. doi:10.1152/ajplung.00037.2018
284. Gresch O, Altrogge L (2012) Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells. *Methods Mol Biol* 801:65–74. doi:10.1007/978-1-61779-352-3_5

285. Ahmedat AS, Warnken M, Seemann WK, Mohr K, Kostenis E, Juergens UR, Racké K (2012) Pro-fibrotic processes in human lung fibroblasts are driven by an autocrine/paracrine endothelinergic system. *Br J Pharmacol* 168(2):471–487. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02190.x
286. Huang SK, Scruggs AM, McEachin RC, White ES, Peters-Golden M (2014) Lung Fibroblasts from Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis Exhibit Genome-Wide Differences in DNA Methylation Compared to Fibroblasts from Nonfibrotic Lung. *PLoS ONE* 9(9). doi:10.1371/journal.pone.0107055
287. Kendall RT, Feghali-Bostwick CA (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol* 5. doi:10.3389/fphar.2014.00123
288. Raghu G, Chen YY, Rusch V, Rabinovitch PS (1988) Differential proliferation of fibroblasts cultured from normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 138(3):703–708. doi:10.1164/ajrccm/138.3.703
289. Potter H, Heller R (2003) Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol* CHAPTER:Unit-9.3. doi:10.1002/0471142727.mb0903s62
290. Ribeiro S, Mairhofer J, Madeira C, Diogo MM, Lobato da Silva C, Monteiro G, Grabherr R, Cabral JM (2012) Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells. *Cell Reprogram* 14(2):130–137. doi:10.1089/cell.2011.0093
291. Aida T, Chiyo K, Usami T, Ishikubo H, Imahashi R, Wada Y, Tanaka KF, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka K (2015) Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. *Genome Biol* 16(1). doi:10.1186/s13059-015-0653-x
292. Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, Nozawa K, Matsumura T, Isotani A, Ikawa M (2016) CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep31666
293. Guschin DY, Waite AJ, Katibah GE, Miller JC, Holmes MC, Rebar EJ (2010) A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol* 649:247–256. doi:10.1007/978-1-60761-753-2_15
294. Iijima O, Fukano H, Takahashi H, Shirai M, Suzuki Y (2006) A purine at +2 rather than +1 adjacent to the human U6 promoter is required to prepare effective short hairpin RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 350(4):809–817. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.187
295. Ranganathan V, Wahlin K, Maruotti J, Zack DJ (2014) Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide-RNAs. *Nat Commun* 5:4516. doi:10.1038/ncomms5516
296. Hamm A, Krott N, Breibach I, Blindt R, Bosserhoff AK (2002) Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng* 8(2):235–245. doi:10.1089/107632702753725003
297. Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC, Price PJ (2001) Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods* 112(2):95–99

298. Salimzadeh L, Jaberipour M, Hosseini A, Ghaderi A (2013) Non-Viral Transfection Methods Optimized for Gene Delivery to a Lung Cancer Cell Line. *Avicenna J Med Biotechnol* 5(2):68–77
299. Evrard A, Bargmann BOR, Birnbaum KD, Tester M, Baumann U, Johnson AAT (2012) Fluorescence-Activated Cell Sorting for Analysis of Cell Type-Specific Responses to Salinity Stress in Arabidopsis and Rice. *Methods Mol Biol* 913:265–276. doi:10.1007/978-1-61779-986-0_18
300. Binek A, Rojo D, Godzien J, Rupérez FJ, Nuñez V, Jorge I, Ricote M, Vázquez J, Barbas C (2019) Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome. *J Proteome Res* 18(1):169–181. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00472
301. Kaur G, Dufour JM (2012) Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis* 2(1):1–5. doi:10.4161/spmg.19885
302. Hultquist JF, Hiatt J, Schumann K, McGregor MJ, Roth TL, Haas P, Doudna JA, Marson A, Krogan NJ (2019) CRISPR-Cas9 genome engineering of primary CD4+ T cells for the interrogation of HIV-host factor interactions. *Nat Protoc* 14(1):1–27. doi:10.1038/s41596-018-0069-7
303. Oh H-Y, Jin X, Kim J-G, Oh M-J, Pian X, Kim J-M, Yoon M-S, Son C-I, Lee YS, Hong K-C, Kim H, Choi Y-J, Whang KY (2007) Characteristics of primary and immortalized fibroblast cells derived from the miniature and domestic pigs. *BMC Cell Biol* 8:20. doi:10.1186/1471-2121-8-20
304. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1):59–74. doi:10.1099/0022-1317-36-1-59
305. Jochemsen H, Hertoghs JJ, Lupker JH, Davis A, van der Eb AJ (1981) In vitro synthesis of adenovirus type 5 T antigens. II. Translation of virus-specific RNA from cells transformed by fragments of adenovirus type 5 DNA. *J Virol* 37(1):530–534
306. Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE (2001) Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 15(23):3104–3117. doi:10.1101/gad.926401
307. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16(8):869–871. doi:10.1096/fj.01-0995fje
308. Ehrke-Schulz E, Bergmann T, Schiwon M, Doerner J, Saydaminova K, Lieber A, Ehrhardt A (2016) Quantification of designer nuclease induced mutation rates: a direct comparison of different methods. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3:16047-. doi:10.1038/mtm.2016.47
309. Vouillot L, Thélie A, Pollet N (2015) Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. *G3 (Bethesda)* 5(3):407–415. doi:10.1534/g3.114.015834

310. KC R, Srivastava A, Wilkowski JM, Richter CE, Shavit JA, Burke DT, Bielas SL (2016) Detection of nucleotide-specific CRISPR/Cas9 modified alleles using multiplex ligation detection. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep32048
311. Dabrowska M, Czubak K, Juzwa W, Krzyzosiak WJ, Olejniczak M, Kozlowski P (2018) qEva-CRISPR: a method for quantitative evaluation of CRISPR/Cas-mediated genome editing in target and off-target sites. *Nucleic Acids Res* 46(17):e101. doi:10.1093/nar/gky505
312. Hollywood JA, Lee CM, Scallan MF, Harrison PT (2016) Analysis of gene repair tracts from Cas9/gRNA double-stranded breaks in the human CFTR gene. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep32230
313. Thurtle-Schmidt DM, Lo T-W (2018) Molecular biology at the cutting edge: A review on CRISPR/CAS9 gene editing for undergraduates. *Biochem Mol Biol Educ* 46(2):195–205. doi:10.1002/bmb.21108
314. Al-Jezawi NK, Ali BR, Al-Gazali L (2017) Endoplasmic reticulum retention of xylosyltransferase 1 (XYLT1) mutants underlying Desbuquois dysplasia type II. *Am J Med Genet A* 173(7):1773–1781. doi:10.1002/ajmg.a.38244
315. Brogna S, Wen J (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16(2):107–113. doi:10.1038/nsmb.1550
316. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier DYR (2015) Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524(7564):230–233. doi:10.1038/nature14580
317. Patrinostrò X, O'Rourke AR, Chamberlain CM, Moriarity BS, Perrin BJ, Ervasti JM (2017) Relative importance of β cyto- and γ cyto-actin in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 28(6):771–782. doi:10.1091/mbc.E16-07-0503
318. Narasimhan VM, Hunt KA, Mason D et al (2016) Health and population effects of rare gene knockouts in adult humans with related parents. *Science* 352(6284):474–477. doi:10.1126/science.aac8624
319. Raj A, van Oudenaarden A (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135(2):216–226. doi:10.1016/j.cell.2008.09.050
320. El-Brolosy MA, Stainier DYR (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 13(7). doi:10.1371/journal.pgen.1006780
321. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25(4):402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
322. Reineke J (Hrsg) (2012) Nanotoxicity. Methods and protocols. Springer protocols, Bd 926. Humana Press, New York
323. Gary RK, Kindell SM (2005) Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal Biochem* 343(2):329–334. doi:10.1016/j.ab.2005.06.003

324. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9363–9367

9. Publikationen und Präsentationen

Publikationen in *peer-review* Zeitschriften

1. **Fischer B**, Ly T-D, Hendig D, Kuhn J, Pécheur E-I, Reungoat E, Knabbe C, Faust I (2019). First description of a compensatory xylosyltransferase I induction observed after an antifibrotic UDP-treatment of normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 512(1):7–13. doi:10.1016/j.bbrc.2019.02.150
2. Riedel L, **Fischer B**, Ly T-D, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C, Faust I (2018). microRNA-29b mediates fibrotic induction of human xylosyltransferase-I in human dermal fibroblasts via the Sp1 pathway. *Sci Rep* 8. doi:10.1038/s41598-018-36217-2
3. Faust I, Donhauser E, **Fischer B**, Ibold B, Kuhn J, Knabbe C, Hendig D (2017). Characterization of dermal myofibroblast differentiation in pseudoxanthoma elasticum. *Exp Cell Res* 360(2):153–162. doi:10.1016/j.yexcr.2017.09.001
4. **Fischer B**, Ly T-D, Hendig D, Kuhn J, Cobben J-M, Knabbe C, Faust I. Fibroblasts originated from a patient suffering from *XYLT1*-related skeletal dysplasia show abnormal myofibroblast-characteristics (Manuskript in Vorbereitung).

Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. **Fischer B**, Faust I, Donhauser E, Kuhn J, Knabbe C, Hendig D (2016). A comparison of the differentiation of normal human dermal fibroblasts and PXE fibroblasts into myofibroblasts.
13. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland.
Clin. Chem. Lab. Med. 54 (10): eA438, OCT 2016.
2. **Fischer B**, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C, Faust I (2017). Inhibition of xylosyltransferases by nucleotides and xylosides.
Gordon Research Seminar/Conference „Tissue Repair & Regeneration“, New London, NH, USA.
3. **Fischer B**, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C, Faust I (2017). Xyloside- and nucleotide treatment of normal human dermal fibroblasts leads to decreased mRNA expression levels of extracellular matrix components.
14. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Oldenburg, Deutschland.
Clin. Chem. Lab. Med. 54 (10): eA138, NOV 2017.
4. **Fischer B**, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C, Faust I (2017). Treatment with 4-Methylumbelliferyl- β -D-xyloside and uridine diphosphate leads to an increased intracellular XT-activity in normal human dermal fibroblasts.
33rd Ernst Klenk symposium in molecular medicine, Cologne, Deutschland.

5. **Fischer B**, Ly T-D, Cobben J-M, Hendig D, Kuhn J, Knabbe C and Faust I (2018). Compound heterozygous *XYLT1* deletions in dermal fibroblasts of a patient with short limb skeletal dysplasia leads to abnormal myofibroblast characteristics.
15. Jahrestagung, Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim, Deutschland.
6. **Fischer B** (2017). Using the CRISPR/Cas system in human embryonic kidney (HEK) cells to target the *XYLT1*-gene.
Research Day 2017, Bochum.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 20.10.1986
 Geburtsort: Bielefeld
 Nationalität: Deutsch

Aktuelle Tätigkeit

2016 – heute **Wissenschaftlicher Mitarbeiter/Doktorand** am Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin.

Studium

2013 – 2016 **Masterstudiengang "genome based systems biology"** an der Universität Bielefeld mit dem Abschluss *Master of Science*.

Titel der Masterarbeit: „Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode zum Nachweis von organischen Pyrophosphaten und Generierung stabiler *ABCC6-knockout*-HEK293-Zellen.“

2009 – 2013 **Bachelorstudiengang "molekulare Biotechnologie"** an der Universität Bielefeld mit dem Abschluss *Bachelor of Science*.

Titel der Bachelorarbeit: „Promotoraustausch zum Stressabbau in Wirtszellen und zur Verbesserung der Expressionsrate eines rekombinanten Gens“.

2008 – 2009 **Bachelorstudiengang "Bioinformatik und Genomforschung"** an der Universität Bielefeld.

Wehrdienstleistung

2007 – 2008 **Panzergrenadierbataillon Augustdorf**, Obergefreiter.

Schulbildung

1997 – 2007 **Niklas-Luhmann-Gymnasium** Oerlinghausen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

11. Anhang

11.1 Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)

Created with SnapGene®

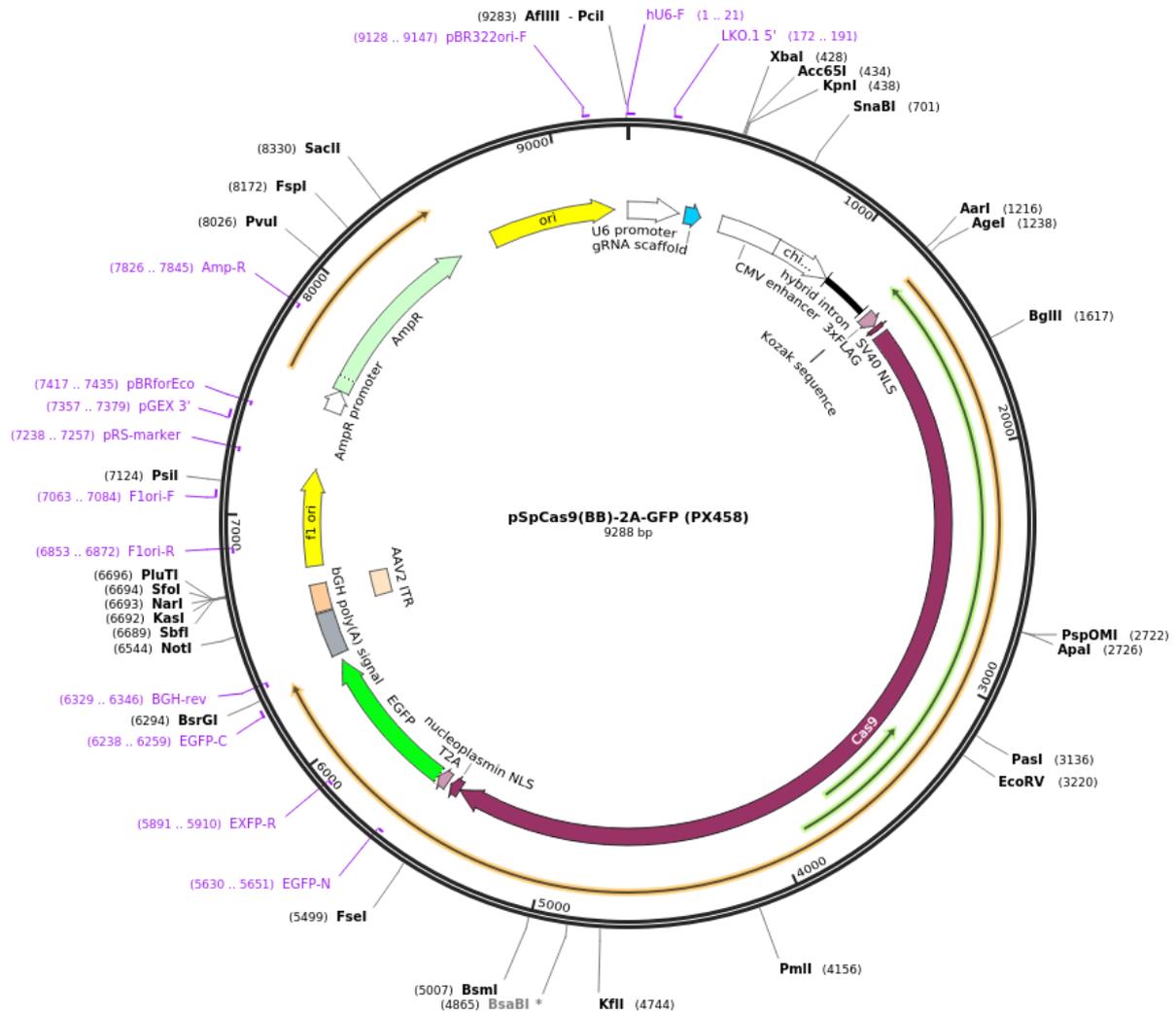


Abbildung 11.1: Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), Addgene.

11.2 Synthetische Akzeptorpeptide

Tabelle 11.1: Für die Entwicklung des MS XT-I Aktivitätstests untersuchte synthetische Akzeptorpeptide.

Trivialname Peptid	AS-Sequenz (N→C)	Masse [kDa]	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]	Übergang [m/z] (Vorläufer-Ion → Produkt-Ion)	Übergang [m/z] (Xylosyliert → Unxylosyliert)	Peptid-Xyl [arbitrary unit]		Retentionszeit [min]
							XT-I	XT-II	
-1N	Bio- EEEGSGGQKK-FAM	1688,8	2	54	844,9 → 227,0	911,1 → 844,9	21621	28085	1,63
K1	Bio-QEEEGSGGQKK-FAM	1816,9	2	66	908,9 → 227,0	975,1 → 908,9	20201	34717	1,63
K3	Bio- EEEGSGGQ K-FAM	1811,4	2	59	603,8 → 84,1	670 → 603,8	19879	34345	1,63
KE-74301	Bio-QEEEGSGGQGGK-FAM	1842,4	6	58	922,1 → 244,1	988,3 → 922,1	21420	21012	1,63
KE-74302	Bio-QEEEGSGVGGGK-FAM	1844,9	16	78	923,1 → 287,0	989,3 → 923,1	22210	28772	1,63
KE-74303	Bio-QESSGSGGQGGK-FAM	1718,8	12	34	860,1 → 355,1	926,3 → 860,1	27819	12778	1,63
KE-75524	Bio-QEPEGSGGQGGK-FAM	1770,8	8	64	886,4 → 227,1	952,6 → 886,4	16345	32232	1,63
KE-75527	Bio-QESEGSGGQGGK-FAM	1760,8	18	60	881,0 → 227,1	947,2 → 881,0	28499	28423	1,63
KE-75528	Bio-QEEEGSGGQGGK-FAM	2048,2	4	60	1024,6 → 296,1	1090,8 → 1024,6	18564	17892	1,63
P1	Bio-QLTTGSGGQKK-FAM	1744,9	20	74	872,9 → 84,04	939,1 → 872,9	13036	7668	1,63
P2	Bio-QEEERSGGQKK-FAM	1916,0	88	66	958,2 → 286,9	1024,4 → 958,2	0	0	1,63

12. Erklärung

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

Datum, Ort

Unterschrift