



Die Rolle Sentrin spezifischer Proteasen in der stabilen Aktivierung von Synovialfibroblasten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Simon Strietholt

-2012-

Die Rolle Sentrin spezifischer Proteasen in der stabilen Aktivierung von Synovialfibroblasten
bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Simon Strietholt
aus Essen

-2012-

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Experimentelle Muskuloskeletale Medizin des Universitätsklinikums Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Pap angefertigt.

Als Zweitprüfer betreute diese Arbeit Herr Prof. Dr. rer. nat. Andreas Püschel, Abteilung Molekularbiologie, Institut für Molekulare Zellbiologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster.

Als Drittprüfer betreute diese Arbeit Frau Prof. Dr. rer. nat. Eva Liebau, Institut für Zoophysiologie, Westfälische Wilhelms Universität Münster.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Prüfer
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Pap
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Püschel
Dritter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Eva Liebau

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2013

Tag der Promotion: 12.04.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
2. TABELLENVERZEICHNIS	V
3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
4. ZUSAMMENFASSUNG	13
5. ZIELSETZUNG	15
6. EINLEITUNG	16
6.1. Die Rheumatoide Arthritis	16
6.1.1. Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis	17
6.1.2. Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis	17
6.1.3. Aktivierte Rheumatoid Arthritische Synovialfibroblasten	19
6.1.4. Das hTNFtg Mausmodell	21
6.2. Invasivität und Matrixzerstörung	22
6.2.1. Matrix Metalloproteinasen	22
6.3. Der Prozess der Apoptose	24
6.4. Posttranslationale Modifikation	26
6.4.1. <i>Small ubiquitin related modifier</i> (SUMO)	27
6.4.2. Vergleich von Ubiquitinierung und SUMOylierung	28
6.4.3. Das SUMO-Motiv	30
6.4.4. Sentrin spezifische Proteasen (SENPs)	31
6.4.5. SUMOylierungsprozesse in Krankheitsprozessen	33
7. ERGEBNISSE	35
7.1. Die SUMO-2/3 Expression in Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis	35
7.2. Der Einfluss von SENP5 auf die stabile Aktivierung von Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis	37
7.2.1. Die SENP5 Expression ist im RA-Synovialgewebe leicht erhöht	37
7.2.2. Die Lokalisation von SENP5 in RASF ist nuklear	40
7.2.3. Die Expression von SENP5 ist im synovialen Gewebe der hTNFtg Maus stark erhöht	41
7.2.4. Die Überexpression von SENP5 steigert die Proliferationsrate muriner Synovialfibroblasten	42
7.2.5. Einfluss der Überexpression von SENP5 auf die FAS-Ligand induzierte Apoptose von Synovialfibroblasten.	43

7.2.6. Die Überexpression von SENP5 induziert die mMMP-9 Expression in murinen Synovialfibroblasten	46
7.3. Der Einfluss von SENP7 auf die stabile Aktivierung von Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis	47
7.3.1. Die SENP7 Expression ist im RA-Synovialgewebe stark erhöht	47
7.3.2. Die Lokalisation von SENP7 in RASF findet sich über den Nukleus hinaus im Zytoplasma	50
7.3.3. Die Expression von SENP7 ist in Synovialfibroblasten der hTNFtg Maus stark erhöht	52
7.3.4. Die SENP7 Expression wird in murinen Synovialfibroblasten durch hTNF- α induziert	54
7.3.5. Die Überexpression von SENP7 steigert die Proliferationsrate muriner Synovialfibroblasten	55
7.3.6. Die Überexpression von SENP7 steigert die FAS-Ligand induzierte Apoptose muriner wt Synovialfibroblasten	57
7.3.7. Die Überexpression von SENP7 induziert die mMMP-9 Expression in murinen Synovialfibroblasten	59
8. DISKUSSION	60
8.1. Die Expression von SUMO-2/3 in Synovialfibroblasten	60
8.2. Expression und Lokalisation von SENP5 und SENP7 in RASF	62
8.3. Expression von SENP5 und SENP7 in hTNFtg Synovialgewebe und SF	66
8.4. Einfluss von SENP5 und SENP7 auf die Proliferationsrate von wt und hTNFtg SF	67
8.5. SENP5 und SENP7 in der Apoptoseregulation	68
8.6. SENP5 und SENP7 in der Regulation von murinem pro-MMP-9	69
9. MATERIAL	71
9.1. Reagenzien	71
9.2. Verbrauchsmaterialien	71
9.3. Geräte	72
9.4. Puffer und Lösungen	74
9.5. Primer und siRNAs	76
9.6. Antikörper	77
9.7. Expressionsvektoren und Konstrukte	79
9.8. Kompetente Bakterien	82
10. METHODEN	83
10.1. Tierversuche	83

10.1.1. Entkalkung und Einbettung von murinen Hinterpfoten für histologische Untersuchungen	83
10.2. Histologische Methoden	84
10.2.1. Vorbereitung von humanem Synovialgewebe für histologische Untersuchungen	84
10.3. Immunologische Methoden	85
10.3.1. Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten	85
10.3.2. Immunhistochemische Färbung von Zellen	86
10.3.3. Extraktion von Gesamtprotein	86
10.3.4. Quantitative Proteinbestimmung	87
10.3.5. SDS-Gelelektrophorese	87
10.3.6. Western-Blot zum immunhistologischen Nachweis von Proteinen	88
10.4. Zellbiologische Methoden	90
10.4.1. Zellkultur	90
10.4.2. Isolierung und Kultivierung von primären Synovialfibroblasten aus humanem Synovialgewebe	90
10.4.3. Isolierung und Kultivierung von primären murinen Maussynovialfibroblasten	91
10.4.4. Kryokonservierung von Zellen	91
10.4.5. Transfektion von kultivierten Zellen	92
10.4.6. Bestimmung der Proliferationsrate eukaryotischer Zellen	93
10.4.7. Bestimmung der Apoptoserate eukaryotischer Zellen	93
10.4.8. Bestimmung der murinen pro-MMP-9 Sekretion eukaryotischer Zellen	94
10.5. Molekularbiologische Methoden	95
10.5.1. Isolation von GesamtRNA und Reverse Transkription von cDNA	95
10.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	95
10.5.3. Genotypisierung der hTNFtg Maus	98
10.5.4. Agarose Gelelektrophorese	99
10.5.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	100
10.5.6. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	100
10.5.7. Restriktionsverdau	100
10.5.8. Ligation	101
10.5.9. Transformation von Bakterien	101
10.5.10. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	102
10.5.11. Sequenzierung der DNA	103
10.6. Statistik	103
11. LITERATURVERZEICHNIS	104
12. CURICULUM VITAE	112
13. ORIGINALARBEITEN	113
14. DANKSAGUNG	114
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	115

1. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 SCHEMA EINES GESUNDEN UND RHEUMATOID ARTHRITISCHEN GELENKES	18
ABBILDUNG 2 AKTIVIERTE SYNOVIALFIBROBLASTEN IN DER PATHOGENESE DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS	20
ABBILDUNG 3 APOPTOTISCHE SIGNALWEGE	25
ABBILDUNG 4 STRUKTUR DER SUMO-PROTEINE UND UBIQUITIN	28
ABBILDUNG 5 SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER SUMOYLIERUNGSPROZESSE	29
ABBILDUNG 6 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SENTRIN SPEZIFISCHEN PROTEASEN	31
ABBILDUNG 7 EXPRESSION VON SUMO-2/3 IN SYNOVIALGEWEBE VON RA- UND OA-PATIENTEN	24
ABBILDUNG 8 SUMOYLIERUNG IN RASF UND OASF	26
ABBILDUNG 9 EXPRESSION VON SENP5 IN SYNOVIALGEWEBE VON RA- UND OA-PATIENTEN	27
ABBILDUNG 10 EXPRESSION VON SENP5 IN RASF UND OASF	28
ABBILDUNG 11 LOKALISATION VON SENP5 IN RA- UND OASF	40
ABBILDUNG 12 EXPRESSION VON SENP5 IN METATARSALSCHNITTEN DER WT UND HTNFTG MÄUSE	31
ABBILDUNG 13 PROLIFERATIONS RATEN VON MURINEN, PRIMÄREN SYNOVIALFIBROBLASTEN NACH ÜBEREXPRESSION ODER HEMMUNG VON SENP5	43
ABBILDUNG 14: EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION VON SENP5 AUF DIE CASPASE-3/7 AKTIVITÄT IN RASF UND OASF	44
ABBILDUNG 15: EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION VON SENP5 AUF DIE CASPASE3/7 AKTIVITÄT IN HTNFTG UND WT SF	45
ABBILDUNG 16 MURINE PRO-MMP-2, -3 UND -9 EXPRESSION IN WT SF NACH DER ÜBEREXPRESSION VON SENP5	35
ABBILDUNG 17 EXPRESSION VON SENP7 IN RA- UND OA-SYNOVIALGEWEBE	37
ABBILDUNG 18 EXPRESSION VON SENP7 IN RA-SYNOVIALGEWEBE (DETAILANSICHT)	37
ABBILDUNG 19 EXPRESSION VON SENP7 IN RASF UND OASF	49
ABBILDUNG 20 LOKALISATION VON SENP7 IN RASF UND OASF	50
ABBILDUNG 21 KOLOKALISATION VON SENP7 IN RASF	51
ABBILDUNG 22 IMMUNOLOGISCHE SENP7 FÄRBUNG MURINER METATARSALSCHNITTE	42
ABBILDUNG 23 TRANSLATION UND TRANSKRIPTION VON SENP7 IN HTNFTG UND WT MAUSFIBROBLASTEN	54
ABBILDUNG 24 EXPRESSION VON SENP7 NACH STIMULATION MIT IL-1B UND TNF-A	55
ABBILDUNG 25 PROLIFERATIONS RATEN VON MURINEN PRIMÄREN SYNOVIALFIBROBLASTEN NACH ÜBEREXPRESSION VON SENP7	56
ABBILDUNG 26 EINFLUSS VON FASL AUF HUMANE RASF UND OASF NACH ÜBEREXPRESSION VON SENP7	57
ABBILDUNG 27 EINFLUSS VON FAS-LIGAND AUF MURINE SF NACH ÜBEREXPRESSION VON SENP7	58
ABBILDUNG 28 MURINE PRO-MMP-2, -3, -9 EXPRESSION IN WT SF NACH DER ÜBEREXPRESSION VON SENP7	48
ABBILDUNG 29 VEKTORKARTE DES PEGFP-C1 KLONIERUNGSVEKTORS	80
ABBILDUNG 30 VEKTORKARTE DES PCMV-SPORT6 KLONIERUNGSVEKTORS	71

2. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 ACR-KLASSIFIKATIONSKRITERIEN FÜR DIE RHEUMATOIDE ARTHRITIS	16
TABELLE 2 MATRIX METALLOPROTEINASEN	23
TABELLE 3 SENTRIN SPEZIFISCHE PROTEASEN, LOKALISATION UND PROZESSE	32
TABELLE 4 GERÄTE	72
TABELLE 5 PUFFER UND LÖSUNGEN	74
TABELLE 6 PRIMER	76
TABELLE 7 VERWENDETE SIRNA	76
TABELLE 8 ANTIKÖRPER	77
TABELLE 9 VERWENDETE KONSTRUKTE	79
TABELLE 10 KOMPETENTE BAKTERIEN	82

3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach demineralisiertes Wasser)
ACR	<i>American college of rheumatology</i>
AIA	<i>Antigen induced arthritis</i>
AK	Antikörper
Aos1	siehe auch SAE2
APAF-1	apoptotischer Protease Aktivierungsfaktor-1
APO-1	siehe auch FAS
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS, aa	Aminosäuren, <i>aminoacids</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated protein X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Apoptosis regulator Bcl-X</i>
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CD95	siehe auch FAS
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
CENP-1	Centromre protein 1

CIA	<i>Collagen induced arthritis</i>
COS7	<i>CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material</i>
C-terminal	<i>Carboxy-terminal</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Daxx	<i>Death domain associated protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEN1	SENP8
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DLD-1	<i>colorectale adeoncarzinoma Zellinie</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>death receptor</i>
DRP-1	Dynamamin related protein-1
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E1	E-1 Heterodimer aus AOS1/UBA2, aktivierendes Enzym
E2	E-2 Enzym Ubc9, konjugierendes Enzym
E3	E-3 Enzym, konjugierende Enzyme
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FAS	<i>TNF receptor superfamily member 6</i>
FASL	<i>TNF receptor superfamily member</i>

	<i>6 ligand</i>
FCS	<i>Fetal calf medium</i>
fl	<i>fulllength</i>
FLIP	Caspase-related inducer of apoptosis
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
fw.	<i>forward</i> (vorwärts)
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde (<i>hora</i>)
HAT	Histinacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetyltransferasen
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Gebärmutterhalskrebszelllinie
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
HLA	<i>human leucoyte antigene</i>
HLA-DR	<i>human leucoyte antigene death receptor</i>
hu	human
hTNFtg	humanes TNF transgen
IC	Immunohistochemie
IF	Immunfluoreszenz
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
k	Kilo
K	Lysin
KO	<i>Knock out</i>
l	Liter
LB-Medium	<i>Luria Broth Base Medium</i>
m	Milli

M	mol/Liter
MATRIN	<i>matrix-associated transepithelial resistance invasion</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter (=10 ⁻³ l)
mm	Millimeter (=10 ⁻³ m)
mM	Millimol/Liter
mmol	Millimol (=10 ⁻³ mol)
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger-RNA (=Boten-Ribonukleinsäure)
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Nano
N	Anzahl
NDSM	<i>negatively-charged amino-acid-dependent sumoylation motif</i>
NEDD	<i>Neural precursor cell-Expressed Developmentallydown-regulated</i>
NEDP1	SENp8
ng	Nanogramm (= 10 ⁻⁶ g)
nl	Nanoliter (= 10 ⁻⁶ l)
nm	Nanometer (=10 ⁻⁹ m)
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa light chain' of activated B cells</i>
N-terminal	Amino-terminal
OASF	Osteoarthritische Synovialfibroblasten
ODx	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
p115	<i>golgi vesicle tethering protein p115</i>
p53	<i>tumor protein 53</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

P	Prolin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pc-2	<i>polycomb protein 2</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentium Hydrogenium</i>
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tension homolog</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
RA	Rheumatoide Arthritis
RANBP2	<i>RAN binding protein 2</i>
RANGAP1	<i>RAN GTPase activating protein 1</i>
rev.	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAE1	<i>SUMO activating enzyme 1</i>
SAE2	<i>SUMO activating enzyme 2</i>
SBM-Motiv	<i>SUMO binding motif</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SD	<i>Standard derivation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SENP	<i>Sentrin specific protease</i>
SF	Synovialfibroblasten
SIM-Motiv	<i>SUMO interaction motif</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smad2	<i>mothers against DPP homolog 2</i>
Smad3	<i>mothers against DPP homolog 3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> (Polymerase)
TBS	<i>Tris buffered solution</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL-R1	<i>Tumornecrosefaktor related apoptosis inducing ligand-receptor 1</i>
U	<i>Units</i>
Uba2	<i>Ubiquitin-like modifier activating enzyme 2</i>
Ubc9	<i>Ubiquitin carrier protein 9</i>
Ubl	<i>Ubiquitin like modifier</i>
Ulp	Ubiquitin like protein
ÜN	Über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular epidermal growth factor</i>
Vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil
WB	Western Blot

wnt	<i>wingless</i>
wt	Wildtyp
w/v	Massenkonzentration
xg	Fache Erdgeschwindigkeit
z.B.	Zum Beispiel

4. Zusammenfassung

Die Familie der *Small ubiquitin related modifier* (SUMO) Proteine ist ein Familie von 4 posttranslational modifizierenden Molekülen, die die Funktion diverser Zielmoleküle über kovalente und nichtkovalente Bindungen an diese verändern kann. Diese Änderung kann sich auf die Stabilität, Lokalisation, wie auch die Funktion der gebundenen Zielproteine auswirken. Die Reifung wie auch das Lösen SUMOs von den Zielproteinen sind von einer Familie SUMO spezifischer Proteasen, den Sentrin spezifischen Proteasen (SENP) abhängig. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Rolle von SENP5 und 7 in der stabilen Aktivierung von Rheumatoid Arthritischen Synovialfibroblasten untersucht.

Erstmals konnte eine erhöhte Expression der SUMO Proteine 2 und 3 in Rheumatoid Arthritischem (RA)-Synovialgewebe nachgewiesen werden. In anschließenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die verstärkte SUMO-2/3 Expression auf die Expression in den stabil aktivierten Synovialfibroblasten von RA-Patienten zurückzuführen ist. Aufbauend auf den SUMO-2/3 Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die SUMO-2/3 spezifischen Proteasen SENP5 und SENP7 verstärkt im RA-Synovialgewebe exprimiert werden. Die Daten dieser Arbeit belegten die verstärkte Expression von SENP7 in den Rheumatoid Arthritischen Synovialfibroblasten (RASf). Des Weiteren konnten SENP5 und SENP7 in RASf im Nukleus nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte sowohl in den RASf wie auch in den Osteoarthritischen Synovialfibroblasten (OASF) ein klares Signal für SENP7 im Zytoplasma detektiert werden. In den RASf kolokalisierte das SENP7 Signal mit dem Zentrosom und dem Golgi Apparat. Darüber hinaus akkumuliert das SENP7 Signal punktuell im Nukleus der RASf. Diese erstmals beobachtete Zentrosomenlokalisierung von SENP7 in den RASf lässt auf eine Beteiligung der Protease an Zellteilungsprozessen schließen. Die Kolokalisation von SENP7 im Golgi Apparat macht einen Einfluss der Protease auf die Modifikation von Proteinen in diesem Zellorganell wahrscheinlich. In Versuchen im hTNFtg Mausmodell, welches eine chronische, inflammatorische polyartikuläre Arthritis entwickelt, war eine gesteigerte Expression der murinen Proteasen SENP5 und SENP7 im Synovialgewebe der hTNFtg Maus zu detektieren. Die Expression von murinem SENP5 erschien gleichmäßig auf das Synovialgewebe der hTNFtg Maus verteilt, die Expression von murinem SENP7 im Synovialgewebe der hTNFtg Maus war im Bereich der Gelenkdestruktion und des Pannusgewebe besonders deutlich ausgeprägt. Im Vergleich hierzu war die Expression von SENP5 und SENP7 im wt Synovialgewebe schwächer aber detektierbar. Die Stimulation von wildtyp Synovialfibroblasten (wt SF) mit hTNF- α intensiviert die Expression von murinem SENP7 in den wt SF. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von murinem SENP7 durch den externen Stimulus hTNF- α induziert

wird. Da SUMO-2/3 Modifikationen Effekte auf Prozesse im Umfeld von Zellteilungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozessen haben, wurde der Einfluss einer Überexpression von SENP5 und SENP7 in murinen SF auf funktioneller Ebene untersucht. Die Überexpression von SENP5 oder SENP7 in murinen wt SF steigerte die Proliferationsrate dieser wt SF. Die Analoge Überexpression der Proteasen in hTNFtg SF konnte die Proliferationsrate dieser Synovialfibroblasten stärker steigern als in den wt SF. Damit konnte erstmalig im Rahmen dieser Arbeit ein Effekt von SENP7 auf die Proliferation von primären murinen Synovialfibroblasten gezeigt werden. Ein weiteres Charakteristikum der RASF ist die verminderte Empfindlichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen, welche dazu beiträgt, dass sich mit fortschreitender Erkrankung das Pannusgewebe im RA-Synovium verdickt. Wie die Untersuchungen, zeigten bewirkte eine Überexpression der SUMO-2/3 spezifischen Proteasen SENP5 oder SENP7 in wt SF eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber der FAS-Ligand induzierten Apoptose. Auch hier hatte ähnlich wie in den Proliferationsuntersuchungen die Überexpression von SENP7 einen wesentlich stärkeren Effekt. Diese Daten lassen darauf schließen, dass eine veränderte SUMOylierung in den RASF als Folge einer erhöhten SENP5 oder SENP7 Expression Auswirkungen auf unterschiedliche proapoptotische Signalmoleküle hat. Maßgeblich an den destruktiven Prozessen der RA beteiligt, spielen die MMP eine Schlüsselrolle in der RA-Erkrankung. Die Messung der murinen pro-MMP-9 Expression in wt SF nach einer erfolgten Transfektion mit einem SENP5 oder einem SENP7 Expressionsvektor zeigte eine starke Induktion der Expression von murinem pro-MMP-9 in den murinen Synovialfibroblasten. Eine Wirkung der Proteasen auf regulatorische Modifikationen und Signalwege, die modulierend auf die Induktion von murinem pro-MMP-9 einwirken ist denkbar.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse erweitern das noch junge Forschungsfeld der SENP-Proteine um erste Erkenntnisse zur Bedeutung von SENP5 und SENP7 in der Rheumatoiden Arthritis.

5. Zielsetzung

In ersten Versuchen zu den funktionellen Konsequenzen einer veränderten SUMOylierung in RASF konnten Meineke *et al.* zeigen, dass die verminderte Empfindlichkeit der RASF für FAS-Ligand induzierte Apoptose auf die erhöhte SUMO-1 Expression zurückzuführen ist¹. Die Beteiligung des posttranslationalen Modifikators SUMO-1 an der Empfindlichkeit der RASF für proapoptotische Signale bietet eine Erklärung für die charakteristische verminderte Apoptoserate der stabil aktivierten Synovialfibroblasten von RA-Patienten. Durch Überexpression der SUMO-1 spezifischen Protease SENP1 gelang es Meineke *et al.* die FAS-Ligand induzierte Apoptoserate der RASF zu erhöhen. Aufbauend auf diesen Daten zur erhöhten Expression von SUMO-1 in den RASF und den funktionellen Einflüssen der SUMO-1 spezifischen Protease SENP1 auf die Empfindlichkeit der RASF für die FAS induzierte Apoptose, sollte im Rahmen dieser Dissertation die SUMOylierung durch SUMO-2/3 und die Expression der SUMO-2/3 spezifischen Proteasen SENP5 und SENP7 auf die stabile Aktivierung von Rheumatoid Arthritischen Synovialfibroblasten betrachtet werden. Um den Kenntnisstand zu den bisher in der RA unerforschten SUMO-Proteinen SUMO-2 und -3 zu erweitern, sollte einleitend die Expression diese Proteine im Synovialgewebe von Patienten mit RA untersucht werden. Zusammen mit diesen Proteinen sollten die zugehörigen SUMO-2/3 spezifischen Proteasen SENP5 und SENP7 erstmalig in RA-Synovialgewebe und kultivierten primären RASF betrachtet werden. Neben grundlegenden Aussagen zur transkriptionellen und translationalen Expression, sollte die Lokalisation der Proteasen in primären RASF geklärt werden, um Rückschlüsse zu möglichen Funktionen der Proteasen treffen zu können. Ergänzend zu den Analysen in humanen RA- und OA-Synovialgewebeproben und RA- und OA-Synovialfibroblasten, sollte die Bedeutung von SENP5 und SENP7 im hTNF- α -abhängigen Mausmodell einer destruktiven Arthritis geklärt werden. Die Expression und die funktionellen Konsequenzen der Expression von SENP5 und SENP7 sollten in primären murinen SF untersucht werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen zu den SENP-Proteinen und der Expression in humanem RA-Synovialgewebe und RASF sollten im murinen Modell der RA gezielt Prozesse der Pathogenese untersucht werden, in denen SENP5 und SENP7 einen entscheidenden Einfluss haben könnten: Proliferation, Apoptose und regulatorische Prozesse.

6. Einleitung

6.1. Die Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA), auch chronische Polyarthrit, ist eine entzündliche Gelenkerkrankung die den Knorpel und Knochen der Gelenke zerstört. Die Prävalenz der RA liegt bei etwa 1%, wobei das Risiko an RA zu erkranken für Frauen etwa dreimal höher ist als für Männer². Erste Symptome, die in der Regel zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr auftreten, sind charakteristische bilaterale Schmerzen der Hand- und Fingergelenke. Es können allerdings auch Fuß-, Hüft-, Knie- oder Schultergelenke betroffen sein. Einhergehend mit diesen Schmerzsymptomen, die durch Entzündungen der Gelenke hervorgerufen werden, tritt auch eine Schwellung in den betroffenen Gelenkregionen auf, begleitet von Morgensteifigkeit. Da die krankhaften Prozesse der RA Jahre vor der Erstdiagnose einsetzen, ist diese Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose oft bereits fortgeschritten. Gerade die Schäden des Knorpelgewebes sind in späten Stadien nahezu irreversibel. Daher ist eine frühzeitige Diagnose der Erkrankung wichtig, um in einem möglichst frühen Stadium der Krankheit mit einer gezielten Therapie beginnen zu können. Um eine Diagnose zu erleichtern, hat das *American College of Rheumatology* (ACR) bereits 1987 die sogenannten ACR-Kriterien aufgestellt. Die aktualisierten Kriterien nach Alethana *et al.* 2010 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Von den sieben aufgeführten Punkten müssen mindestens vier erfüllt sein, um eine RA-Erkrankung sicher zu diagnostizieren³.

Tabelle 1 ACR-Klassifikationskriterien für die Rheumatoide Arthritis

Gelenkentzündung mit tastbaren Schwellungen in einem oder mehreren Gelenken über mindestens sechs Wochen
Eine sechs Wochen andauernde Morgensteifigkeit der Gelenke über jeweils mindestens eine Stunde hinweg
Schwellung (Arthritis) an Hand- oder Fingergelenken länger als sechs Wochen
Eine auf beiden Körperseiten in den selben Gelenken auftretende symmetrische Arthritis
sogenannte Rheumaknoten
der Nachweis von sogenannten Rheumafaktoren im Blut des Patienten
im Röntgenbild nachweisbare, typische Veränderungen wie gelenknahe Osteoporose und/oder Erosionen

nach Alethana *et al.* 2010³

6.1.1. Ätiologie der Rheumatoiden Arthritis

Trotz der Häufigkeit der RA-Erkrankung innerhalb der Bevölkerung sind die Ursachen der RA bisher weitgehend unbekannt. So werden Bakterien oder Viren als Krankheitsauslöser, genetische Prädispositionen oder hormonellen Einflüsse diskutiert. Es werden z. B. Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus⁴, aber auch mit Retroviren als mögliche Auslöser benannt⁵⁻⁷. Weitere Faktoren wie Umwelteinflüsse, hormonelle Einflüsse, Ernährung oder die Rauchgewohnheiten der Patienten werden ebenfalls diskutiert^{8,9}.

Weiterhin spielen andere Faktoren eine Rolle für den Schweregrad der RA-Erkrankung. Eindeutig gibt es eine genetische Prädisposition für den Verlauf der Erkrankung⁸. Als genetische Faktoren werden die Gruppe der *human leucocyte antigene* (HLA)-Klasse II besprochen. Die auf Chromosom 6 gelegenen HLA Gene kodieren für transmembrane Glykoproteine, die unter anderem in Makrophagen für die Antigenpräsentation verantwortlich sind¹⁰⁻¹². Zu diesen Hypothesen kommen in den letzten Jahren auch vermehrt Hinweise auf epigenetische Faktoren hinzu, die auf die Vielzahl der in der RA gestörten Prozesse einwirken können¹³⁻¹⁵. Sichere Erkenntnisse wie weit diese Faktoren sich auf die Schwere der Erkrankung auswirken gibt es bisher nicht.

6.1.2. Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Die Gelenke bilden die beweglichen Verbindungen des menschlichen Körpers zwischen den einzelnen Knochen. Anatomisch setzt sich das Gelenk aus den Gelenkknochen zusammen, die im Bereich des Gelenkkopfes von einer Knorpelschicht bedeckt sind (Abbildung 1). Umschlossen wird das Gelenk von einer Gelenkkapsel (dem sogenannten Synovium). Die Gelenkinnenhaut (Synovialmembran), welche das Gelenk auskleidet, stellt die Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen über die Synovialflüssigkeit sicher¹⁶. Im gesunden Gelenk besteht die Synovialmembran aus einer dünnen Zellschicht (*lining layer*) als Grenze zum Gelenkinnenraum.

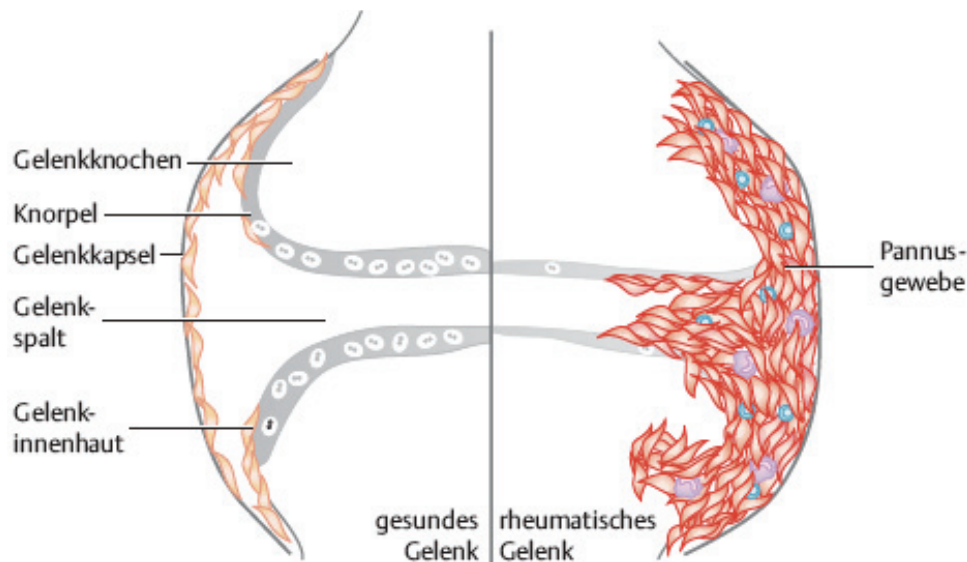


Abbildung 1 Schema eines gesunden und rheumatoid arthritischen Gelenkes

Schematische Darstellung eines gesunden (links) und eines rheumatischen Gelenkes (rechts): Im Gegensatz zum gesunden Gelenk, bildet sich im erkrankten Gelenk ein hyperplastisches Pannusgewebe aus. Die hier zu findenden Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten tragen zum progressiven Zersetzen des Knorpels bei (modifiziert nach Pundt *et al.* 2009¹⁶).

Im Zuge der RA kommt es zu einer krankhaften Veränderung dieser Zellschichten, die sich vornehmlich durch Zellvermehrung und Dickenwachstum der Membranen auszeichnet. Diese Pannusbildung unterscheidet sich von Patient zu Patient sowohl in der Bildungsgeschwindigkeit als auch in der Ausprägung des hyperplastischen Gewebes.

Der Beginn der Gelenkentzündung ist durch eine Infiltration von mononukleären Zellen gekennzeichnet. Beginnend mit einer Einwanderung von Makrophagen setzt eine gesteigerte Expression von Chemo- und Zytokinen ein. Das vermehrte Ausschütten proinflammatorischer Zytokine insbesondere des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) führt zu einem Entzündungsprozess im Gelenk und sorgt neben einer Aktivierung der Osteoklasten¹⁷⁻¹⁹, welche für den Prozess der Knochendestruktion mitverantwortlich sind, für eine stabile Aktivierung der Synovialfibroblasten. Diese nehmen ihren charakteristischen, tumorähnlichen Phänotyp an²⁰. Neben den Synovialfibroblasten tragen auch die Makrophagen und Lymphozyten zum Entzündungsprozess und zur Matrixzerstörung bei. Dies geschieht lokal über das weitere Rekrutieren von Entzündungszellen (wie zum Beispiel aktivierter Monozyten), Neovaskularisierung und das Ausschütten von Matrix degradierenden Enzymen^{21,22}. Weiterhin sind T-Zellen bei der Entzündungsreaktion beteiligt. Alle diese einzelnen Prozesse bilden ein komplexes Zusammenspiel, das zum Gesamtbild der RA beiträgt.

6.1.3. Aktivierte Rheumatoid Arthritische Synovialfibroblasten

Neben Makrophagen und T-Zellen spielen die Rheumatoid Arthritischen Synovialfibroblasten (RASf) eine entscheidende Rolle bei der Zerstörung von Knorpel und Knochen. Externe Stimuli wie zum Beispiel Zytokine oder Wachstumsfaktoren führen bereits in den frühen Phasen der Pathogenese zu einer als stabile Aktivierung bezeichneten Reaktion der Fibroblasten. In der wissenschaftlichen Diskussion herrscht allerdings bisher kein Konsens darüber welche dieser Stimuli für diese Aktivierung entscheidend sind^{20,24}.

Diese stabile Aktivierung führt zur Veränderung der Synovialfibroblasten sowohl bezüglich der Morphologie als auch diverser zellulärer Prozesse wie zum Beispiel eine veränderte Empfindlichkeit für apoptotische Signale oder eine dauerhaft verstärkte Ausschüttung von Zytokinen. Die aktivierten Synovialfibroblasten weisen auf morphologischer Ebene eine in der Phasenkontrastmikroskopie eher runde Zellmorphologie auf sowie einen blassgrauen Kern^{25,26}. Auf molekularbiologischer Ebene ist eine unbalancierte Proteinexpression, insbesondere von Zytokinen¹⁸, aber auch von antiapoptotischen Proteinen wie zum Beispiel Bcl-2, Protooncogenen, Proteoglykanen und Wachstumsfaktoren zu finden²⁶. Die transformierten Fibroblasten sind nur noch bedingt zugänglich für proapoptotische Signale²⁷, heften sich an den Knorpel im Gelenk an und zerstören ihn progressiv durch das Zersetzen der artikulären Strukturen des Gelenkknorpels²⁸. Eine Reihe von Studien im *severe combined immune-deficient* (SCID) Mausmodell, konnte die Eigenschaften der transformierten Fibroblasten und ihre stabile Aktivierung belegen²⁹. Hierbei wurden humane RASf und Synovialfibroblasten von osteoarthritischen Patienten (OASF) isoliert und *in vitro* kultiviert. Nach Transplantation der über einige Passagen hinweg kultivierten Fibroblasten zusammen mit gesundem humanem Knorpel in einem Gewebeschwamm, unter die Nierenkapsel der SCID Maus zeigten die RASf im Gegensatz zu den OASF den typischen aggressiven, tumorähnlichen Phänotyp³⁰. Eine deutliche Anheftung der RASf an den Knorpel wie auch die Zerstörung der Matrix war nach den zwei Monate dauernden Versuchen zu beobachten. In den weiterführenden Arbeiten von Lefevre *et al.*³¹ konnte gezeigt werden, dass gemeinsam mit Schwämmen transplantierte RASf in der Lage sind im SCID Mausmodell in gesunden transplantierten Knorpel der kontralateralen Seite der Mäuse einzuwandern und dort ihren aktivierten Phänotyp beibehalten. OASF wurden als Kontrolle verwendet. Die OA ist durch einen progressiven Knorpelverlust, eine krankhafte Ausbildung von Osteophyten (degenerative, knöcherne Ausläufer am Rand des Knochens), sowie eine gelegentlich auftretende Entzündung gekennzeichnet. Die OASF zeigen im Gegensatz zu den RASf keinen stabil aktivierten tumorähnlichen Phänotyp. Die Chondrozyten verschieben ihre Aktivität in der OA in erster Linie auf katabolische Prozesse während eine natürliche Aktivierung anabolischer Stimuli zum Teil nicht mehr angenommen wird²⁸.

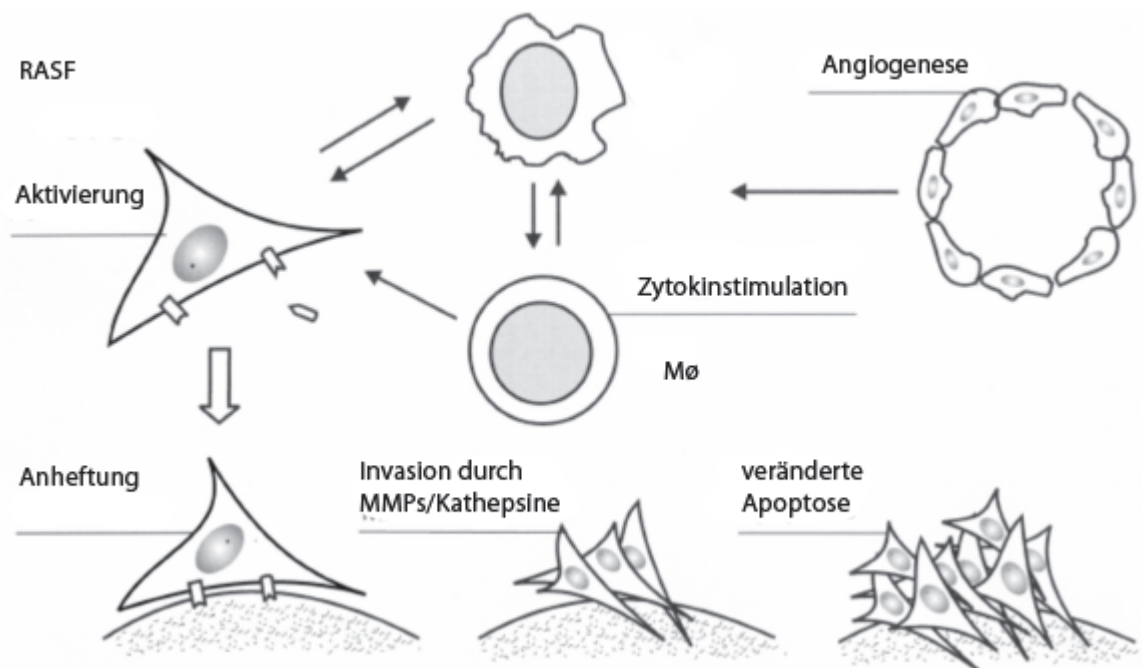


Abbildung 2 Aktivierte Synovialfibroblasten in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis

Aktivierte Synovialfibroblasten exprimieren verstärkt Tumorsuppressoren, Protoonkogene und Apoptose assoziierte Proteine. Neben T-Zellen und Makropagen exprimieren auch Fibroblasten matrixdegradierende Enzyme und Adhäsionsmoleküle. Makrophagen (Mø) differenzieren unter diesen Bedingungen zu Osteoklasten, weiterhin wird die Angiogenese stimuliert (nach Pap 1999³²).

Aktivierte Fibroblasten weisen charakteristische Veränderungen auf (Abbildung 2). So tragen aktivierte Fibroblasten durch ihre übermäßige Produktion von Zytokinen wie TNF- α (Tumornekrosefaktor-alpha) und Adhäsionsmolekülen wie z. B. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) zu den destruktiven Prozessen im Gelenk bei³³. Diese Veränderungen der Zytokinsekretion unter anderem der Fibroblasten führen zu einem Milieu im Synovium, das die Zellen dauerhaftem Stress aussetzt³⁴. Trotz des genotoxischen Umfeldes im Synovium, das zu hypoxischem Stress und einer Häufung von DNA-Strangbrüchen führt, ist in den RASF eine deutlich verminderte Empfindlichkeit für die Apoptose zu beobachten³⁵. Durch das Wachsen der Synovialmembran verdickt sich diese Struktur zu einem stark hypoxischen Pannusgewebe. Unter diesen hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer verstärkten Expression von hitzeinduzierbaren Molekülen wie zum Beispiel Hypoxie induzierbarer Faktor 1 α und β (HIF1 α und HIF1 β)^{37,38}, welche verstärkend auf die Angiogenese wirken^{24,39}. Die Adhäsionsmoleküle vermitteln das Anheften der Fibroblasten an den Gelenkknorpel. Dieser Schritt initiiert die Zerstörung der Knorpelmatrix durch die RASF. Ein erhöhtes, invasives Verhalten der RASF wird durch eine veränderte Proteinexpression verschiedener Proteine wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) oder Kathepsine begünstigt^{30,40}.

6.1.4. Das hTNFtg Mausmodell

Um die Pathogenese der RA besser verstehen zu können und mögliche Therapieansätze im Tiermodell zu testen, werden in der RA-Forschung verschiedenen Tiermodelle verwendet⁴¹. Neben induzierbaren Modellen der RA wie z. B. der durch bovines Kollagen II induzierbaren Arthritis (CIA) oder der adjuvant induzierten Arthritis (AIA) in denen die Mäuse durch Injektionen der genannten Substanzen in die Pfoten Gelenke eine starke Entzündung, gefolgt von einer progressiven Gelenkszerstörung entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das humane TNF transgene Mausmodell verwendet.

TNF- α ist ein zentraler Signalstoff im Immunsystem und spielt eine entscheidende Rolle bei lokalen und systemischen Entzündungen, bei der Regulierung diverser Zellprozesse wie der Apoptose, der Proliferation und der Zelldifferenzierung sowie der Aktivität von Immunzellen. Die humane transgene Tumor Nekrose Faktor (hTNFtg) Maus bietet eine hervorragende Möglichkeit die Pathogenese der RA im Hinblick auf dieses initierende Zytokin TNF- α *in vivo* zu untersuchen. Diese Mäuse exprimieren ein 3'-modifiziertes humanes TNF- α Gen-Konstrukt, welchem die für die Regulation des hTNF α -Gens wichtige 3'-Sequenz fehlt. Dieses Konstrukt sorgt in dieser transgenen Maus für eine starken Zunahme der Expression von humanem TNF- α in Milz, Lunge, Thymus, Nieren, Gelenken und der Leber⁴². Durch die dauerhaft erhöhte Expression des humanen TNF- α entwickeln die Mäuse in einem kurzen Zeitraum von etwa 6-8 Wochen eine chronische, polyartikuläre Arthritis. Phänotypisch äußert sich diese Zytokinüberexpression durch Schwellung der Hinterpfoten, begleitet von einer deutlichen Entzündung. Infolge dessen zeigen betroffene Mäuse eine Einschränkung der Beweglichkeit von Hinterpfoten und Sprunggelenken.

Im direkten Vergleich zur RA weist der Phänotyp der hTNFtg Maus deutliche Parallelen auf. So lassen sich ab der vierten Woche erste inflammatorische Reaktionen feststellen, sowie in der Folge auftretende Schwellungen in den Vorderextremitäten. Etwa ab der sechsten Woche sind im histologischen Befund erste Knorpeldestruktionen nachzuweisen. Diese von Entzündungen und starken Schwellungen der betroffenen Gelenke begleiteten Prozesse schreiten kontinuierlich voran. Etwa im Alter von 16 Wochen ist die Mobilität der Mäuse stark eingeschränkt, da Knorpel und Knochen der betroffenen Gelenke der Maus nahezu vollständig zerstört sind. Anhand dieses Modells konnte der Einfluss von TNF- α auf die charakteristischen Prozesse in RA untersucht werden. Wie auch in der Therapie der RA kann dem Fortschreiten der in der Maus beobachteten Prozesse durch das regelmäßige Verabreichen von TNF- α blockierenden Antikörpern entgegengewirkt werden. Um die Rolle der SENP-Proteasen und der SUMO-Proteine in der Pathogenese der RA besser verstehen zu können, wurden neben humanen Gewebeschnitten und primären Fibroblasten auch Untersuchungen in Gewebeschnitten und Synovialfibroblasten (SF) des hTNFtg

Mausmodells durchgeführt.

6.2. Invasivität und Matrixzerstörung

Im rheumatischen Gelenk ist das natürliche Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) massiv gestört. Es kommt zu einem krankhaften Anheften der Zellen an die Matrix, gefolgt von einer Degradation der Matrix durch den angehefteten Fibroblasten und einer anschließenden Zerstörung des Knorpels. Dieses invasive Verhalten der RASF führt schließlich zur völligen Zerstörung des Gelenkes. Insbesondere die Sezernierung von Matrix Metalloproteinasen ist für diese Invasivität der RASF verantwortlich²².

6.2.1. Matrix Metalloproteinasen

Matrix Metalloproteinasen (MMP) sind eine im extrazellulären Raum aktive Gruppe von Enzymen, die durch Abbau der EZM am Gewebeumbau beteiligt sind. Über diesen Prozess hinaus haben die MMP Einfluss auf die Prozessierung diverser Signalmoleküle. Die insgesamt 20 Mitglieder umfassende Familie der Matrix Metalloproteinasen teilt sich in Gelatinasen, Matrilysine, Stromelysine, Kollagenasen und membrangebundene MMP (Tabelle 1). Alle Proteasen sind am Abbau verschiedenster Komponenten der EZM beteiligt. Aufgrund dessen spielen die MMP an zahlreichen Prozessen und Erkrankungen wie Embryogenese, Angiogenese, Knochenremodelling, Wundheilung, Metastasierung, Tumordinvasion, fibrotischen Erkrankungen, Osteoarthritis oder inflammatorischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle^{22,43,44}. Der Großteil der MMP wird induziert und nicht konstitutiv exprimiert. Mit Ausnahme der intrazellulär durch Furin aktivierten MMP (MT-1- und -2-MMP, MMP-11, MMP-23 und MMP-28^{51,52}) haben alle extrazellulären MMP ein etwa 20 Aminosäuren langes Signalpeptid, das während der Sezernierung abgespalten wird. Die MMP werden als inaktive Proformen in den Extrazellulärraum sezerniert⁵³. Die Aktivierung von pro-MMP ist ein initialer Schritt in der Regulation der MMP-Aktivität. Diese Aktivierung wird durch Abspaltung eines 80 Aminosäuren umfassenden Propeptid am N-Terminus der katalytischen Domäne erreicht. Die Aktivierung wird hauptsächlich durch die Zerstörung der Interaktion zwischen einer Cysteinsulphydrylgruppe in der Propeptiddomäne und der Zink-Ionenbindung im katalytischen Zentrum gewährleistet. Dieser Mechanismus, bekannt als Cystein-Switch Modell, repräsentiert ein generelles Modell zur Aufrechterhaltung der pro-MMP-Latenz, worunter die Erhaltung des Enzyms in seiner inaktiven Form zu verstehen ist⁵⁴.

Darüber hinaus können MMP auch auf Signalmoleküle einwirken und deren Aktivität direkt oder indirekt beeinflussen. Strukturelle Matrixproteine, Kollagene und Proteoglycane, Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Oberflächenrezeptoren aber auch Proteasen und sogar MMP selber werden von MMP als Substrat erkannt. So etwa Chemokine oder Wachstumsfaktoren, die in der EZM gebunden vorliegen und deren Freisetzung durch MMP gesteuert wird.

Tabelle 2 Matrix Metalloproteinasen

Nomenklatur der Matrix Metalloproteinasen und ihrer enzymatischen Funktionen

Nomenklatur MMP Familie	Enzym
MMP-1	Kollagenase-1
MMP-8	Kollagenase-2
MMP-13	Kollagenase-3
MMP-2	Gelantinase A
MMP-9	Gelantinase B
MMP-3	Stromelysin-1
MMP-10	Stromelysin-2
MMP-11	Stromelysin-3
MMP-12	Metalloelastase
MMP-7	Matrilysin-1
MMP-26	Matrilysin-2
MMP-14	MT1-MMP
MMP-15	MT2-MMP
MMP-16	MT3-MMP
MMP-17	MT4-MMP
MMP-24	MT5-MMP
MMP-25	MT6-MMP

modifiziert nach Hu *et al.*⁵⁵

In der Pathogenese der RA spielen MMP eine bedeutende Rolle. Die Überexpression der MMP führt zur Degradation der EZM und der artikulären Strukturen⁵⁵. Nach einer initialen Spaltung von Proteoglykanen (z.B. durch MMP-7, 9 und 14) erfolgt ein Abbau des fibrillären Kollagen II durch MMP-1 und MMP-13. Diese zwei Kollagenasen werden insbesondere von den RASF (MMP-1) aber auch von Chondrozyten und Makrophagen (MMP-13) im rheumatischen Synovium stark exprimiert²². Das degradierte Typ II Kollagen dient in Fragmentform als Substrat für andere MMP. So zum Beispiel Gelatinasen wie MMP-9 und MMP-2, die wiederum von Chondrozyten exprimiert werden. Zusätzlich werden Proteoglykane aufgespalten, die von MMP-3 degradiert werden. Diese beobachtete hohe Expression von MMP im RA Synovium wird neben exogenen Stimuli (Hypoxie, toxisches Milieu) durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 β angeregt, die in erster Linie durch Monozyten und Makrophagen produziert werden^{19,56}.

6.3. Der Prozess der Apoptose

Der programmierte Zelltod wurde erstmals durch Walter Flemming 1885 morphologisch beschrieben. Geprägt hat John Kerr den Begriff in seinen Arbeiten aus dem Jahre 1972⁵⁷. Diese Form des Zelltodes ist neben der Autophagozytose und der Nekrose eine natürliche, körporgesteuerte Form des Zelltodes. Sie wird über genaue genetische Mechanismen kontrolliert und ist von eminenter Wichtigkeit für die Homöostase des Gewebes. Im Gegensatz zur Autophagozytose, welche die Zellkomponenten zum lysosomalen Abbau führt und der Nekrose in der die Zellen vorzeitig absterben, wirkt die Apoptose in ihren Signalen darauf ein, dass die Zellen geregelt und ohne Entzündungsprozess abgebaut werden.

Der Prozess der Apoptose wird durch morphologische Veränderungen der Zellen begleitet.

In der Frühphase der Apoptose ist die Schrumpfung, das Reduzieren des Zellvolumens gut auszumachen. Anschließend kann eine einsetzende Fragmentierung des Zellkerns beobachtet werden, gefolgt von einer Abschnürung von membranummantelten Vesikeln (apoptotische Körperchen). Diese werden phagozytotisch ohne das Einsetzen einer Entzündungsreaktion durch die Zellen des angeborenen Immunsystems abgebaut⁵⁷. In der Initiation der Apoptose unterscheidet man zwei mögliche Wege. Zum Einen den extrinsischen zum Anderen den intrinsischen Signalweg.

Der extrinsische Apoptoseweg (Typ I) verläuft über die Bindung von Todesliganden an unterschiedliche membranständige Todesrezeptoren (*death receptor, DR*). Diese, zu den TNF-Rezeptoren gehörenden DR sind eine Rezeptorfamilie mit insgesamt sechs Mitgliedern. Zu ihnen zählen z.B. FAS (auch CD95 oder APO1), Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R) oder der *tumornecrosisfactor related apoptosis inducing ligand-receptor 1* (TRAIL-R1).

Strukturell sind diesen DR zwei bis fünf cysteinreiche, extrazelluläre Domänen gemein. Funktionell dienen diese Domänen der Übertragung von Apoptose-induzierenden Signalen nach der Ligandenbindung an die intrazellulären Todesdomänen (*death domain, DD*). Nach FAS-Ligandenbindung an den FAS-Rezeptor formiert sich der *death inducing signaling complex* (DISC-Komplex). Dieser Komplex aus *Fas-Associated protein with Death Domain* (FADD), Caspase-8 und Caspase-10 aktiviert weitere Caspasen und leitet die Apoptose ein⁵⁸ (siehe Abbildung 3).

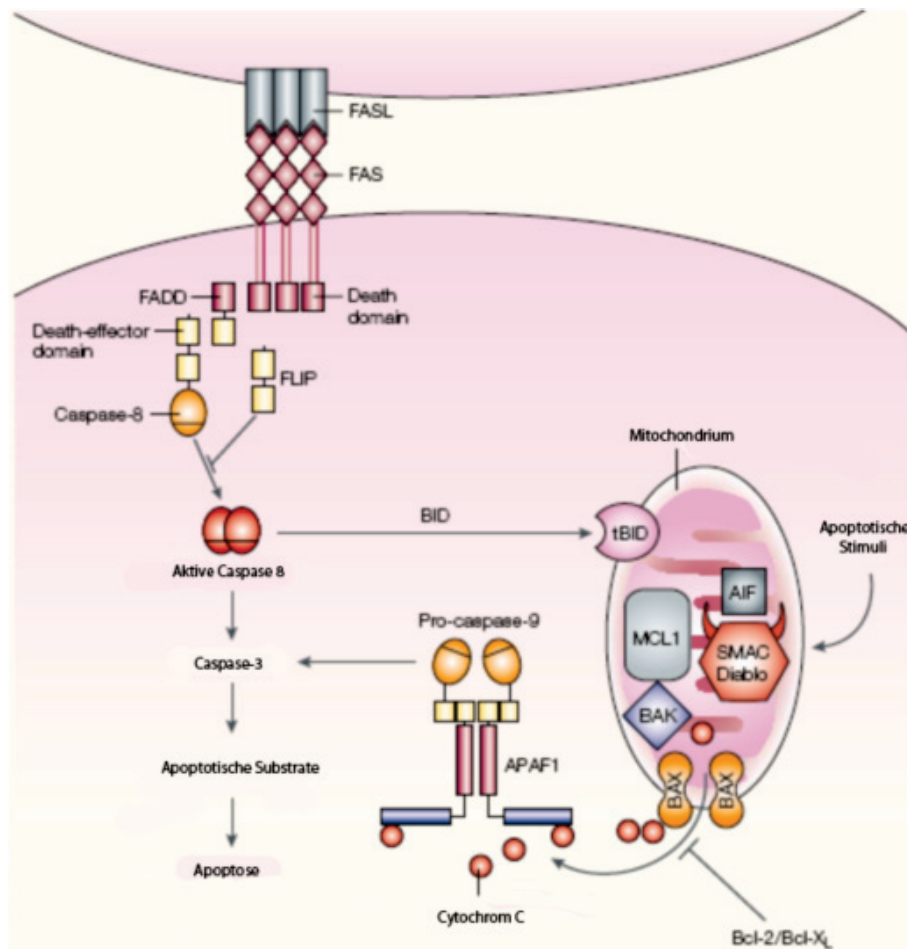


Abbildung 3 Apoptotische Signalwege

Schematische Darstellung der Todesrezeptor (DR)-Signalwege und des mitochondrialen Signalweges der Apoptose. Zum Einen kann die Apoptose durch DR-Ligation (hier im Beispiel FAS-FASL) erfolgen, zum Anderen durch Störung der Mitochondrienintegrität nach DNA-Schädigung, UV-Strahlung oder Einwirkung durch zytotoxischen Stress. Die DR induzierte Aktivierung von *downstream* Caspasen wird unterbunden durch FLIP. Nach Induktion des DR-Signalweges kommt es zur Aktivierung der Caspase-8 und damit auch ohne mitochondriale Schädigung zur Aktivierung der Caspase-3. Im Falle einer BID verlaufenden Apoptose setzt ein Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ein und führt zum Freisetzen von Cytochrom C in das Zytoplasma. Dieses kann bei Präsenz von APAF1 und ATP die Caspase-9 aktivieren. Antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-XL schützen gegen den Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials das von proapoptotischen Signalen wie BAX und BAK induziert wird (Abbildung modifiziert nach Pope *et al.* 2002⁵⁸).

Der zweite Weg die Apoptose zu initiieren verläuft über intrinsische und mitochondriale Signalwege (Typ II). Nach einem initialen Auslöser (Hitze, Strahlung, Chemikalien etc.) wird

durch die resultierende DNA-Schädigung der Transkriptionsfaktor p53 freigesetzt. Dieser reguliert Gene, welche ihrerseits Einfluss auf Gene in diesem Signalweg haben, die die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verstärken. So wird z.B. die Synthese von Bad (*Bcl-2-antagonist of cell death*) und Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) stimuliert. Diese verhindern die Inaktivierung von apoptotischen Proteinen. Hierdurch können Bax (*Bcl-2-associated X Protein*) und Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) proapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie an die äußere mitochondriale Membran binden und Poren bilden. Durch diese Membranporen wird nun Cytochrom C in das Zytosol geschleust. Durch Bindung an Procaspase-9 und APAF-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) in einem als Apoptosom bezeichneten *death inducing signaling complex* (DISC)-ähnlichen Komplex, kommt es zur Prozessierung von Caspase-3. Weitere Caspasen werden in einer apoptotischen Kaskade aktiviert bis sich letztendlich die Zelle in Vesikel abschnürt und phagozytotisch abgebaut wird⁵⁸.

6.4. Posttranslationale Modifikation

Mechanismen, die in der Zelle auf bereits translatierte Proteine einwirken und deren Eigenschaft, Stabilität oder Lokalisation beeinflussen bezeichnet man als posttranslationale Modifikationen (PTM). Diese Prozesse werden von einer Vielzahl an speziellen Proteinen katalysiert. Die katalytischen Proteine sind zum Teil konstitutiv aktiviert oder können flexibel als eine Reaktion auf Umwelteinflüsse oder Stresssignale wirken. In ihrer Lokalisation können diese Modifikationen unmittelbar am Entstehungsort des neu synthetisierten Zielproteins oder aber innerhalb bestimmter Zellorganellen ausgeführt werden.

Es sind folgende Arten der posttranslationalen Modifikation von Proteinen bekannt:

- Abspaltungen, wie zum Beispiel des N-terminalen Formylrestes durch die Deformylase oder das gezielte Abspalten von Signalsequenzen (etwa bei pro-MMP)
- Das spezifische Herausschneiden von Teilsequenzen (Vorläuferproteine) oder auch die völlige Proteininaktivierung durch Proteolyse
- Das Hinzufügen und Anhängen von funktionellen Gruppen wie z. B. Amine oder Aldehyde, Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Acetylierungen, Methylierungen und Glykosylierungen
- Hinzufügen von Bindungen, das Knüpfen von Disulfidbrücken, die Veränderung der Faltung durch Chaperone, die Bildung von Proteinkomplexen aus Untereinheiten oder auch der Bildung von festen Strukturen über kovalente Quervernetzungen (etwa Kollagen-Fibrillen)

- Die kovalente Bindung von kleinen Signalproteinen an das Zielprotein bei posttranslationalen Proteinmodifikationen wie Ubiquitylierung, NEDDylierung und SUMOylierung

6.4.1. Small ubiquitin related modifier (SUMO)

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Regulierung eines dieser posttranslationalen modifizierenden Prozesse, die SUMOylierung durch die Sentrin spezifischen Proteasen (SENPs). Das SUMO (**S**mall **u**biquitin **r**elated **m**odifier)-Protein katalysiert einen als SUMOylierung bezeichneten Prozess bei dem SUMO-Proteine kovalent an einen Lysinrest des Zielproteins gebunden werden. Dieser Prozess kann die Funktion, Lokalisation, Stabilität aber auch die Proteinwechselwirkung des modifizierten Zielproteins entscheidend beeinflussen^{59,60}. Neben diesen Einflüssen auf ihre direkten Zielproteine können SUMOylierungen ebenso die Transkription anderer Proteine durch Modifikationen von Transkriptionsfaktoren beeinflussen⁶¹.

Bekannt sind in Säugern vier SUMO-Proteine (SUMO-1, -2, -3 und -4). Aufgrund ihrer hohen (98%igen) Homologie werden SUMO-2 (103 AS) und -3 (112 AS) in der Literatur zumeist gemeinsam betrachtet. Sie sind beide ubiquitär exprimiert. Gegenüber SUMO-1 (101 AS) beträgt die Homologie lediglich 43% (Abbildung 4)⁶². SUMO-4, das in der Literatur häufig als Pseudogen angesprochen wird, konnte zwar in Nierenzellen und Immungewebe nachgewiesen werden, seine Funktion bleibt bisher allerdings unbekannt^{63,64}.

Betrachtet man die Struktur der SUMO-Proteine im Detail, so erkennt man deutlich, trotz einer geringen Homologie der Primärsequenz, eine starke Ähnlichkeit in der 3D-Struktur von Ubiquitin und SUMO (siehe Abbildung 4b)⁶⁵. Ubiquitin ist ebenfalls für eine posttranslationale Modifikation verantwortlich. Im Gegensatz zur SUMOylierung ist die Wirkung des Ubiquitins eher proapoptotisch⁶⁶⁻⁶⁸. In einigen Fällen konkurrieren Ubiquitin und SUMO sogar um den gleichen Lysinrest Ihres Zielproteins^{60,69}. Funktionell dient die SUMOylierung im Gegensatz zur Ubiquitinierung allerdings in erster Linie der Stabilisierung von Zielmolekülen und nicht dem Markieren der Zielproteine für den späteren Abbau. Neben dieser Funktion hat SUMO auch weiteren Einfluss auf seine Zielproteine beispielsweise auf deren Lokalisation oder Substratspezifität⁷⁰⁻⁷².

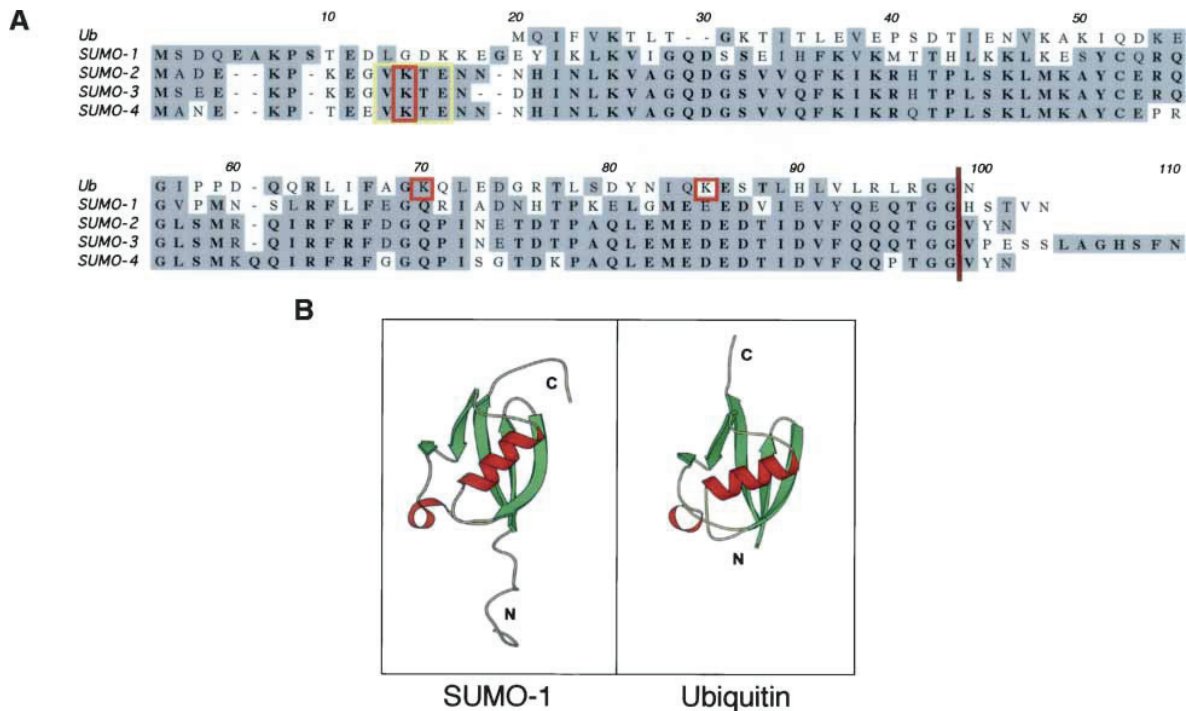


Abbildung 4 Struktur der SUMO-Proteine und Ubiquitin

A) Vergleich der Sequenz der SUMO-Proteine 1 bis 4. Übereinstimmende Sequenzbereiche von SUMO Proteinen wurden farblich hervorgehoben. SUMO-1 weist nur eine 43%ige Homologie zu SUMO-2/-3 auf. Untereinander unterschieden sich die SUMO-2/3 Proteine kaum (98% Homologie).

B) Strukturen von SUMO-1 und Ubiquitin im Vergleich. Deutlich zu erkennen ist die strukturelle Verwandtschaft der Proteine, beide weisen vier β -Faltblattstrukturen sowie strukturell ähnlich angeordnete α -Helices auf (Abbildung nach Gill *et al.* 2004⁷³).

6.4.2. Vergleich von Ubiquitinierung und SUMOylierung

Das ubiquitär exprimierte Ubiquitin ist eines der zentralen posttranslational modifizierenden Moleküle in der Zelle. Dieses Protein ist gut untersucht und seine essentielle Rolle bei der Proteindegradation weitreichend verstanden. Die Bindung dieses Modifikationsmoleküls an Zielproteine erfolgt über eine Proteinbindung, der sogenannten Ubiquitinierung und beeinflusst die Eigenschaften der Zielproteine reversibel. Diese Modifikation kann sich auf Lokalisation, Stabilität aber auch auf die Funktion der Proteine auswirken⁶⁶. Zielproteine für eine Ubiquitinierung findet man vornehmlich im Zytoplasma, der Membran, im Zellkern oder dem Endoplasmatischen Reticulum. Die zellulären Prozesse an denen die Proteine, die modifiziert werden beteiligt sind, haben sehr unterschiedliche Funktionen in der Zelle. Diese Funktionen reichen von der Regulation der Chromatinstruktur über DNA-Replikation/Reparatur⁶⁰, Steuerung der subzellulären Lokalisation bis hin zu epigenetischen Prozessen der Histondeactylasen. Je nach Anzahl der gebundenen Ubiquitin-Moleküle unterscheidet man zwischen einer Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung. Zur Ubiquitin-Proteinfamilie gehören weiterhin NEDD8 und die SUMO-Proteine auf deren

Modifikationskreislauf hier näher eingegangen werden soll. Wie auch im Ubiquitinierungskreislauf, findet die Modifikation mit SUMO über eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und einer ϵ -Aminogruppe des Akzeptorlysins im Zielprotein statt. Auch in den einzelnen Schritten des Prozesses weist die SUMOylierung deutliche Ähnlichkeit zur Ubiquitinierung auf⁷³. Abbildung 5 zeigt schematisch die einzelnen Schritte der SUMOylierung.

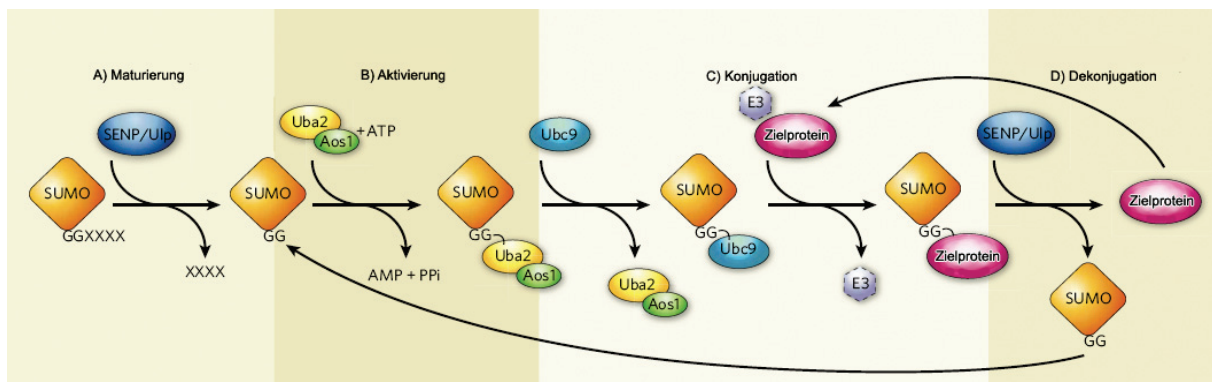


Abbildung 5 Schematische Übersicht der SUMOylierungsprozesse

Der SUMOylierungsprozess teilt sich in drei unterschiedliche Schritte auf. A) Die Maturierung katalysiert durch SENP Proteasen setzt ein N-terminales Doppelglycinmotif frei B) Die Aktivierung durch einen Heterodimer aus Uba2 und Aos1 (auch als SAE1 und SAE2 bezeichnet) kann durch ATP Verbrauch das SUMO-Protein aktivieren. C) Die Konjugation über Ubc9 und eine der SUMO E3 Ligasen bindet SUMO an sein Zielprotein. D) Die SUMO-Dekonjugation erfolgt ebenfalls über SENP Proteasen und kann die SUMO-Bindung an das Zielprotein wieder lösen (Abbildung modifiziert nach Meulmester 2008⁷⁴).

Die SUMOylierung beginnt mit einem immaturierten SUMO Vorläufer. Dieser ist inaktiv und wird erst nach einer C-terminalen Prozessierung durch ein Mitglied der SUMO/Sentrin-spezifischen Proteasen (SENP) aktiviert⁷⁵. Die so aktivierte Form trägt ein C-terminal freigelegtes Doppelglycin-Motiv.

Die Konjugation von SUMO an ein Zielprotein wird durch einen ATP-abhängigen Schritt eingeleitet. Ein SUMO aktivierendes Enzym E1 (AOS1/UBA2) bindet hierzu das SUMO Molekül⁷⁶⁻⁷⁸. Das E1 Enzym geht über die C-terminale Carboxygruppe des SUMO-Proteins eine intermediäre Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms ein. Daraufhin bildet das konjugierende Enzym E2 (Ubc9) einen Thioester mit SUMO aus, auch hier über ein Cystein im aktiven Zentrum des E2-Enzyms^{79,76,80}. Das E1 wird durch Bindung des E2-Enzyms vom SUMO-Protein verdrängt. Im finalen Schritt kommt es zur Übertragung von SUMO auf das Zielprotein⁸¹. Für diesen Schritt konnte gezeigt werden, dass dieser auch in Abwesenheit der E3-Enzyme ablaufen kann so z.B. die Bindung von SUMO-1 an RANGAP. Zu ihnen zählen unter anderem *Protein Inhibitors of Activated STAT family* (PIAS) Proteine⁸². Die so entstandene Bindung zwischen SUMO und dem Zielprotein ist reversibel. Durch SUMO spezifische Porteesen der SENP-Familie kann SUMO wieder von seinen Zielproteinen dekonjugiert werden (Auftrennung einer Amidbindung von einem konjugierten

Lysin). Hierdurch kann das SUMO-System äußerst flexibel auf äußere Faktoren (Hypoxie/Hitzeshock) reagieren⁸³⁻⁸⁵. Die geringe basale SUMOylierung in den Zellen kann kurzfristig stark erhöht werden und nach dem initiiierenden Stressfaktor unmittelbar wieder auf den Ausgangswert zurückgesetzt werden. Über die reine mono-SUMOylierung hinaus können sich die SUMO-2/3 Proteine ähnlich wie Ubiquitin untereinander komplex vernetzen und poly-SUMO-2/3 Ketten ausbilden⁸⁶. Dieser Editierungsschritt unterscheidet sich chemisch nicht von der Bindung SUMOs an ein Zielprotein, ist aber bisher nur unzureichend verstanden. In der Hefe *Sacharomyces pombe* ist die poly-SUMOylierung essentiell für die Replikation⁸⁷.

Diese massiven Änderungen in der SUMOylierung können eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die Histonmodifikation und hierdurch die Genaktivität beeinflussen. Dies hat umfassende Auswirkungen auf die betroffenen Zielproteine und Zellen.

6.4.3. Das SUMO-Motiv

SUMOylierungen können über kovalente und nicht kovalente Bindungen des SUMO-Proteins an das Zielmolekül erfolgen. Um eine Isopeptidbindung mit einem Zielprotein bilden zu können wird ein Lysin (K) benötigt, welches sich in der Regel eingebettet in einem SUMO-Motiv befindet und als spezifische SUMOylierungsstelle dient. Das charakteristische Konsensusmotiv für eine SUMOylierung in den Zielproteinen lässt sich durch die Abfolge von vier Aminosäuren ΨKxE erfassen, Ψ bezeichnet eine beliebige alipatisch verzweigte Aminosäure, x jede beliebige Aminosäure^{79,88}. Neuere Forschung zeigt, dass es neben diesen Motiven zwei weitere SUMO-Motive gibt. Eines dieser Motive ist ein phosphorylierungsabhängiges SUMO-Motiv, welches im Hitzeschockfaktor-1 zu finden ist^{83,89}. Im Kern besteht dieses zwar aus der charakteristischen Motivsequenz, wird allerdings von einem phosphorylierten Serin und einem Prolinrest ($\Psi KxE_{xpp}SP$) erweitert. In der Literatur werden weitere Motive beschrieben, so beschreiben Yang *et al.* ein SUMO-Motiv, welches negative Aminosäurereste C-terminal vom Lysin trägt und als NDSM (*negatively-charged amino-acid-dependent sumoylation motif*) bezeichnet wird⁸⁸. Weiterhin sind die sogenannten SIM/SBM-Motive zu nennen (*SUMOinteraction/SUMO Binding-Motifs*)⁹⁰. Kennzeichnend ist in diesen Motiven eine hydrophobe Kernsequenz N- oder C-terminal flankiert von sauren und/oder Serinresten⁷⁹. Es gibt Hinweise auf die Bindungen von E3-ähnlichen Faktoren an das SUMO-Motiv in Zielproteinen die zu einer effizienteren SUMOylierung führen^{70,91}.

6.4.4. Sentrin spezifische Proteasen (SENP)

Sowohl die Maturierung als auch die Dekonjugation der SUMO-Proteine wird von spezifischen Proteasen katalysiert, den Sentrin spezifischen Proteasen (SENPs). Die Familie der SENPs besteht aus 8 Proteasen (siehe Tabelle 3) denen allen eine C-terminale katalytische Domäne zu eigen ist (siehe Abbildung 6)⁹². Obwohl sie sich in ihrer Sequenz erheblich (20-60%) unterscheiden, weist diese etwa 220 AS lange Domäne stets eine charakteristische Triade (His-Asp-Cys) der Cysteinyln-Proteasen auf.

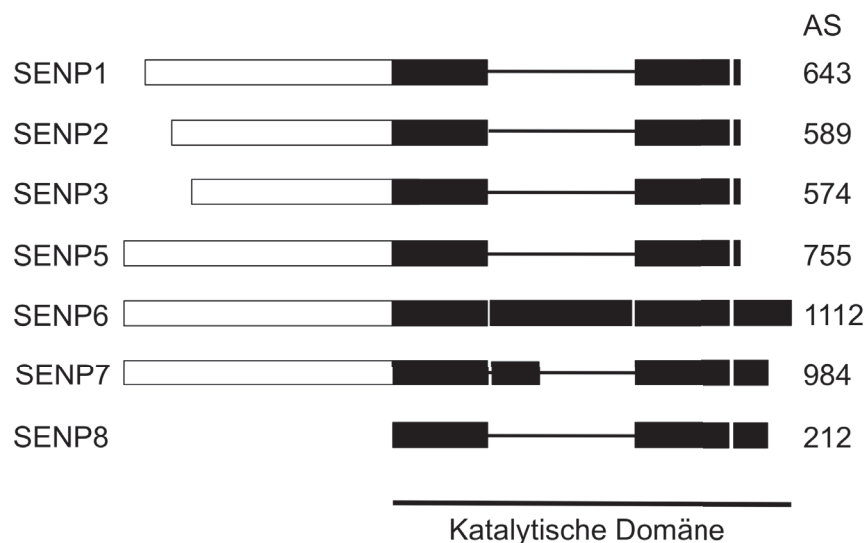


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Sentrin spezifischen Proteasen

Die konservierte katalytische Domäne ist in schwarz dargestellt. In weiß sind die nicht konservierten N-terminalen Regionen unbekannter Funktion dargestellt. AS: Länge des Proteins in Aminosäuren. Da SENP4 ein Pseudogen ist, wird es hier nicht aufgeführt (modifiziert nach Drag 2008⁹³).

Die zwei wesentlichen Funktionen der SENPs, die Maturierung des SUMO-Vorläufers und die Dekonjugation der Isopeptidbindung zwischen SUMO und Zielprotein, können von den verschiedenen SENPs mit unterschiedlicher Präferenz durchgeführt werden. So zeigt SENP2 eine deutliche Präferenz für die Prozessierung von SUMO gegenüber der Dekonjugation von SUMO. Im Fall der Dekonjugation unterscheidet die Protease allerdings nicht zwischen den unterschiedlichen SUMO-Proteinen⁹⁴. Demgegenüber sind SENP6 und 7 nur in geringem Maß zur Prozessierung bzw. zur Dekonjugation von SUMO fähig. In beiden Prozessen zeigen sie allerdings eine klare Bevorzugung von SUMO-2/3⁹⁶. In den jüngeren Publikationen werden diese beiden Proteasen aufgrund ihrer Insertion in der katalytischen Domäne als eine Unterfamilie der SENPs zusammengefasst, die für eine weitere wichtige Funktion, die SUMO-Ketteneditierung zuständig sind⁹⁵.

Auch die Lokalisation der unterschiedlichen SENPs in der Zelle weist Unterschiede auf. So findet man sie häufig nuklear⁸², aber auch in der Peripherie des Nukleus und an den Zellkernporen (Tabelle 3). Neue Publikationen wiesen auf flexiblere Lokalisationsmuster für

SENPs hin^{97,98}. Die zelluläre Lokalisation der SENP-Proteine ist durch die N-terminalen Sequenzen bestimmt. Diese Sequenzen, (so postuliert) sollen auch die Aktivität der SENPs regulieren⁹³. Die Gruppe der Proteasen spielt an den Schlüsselpunkten der SUMOylierung (Maturierung und Dekonjugation) als Hydrolase oder Dekonjugase eine essentielle Rolle^{99,100}. Eine dieser SENP Proteasen SENP8 (auch DEN1 oder NEDP1), ist spezifisch für ein anderes *Ubiquitin like protein*, NEDD8¹⁰¹.

Tabelle 3 Sentrin spezifische Proteasen, Lokalisation und Prozesse

Bezeichnung	Lokalisation	Prozessierung	Dekonjugation	Ketteneditierung
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Ulp1	Nukleare Peripherie	Ja	Ja	Nein
Ulp2	Nukleoplasma	Nein	Ja	Ja
<i>Homo sapiens</i>				
SEN1	Punktuell im Nukleus Zellkernporen	SUMO-1> SUMO-2> SUMO-3 *	SUMO-1/2/3	-
SEN2	Zellkernporen	SUMO-1> SUMO-2> SUMO-3	SUMO-1/2/3	-
SEN3	Nukleolus	Unbekannt	SUMO-2/-3	-
SEN5	Nukleolus	SUMO-3	SUMO-2/-3	-
SEN6	Nukleoplasma	- (schwach)	SUMO-1	SUMO-2/3
SEN7	Nukleoplasma	- (schwach)	- (schwach)	SUMO-2/3
SEN8	Nukleoplasma	-	-	-

* SUMO-1>SUMO-2>SUMO-3: Prozessierung von SUMO-1 ist stärker als die SUMO-2 Prozessierung und diese wiederum stärker als die SUMO-3 Prozessierung (Modifiziert nach Kim *et al.* 2007¹⁰²).

SEN5 ist eine Protease mit einer klaren Präferenz für die Hydrolaseaktivität und die Dekonjugaseaktivität der SUMO-2/3 Proteine. Diese Protease spielt in erster Linie eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung, der Proliferation¹⁰³ wie auch bei der Differenzierung¹⁰⁴. Insbesondere die Translokation von SEN5 aus dem Nukleus in die Mitochondrien während des Übergangs der G2 zur M-Phase der Mitose, welche durch Zunino *et al.* beobachtet wurde, unterstreicht die flexible Lokalisation von SEN5 und dessen Rolle bei der Zellteilung⁹⁸. SEN7 bildet mit SEN6 eine Unterfamilie, die durch eine Insertion in der katalytischen Domäne gekennzeichnet ist. In ihrer Arbeit konnten Lima *et al.*

identifizieren, dass diese Insertion essentiell für die Ketteneditierung von SUMO-2/3 ist⁹⁵. Biochemische und strukturelle Analysen zeigten, dass innerhalb der Insertion 3 *loops* vorhanden sind, von denen lediglich *loop* 1 essentiell für die Funktion der Protease ist¹⁰⁵. Mutationen in diesem *loop*-Motiv bestätigten, dass SENP6 und 7 über diese Sequenz die Spezifität für die SUMO-2/3-Ketteneditierung vermittelt wird¹⁰⁵. Durch verschiedene Mutationen im *loop1* wie das Ersetzen von vier Prolinen durch vier Glyzine, die Komplettdelation des *loop1* und eine Punktmutation des Lysin 691 zu Glutamin zeigte sich eine Reduktion der katalytischen Aktivität der SENPs. Die Mutation im *loop1* bewirkte einen Wechsel der Substratspezifität von SENP7 zu einer reinen Maturierungs- und Dekonjugationsprotease für SUMO-2/3 wie SENP5¹⁰⁵.

6.4.5. SUMOylierungsprozesse in Krankheitsprozessen

Die noch sehr junge Forschung an SUMO und seinen Proteasen den SENPs besteht bis zum jetzigen Zeitpunkt primär aus Untersuchungen mit sehr stark biochemisch geprägten Fragestellungen, sowie der Charakterisierung von am SUMOylierungsprozess beteiligten Enzymen und der Identifizierung von SUMO-Zielproteinen.

Doch allein aus der zentralen Rolle der Proteinmodifikation durch SUMO lässt sich annehmen, daß verschiedene Krankheitsbilder von einem Ungleichgewicht der SUMOylierungsmuster betroffen sein könnten. Bekannt ist eine Rolle an unterschiedlichen Krebserkrankungen. Im Besonderen wird hier die Regulierung von Tumornekrose- oder Supressorgen untersucht. So zum Beispiel PTEN, Daxx oder PML, p53¹⁰⁶. Die Rolle bei der Zellteilung und Apoptose unterstreichen die Bedeutung von korrekten SUMOylierungsmustern¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Aber auch andere Erkrankungen rücken in den Fokus der Forschung. So konnten Meineke *et al.* zeigen, dass SUMO-1 einen deutlichen Einfluss auf FAS induzierte Apoptose hat¹. Durch eine Überexpression von SENP1 konnte die Empfindlichkeit der deutlich resistenteren RASF auf eine FAS-Ligand Stimulierung wieder normalisiert werden. Jüngere Publikationen identifizieren SUMO-4-Mutationen als einen Faktor bei der Vorbelastung für Rheumatoide Arthritis¹¹⁰. Neben Tumorzellen sind Einflüsse der SUMOylierung bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonerkrankung¹¹¹, Huntingtonsche Erkrankung¹¹² oder der Alzheimererkrankung bekannt¹¹³⁻¹¹⁶. SUMO-4 ist als der Suszeptibilitätsfaktor für Typ 1 Diabetes in der Diskussion¹¹⁷⁻¹²⁰. Verbindungen der SENPs zu Krankheitsbildern sind bisher in erster Linie in verschiedenen Krebsarten gezeigt worden^{104,108,121}. So zeigte sich, dass in Prostata Adenokarzinomzellen (LNCaP) SENP1 auf typische Proteine onkogener Signalwege einwirkt, wie zum Beispiel den Androgenrezeptor (AR), c-Jun und Cyclin-D1¹²². Die Expression von SENP1 ist in der colorektalen

Adenokarzinom Zelllinie DLD-1 erhöht und wirkt auf das Wachstum der Zellen ein¹²³. Hierüber hinaus finden sich keine klaren Bezüge zu anderen Krankheitsbildern wie für SUMO. Der Einfluss der SENP-Proteasen auf Faktoren in diverseren Signalwegen wie zum Beispiel *wnt*¹²⁴, *p53*^{109,125,126} aber auch an der Hypoxie^{85,89} lässt eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese verschiedenster Krankheiten vermuten. Zieht man die publizierten Daten in Betracht, so sind die SENPs an der Proliferation, der Apoptose und der Hypoxie beteiligt^{97,98,103,125}. Diese Beteiligung macht diese Proteasen interessant, zeigen doch RASF krankhafte Veränderungen in diesen Prozessen. Die verminderte Empfindlichkeit für von RASF für die Apoptose, was insbesondere die FAS induzierte Apoptose für die Pannusbildung verantwortlich zu sein scheint^{26,27,40,56}. Innerhalb des massiv angewachsenen Pannusgewebes herrscht eine erhöhte Hypoxie³⁹. Die bisherigen *knock-out* Mäuse zu den SENP-Proteinen zeigen alle einen lethalen Phänotyp im frühen Blastozystenstadium oder im Embryonalstadium und lieferten daher keine Erkenntnisse zu den funktionellen Aufgaben der SENPs.

7. Ergebnisse

7.1. Die SUMO-2/3 Expression in Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis

Aufbauend auf den Arbeiten von Meineke *et al.*¹²⁷ und Baier *et al.*¹²⁸, die eine verstärkte Expression von SUMO-1 in RASF zeigen konnten, wurde im ersten Schritt die Expression von SUMO-2/3 in humanem Synovialgewebe untersucht. Hierzu wurde das in Paraffin eingebettete Synovialgewebe von verschiedenen RA- und OA-Patienten immunhistologisch gefärbt (siehe 10.3.1) und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. Der verwendete polyklonale Antikörper α -SUMO-2/3 von Chemikon (Ab3876) detektiert aufgrund der hohen Homologie von SUMO-2 und SUMO-3 stets beide Proteine. Zusätzlich zu freiem SUMO-2/3 weist dieser Antikörper gebundenes SUMO-2/3 an den Zielproteinen nach.

Abbildung 7 zeigt in den ersten drei Bildern repräsentative Färbungen dieser Gewebeschnitte. Im OA-Synovialgewebe konnte eine spezifische Färbung von SUMO-2/3 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu war die spezifische Färbung von SUMO-2/3 in RA-Synovialgewebe deutlich erhöht. Besonders im *synovial lining layer* der RA-Synovialgeweben zeigte sich eine starke Färbung und somit eine starke Expression von SUMO-2/3. Diese Bereiche der Synovialmembran sind unter Anderem für die Adhäsion an den Knorpel und Knochen verantwortlich.

Die Quantifizierung der spezifischen histologischen SUMO-2/3 Färbungen erfolgte durch Auszählung der synovialen Zellen anhand der Färbeintensitäten. Der Grad der Färbeintensität wurde unterteilt in negativ (keine Färbung), positiv (eine spezifische Färbung) und stark positiv (starke spezifische Färbung). Die prozentuale Verteilung der Färbeintensitäten in den RA- und OA-Synovialgeweben ist ebenfalls in Abbildung 7 abgebildet. Der prozentuale Anteil der gesamt positiven, ausgezählten Zellen unterschied sich deutlich zwischen RA- (94,33% \pm 3.314%) und OA-Synovialgewebe (74,49% \pm 19.22%). Eine statistische Untersuchung zeigte allerdings keine Signifikanz (*unpaired t-test*, $p=0,3664$).

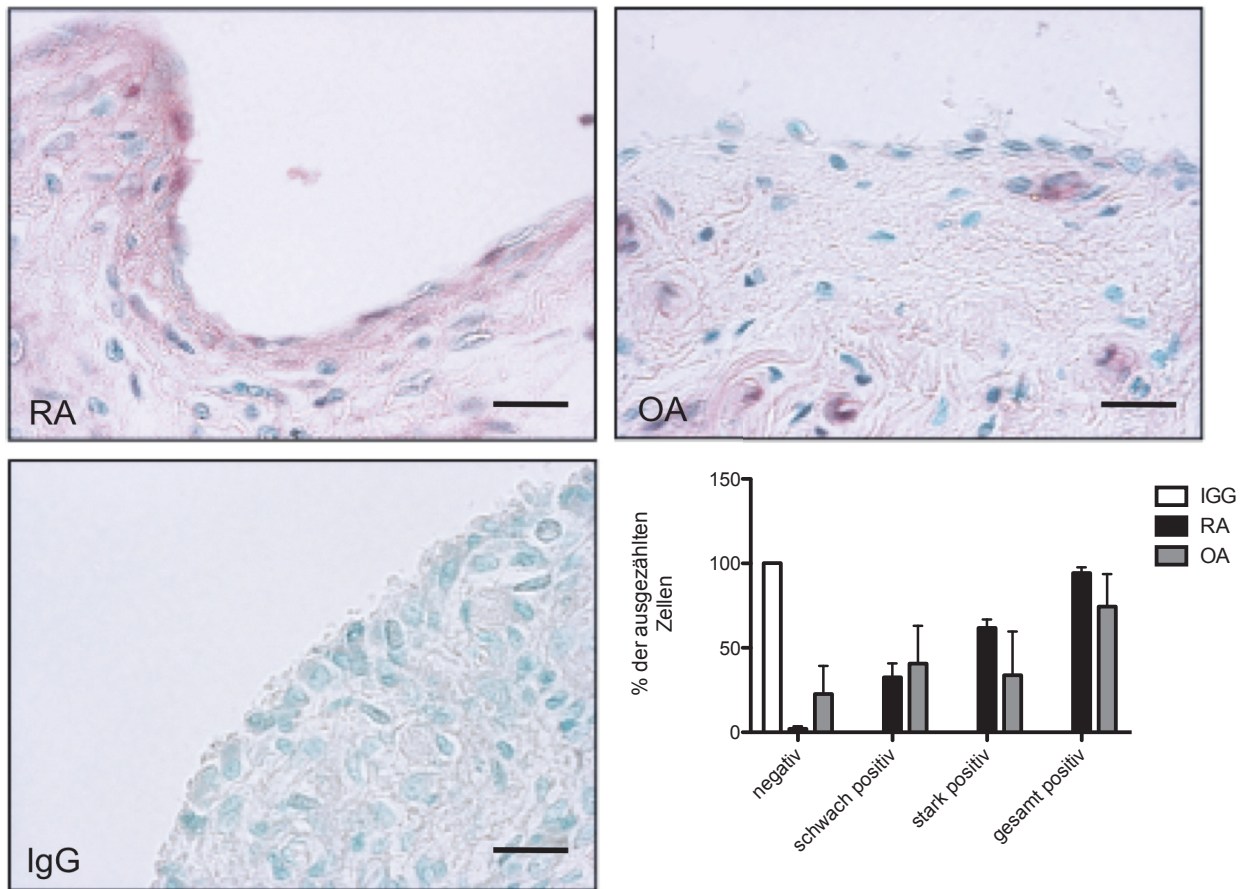


Abbildung 7 Expression von SUMO-2/3 in Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten

Paraffinschnitte von Synovialgeweben von RA- (RA) und OA-Patienten (OA) wurden mit einem SUMO-2/3 spezifischen Antikörper (rot, Verdünnung 1:300) immunhistologisch gefärbt. Als Kernfärbung wurde eine Färbung mit Methylgrün (grün) durchgeführt. Um unspezifische Bindungen des sekundären AK auszuschließen wurde das Synovialgewebe eines RA-Patienten mit einem IgG AK (IgG) gefärbt (*Anti-biotylated rabbit IgG*, Vector BA-2001). Die Bilder der spezifischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch aufgenommen (Olympus BX51, Vergrößerung 40 fach, n=3, Maßstabsbalken 20 µm).

In den Färbungen von Synovialgewebe wurden die SF nach Intensität der AK-Färbung ausgezählt. Hierbei wurde zur Unterscheidung ein Scoring mit drei Kategorien (negativ =keine Färbung, schwach positiv= schwache Färbung, stark positiv= starke Färbung) verwendet. Die prozentualen Anteile der Zellen innerhalb dieser drei Kategorien wurden ermittelt und miteinander verglichen (n=3).

In der *synovial lining layer* der Synovialmembran von RA-Patienten sind vermehrt aktivierte Synovialfibroblasten (RASf) zu finden. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob sich die verstärkte Expression von SUMO-2/3 Proteinen in den RA-Synovialgeweben auf die erhöhte Expression von SUMO-2/3 in RASf zurückführen lässt, wurden mittels Western-Blot Analyse Gesamtproteinextrakte aus kultivierten primären RASf und OASf *in vitro* auf die Expression von SUMO-2/3 untersucht. Auch in diesem Versuch wurde der polyklonale Antikörper von Chemikon (Ab3876) verwendet.

In Analogie zu den Gewebeuntersuchungen war in den RASf eine stärkere SUMOylierung der Zielproteine durch SUMO-2/3 zu detektieren als in den OASf (Abbildung 8). Darüber

hinaus zeigte sich in den RASF eine verstärkte SUMOylierung der Zielproteine im höheren molekularen Bereich (bei 70 bis 120kDa). Die Proteine der OASF waren nur schwach durch SUMO-2/3 in diesem Bereich SUMOyliert. Somit konnte mit diesen Versuchen erstmals gezeigt werden, dass die SUMOylierung der Zielproteine durch SUMO-2/3 in den RASF erhöht ist.

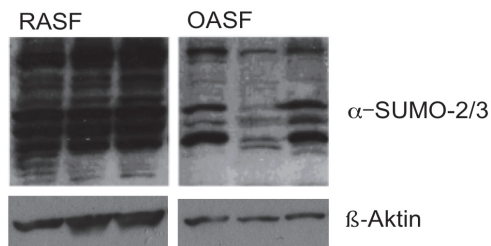


Abbildung 8 SUMOylierung in RASF und OASF

Mittels eines α -SUMO-2/3 Antikörpers (1:500, 3% BSA TBS) wurde die SUMOylierung durch SUMO-2/3 auf Proteinebene in RASF und OASF untersucht (30 μ g Protein, 10% SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, n=4). Gesamtproteinextrakte aus kultivierten Synovialfibroblasten von jeweils drei verschiedenen RA- und OA-Patienten wurden im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (1:1000, 3% BSA

7.2. Der Einfluss von *SEN5* auf die stabile Aktivierung von Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis

7.2.1. Die *SEN5* Expression ist im RA-Synovialgewebe leicht erhöht

Die SUMOylierungen von Zielproteinen mit SUMO-2/3 wird unter Anderem durch SUMO-2/3 spezifische Proteasen der *SEN5*-Familie reguliert. Diese Proteasen katalysieren den Prozess der SUMO Maturierung und die Dekonjugation von SUMO-2/3 von ihren Zielproteinen (siehe 6.4.4). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Proteasen *SEN5* und *SEN7* eine starke Präferenz für SUMO-2/3 aufweisen. Daher fokussierte sich das Interesse dieser Arbeit auf die unbekannte Rolle von *SEN5* und *SEN7* in der RA.

Analog zu den Untersuchungen von SUMO-2/3 wurde die Expression von *SEN5* in RA- und OA-Synovialgewebe analysiert. Die entsprechenden Paraffinschnitte wurden mit einem α -*SEN5* spezifischen Antikörper (Abcam Ab58420) gefärbt und im Anschluss lichtmikroskopisch untersucht.

Abbildung 9 sind exemplarisch die spezifischen Färbung von *SEN5* in Synovialgeweben von RA- und OA-Patienten dargestellt. In den Paraffinschnitten der RA-Synovialgewebe konnte eine deutlich erhöhte Expression von *SEN5* sowohl im *synovial lining layer* wie auch im *sublining* der Synovialmembran detektiert werden. Im Vergleich zeigten die Färbungen der Paraffinschnitte der OA-Patienten nur eine schwache *SEN5* Expression.

Die Quantifizierung der Färbungen erfolgte wie für die SUMO-2/3 Histologien (siehe Abschnitt 7.1). Die prozentuale Verteilung der Färbeintensitäten ist in der Grafik in Abbildung 9 dargestellt. Der prozentuale Unterschied der gesamt positiven Zellen zwischen RA-

(76,77% \pm 2,259%) und OA-Synovialgewebe (62,43% \pm 8,586%) war nicht statistisch signifikant (*unpaired t-test*, $p = 0,1818$).

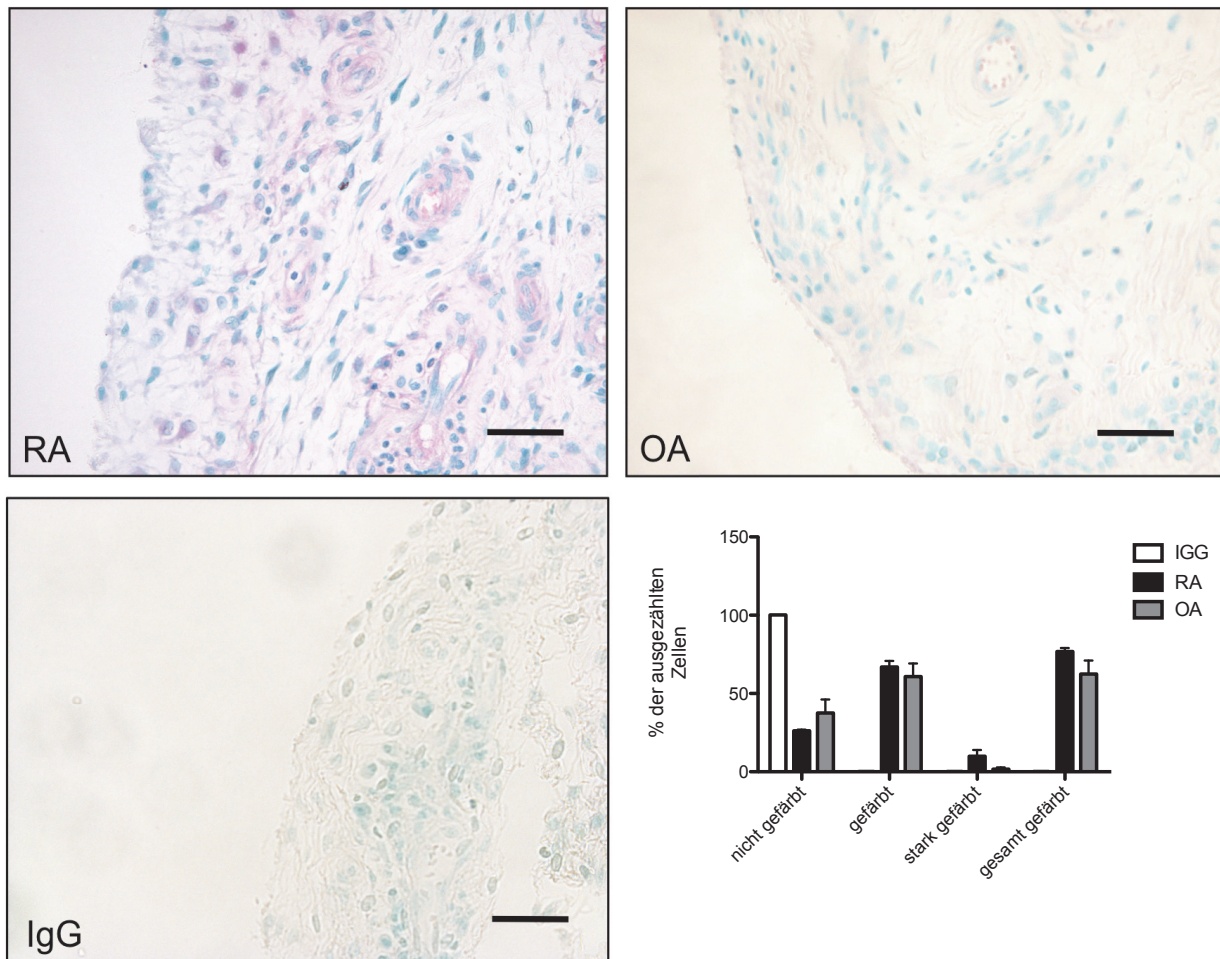


Abbildung 9 Expression von SENP5 in Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten

Paraffinschnitte von Synovialgeweben von RA-Patienten (RA) und OA-Patienten (OA) wurden mit dem biotinylierten SENP5 spezifischen Antikörper histologisch gefärbt (rot, Verdünnung 1:300). Als Kernfärbung wurde eine Gegenfärbung mit Methylgrün (grün) durchgeführt. (IgG) IgG-Kontrolle in RA-Gewebe. Die Bilder der spezifischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch aufgenommen (Olympus BX51, 40fache Vergrößerung $n=3$, Maßstabsbalken 20 μm).

In repräsentativen Färbungen von Synovialgewebe wurden die SF nach Intensität der AK Färbung ausgezählt. Hierbei wurde unterschieden zwischen negativ =keine Färbung, schwach positiv= schwache Färbung, stark positiv= starke Färbung. Die prozentualen Anteile der Zellen innerhalb dieser drei Kategorien wurden ermittelt und miteinander verglichen ($n=3$).

Da in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass SUMO-2/3 verstärkt in RASF exprimiert wird, wurde in Analogie die Expression von SENP5 in primären RASF und OASF untersucht. Die Expression von SENP5 in kultivierten, primären Synovialfibroblasten von RA- und OA-Patienten wurde auf mRNA-Ebene mittels semi-quantitativer PCR untersucht. Abbildung 10A zeigt exemplarisch das Ergebnis eines durchgeführten PCR-Versuches. Die Expression von SENP5 konnte auf mRNA-Ebene in RASF und OASF nachgewiesen werden.

Die Stärke der nachgewiesenen SENP5 Expression wies in RASF keinen deutlichen Unterschied zur Expression von SENP5 in den OASF auf. Dies wurde auch durch die Quantifizierung der PCR-Banden bestätigt (siehe Abbildung 10 B, *unpaired t-test*, $p=0,8279$).

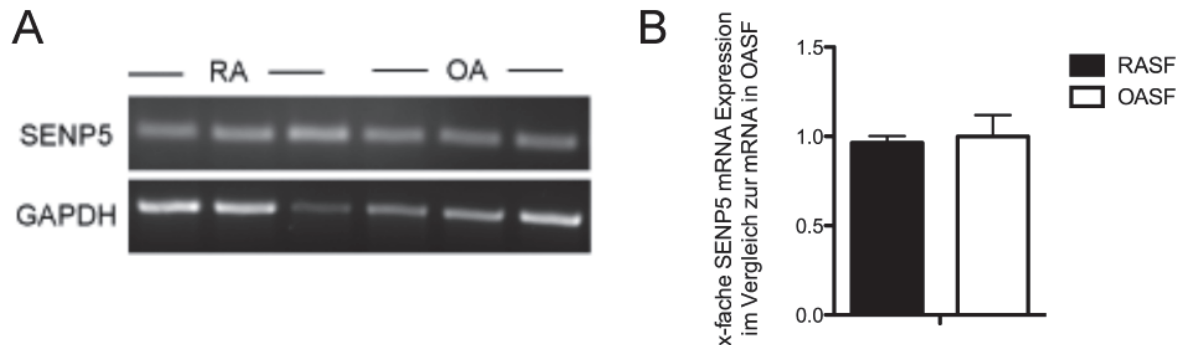


Abbildung 10 Expression von SENP5 in RASF und OASF

A Mittels einer semi-quantitativen PCR wurde die Expression der mRNA von SENP5 in RASF und OASF aus verschiedenen Patienten analysiert. Als Ladekontrolle wurde die mRNA von GAPDH amplifiziert (2%iges TAE-Agarosegel, $n=3$).

B Unter Verwendung der Software ImageJ (NIH, US) wurde die Intensität der SENP5 PCR-Banden ermittelt und diese gegen die Intensität der entsprechenden GAPDH PCR-Bande abgeglichen. Die erhaltenen Werte der PCR-Banden der RASF wurden gemittelt und mit dem Mittelwert der entsprechenden PCR-Banden der OASF verglichen (*unpaired t-test* $p=0,8279$).

7.2.2. Die Lokalisation von SENP5 in RASF ist nuklear

Um die Lokalisation von SENP5 in RA- und OASF zu untersuchen, wurden kultivierte, primäre Synovialfibroblasten von RA- und OA-Patienten gemäß 10.3.2 nach der Aussaat auf Deckgläsern fixiert und mit dem spezifischen α -SENP5 Antikörper (Abcam AB58420) gefärbt. Als Gegenfärbung wurde eine Propidiumiodidfärbung durchgeführt, mit der der Nucleus der Zellen visualisiert wurde.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem α -SENP5 spezifischen Antikörper zeigte in den primären Synovialfibroblasten der RA- und OA-Patienten eine deutliche Lokalisation von SENP5 im Nucleus (Abbildung 11). Die Überlagerung mit dem Propidiumiodidsignal des Nucleus lokalisierte das SENP5 Signal im Nucleus. Die Lokalisation von SENP5 wies zwischen den Synovialfibroblasten von RA- und OA-Patienten keinen Unterschied auf.

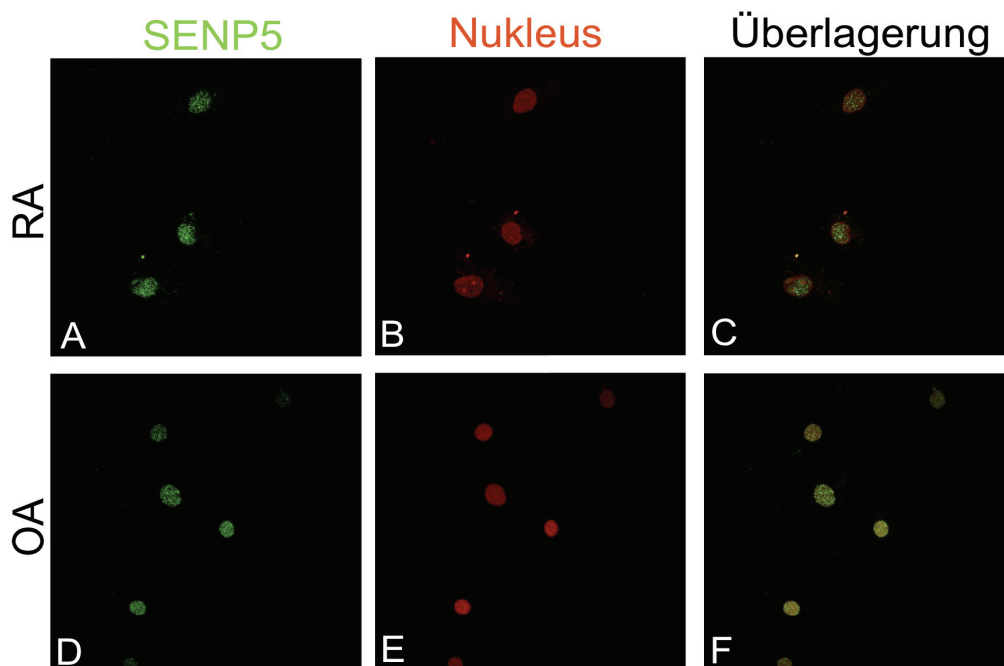


Abbildung 11 Lokalisation von SENP5 in RA- und OASF

Obere Reihe: SENP5 Lokalisation in RASF. Untere Reihe: SENP5 Lokalisation in OASF.

(A/D) SENP5 spezifische Färbung mittels eines α -SENP5 Antikörpers (grüne Fluoreszenz, 1:300, sekundärer AK rabbit, FITC gekoppelt, 1:1000)

(B/E) Nucleusfärbung mit Propidiumiodid (rote Fluoreszenz, 1:1000)

(C/F) Überlagerung der beiden Färbungen. Die Synovialfibroblasten wurden am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (Olympus BX51, 100fache Vergrößerung, n=3).

7.2.3. Die Expression von SENP5 ist im synovialen Gewebe der hTNFtg Maus stark erhöht

Analog zu den Untersuchungen in humanem Synovialgewebe und Synovialfibroblasten, wurden die Versuche in Synovialgewebe und -fibroblasten der hTNFtg bzw wt Maus durchgeführt. Für eine spezifische Färbung des Synovialgewebes wurden die Hinterpfoten 10 Wochen alter hTNFtg und wt Mäuse präpariert (zum Protokoll siehe 10.1.1). Mittels des α -SENP5 Antikörpers (Abcam AB58420) wurden die Metatarsusschnitte gefärbt. Als Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit Methylgrün gefärbt.

Die immunhistologische Färbung der Schnitte der murinen Metatarsi zeigte eine spezifische SENP5-Färbung der Synovialmembran der hTNFtg Maus (Abbildung 12). Morphologisch wies das untersuchte Gewebe der hTNFtg Maus eine starke Destruktion der Knochen- und Knorpelstrukturen auf (Pfeil). Die Ausbildung des Pannus ist deutlich zu erkennen (Stern). Demgegenüber zeigte die Färbung der Schnitte der Metatarsi der wt Maus nur eine schwache SENP5-spezifische Färbung.

Die Quantifizierung der SENP5-spezifischen Färbungen der wt und hTNFtg Metatarsalschnitten bestätigte einen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil der gesamt positiven Zellen in hTNFtg Schnitten im Vergleich zu den gesamten positiven Zellen der wt Präparate (*unpaired t-test*, $p=0,03259$). Insgesamt sind signifikant mehr synoviale Zellen im hTNFtg Metatarsalschnitt stark positiv gefärbt verglichen mit den synovialen Zellen der wt Präparate (*unpaired t-test*, $p= 0,0092$).

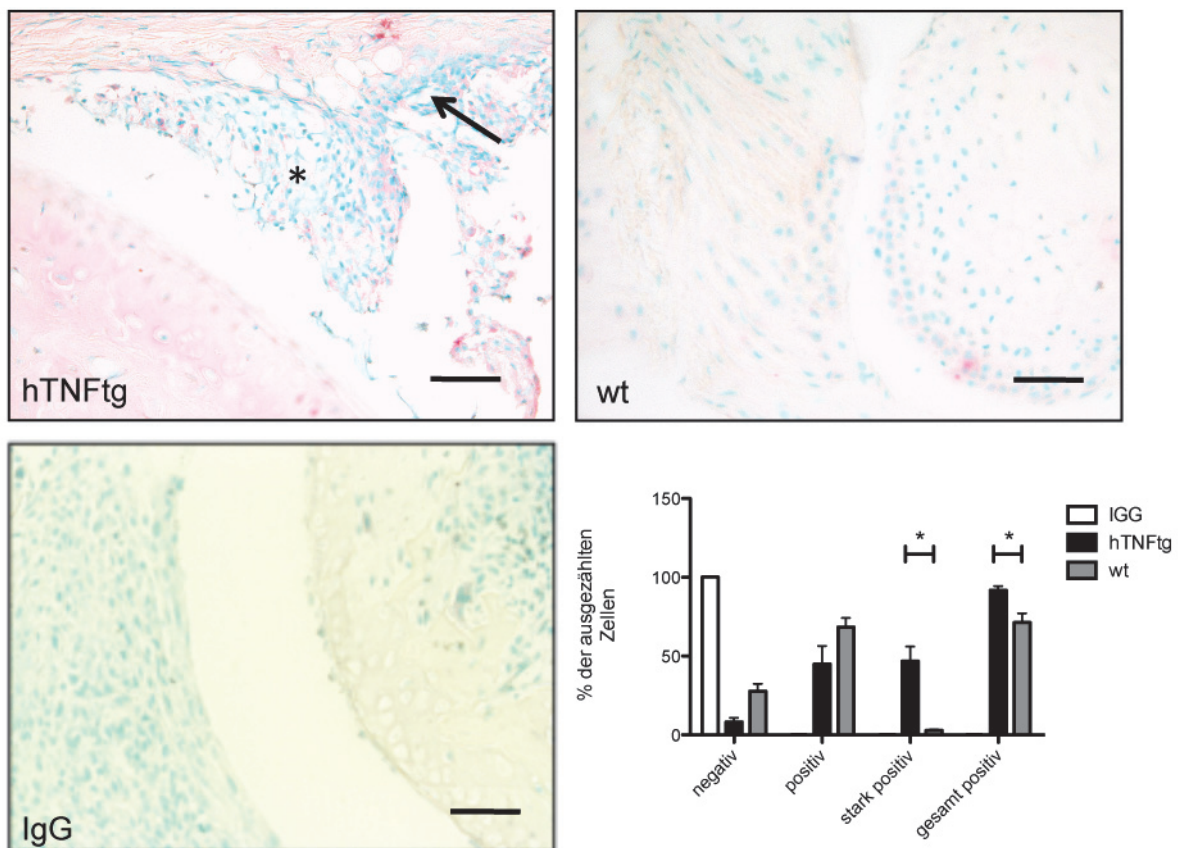


Abbildung 12 Expression von SENP5 in Metatarsalschnitten der wt und hTNFtg Mäuse

Immunhistologische Färbung von Schnitten des Mittelfußes einer 10 Wochen alten C57/BL6-wt Maus (wt) und einer gleichaltrigen hTNFtg Maus (hTNFtg) mit einem α -SENP5 spezifischen Antikörper (rot). (IgG) IgG Kontrolle eines wt Schnittes (anti-biotylated IgG, Vector BA-2001). Zur Kernfärbung wurde Methylgrün verwendet (grün). Stern: Pannusgewebe, Pfeil: Destruktion der artikulären Strukturen (Olympus BX51, 40 fache Vergrößerung, n=5, Maßstabsbalken 20 μ m).

In den Färbungen von Metatarsalschnitten wurden die gefärbten Zellen nach Intensität der AK-Färbung ausgezählt. Hierbei wurde zur Unterscheidung ein Scoring mit drei Kategorien (negativ =keine Färbung, schwach positiv= schwache Färbung, stark positiv= starke Färbung) verwendet. Die prozentualen Anteile der Zellen innerhalb dieser drei Kategorien wurden ermittelt und miteinander verglichen.

7.2.4. Die Überexpression von SENP5 steigert die Proliferationsrate muriner Synovialfibroblasten

Aufbauend auf den Veröffentlichungen zur Steigerung der Proliferation durch SENP5 war es von erheblichem Interesse, den Einfluss der Sentrin spezifischen Protease 5 auf die Proliferationsraten von SF zu untersuchen¹²⁹. Die SF wurden mit einem Expressionsvektor für SENP5 (SENP5GFP) oder einem Leervektor (pEGFP-C1) transfiziert. Anschließend wurde der BRDU ASSAY (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

Die Ergebnisse, in Abbildung 13 dargestellt, zeigten dass eine Überexpression von SENP5 in wt SF die Proliferationsrate schwach steigerte (*unpaired t-test*, $p= 0,4229$, dargestellt

durch die x-fache Steigerung der Absorption zum Leervektor). Als Kontrolle diente eine Transfektion mit dem Leervektor pEGFP-C1. Die Hemmung von SENP5 mittels einer SENP5 spezifischen siRNA verringerte die Proliferation der wt SF leicht (*unpaired, t-test* $p=0,8260$). Die Überexpression von SENP5 in hTNFtg SF führte zu einer starken Erhöhung der Proliferationsrate dieser SF. Die Proliferationsrate stieg um das 1,7 fache (*unpaired t-test, p=0,2623*). Der *knockdown* von SENP5 in den hTNFtg SF durch die spezifische SENP5 siRNA reduzierte die Proliferationsrate deutlich zum Leervektor (*unpaired t-test, p=0,0584*).

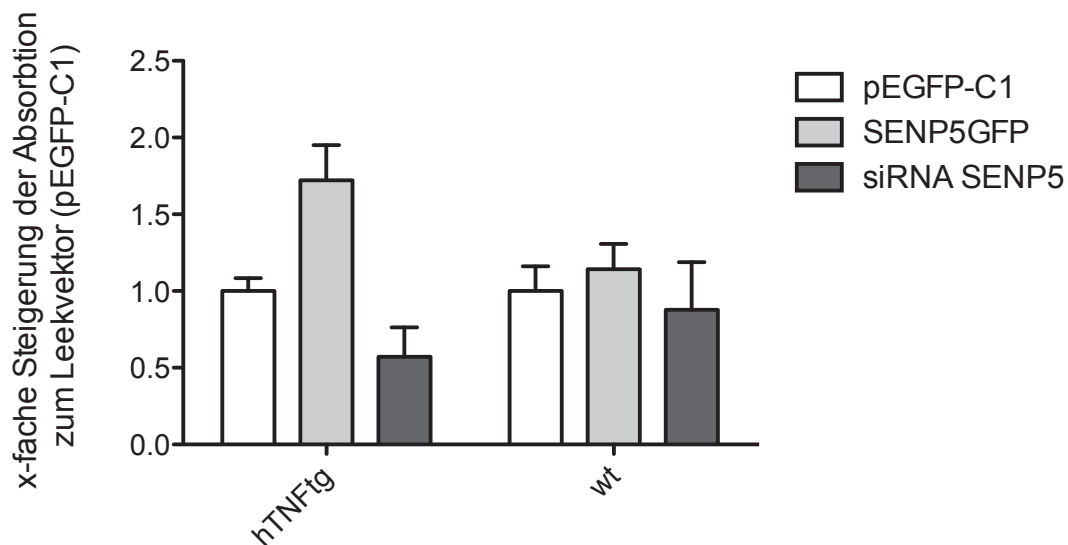


Abbildung 13 Proliferationsraten von murinen, primären Synovialfibroblasten nach Überexpression oder Hemmung von SENP5

Messung des BRDU Einbaus in hTNFtg und wt SF nach einer Transfektion mit einem SENP5 Expressionsvektor (SENP5GFP) bzw. einem Leervektor (pEGFP-C1). Die Proliferationsrate wurde durch die Messung der OD bei 450/550nm bestimmt. Die Proliferation des Leervektors wurde auf 1 normalisiert (n=3).

7.2.5. Einfluss der Überexpression von SENP5 auf die FAS-Ligand induzierte Apoptose von Synovialfibroblasten.

Meineke *et al.* konnten zeigen, dass die erhöhte SUMO-1 Expression eine verringerte Empfindlichkeit der RASF für FAS-Ligand induzierte Apoptose bewirkt. Diese verringerte Empfindlichkeit konnte durch die Überexpression von SENP1 normalisiert werden. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von SENP5 auf die Empfindlichkeit von humanen und murinen SF für FAS-Ligand induzierte Apoptose untersucht. Dazu wurde der *Promega Homogeneous Caspase3/7 Assay* (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet (siehe 10.4.7).

Die Überexpression von SENP5 durch den SENP5GFP Expressionsvektor in RASF verringerte im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten RASF sowohl die uninduziert als auch die FAS-Ligand induzierte Apoptose (Abbildung 14). Signifikanz konnte für diesen Unterschied jedoch nicht ermittelt werden (*unpaired t-test*, $p=0,5450$). Die Überexpression von SENP5 in OASF hatte keinen Effekt auf die Caspase 3/7 Aktivität dieser SF. Auch die Inkubation der Zellen mit dem FAS-Liganden führte zu keiner Steigerung der Caspase3/7 Aktivität (*unpaired t-test*, $p= 0,7306$).

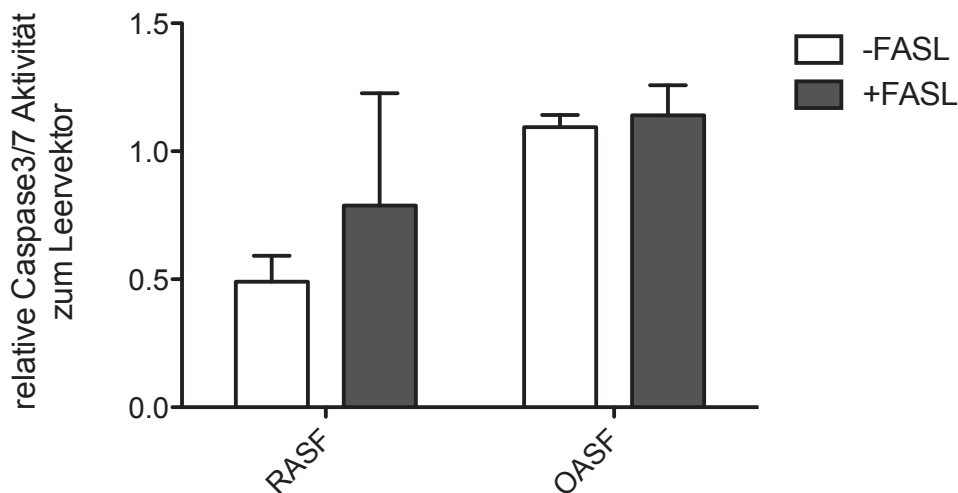


Abbildung 14: Einfluss der Überexpression von SENP5 auf die Caspase-3/7 Aktivität in RASF und OASF

Messungen der Caspase-3/7 Aktivität von RA- und OASF nach einer Transfektion mit einem SENP5 Expressionsvektor (SENP5GFP) ohne FAS-Ligand Inkubation (-FASL) sowie mit einer FAS- Ligand Inkubation (+FASL, 13h, 100ng/ μ l). Die erhaltenen Messwerte wurden gegen die Caspase-3/7 Aktivität von mit einem Leervektor (pEGFP-C1) transfizierten wt SF gegen 1 normalisiert (n=3).

Die Überexpression von SENP5 durch den SENP5GFP-Expressionsvektor in hTNFtg und SF hatte keinen Einfluss auf deren Caspase-3/7 Aktivität (Abbildung 15). Ebenso konnte in den hTNFtg SF kein signifikanter Unterschied der Caspase-3/7 Aktivität nach Inkubation mit dem FAS-Liganden nachgewiesen werden. Die relative Caspase-3/7 Aktivität in den SENP5 überexprimierenden wt SF nach einer Überexpression von SENP5 stieg nach Inkubation mit dem FAS-Ligand über 13 h auf das 1,505 fache (*unpaired t-test*, $p=0,0579$).

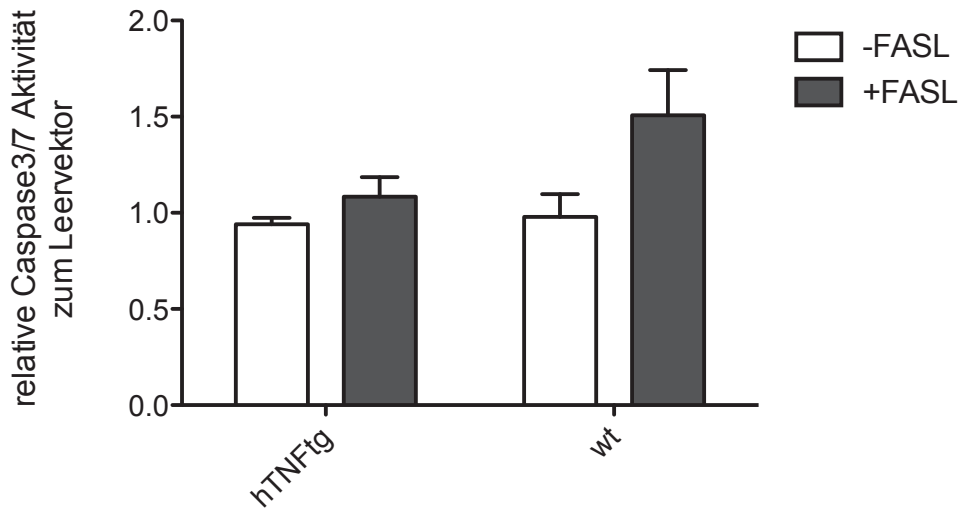


Abbildung 15: Einfluss der Überexpression von SENP5 auf die Caspase3/7 Aktivität in hTNFtg und wt SF

Messungen der Caspase-3/7 Aktivität von hTNFtg und wt SF nach einer Transfektion mit einem SENP5 Expressionsvektor (SENP5GFP) ohne FAS-Ligand Inkubation (-FASL) sowie mit einer FAS-Ligand Inkubation (+FASL, 13h, 100ng/ μ l). Die erhaltenen Messwerte wurden gegen die Caspase-3/7 Aktivität von mit einem Leervektor (pEGFP-C1) transfizierten wt SF gegen 1 normalisiert (n=3).

7.2.6. Die Überexpression von SENP5 induziert die mMMP-9 Expression in murinen Synovialfibroblasten

Die irreversible Destruktion der artikulären Strukturen bei der RA und in der hTNFtg Maus ist mit der veränderten Expression verschiedener MMP assoziiert. Aufbauend auf den durch Maciejewska-Rodriguez veröffentlichten Daten zur Regulation der MMP-1 Expression durch SENP1 wurde im Folgenden die Rolle von SENP5 auf die Expression von murinem pro-MMP-2, 3 und 9 in primären wt SF untersucht¹⁴. Hierzu wurden die wt SF mit dem Expressionsvektor SENP5GFP bzw. dem Leervektor (pEGFP-C1) transfiziert. Anschließend wurden mit den entsprechenden *Mouse pro-MMP Quantikine® ELISA kits* (R&D, Wiesbaden) die Expressionen von pro-MMP-2, -3 und -9 bestimmt (siehe 10.4.8).

Eine Überexpression von SENP5 (SENP5GFP) hatte keinen Einfluss auf die Expression von pro-MMP-2 und -3 in wt SF (Abbildung 16). Diese Überexpression induzierte jedoch die murine pro-MMP-9 Expression. Im Kulturüberstand der SENP5 überexprimierenden wt SF konnten $1,952 \text{ ng/ml} \pm 1,534$ murines pro-MMP-9 detektiert werden ausgehend von einer murinen pro-MMP-9 Expression von $0,873 \text{ ng/ml} \pm 0,679$ in mit dem Leervektor (pEGFP-C1) transfizierten wt SF (*unpaired t-test*, $p=0,3274$).

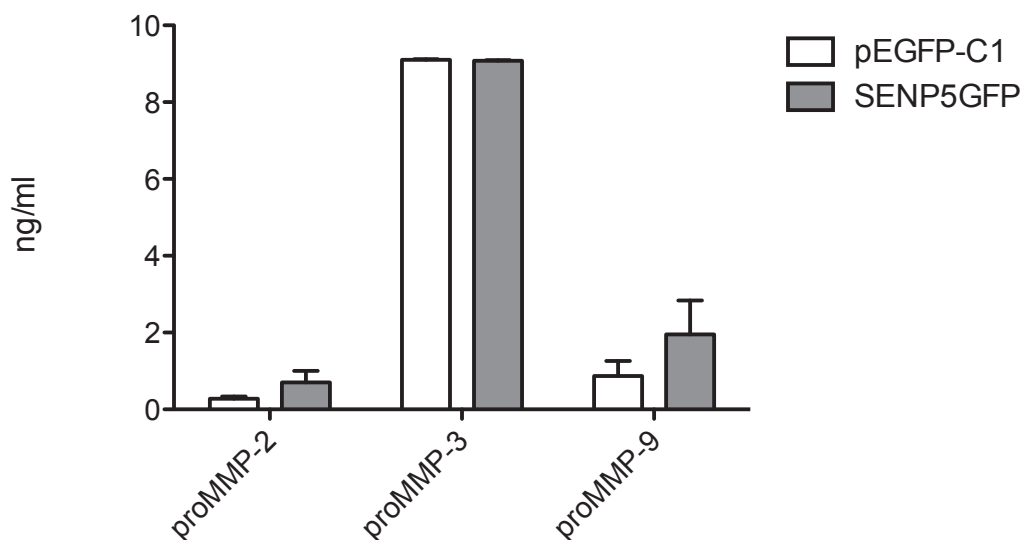


Abbildung 16 murine pro-MMP-2, -3 und -9 Expression in wt SF nach der Überexpression von SENP5

In primären wt Synovialfibroblasten wurde SENP5 (SENP5GFP) überexprimiert. Als Kontrollvektor wurde pEGFP-C1 verwendet. Im Kulturüberstand dieser wt SF wurde die Expression von proMMP-2, -3 und -9 mit den entsprechenden ELISAs analysiert. Die Daten wurden als Mittelwerte und SD dargestellt ($n=3$).

7.3. Der Einfluss von SENP7 auf die stabile Aktivierung von Synovialfibroblasten in der Rheumatoiden Arthritis

7.3.1. Die SENP7 Expression ist im RA-Synovialgewebe stark erhöht

Über die SUMO-2/3 spezifische Protease SENP7 ist in der Literatur über die reinen grundlegenden Funktionen hinaus wenig bekannt. Bisher beschränken sich die Publikationen auf die Substratspezifität von SENP7 und die Beteiligung der Protease an Maturierungs-, Dekonjugations- und Ketteneditierungsprozessen der SUMOylierung. Um die Expression von SENP7 im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte dieser Gewebe mit dem α -SENP7 Antikörper (Abcam Ab5906) nach dem unter 10.3.1 aufgeführten Protokoll gefärbt. Als Kernfärbung wurde auch hier eine Färbung mit Methylgrün verwendet.

In Abbildung 17 sind exemplarisch spezifische Färbungen von SENP7 in Paraffinschnitten von Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten abgebildet. Im RA-Synovialgewebe zeigte sich eine stark erhöhte SENP7 Expression. Diese SENP7 Expression konnte von der *lining layer* bis in das *sublining* der Synovialmembran beobachtet werden, wie auch in den Epithelzellen der Blutgefäße (Abbildung 18A). Die Detailansicht (Abbildung 18B) zeigt die deutliche, SENP7 spezifische Färbung, die im Randbereich der Membran stark erhöht ist. Im Vergleich hierzu wird SENP7 im OA-Synovialgewebe nur sehr schwach exprimiert. Die Quantifizierung der spezifischen Färbungen untermauerte diese Ergebnisse. Prozentual waren deutlich mehr gesamt positiven Zellen in den RA-Synovialgeweben als in OA-Synovialgeweben (*unpaired t-test*, $p=0,1305$). Der Unterschied im prozentualen Anteil der stark positiv gefärbten Zellen zwischen RA- und OA-Synovialgewebe war signifikant (*unpaired t-test*, $p=0,0223$).

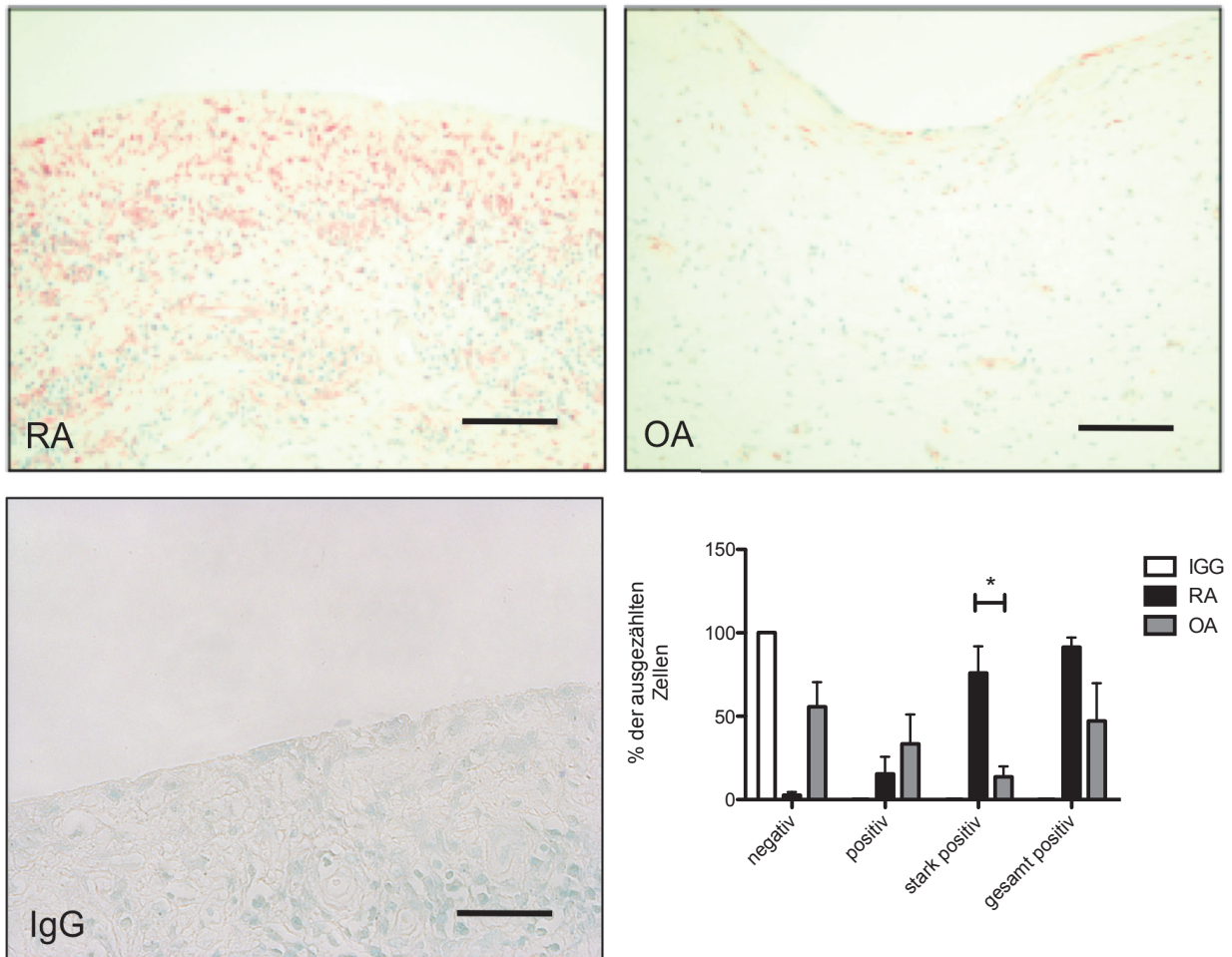


Abbildung 17 Expression von SENP7 in RA- und OA-Synovialgewebe

Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten von RA- (RA) und OA-Patienten (OA) mit einem spezifischen α -SENP7 Antikörper (rot, 1:300). Zur Kernfärbung wurde Methylgrün eingesetzt (grün). (IgG) IgG-Kontrolle in RA-Gewebe. Die Bilder der spezifischen Färbungen wurden lichtmikroskopisch aufgenommen (Olympus BX51, 10 fache Vergrößerung, n=5, Maßstabsbalken 20 μ m).

In den Färbungen von RA- und OA-Synovialgeweben wurden die synovialen Zellen nach Intensität der AK-Färbung ausgezählt. Hierbei wurde zur Unterscheidung ein Scoring mit drei Kategorien (negativ = keine Färbung, schwach positiv = schwache Färbung, stark positiv = starke Färbung) verwendet. Die prozentualen Anteile der Zellen innerhalb dieser drei Kategorien wurden ermittelt und miteinander verglichen.

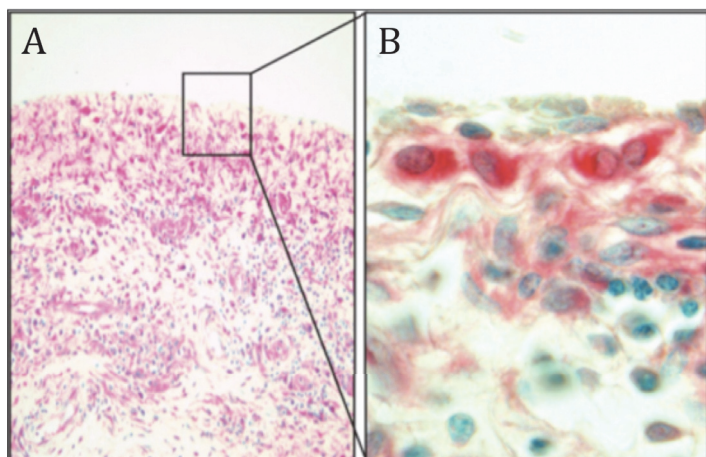


Abbildung 18 Expression von SENP7 in RA-Synovialgewebe (Detailansicht)

A) Immunhistologische Färbung von SENP7 in synovialen Gewebe von RA-Patienten mit einem α -SENP7 spezifischen Antikörper (rot, 1:300, 10fache Vergrößerung)

B) Detailansicht der *lining layer* dieser immunhistologischen RA-Synovialgewebefärbung (rot, Olympus BX51, 100fach vergrößert). Es wurde eine Gegenfärbung mit Methylgrün (grün) durchgeführt.

In Analogie zu den Untersuchungen von SUMO-2/3 und SENP5, wurde die Expression von SENP7 in RA- und OASF mittels semiquantitativer PCR und Western Blot-Analysen untersucht.

Durch die semiquantitative PCR konnte eine SENP7 Expression in primären, kultivierten RASF und OASF nachgewiesen werden. Diese Expression war auf transkriptioneller Ebene in RASF im Vergleich zu OASF stark erhöht (Abbildung 19A zeigt die zweifache Erhöhung der SENP7 Expression in RASF zur Expression von SENP7 in OASF).

Auch auf translationaler Ebene konnte mittels Western Blot-Analyse die SENP7 Expression in primären RASF und OASF nachgewiesen werden (Abbildung 19B). Die Expression in den OASF war nachweisbar, aber schwach. Demgegenüber war die SENP7 Expression in RASF stark erhöht.

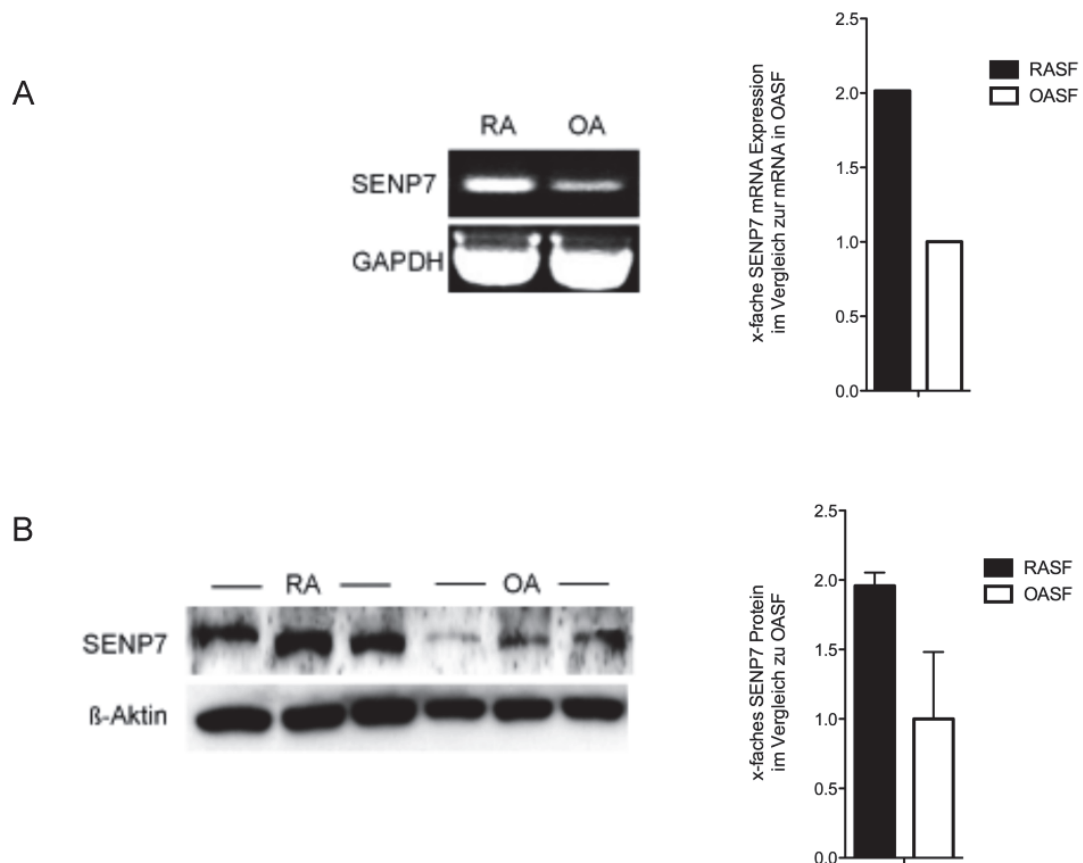


Abbildung 19 Expression von SENP7 in RASF und OASF

A) Semi-quantitative PCR gegen SENP7 in RASF und OASF auf cDNA *templates* von isolierter mRNA. Als Ladekontrolle wurde eine PCR gegen GAPDH durchgeführt (2% TAE Agarosegel).

B) Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus RASF und OASF mit einem α -SENP7 spezifischen Antikörper (1:500). Die SENP7 spezifische Bande konnte bei 113 kDa detektiert werden. In diesem Versuch wurde β -Aktin (43 kDa) als Ladekontrolle mitgeführt (10% SDS Gel).

Rechts, quantitative Auswertungen der SENP7 PCR bzw. des Western Blots. Unter Verwendung der Software ImageJ (NIH,US) wurde die Intensität der humanen SENP7 PCR- bzw. der Proteinbanden ermittelt und diese gegen die Intensität der zugehörigen GAPDH bzw. β -Aktin Bande abgeglichen. Die erhaltenen Werte wurden gegen den Mittelwert der SENP7 Signale in OASF normalisiert.

7.3.2. Die Lokalisation von SENP7 in RASF findet sich über den Nukleus hinaus im Zytoplasma

Zur Untersuchung der Lokalisation von SENP7 wurden gemäß der unter 10.3.2 aufgeführten Methode zur immunzytochemischen Färbung von Zellen, RASF und OASF auf Deckgläsern ausgesät, fixiert und SENP7 mittels eines spezifischen polyklonalen α -SENP7 Antikörpers (Abgent AP1241a) gefärbt. Eine Inkubation mit Propidiumiodid erfolgte zur Visualisierung des Nukleus.

Die Immunfluoreszenzfärbungen konnten in RASF und OASF eine zytosolische SENP7 Lokalisation visualisieren. Wie in Abbildung 20 zu sehen, zeigten die RASF im Gegensatz zu den OASF neben dem deutlichen SENP7 Signal im Zytoplasma eine punktuelle Kolokalisation von SENP7 mit dem Propidiumiodidsignal im Nukleus.

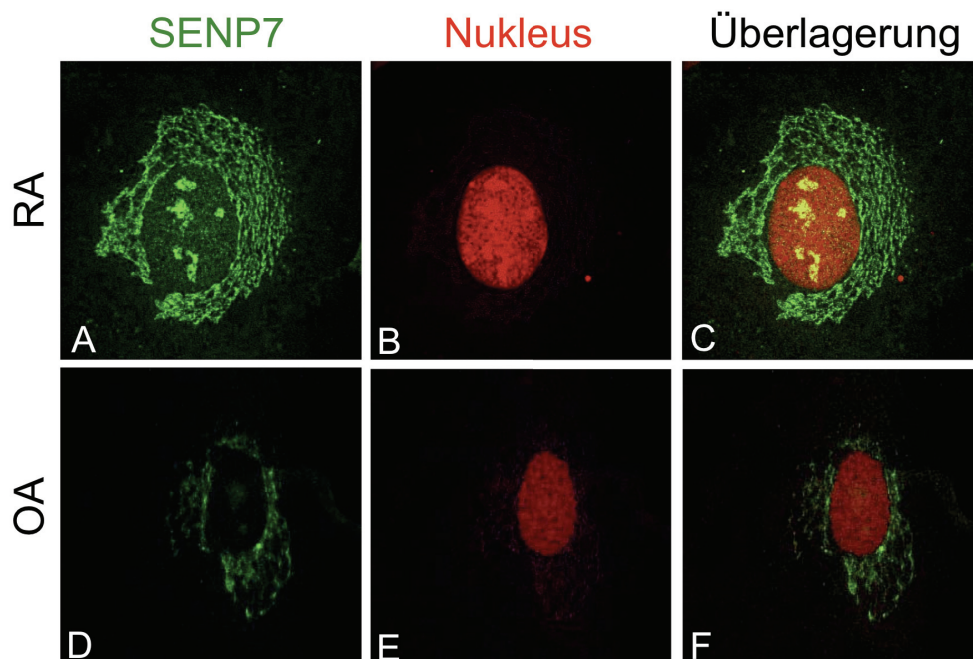


Abbildung 20 Lokalisation von SENP7 in RASF und OASF

Immunzytochemischer Nachweis von humanem SENP7 in RASF und OASF.

A/D) SENP7 Lokalisation im Zytoplasma und Nukleus der Synovialfibroblasten (grün, 1:1000, FITC-Signal), B/E) Propidiumiodidfärbung des Zellkernes (rot, 1:1000), C/F) Überlagerung der FITC und Propidiumiodidsignale (gelb). Die Aufnahmen wurden mit dem *True Confocal Scanner Leica TCS SP2* Konfokalmikroskop gemacht (n=3).

Um die perinukleäre Lokalisation von SENP7 weiter zu spezifizieren wurden RASF zusätzlich zum α -SENP7 AK mit zellorganellspezifischen Markern gefärbt. Hierzu wurde ein Marker für den Golgi Apparat (58K, Abcam, AB6284) eingesetzt, sowie der Zentrosomenmarker gamma-tubulin (Sigma T9026).

Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Lokalisationsstudien in den RASF. Wie

in den vorangegangenen Lokalisationsversuchen wurde SENP7 in den RASF sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert (FITC, grün). Das klare Signal der Färbung des Golgi Apparates (Abbildung 21B, Alexa Fluor 488, rot) zeigte die Lage des Golgi Apparates innerhalb der RASF. Abbildung C überlagert das SENP7 Signal (A) mit dem Golgi Apparat Signal (B). Dieser Versuch bestätigte, dass SENP7 in den RASF im Golgi Aparat kolokalisiert ist.

Desweiteren wurde ein Antikörper gegen gamma-tubulin (Sigma T9026) eingesetzt, welcher spezifisch das Zentrosom markiert (Abbildung 21D-F). Die in Abbildung 21 D zu sehende SENP7 Lokalisation ist auch hier im Nukleus und dem Zytoplasma vorhanden (FITC, grün). Die gamma-tubulin Färbung in Bild E visualisiert das Zentrosom (Alexa Fluor 488, rot). Bild F zeigt die Überlagerung des SENP7 Signals mit den Signal des Zentrosoms. Diese Versuche konnten eine Kolokalisation von SENP7 mit dem Zentrosom der RASF zeigen.

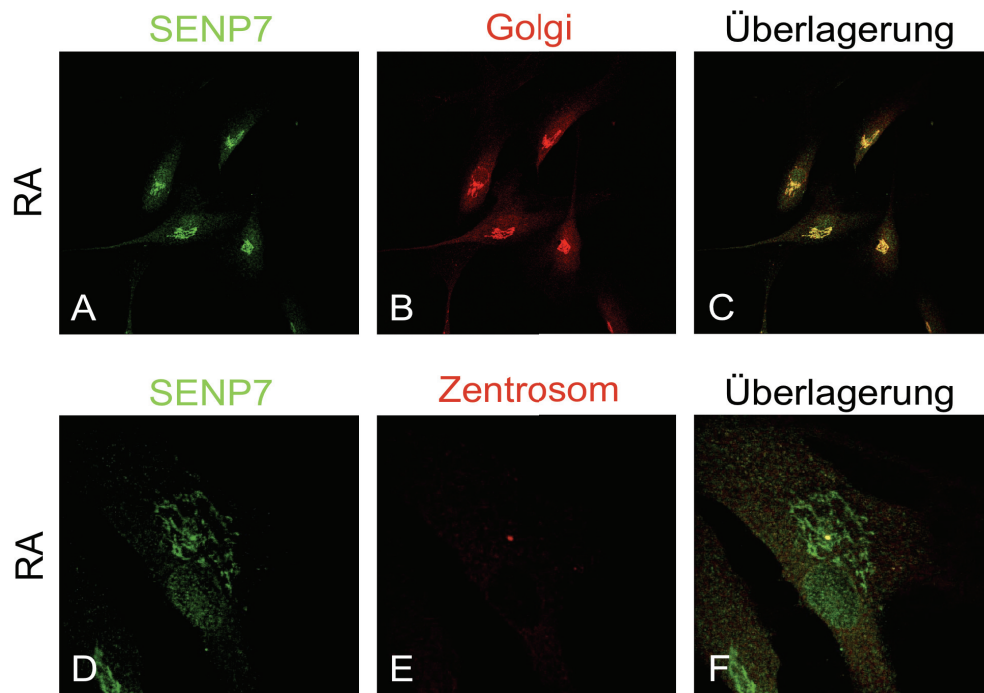


Abbildung 21 Kolokalisation von SENP7 in RASF

Immunzytochemischer Nachweis von SENP7, dem Golgi Apparat und dem Zentrosom in RASF A/D) Nachweis von SENP7 in RASF (grün, 1:1000, FITC), B) Färbung des Golgi Apparates mittels 58K-Golgi marker (rot, 1:1000, Alexa Fluor 488), E) Färbung mit dem Zentrosomenmarker α -gamma-tubulin (rot, 1:1000, Alexa Fluor 488), C) Überlagerung der Aufnahmen A und B, F) Überlagerung der Aufnahmen D und E. Die Aufnahmen wurden mit dem *True Confocal Scanner Leica TCS SP2* Konfokalmikroskop gemacht (n=3).

7.3.3. Die Expression von SENP7 ist in Synovialfibroblasten der hTNFtg Maus stark erhöht

Analog zu den Untersuchungen von SENP5 wurde die Expression von SENP7 ebenfalls in murinem Synovialgewebe und Synovialfibroblasten der hTNFtg bzw. wt Mäuse (10 Wochen alt) durchgeführt (zum Protokoll siehe 10.1.1). Zur spezifischen Färbung des murinen Synovialgewebes der Metatarsi der hTNFtg und wt Mäuse wurden die Präparate mit dem α -SENP7 spezifischen polyklonalen Antikörpers (Abcam, AB5906) inkubiert. Als Gegenfärbung wurde Methylgrün verwendet.

In Abbildung 22 sind repräsentative, immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten der murinen hTNFtg und wt Metatarsi dargestellt. Die SENP7 Färbung wies im Synovialgewebe der wt Maus ein schwaches SENP7 Signal auf. Dieses Signal war gleichmäßig über das Gewebe verteilt. Demgegenüber konnte die Färbung des Synovialgewebes der hTNFtg Maus eine starke Expression von SENP7 nachweisen. Das stark zerstörte Gelenk der hTNFtg Maus zeigte gerade im Pannusgewebe ein stark erhöhtes SENP7 Signal.

Die Quantifizierung der gefärbten Metatarsalschnitte bestätigte den signifikant erhöhten prozentualen Anteil der gesamt positiven synovialen Zellen im hTNFtg Gewebe im Vergleich zum wt Gewebe (*unpaired t-test*, $p=0,0055$). Darüber hinaus war auch der prozentuale Anteil der stark positiven synovialen Zellen im hTNFtg Gewebe signifikant grösser als im wt Gewebe (*unpaired t-test*, $p=0,0229$).

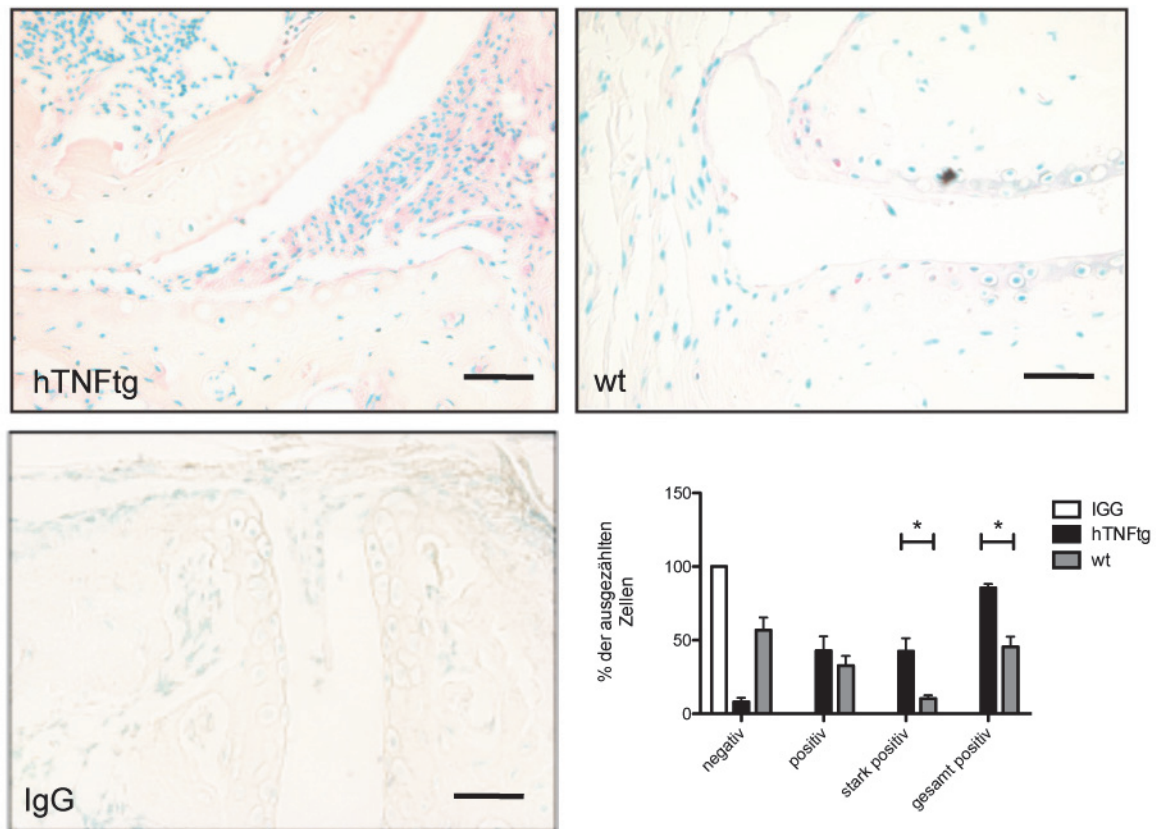


Abbildung 22 Immunologische SENP7 Färbung muriner Metatarsalschnitte

Immunhistologische Färbung von Schnitten des Mittelfußes einer 10 Wochen alten C57/BL6-hTNFtg Maus (hTNFtg) und einer gleichaltrigen wt Maus (wt) mit einem α -SENP7 spezifischen Antikörper (rot). (IgG) IgG-Kontrolle eines hTNFtg Schnittes (anti-biotylated IgG, Vector BA-2001). Zur Kernfärbung wurde Methylgrün verwendet (grün). (Olympus BX51, 40 fache Vergrößerung, n=3, Maßstabsbalken 50 μ m).

Die gefärbten synovialen Zellen in den murinen Metatarsalschnitten wurden nach Intensität der AK Färbung ausgezählt. Hierbei wurde zur Unterscheidung ein Scoring mit drei Kategorien, negativ = keine Färbung, schwach positiv = schwache Färbung, stark positiv = starke Färbung) verwendet. Die prozentualen Anteile der Zellen innerhalb dieser drei Kategorien wurden ermittelt und miteinander verglichen.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob sich die verstärkte Expression von SENP7 im Synovialgewebe von hTNFtg Mäusen auf eine verstärkte Expression von SENP7 in den SF zurückführen lässt, wurde mittels semi-quantitativer PCR und Western Blot-Analysen die Expression von SENP7 in hTNFtg und wt SF untersucht. Aus kultivierten primären SF der hTNFtg und wt Mäuse wurde GesamtRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels semi-quantitativer PCR auf die Expression von SENP7 analysiert. Für die Western Blot-Analyse wurden Gesamtproteinextrakte aus primären kultivierten hTNFtg und wt SF auf die Expression von SENP7 untersucht. Auch in diesem Versuch wurde der polyklonale α -SENP7 Antikörper (Abcam, AB5906) verwendet.

Wie Abbildung 23A zeigt war die transkriptionelle SENP7 Expression in den wt SF kaum detektierbar, in den SF von hTNFtg Mäusen dagegen stark erhöht. In Abbildung 23B ist die translationelle Expression von SENP7 im Gesamtproteinextrakt von hTNFtg und wt SF

dargestellt. Die Expression von SENP7 in wt SF war nicht nachweisbar, die Expression in hTNFtg SF war stark erhöht.

Wie Abbildung 23 zeigt, war eine SENP7 Expression in den wt SF auf transkriptioneller (A) sowie translationaler (B) Ebene kaum detektierbar. Im Gegensatz, konnte eine starke SENP7 Expression in kultivierten SF der hTNFtg Mäuse sowohl auf mRNA (A) als auch auf Proteinebene (B) nachgewiesen werden.

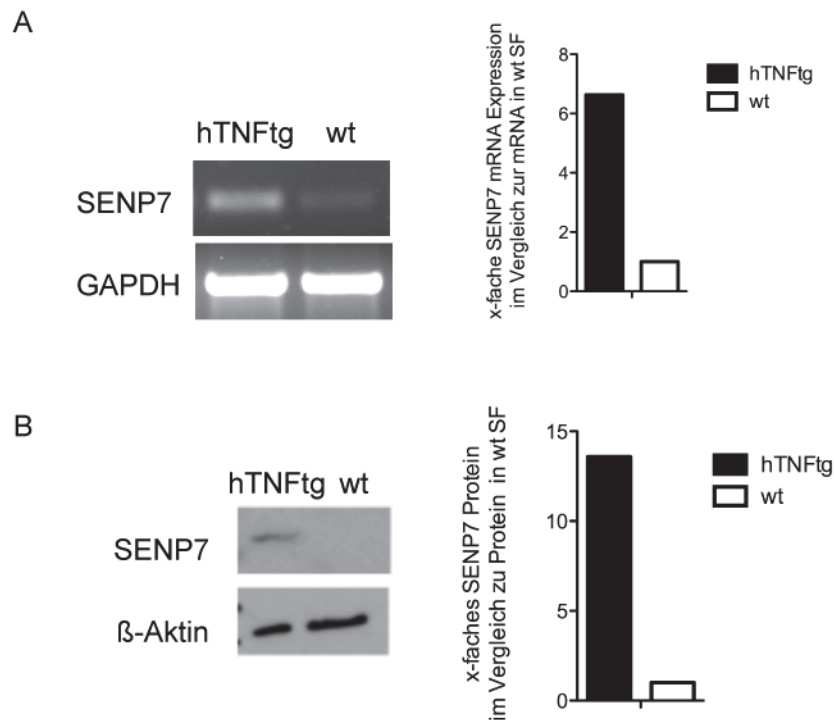


Abbildung 23 Translation und Transkription von SENP7 in hTNFtg und wt Mausfibroblasten

A) Semi-quantitative PCR der SENP7 Expression in hTNFtg SF im Vergleich zur Expression von SENP7 in wt SF. Als Ladekontrolle wurde eine PCR gegen GAPDH durchgeführt (2% TAE Agarosegel, n=3). B) Western Blot Analyse von Proteinextrakten aus hTNFtg SF und wt SF mit einem α -SENP7 spezifischen Antikörper. Als Ladekontrolle diente die Detektion von β -Aktin (10% SDS-Gel, n=1).

Rechts dargestellt sind die Quantifizierungen der PCR-Banden bzw. der Banden des Western Blots. Unter Verwendung der Software ImageJ (NIH, US) wurde die Intensität der humanen SENP7 PCR- bzw. Proteinbanden ermittelt und gegen die Intensität der zugehörigen GAPDH/ β -Aktin Bande abgeglichen. Die erhaltenen Werte wurden gegen den Mittelwert der SENP7 Intensität in den wt SF normalisiert.

7.3.4. Die SENP7 Expression wird in murinen Synovialfibroblasten durch hTNF- α induziert

Da Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf die stabile Aktivierung von RASF haben, wurde im Folgenden der Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf die SENP7 Expression in wt SF untersucht. Die wt SF wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 48 h mit humanem TNF- α

oder IL-1 β inkubiert. Die Expression von SENP7 wurde in den Gesamtproteinextrakten der wt SF mittels des α -SENP7 spezifischen Antikörpers (Novus Biologicals, NB100-92106) detektiert.

Nach der Inkubation der wt SF mit IL-1 β ist kein Unterschied in der Expression von SENP7 zu unstimulierten wt SF (Kontrolle) nachzuweisen (Abbildung 24). Die Stimulation der wt-SF mit humanem TNF- α induziert die SENP7 Expression stark im Vergleich zu unstimulierten wt SF (*unpaired t-test*, $p=0,1847$).

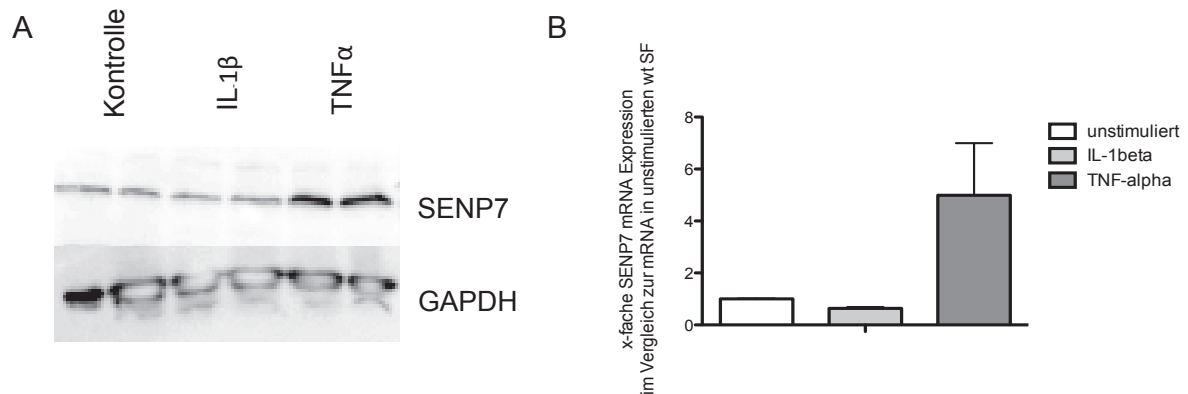


Abbildung 24 Expression von SENP7 nach Stimulation mit IL-1 β und TNF- α

A Western Blot-Analyse von Gesamtproteinextrakten (120 μ g) aus wt SF, die für 48 h mit den Zytokinen IL-1 β (10ng/ml) oder TNF- α (100ng/ml) stimuliert wurden. Die SENP7 Expression wurde mit einem spezifischen α -SENP7 Antikörper detektiert (1:500, Novus Biologicals, NB100-92106). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet (1:1000, 10% SDS Gel, $n=3$).

B Unter Verwendung der Software ImageJ (NIH, US) wurde die Intensität der humanen SENP7 Proteinbanden ermittelt und diese gegen die Intensität der zugehörigen GAPDH Bande abgeglichen. Die erhaltenen Werte wurden gegen den Mittelwert der SENP7 Signale in unstimulierten wt SF normalisiert.

7.3.5. Die Überexpression von SENP7 steigert die Proliferationsrate muriner Synovialfibroblasten

Aufbauend auf den Versuchen zum Einfluss von SENP5 auf die Proliferation von murinen Synovialfibroblasten wurde der Einfluss von SENP7 auf die Proliferationsrate von hTNFtg und wt SF untersucht. Hierzu wurden die SF mit einem SENP7 Expressionsvektor (SENP7CMV) bzw. einem Leervektor (pEGFP-C1) transfiziert. Anschließend wurde der BRDU ASSAY (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Ergebnisse die in Abbildung 25 graphisch dargestellt sind, zeigen, dass eine Überexpression von SENP7 in hTNFtg SF die Proliferationsrate der hTNFtg SF steigert. Die Proliferationsrate (dargestellt durch die x-fache Steigerung der Proliferation zum Leervektor) stieg auf das 1,5fache im Vergleich zum Leervektor signifikant an (*unpaired t-test*,

p=0,0003). Die Überexpression von SENP7 in wt SF führte ebenfalls zu einer starken Erhöhung der Proliferationsrate der wt SF. Die Proliferationsrate (dargestellt durch die x-fache Steigerung der Proliferation zum Leervektor) stieg auf das etwa 1,5fache der Proliferation des Leervektors ebenfalls signifikant an (*unpaired t-test*, p= 0,0143).

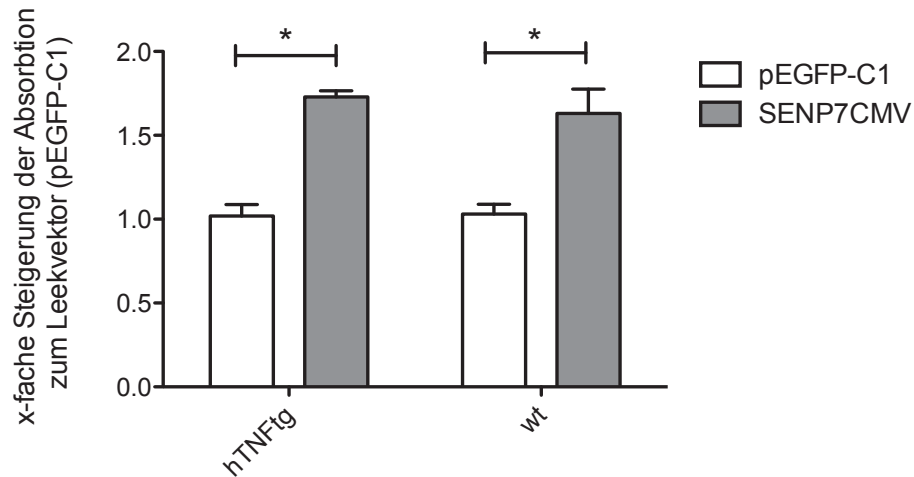


Abbildung 25 Proliferationsraten von murinen primären Synovialfibroblasten nach Überexpression von SENP7

Messung des BRDU Einbaus in hTNFtg und wt SF nach einer Transfektion mit einem SENP7 Expressionsvektor (SENP7CMV) bzw. einem Leervektor (pEGFP-C1). Die Proliferationsrate wurde durch die Messung der OD bei 450/550nm bestimmt. Die Proliferation des Leervektors wurde auf 1 normalisiert (n=3).

7.3.6. Die Überexpression von SENP7 steigert die FAS-Ligand induzierte Apoptose muriner wt Synovialfibroblasten

Einhergehend mit den Untersuchungen zum Einfluss von SENP5 auf die Caspase3/7 Aktivität wurden in humanen und murinen SF der Einfluss einer SENP7 Überexpression auf die Empfindlichkeit dieser SF für FAS-Ligand induzierte Apoptose untersucht. SENP7 wurde durch Transfektion der SF mit einem SENP7 Expressionsvektor (SENP7CMV) überexprimiert. Die Caspase3/7-Aktivität wurde als Indikator der Apoptose mit dem *Promega Homogeneous Caspase3/7 Assay* (Promega, Mannheim) untersucht (siehe 10.4.7).

Die Überexpression von SENP7 in RASF steigerte die Empfindlichkeit der RASF leicht gegenüber FAS-Ligand induzierter Caspase3/7-Aktivität (*unpaired t-test*, $p=0,1961$ siehe Abbildung 26). Dieser Effekt einer SENP7 Überexpression konnte, wenn auch schwächer, auch für die FAS-Ligand induzierte Caspase3/7-Aktivität in OASF nachgewiesen werden (*unpaired t-test*, $p=0,2061$).

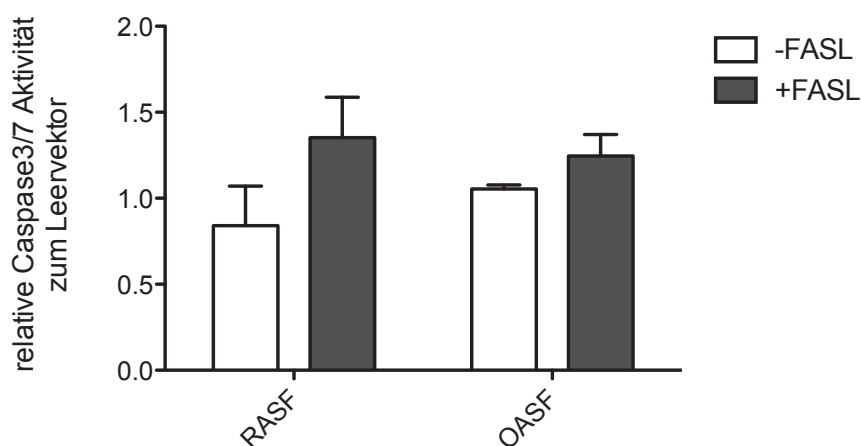


Abbildung 26 Einfluss von FASL auf humane RASF und OASF nach Überexpression von SENP7

In RASF und OASF wurde durch Transfektion eines SENP7 Expressionsvektors (SENP7CMV) SENP7 in den Synovialfibroblasten überexprimiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit FASL (100ng/ μ l). Die Apoptoserate wurde mittels Caspase-3/7 Aktivität bestimmt und als relative Aktivität normiert auf Zellen die mit einem Leervektor (pEGFP-C1) transfiziert wurden.

Die Überexpression von SENP7 in hTNFtg SF zeigte keine signifikante Erhöhung der Caspase3/7 Aktivität in den hTNFtg SF nach FAS-Ligand Inkubation (*unpaired t-test*, $p=0,1778$, Abbildung 27). Wie ebenfalls in Abbildung 27 dargestellt, steigerte die Überexpression von SENP7 in wt SF durch den SENP7CMV-Expressionsvektor nach Inkubation mit dem FAS-Liganden über 13 h signifikant auf das 1,722 fache. Die statistische

Analyse dieser Werte bestätigte eine signifikante Erhöhung der Empfindlichkeit der wt SF für FAS-Ligand induzierte Apoptose nach SENP7 Überexpression (*unpaired t-test*, $p=0,0294$).

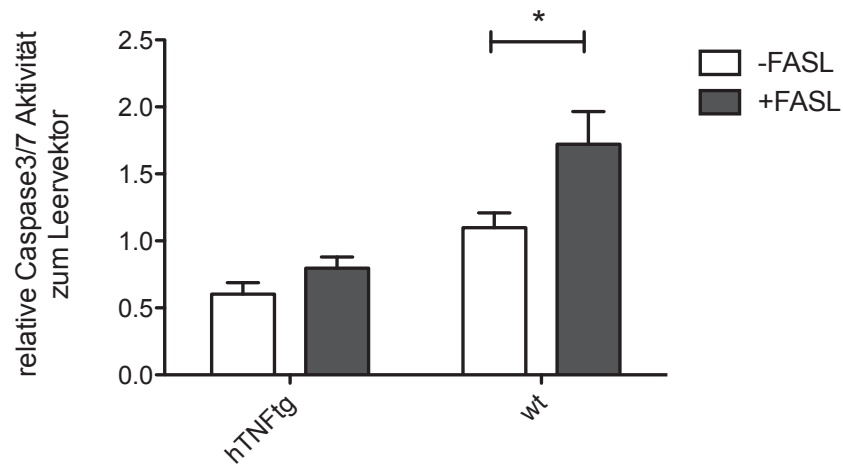


Abbildung 27 Einfluss von FAS-Ligand auf murine SF nach Überexpression von SENP7

In hTNFtg und wt Synovialfibroblasten wurde SENP7 (SENP7CMV) überexprimiert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit FAS-Ligand (13h, 100ng/ μ l). Die Apoptoserate wurde mittels Caspase-3/7 Aktivität bestimmt und als relative Aktivität normiert auf Zellen die mit einem Leervektor transfiziert wurden. Als statistischer Test wurde der *unpaired t-test* verwendet.

7.3.7. Die Überexpression von SENP7 induziert die mMMP-9 Expression in murinen Synovialfibroblasten

Wie für die Protease SENP5 wurden auch die Effekte einer Überexpression von SENP7 auf die Expression von murinen pro-MMP untersucht. Hierzu wurden die wt SF mit dem Expressionsvektor SENP7CMV bzw. dem Leervektor (pEGFP-C1) transfiziert. Anschließend wurde die Expression von murinem pro-MMP-2, -3 und -9 durch die wt SF mittels der entsprechenden *pro-MMP Quantikine® ELISA kits* (R&D, Wiesbaden) bestimmt (siehe 10.4.8).

Abbildung 28 zeigt, dass die Überexpression von SENP7 (SENP7CMV) keinen Einfluss auf die murine pro-MMP-2 und -3 Expression hatte. Die murine pro-MMP-9 Expression in wt SF wurde nach Überexpression von SENP7 deutlich induziert. Im Kulturüberstand der SENP7 überexprimierenden wt SF konnten $11,084 \text{ ng/ml} \pm 3,270 \text{ SD}$ murines pro-MMP-9 detektiert werden ausgehend von einer murinen pro-MMP-9 Expression von $0,873 \text{ ng/ml} \pm 0,679$ im Kulturüberstand mit dem Leervektor (pEGFP-C1) transfizierter wt SF (*unpaired t-test*, $p=0,0061$).

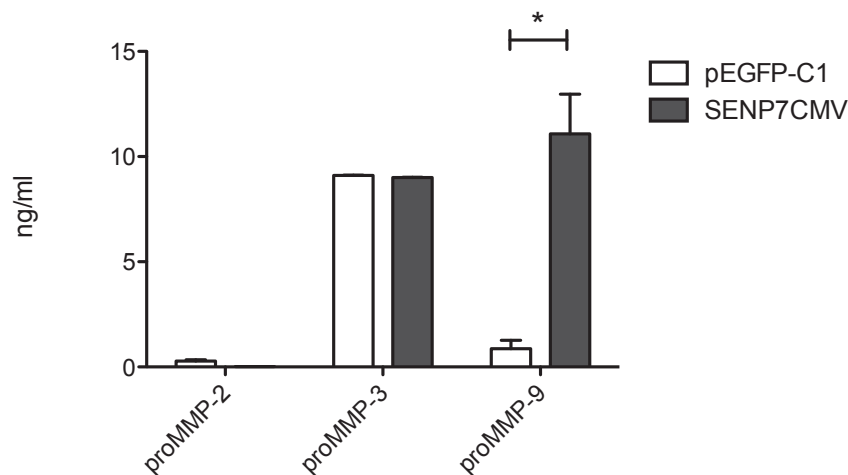


Abbildung 28 murine pro-MMP-2, -3, -9 Expression in wt SF nach der Überexpression von SENP7

In primären wt Synovialfibroblasten wurde SENP7 (SENP7CMV) überexprimiert. Als Kontrollvektor wurde pEGFP-C1 verwendet. Im Kulturüberstand dieser wt SF wurde die murinen pro-MMP-2, -3 und -9 Expression mit dem entsprechenden ELISAs analysiert. Die Daten wurden als Mittelwerte und SD dargestellt (n=3).

8. Diskussion

8.1. Die Expression von SUMO-2/3 in Synovialfibroblasten

Trotz Ihrer ähnlich zentralen Rolle im Zellmetabolismus wie sie der posttranslationale Modifikator Ubiquitin einnimmt, wurde erst 16 Jahre nach der Entdeckung der Ubiquitinierung die Familie der SUMO-Proteine gefunden. Dies geschah über den Nachweis der starken Bindung von SUMO-1 an *Ran GTPase-activating protein* (RANGAP), die im Gegensatz zu den üblichen SUMOylierungen von Zielproteinen stabil ausgeprägt ist⁷⁰. Andere SUMOylierungsprozesse sind aufgrund ihres flexiblen Charakters bis heute nur schwer nachzuvollziehen. Dennoch hat sich der Kenntnisstand zur SUMOylierung in den letzten Jahren massiv erweitert.

SUMOylierungen sind eine von vielen Modifikationen, die die Funktion und Regulation ihrer Zielproteine beeinflussen können. Säuger exprimieren drei SUMO Proteine: SUMO-1, -2 und -3. Ein Gen für SUMO-4 wurde im humanen Genom identifiziert. SUMO-1, -2 und -3 werden ubiquitär exprimiert, in allen Geweben und allen Entwicklungsstadien. SUMO-2/3 Proteine werden im Vergleich zu SUMO-1 deutlich stärker exprimiert. Die SUMO-4 Expression scheint auf Nieren und Leber begrenzt zu sein⁷⁴.

Alkuraya *et al.* 2006 konnten durch eine SUMO-1 KO Maus die essentielle Bedeutung der SUMOylierung zeigen. Die Maus zeigt sich homozygot wie heterozygot embryonal letal, heterozygot wies die SUMO-1 KO Maus während der Embryogenese einen offenen Gaumen auf¹³⁰. Eine Deletion des murinen SUMO-1 Genes in einer zweiten KO Maus nach dem dritten Exon wies jedoch keinen derartigen Phänotyp auf. Wahrscheinlich wird die SUMO-1 Funktion in dieser Maus durch SUMO-2/3 ausgeglichen¹³¹. Eine SUMO-2/3 KO Maus ist bisher nicht bekannt.

Wie die Untersuchungen zur SUMO-2/3 Expression im humanen synovialen Gewebe zeigen, konnte ein starker Unterschied zwischen RA- und OA-Synovialgewebe beobachtet werden. Schon im histologischen Bild ist die erhöhte SUMO-2/3 Expression im RA-Synovialgewebe im Vergleich zu OA-Synovialgewebe deutlich erhöht. Offen ist worauf die massiv erhöhte Expression und die damit verbundene veränderte SUMOylierung durch SUMO-2/3 zurückzuführen ist. Mit hoher Evidenz werden immer wieder die Hypoxie und Stresssignale als Faktoren angesprochen die Einfluss auf die SUMOylierung haben^{60,83,84,89}. Die Publikationen zur Hypoxie bieten einen guten Ansatz die veränderte SUMOylierung durch SUMO-2/3 im RA-Synovialgewebe und RASF zu erklären, da die Hypoxie in der RA einer

der Schlüsselfaktoren bei der Initiation der Angiogenese und der Entzündungsreaktion ist^{39,132}. Die Hypoxie könnte in dem krankhaft veränderten Synovialgewebe des Pannus zu einer erhöhten SUMO-2/3 Expression führen¹³².

In anschließenden Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die verstärkte SUMO-2/3 Expression auf die Expression von SUMO-2/3 in den stabil aktivierten Synovialfibroblasten von RA-Patienten zurückzuführen ist, welche vermehrt in der *synovial lining layer* der Synovialmembran von RA-Patienten zu finden sind. Diese Erhöhung der SUMO-2/3 Expression könnte über die dauerhafte Anwesenheit von diversen Stresssignalen erklärt werden. Neben der massiven Ausschüttung von Zytokinen, der Hypoxie und einer allgemein genotoxischen Umgebung finden sich in den RASF vermehrt DNA-Strangbrüche¹³³. Ein Zusammenspiel verschiedener auslösender Faktoren ist möglich. So kann durch die Ausschüttung von Zytokinen bereits eine Stimulation der SUMO-2/3 Expression in der RASF angenommen werden, die sich durch vermehrte DNA-Strangbrüche und eine begleitende Hypoxie im Pannusgewebe mehr und mehr aufbaut und schließlich dauerhaft auf einem hohen Niveau verbleibt. Auch nach einigen Passagen in der Zellkultur und damit außerhalb ihres hypoxischen, entzündlichen Milieus behalten die isolierten RASF diese erhöhte SUMO-2/3 Expression bei. Die erhöhte SUMO-2/3 Expression in RASF gehört somit entweder zu den Charakteristika der stabil aktivierten RA-Synovialfibroblasten oder ist eine Folgeerscheinung der stabilen Aktivierung. Die in den RASF gefundene Erhöhung konnte in den Arbeiten von Frank *et. al.* auch für die hTNFtg Maus gezeigt werden. Hier zeigte sich in der Histologie eine Erhöhung der SUMO-2/3 Expression im Schnitt des Metatarsus der hTNFtg Maus im Vergleich zur nur marginal nachweisbaren SUMO-2/3 Expressionen im Metatarsus der wildtyp Maus¹³⁴.

Die massiv erhöhte Expression von SUMO-2/3 und die damit einhergehende verstärkte SUMOylierung in RASF könnte nach heutigem Kenntnisstand einige, der in RASF zu findenden krankhaften Veränderungen erklären. Die SUMOylierung als Schlüsselfaktor bei zentralen Prozessen wie Zellteilung, Migration und der Apoptose umfasst in ihren Funktionen die Kernprozesse, die in stabil aktivierten Synovialfibroblasten in der RA missreguliert sind¹³⁵⁻¹³⁷. In den ersten Arbeiten zu diesem Thema, welche auf den Ergebnissen von Franz *et al.* aufbauten, konnten die Zusammenhänge der SUMOylierung durch SUMO-1 mit der Interaktionen von FAS und FASL und eine damit verbundene verminderte Empfindlichkeit der RASF für FAS induzierte apoptotische Signale gezeigt werden¹³⁸.

Der Grossteil der Forschungsfoki richtet sich auf die Interaktionen der SUMO-Proteine mit Ihren Zielproteinen, so dass auch nach über 10 Jahren der Forschung über die Regulation von SUMO-2/3 selbst wenig bekannt ist. In den wenigen Publikationen werden zwar Stresseffekte immer wieder thematisiert, diese wirken allerdings nicht direkt auf die SUMO-2/3 Expression ein, sondern auf eine Veränderung in der SUMOylierung spezifischer

Zielproteine^{84,85,139}. In den Daten von Frank *et. al.* wurden die SUMO-2/3 Expressionen nach TNF- α Stimulation untersucht. Hier konnte nur für SUMO-2 eine Induktion durch TNF- α gezeigt werden. Die SUMO-3 Expression wurde von der TNF- α Stimulation nicht beeinflusst¹³⁴. Der Fokus richtet sich stattdessen auf die an der SUMOylierung beteiligten E1, E2 und E3-Enzyme. Die aktivierenden E1-Enzyme sowie das konjugierende E2-Enzym sind beide gut charakterisiert (E1-Enzyme sind UBA2 und AOS1, das E2-Enzym ist Ubc9)^{76,78}. Die Ubc9 KO Maus ist jedoch letal und zeigt in den Blastozysten schwerwiegende Fehlorganisationen im Nukleus begleitet von weitreichenden apoptotischen Prozessen¹⁴⁰. Die Gruppe der E3-Ligasen wird um immer neue Mitglieder erweitert. So existieren auch Enzyme die sowohl als E3-Ligasen in der Ubiquitinierung wie auch der SUMOylierung funktionieren können, wie zum Beispiel TOPOR^{141,142}. Die E3-Ligasen sind als Kandidaten für die Beeinflussung von SUMOylierungsabhängigen Signalwegen am aussichtsreichsten, wirken sie doch nur auf die SUMOylierung einiger spezifischer Zielproteine ein. Hier sind unter anderem Mitglieder der *protein inhibitor of STAT* (PIAS) gefunden worden, sowie das Polycomb-2 protein (Pc2) und RANBP2¹⁴³. Die PIAS1 und PIAS4 Mäuse sind lebensfähig und ihre Phänotypen sind weitestgehend charakterisiert. Die genauen funktionellen Rollen dieser E3-Ligasen sind dennoch unzureichend verstanden¹⁴⁴.

Neben den E3-Ligasen rücken die SENP-Proteine in den jüngeren Publikationen vermehrt in den Fokus der Forschung. Diese Proteasenfamilie katalysiert die Maturierung, Dekonjugation und Ketteneditierung von SUMO-Proteinen. Wie in Tabelle 3 aufgeführt hat jede dieser Proteasen Einfluss auf spezifische Prozesse der SUMOylierung und unterschiedliche SUMO-Proteine. Da in den RA-Synovialfibroblasten die SUMO-2/3 Expression stark erhöht ist, sind die Sentrin spezifischen Proteasen mit einer Präferenz für SUMO-2/3 von besonderem Interesse in dieser Dissertation.

8.2. Expression und Lokalisation von SENP5 und SENP7 in RASF

Zur Expression von SENP-Proteinen ist wenig bekannt. In unterschiedlichen Tumorzellen wurden für verschiedene SENPs sowohl erhöhte wie auch verminderte Expressionen gezeigt. Beispielsweise zeigte sich in humanen Prostatakrebszellen eine Erhöhung der mRNA Level von SENP1 und 3, in Arrayanalysen von humanem Brustkrebsgewebe zeigte sich ein verminderter mRNA Level für SENP6¹²¹.

Der KO von SENPs in Mäusen endete bisher mit letalen Phänotypen. So ist beispielsweise die SENP1 KO Maus embryonal letal in E 12,5 bis E 14,5⁸⁹. Die SENP2 KO Mäuse sind ebenfalls embryonal lethal und zeigten einen Defekt im Übergang der G1- zur S-Phase¹²⁶. Bisher sind keine SENP5 und SENP7 KO Mäuse publiziert.

Da bisher nichts zu den SUMO-2/3 spezifische Proteasen SENP5 und SENP7 in der RA auf Expressionsebene bekannt ist, sowie welchen Einfluss diese Proteasen auf die erhöhte SUMOylierung durch SUMO-2/3 haben, wurden in den anschließenden Versuchen SENP5 und SENP7 auf Expressionsebene untersucht.

SENP5 zeigte nach der immunhistologischen Färbung eine verstärkte Expression im *lining* und *sublining* des humanen RA-Synovialgewebes im Vergleich zur deutlich niedrigeren Expression in OA-Synovialgewebe. Diese verstärkte Expression von SENP5 konnte in RASF nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse zur transkriptionellen Expression legen nahe, dass die verstärkte Expression im RA-Synovialgewebe nicht durch eine verstärkte Expression in RASF hervorgerufen wird. Denkbar wäre, dass nicht ausschließlich die RASF für die SENP5 Expression verantwortlich sind, sondern die beobachteten Unterschiede in der Histologie eher auf eine verstärkte Expression von SENP5 in Epithelzellen der Blutgefäße, Makrophagen oder Lymphozyten zurückzuführen sind. Weiterhin könnte eine Erhöhung auf Proteinebene, die durch eine veränderte Stabilität des Proteins oder eine verminderte Degradation hervorgerufen wird eine Erklärung sein.

Wie für die SENP5 Expression konnten die immunhistologischen Färbungen von SENP7 eine Erhöhung der Expression von SENP7 in RA-Synovialgewebe im Vergleich zu OA-Synovialgewebe detektieren. Diese Färbung zeigte sich im *lining layer* wie auch im *sublining* der Synovialmembran von RA-Patienten. Weiterhin fand sich eine Erhöhung der SENP7 Expression in den Epithelzellen der Blutgefäße. Im Gegensatz zu SENP5 ließ sich in den anschließenden Untersuchungen der RASF und OASF eine stark erhöhte Expression von SENP7 in den RASF nachweisen. Dieser Erhöhung bestätigten sich sowohl transkriptionel wie auch translational. Somit ist die erhöhte SENP7 Expression im Synovialgewebe von RA-Patienten auf eine erhöhte Expression von SENP7 in RASF zurückzuführen.

Die in der Histologie zu beobachtende stärkere SENP7 Expression im *lining layer*, der direkt der Synovialflüssigkeit zugewandten Zellschicht der Synovialmembran, macht die Hypothese einer Zytokininitiation von SENP7 denkbar. In der RA ist die Synovialflüssigkeit durch hohe Level ausgeschütteter Zytokine (wie TNF- α oder IL-1 β) gekennzeichnet^{20,40}. Denkbar wäre auch in der RA eine durch Zytokine bedingte Stresssituation unter der die Fibroblasten verstärkt SENP7 exprimieren, um so spezifisch auf SUMOylierungen einzuwirken und so die Zelle auf die veränderten Bedingungen reagieren zu lassen. Möglich wären hier weiterhin DNA-Strangbrüche, aber auch das Aktivieren oder Hemmen von Transkriptionsfaktoren. Ob diese SENP7 Erhöhung in den RASF ein Faktor in der stabilen Aktivierung der RASF ist oder eine Folge dieser Aktivierung bleibt offen.

Die Lokalisation von SENP5 konnte bisher nur in immortalisierten Zelllinien gezeigt werden^{98,145}. Zuninio *et al.* konnten eine Translokation von SENP5 aus dem Nukleolus in die Mitochondrien zeigen⁹⁸. In primären kultivierten RASF ist bisher keine Lokalisation von SENP5 gezeigt worden. In den Lokalisationsuntersuchungen konnten in RASF und OASF homogene Signale im Nukleus für SENP5 gezeigt werden. Auch zeigten diese Signale keine Unterschiede in ihrer Intensität zwischen RASF und OASF. Die Lokalisation von SENP5 im Nukleus deckt sich mit dem Zellkompartiment in dem der Grossteil der SUMOylierungsprozesse innerhalb der Zelle stattfindet.

Auch in den Lokalisationsuntersuchungen zeigte sich ein der SENP5 Lokalisation ähnliches Nukleussignal für SENP7 in den RASF und OASF. In der Intensität fiel das SENP7 Signal in den RASF deutlich stärker aus als in den OASF. Die RASF zeigten im Gegensatz zu den OASF eine punktuelle Akkumulation des SENP7 Signals im Nukleus. Zusätzlich wiesen die RASF und OASF ein klares Signal im Zytoplasma auf. Die auf diesen Erkenntnissen aufbauenden Kolokalisationsuntersuchungen in RASF konnten eine Kolokalisation des zytoplasmären SENP7 Signales mit dem Zentrosom und dem Golgi Apparat bestätigen. Sowohl das zytoplasmäre SENP7 Signal in den RASF und OASF wie auch die gefundenen Kolokalisationen im Zentrosom und Golgi Apparat sind bisher nicht gezeigt worden.

Das beobachtete punktuelle Muster im Nukleus der RASF ist in einem Grossteil der Zellkerne zu finden. Dieses Muster wurde auch in einer aktuellen Publikation von Maison *et al.* 2012 in NIH3T3 Zellen beobachtet. Dort wurde es mit einer Anreicherung von SENP7 im Bereich des Heterochromatins diskutiert¹⁴⁶. Zu beachten ist allerdings das SENP7 in dieser Publikation mit einem Expressionsvektor in den NIH3T3 Zellen überexprimiert wurde und eine untypische SENP7 Aktivität für SUMO-1 zeigte.

Der nukleäre Unterschied im Lokalisationsmuster von SENP7 in den RASF im Vergleich zu den OASF weist auf eine unterschiedliche SENP7 Regulationen von SUMOylierten Proteinen im Nukleus hin. Für eine andere Protease der SENP-Familie, SENP3 ist in der Literatur beschrieben, dass diese sich unter Hypoxie im Nukleus im Bereich der PML-Körperchen relokalisiert. Dort deSUMOyliert SENP3 die PML-Proteine, hierdurch wird die Anzahl der PML-Körperchen reduziert und die Proliferationsrate der HeLa-Zellen nimmt zu. Diese Stressreaktion ist reversibel und eine spezifische Reaktion der Zellen auf ihr verändertes Umgebungsmilieu⁹⁷.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Lokalisation von SENP7 im Zytoplasma von RASF und OASF gezeigt werden, die Spezifizierung dieser Lokalisation in RASF zeigte eine Kolokalisation von SENP7 mit dem Golgi Apparat und dem Zentrosom. Die Lokalisation in diesen Zellkompartimenten scheint nicht spezifisch für die synovialen Fibroblasten der RA zu sein, da die OASF das gleiche Muster im Zytoplasma zeigen. Die in RASF und OASF

beobachtete unbekannte SENP7 Lokalisation im Zytoplasma der Synovialfibroblasten könnte eine fibroblastenspezifische Lokalisation der Protease im Zytoplasma darstellen. Für SENP7 wäre eine Lokalisation in RASF und OASF zur Regulierung von nukleusexternen SUMOylierungen denkbar. Dies würde nur einen äußerst geringen Anteil der SUMOylierungsprozesse, welche üblicherweise im Nukleus stattfinden ausmachen und regulierend auf diese einwirken. Ebenso ist eine DeSUMOylierung oder Ketteneditierung von SUMOylierten Proteinen nach dem *shuttling* aus dem Nukleus in das Zytoplasma denkbar. Während es für SENP7 in der aktuellen Literatur keine Hinweise auf eine Lokalisation außerhalb des Nukleus gibt, ist für SENP5 eine Translokation in die Mitochondrien publiziert worden⁹⁸. Diese Lokalisation ist essentiell für die Dekonjugation von SUMO-1 von DRP-1. Unterbleibt diese Dekonjugation lässt sich eine Fragmentation der Mitochondrien feststellen. Diese flexible Änderung fügt sich gut in Publikationen ein die SUMO *shuttling* und SUMOylierungen außerhalb des Nukleus nachwiesen¹⁴⁷.

Die beobachtete Zentrosomenlokalisierung von SENP7 in den RASF weist auf eine Beteiligung der Protease an Zellteilungsprozessen hin. Zu einer derartigen Funktion ist in der momentanen Forschung zu SENP7 ebenfalls nichts publiziert. SENP6 als ein weiterer Vertreter der SENP-Proteine mit einer Insertion in der katalytischen Domäne, kann hier zumindest aufgrund der nahen Verwandtschaft zu SENP7 einige Hinweise zu Prozessen an der SENP7 beteiligt ist geben. Zu der SENP7 nahestehenden Protease konnte in der Publikation von Mukhopadhyay *et al.* die essentielle Beteiligung bei der Kinetochorerrichtung in HeLa-Zellen gezeigt werden. SENP6 wirkt in HeLa-Zellen der SUMO-2/3 Modifikation von CENP-1 entgegen. SUMOyliertes CENP-1 wird durch Ubiquitinierung zur Degradation markiert⁹⁶. Es ist denkbar, dass die Kollokalisierung von SENP7 mit dem Zentrosom auf eine ähnliche Funktion bei der Regulierung von SUMOylierungsprozessen bei der Ausbildung der Zentriolen hinweist.

Die Kollokalisierung von SENP7 im Golgi Apparat deutet eine Beteiligung der Protease an der Modifikation von Proteinen in diesem Zellorganell an¹⁴⁸. Leider liegen bisher keine Erkenntnisse zu SUMOylierungsprozessen in diesem Organell vor. Prozesse innerhalb dieses Organells wären ein Mechanismus die Substrateigenschaften von SUMO-Zielproteinen vor Ihrem Transport an ihren endgültigen Wirkungsort in der Zelle deutlich zu beeinflussen. Bisher ist kein SENP-Protein im Golgi Apparat nachgewiesen. SENP7 stellt mit dieser Lokalisation den einzigen Modifikator von SUMO-2/3 Proteinen und der SUMOylierung in diesem Zellorganell dar. SENP7 könnte hier die DeSUMOylierung von Zielproteinen während ihrer Endreifung katalysieren. Dieser Schritt könnte die Aktivität der Proteine verändern, ihre Stabilität, wie auch die endgültige Lokalisation der deSUMOylierten Zielproteine.

8.3. Expression von *SENP5* und *SENP7* in *hTNFtg* Synovialgewebe und SF

Die *hTNFtg* Maus entwickelt durch die dauerhaft erhöhte Expression von humanem TNF- α in einem Zeitraum von etwa sechs Wochen eine chronische, inflammatorische, polyartikuläre Arthritis. Diese schreitet kontinuierlich voran und zeigt in Woche Zehn in der Histologie eine chronische Entzündung, eine starke Pannusbildung sowie eine massive Gelenkzerstörung⁴². In histologischen Schnitten der Metatarsi von zehn Wochen alten *hTNFtg* Mäusen konnte eine starke Expression der murinen Proteasen *SENP5* und *SENP7* im Synovialgewebe im Vergleich zum Synovialgewebe der Metatarsi der gleichaltrigen *wt* Mäuse gezeigt werden. In der Maus sind Homologien aller humanen *SENP*-Proteine zu finden (*SENP1-3,5-7* und die *NEDD8* spezifische Protease *SENP8*).

Während die Expression von murinem *SENP5* (98 %ige Homologie zu humanem *SENP5*) gleichmäßig auf das Synovialgewebe der *hTNFtg* Maus verteilt scheint, ist die Expression von murinem *SENP7* (99 % Homologie zu humanem *SENP7*) im Synovialgewebe der *hTNFtg* Maus in den Bereichen des Pannusgewebe, starker Entzündung und starker Gelenkdestruktion besonders deutlich ausgeprägt. Die murine *SENP7* Expression in den Schnitten der *hTNFtg* Mittelfoten zeigt sich wie in der Färbung gegen murines *SENP5* deutlich stärker als in den Schnitten der *wt* Mittelfoten. Die weiteren Expressionsuntersuchungen von murinem *SENP7* in den *hTNFtg* SF und *wt* SF zeigten eine starke Erhöhung des Transkriptionslevels und der Translationsebene von murinem *SENP7* in den *hTNFtg* SF, analog zu den RASF. Auch in primären Synovialfibroblasten sind bisher keine Ergebnisse zur Expression von murinem *SENP5* oder *SENP7* bekannt, murines *SENP7* konnte durch Maison *et al.* in NIH3T3 Zellen nachgewiesen werden¹⁴⁶.

Um eine Erklärung zu finden, ob murines *SENP7* durch externe Stimuli initiiert wird, wurden Stimulationen von murinen SF mit *hTNF- α* und *IL-1 β* durchgeführt. Beide Zytokine spielen in der RA eine entscheidende Rolle und können mit als Initiatoren der stabilen Aktivierung von RASF angesehen werden⁵⁶. Die Stimulierung von *wt* SF mit *IL-1 β* zeigte keine Stimulation der murinen *SENP7* Expression. Hingegen stimulierte *hTNF- α* die Expression von murinem *SENP7* in *wt* SF. Unter Zytokinstimulation reagieren die Synovialfibroblasten mit einer erhöhten Expression von murinem *SENP7*, das seinerseits lokal in bestimmten Organellen auf die SUMOylierungen diverser Zielmoleküle einwirkt. So kann der Synovialfibroblast im gesunden Synovialgewebe auf eine Inflammation reagieren und durch Veränderung der SUMOylierungsmuster flexibel auf diese einwirken. Im erkrankten Synovialgewebe bei RA ist denkbar, dass diese Stressreaktion anhaltend bestehen bleibt und damit einhergehend die veränderte SUMOylierung durch SUMO-2/3. Neben der bisher immer wieder erwähnten Hypoxie als Stressfaktor für die Induktion der SUMO Expression zeigt sich hier erstmals

auch ein Mechanismus, der an der SUMOylierung beteiligte Proteine über Zytokinstimulationen modulieren kann. Beide Prozesse sind im Pannus und der Synovialmembran von RA-Patienten zu finden^{20,132,133}.

In den Synovialfibroblasten könnte diese erhöhte murine SENP7 Expression ursprünglich über die starke Zytokinausschüttung initiiert worden sein. Eine Normalisierung der SENP7 Expression scheint in den stabil aktivierten RASF zu unterbleiben. Dies führt dazu, dass die erhöhte Expression von murinem SENP7 in den stabil aktivierten RASF und die dauerhaft anhaltende übermäßige SUMOylierung erhalten bleibt. Funktionell ist eine veränderte Reaktion der gesunden murinen und humanen Synovialfibroblasten durch die ständige Ausschüttung des inflammatorischen Zytokins hTNF- α denkbar.

8.4. Einfluss von *SENP5* und *SENP7* auf die Proliferationsrate von *wt* und *hTNFtg SF*

SUMO-2/3 Modifikationen sowie der Effekt der unterschiedlichen SENP-Proteine auf die SUMOylierungen im Umfeld von Zellteilungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozessen wurde durch verschiedene Arbeiten gezeigt^{87,109,140,143,149,150}. Die letalen Phänotypen der bisher bekannten SENP KO-Mäuse lassen ebenfalls die essentielle Rolle der SENP-Proteine während der Embryogenese vermuten, bei der Zellteilungen, Differenzierungen und Proliferation ebenfalls eine zentrale Rolle spielen⁸⁹.

Die Überexpression von SENP5 in den *wt SF* erhöht die Proliferationsrate dieser Zellen. Dieser beobachtete Effekt auf die Proliferationsrate ist nach der Überexpression von SENP5 in *hTNFtg SF* noch deutlicher. Die Hemmung der SENP5 Expression mittels eines spezifischen siRNA Mix zeigt in *wt SF* einen geringen Effekt, die Proliferationsrate der murinen Synovialfibroblasten wurde gesenkt¹⁰³. In den *hTNFtg SF* erwirkte eine analoge Hemmung eine starke Reduktion der Proliferationsrate. Die Ergebnisse zur SENP7 Überexpression zeigten in den Proliferationsversuchen, dass überexprimiertes SENP7 in *wt SF* und *hTNFtg SF* einen proliferationssteigernden Effekt hat. Dieser Effekt war in *wt SF* deutlich und zeigte eine noch wesentlich stärkere Proliferationssteigerung in *hTNFtg SF*. Für SENP7 sind bisher keine Zusammenhänge mit der Proliferation publiziert. Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit der starke Effekt von SENP7 auf die Proliferation von primären murinen Synovialfibroblasten gezeigt werden. Diese Versuche sollten anknüpfen an die Arbeiten von Di Bacco *et al.* die den Einfluss von SENP5 auf die Proliferation zeigten¹⁰³. *Knock down* durch siRNA gegen SENP5 verhinderte, dass HeLa-Zellen weiterhin proliferierten und bewirkte einen Anstieg der SUMO-2/3 Expression in den mit der siRNA transfizierten Zellen. In dieser Publikation wird die fehlende DeSUMOylierung durch SENP5 von Proteinen wie PML und Topoisomerase II für den veränderten Zellzyklus und die

abweichende Proliferation diskutiert. Auch in *Xenopus* ist die SUMOylierung von Topoisomerase II essentiell für die Chromosomensegregation¹⁵¹. In wie weit die gefundenen Unterschiede in der Proliferation von murinen primären SF auf diese SUMOylierungen durch SUMO-2/3 zurückzuführen sind, ist unklar.

8.5. SENP5 und SENP7 in der Apoptoseregulation

Eines der Charakteristika von RASF ist unter Anderem die verminderte Empfindlichkeit gegenüber proapoptotischen Signalen^{27,58}. Die verminderte Apoptoserate sorgt mit dafür, dass sich mit fortschreitender Erkrankung das Pannusgewebe verdickt^{128,152}. Wie die Untersuchungen zeigten, weisen die transfizierten murinen wt SF nach einer Überexpression von SENP5 eine Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber der FAS-Ligand induzierten Apoptose auf. Dieser Effekt ist in den wt SF deutlich zu erkennen, ist im Vergleich mit einer SENP7 Überexpression in wt SF jedoch schwächer. Nach der Überexpression von SENP7 in wt SF wird die Empfindlichkeit von wt SF gegenüber FAS-Ligand induzierter Apoptose stark erhöht. Für die Proteasen SENP5 und 7 sind bisher allenfalls indirekte bzw. keine Bezüge zur Apoptose bekannt. Zunino *et. al* zeigten erstmals eine Translokation von SENP5 in die Mitochondrien während des Übergangs von der G2 zur M-Phase der Mitose in HeLa-Zellen. Die DeSUMOylierung von mitochondrialem DRP1 durch SENP5 initiiert die Fragmentierung der Mitochondrien^{98,145}. Untypisch für SENP5 zeigte die Protease hier eine SUMO-1 spezifische Aktivität. In der Publikation von Meineken *et al.* wurde der proapoptotische Effekt der DeSUMOylierung von SUMO-1 in RASF gezeigt. Durch eine Überexpression der Sentrin spezifischen Protease 1 (SENP1) wurde die Empfindlichkeit der RASF für FAS-Ligand induzierte Apoptose gesteigert. Die Überexpression von SENP1 deSUMOyliert SUMO-1 von PML, die PML Körperchen setzen *Death domain associated protein* (DAXX) frei, dass aus dem Nukleus transloziert und an die *death domain* des FAS-Rezeptors bindet und die RASF zugänglich für FAS-Ligand induzierte Apoptose machte. Bereits Okura *et. al* konnte 1996 diese Interaktion von SUMO-1 mit der intrazellulären Domäne (*death domain*) des FAS-Rezeptors und des TNF-Rezeptors nachweisen³⁵. Ein weiterer Zusammenhang der SUMOylierung mit der Apoptose wurde in *Drosophila melanogaster* aufgezeigt. Die p53 SUMOylierung erfolgt hier an zwei SUMOylierungsstellen. Die Mutation dieser Bindemotive reduziert die transkriptionelle Aktivität von p53 und senkt die Fähigkeit von p53 die Apoptose zu initiieren¹⁵³. Interessant sind die Funde von Mukherjee *et. al* zum *Golgi vesicle tethering protein* p115. Dieses Protein ist im Golgi Apparat lokalisiert, dem Organell in dem in den Kolokalisationsstudien dieser Arbeit ein Signal für SENP7 gefunden wurde. In der Frühphase der Apoptose wird durch Caspasen ein c-terminales Fragment von p115 abgetrennt. Dieses wird aus dem Golgi

Apparat unmittelbar in den Nukleus transportiert wo es die apoptotische Antwort der Zelle beschleunigt. Innerhalb des Fragmentes konnten mehrere SUMOylierungsstellen identifiziert werden. Die SUMOylierung dieses Fragmentes von p115 beschleunigt die Abspaltung des C-terminalen Fragmentes und damit die Apoptose¹⁴⁸. *How et. al* konnten darüber hinaus zeigen, dass dieses Fragment über eine p53-ERK Interaktion die apoptotischen Signale amplifiziert¹⁵⁴. Welcher dieser regulatorischen Signalwege durch SENP5 bzw. SENP7 beeinflusst wird, kann nicht abschließend geklärt werden. Denkbar ist, dass die veränderte SUMOylierung als Folge einer erhöhten SENP5 oder SENP7 Expression Auswirkungen auf unterschiedliche proapoptotische Signalmoleküle hat.

8.6. SENP5 und SENP7 in der Regulation von murinem pro-MMP-9

Maßgeblich an der Destruktion der EZM beteiligt, spielen die MMP eine zentrale Rolle bei den destruktiven Prozessen der RA. Die während der RA überexprimierten MMP sorgen für eine progressive Degradation der EZM durch Spaltung der Proteoglykane und den Abbau von Kollagen II. Initiiert wird die Expression von MMP durch exogene Stimuli (u.A. Hypoxie, toxisches Milieu) wie auch durch verschiedene Zytokine wie z.B. TNF- α oder IL-1 β ^{19,56}.

Die Messung der murinen pro-MMP-9 Expression in wt SF nach einer erfolgten Transfektion mit einem SENP5 Expressionsvektor zeigte eine starke Induktion der Expression von murinem pro-MMP-9 in den murinen Synovialfibroblasten. Noch eindrücklicher sind die in dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse für den Zusammenhang einer Überexpression von SENP7 mit der murinen pro-MMP-9 Expression in wt SF. Eine Überexpression von SENP7 führte zu einer intensiven Aktivierung der murinen pro-MMP-9 Expression in den wt SF. Untersuchungen in der RA zeigten, dass MMP-9 gerade im Bereich von hoher Entzündung sowie im *synovial lining* deutlich erhöht ist¹⁵⁵. Diese Bereiche decken sich mit den Bereichen in den humanen RA-Synovialgewebeschnitten und den Metatarsipräparaten der hTNFtg Maus, in denen eine intensive Färbung für SENP7 immunhistologisch gezeigt werden konnte. MMP-9 ist an der Invasivität der RASF und der Destruktion des Knorpels beteiligt^{21,156}. Da sich die SENP7 Expression über die Funde im *lining layer* hinaus auch in den Epithelzellen der Blutgefäße fanden, kann weiterhin eine Beteiligung dieser Protease in der Angiogenese vermutet werden, da MMP-9 als Gelatinease maßgeblich an der Angiogenese beteiligt ist. Bisher sind jedoch weder für SENP5 noch für SENP7 Bezüge zur Regulation oder Modifikation der MMP bekannt. Ebenso sind keine SUMO-2/3 Modifikationen mit direkten oder indirekten Effekten auf die MMP publiziert. Für SUMO-1 gibt es erste Erkenntnisse für eine modulierende Wirkung auf die MMP-1 und -13^{14,157}.

Funktionell könnten SUMO-Modifikationen auf verschiedenen Ebenen auf die MMP-Regulation einwirken. Denkbar wären unter Anderem Modifikationen von

Transkriptionsfaktoren oder Cofaktoren die SUMOyliert oder DeSUMOyliert einen Einfluss auf die MMP Expressionen haben. Eine Regulierung der MMP Expression mit einem Bezug zur SUMOylierung ist für MMP-13 nachgewiesen worden. SUMOyliertes S100A4 transloziert in den Nukleus und wirkt als Cofaktor für einen bisher unbekanntem Transkriptionsfaktor induzierend auf die IL-1 β vermittelte MMP-13 Expression¹⁵⁷.

Weiterhin gibt es Hinweise für SUMO-1, dass durch SUMOylierung von Histon-Deacetylase 4 (HDAC 4) die Kondensation der DNA auf epigenetischer Ebene an Promotorregionen beeinflusst werden kann. Wie Maciejewska-Rodriguez *et. al* für MMP-1 zeigen konnten, ist die erhöhte Expression von MMP-1 indirekt mit der Acetylierung von Histon 4 in der distalen Promotorregion von MMP-1 verbunden. Durch Überexpression von SENP1 konnte die SUMOylierungsabhängige Acetylierung der Histone in der Promotorregion gesenkt werden. Dies führte zu einer Kondensation des Chromatins und hemmte die MMP-1 Expression¹⁴.

Auch das direkte Einwirken auf MMP als Zielprotein für eine SUMOylierung ist möglich. In der Literatur wird die SUMOylierung allgemein eher mit einer Repression der Transkription assoziiert als mit einer Aktivierung¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Gegenbeispiele sind dennoch zu finden und zeigen den aktivierenden Effekt einer SUMOylierung auf die Transkription. Beispielweise kann die SUMOylierung von *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP), einem *shuttling* Protein und Cofaktor für die p53 Aktivierung, nach DNA Schädigung die transkriptionelle Aktivierung von p53 initiieren¹⁶². Direkte SUMOylierungen der MMP durch SUMO-2/3 sind jedoch nicht bekannt. Die bekannten SIM können über spezielle Software identifiziert werden, allerdings gibt es neben den SIM-Konsensusmotiven für eine SUMOylierung eine Vielzahl untypischer Bindemotive, die schwer zu definieren sind^{82,163}. Die Konsequenzen einer SUMO-Modifikation der MMP sind daher vielgestaltig und schwer zu benennen¹⁶⁴.

Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation erstmalig die starke Erhöhung der SUMO-2/3 Modifikation und die mit diesem Ungleichgewicht einhergehenden erhöhten Expressionen von SENP5 und SENP7 im Synovialgewebe der RA nachgewiesen werden. SUMOylierungen als zentral wirkende Prozesse bieten einen aussichtreichen Kandidaten für ein tieferes Verständniss des charakteristischen Phänotypes der RASF. So konnten in den funktionellen Untersuchungen dieser Dissertation die Einflüsse der Proteasen SENP5 und SENP7 auf die Proliferation in wt und hTNFtg SF, die Apoptoserate und die Expression von murinem pro-MMP-9 in wt SF gezeigt werden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse erweitern das noch junge Forschungsfeld der SENP-Proteine um erste Erkenntnisse zur Bedeutung von SENP5 und SENP7 in der RA. Wie diese Proteasen auf die untersuchten Prozesse einwirken, bleibt jedoch unverstanden. Die Funktionen dieser Proteasen sind nur unzureichend verstanden und durch die zum Teil widersprüchlichen Publikationen für die Substratspezifitäten der SENP-Proteine bisher schwer einzugrenzen^{145,146}.

9. Material

9.1. Reagenzien

Die in den Versuchen verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München), Roche Diagnostics (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) in Analyse-/Reinstqualität bezogen.

9.2. Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, insbesondere Materialien für die Zellkultur, wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen) bezogen.

Die verwendeten Einwegpipetten und Falconröhrchen stammten von BD Biosciences (Heidelberg), Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1,5 ml und 2 ml) von Eppendorff (Hamburg), Sterilfilter von Sartorius (Göttingen) und Pipettenspitzen von Sarstedt (Nümbrecht). Weitere Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls von diesen Herstellern bezogen, oder sind im Text anderweitig gekennzeichnet.

9.3. Geräte

Die Geräte die für die Versuche dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 4 mit den entsprechenden Herstellern aufgeführt.

Tabelle 4 Geräte

Geräte	Hersteller
Advanced Primus 96 Thermocycler	Peqlab, Erlangen
AF 10 Eismaschine	HIBU, Sprockhövel
Casy Modell TT Cell Counter	Roche Diagnostics, Mannheim
Eppendorf Photometer plus	Eppendorf, Hamburg
EVOM-Messgerät	WPI, Sarasota USA
Excelsior ES	Thermo Fisher, Oberhausen
HIR-3 Wasserbad	Thermo Scientific, Schwerte
HLC Thermoschüttler	HLC Biotech, Pforzheim
Infinity Modell 1000 Geldokumentation	Peqlab, Erlangen
JB Aqua 12 Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge
MHR23 Thermoschüttler	HLC Biotech, Pforzheim
Mikroskop AX 10	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axio observer Z1	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Microtom HM355S	Thermo Scientific, Schwerte
pH Meter 766	Mercateo, München
Precellys 24, Homogenisator	Peqlab, Erlangen
Rotator SB3 Stuart (Drehrad)	Carl Roth, Karlsruhe
RM5 Assistent Rollschüttler	Medchrom, Förstheim-Dahlheim
Synergy Millipore	Millipore, Schwalbach
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg

Geräte	Hersteller
True Confocal Scanner Leica TCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar
Unimax 1010, Inlab Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Varioklav Dampf Sterilisator HP	Medizintechnik, Oberschleißheim
Vortex Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe
Waage ALC Modell	Acculab, Göttingen
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

9.4. Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung des Puffers/der Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung (BSA)	3% (w/v) BSA in TBS
Blockierlösung (Histologie)	10% (w/v) <i>horse serum</i> in TBS
Blockierlösung (Milchpulver)	3% (v/v) Blott Milchpulver (Santa Cruz, Heidelberg) in TBS
DEPC Wasser	1ml DEPC (Applichem, Darmstadt) 1 Liter bidest H ₂ O ÜN lösen
Dispase-Lösung	75 mg Dispase II (Roche Diagnostics, Mannheim) in 50 ml DMEM mit 4,5 g/l Glukose
6x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris HCl (pH 7,6) 0,03% (w/v) Bromphenolblau 0,03% (w/v) Xylencyanol 60% (v/v) Glycerol 60 mM EDTA
Einfriermedium	10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) 90% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)
Kollagenlösung (MATRIN-Assay)	75 µl PureCol (Inamed, Fremont) 10 µl Natriumbicarbonat (Gibco, Karlsruhe) 20 µl 10x MEM (Biochrom AG, Berlin)
Kollagenlösung	0,2 µg/ml Kollagen (Ratten) in 0,1 N Essigsäure
Laemmli Protein-Probenpuffer	0,125M Tris/HCl pH 6,8 20% (v/v) Glycerin 10% (v/v) 2-Merkaptoethanol 4% (w/v) SDS 0,004% (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer, pH 8,3	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 2,5% (v/v) Glycerin
MDCK-C7-Puffer	0,2 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 8 g NaCl 1,15 g NaHPO ₄ ad 1000 ml H ₂ O

Bezeichnung des Puffers/der Lösung	Zusammensetzung
NP-40-Lysispuffer	20 mM Tris HCl pH 8 137 mM NaCl 10% (v/v) Glycerol 1% (w/v) NP-40 2 mM EDTA
4% Paraformaldehyd (PFA), pH 7,4	20 g PFA ad 1000 ml 1x PBS
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	9,55 g PBS (Invitrogen, Karlsruhe) ad 1000 ml H ₂ O
Plasmid-Puffer I	50 mM Tris pH 8 mit HCl 10 mM EDTA 0,1 µg/µl RNase
Plasmid-Puffer II	1% (w/v) SDS 200 mM NaOH
Plasmid-Puffer III	3 M Kaliumacetat, pH 4,8 mit Essigsäure
Proteinlysepuffer	50 mM Tris (pH 7,4) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% (w/v) NP40 0,1% (w/v) SDS
6x Protein-Probenpuffer	0,5% (w/v) SDS 15 mM Dithiothreitol (DTT) 15 mM Tris Base (pH 7,0) 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Stripping-Puffer	0,5 M Essigsäure 0,5 M NaCl
Transferpuffer	48 mM Tris Base 39 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS 10% (v/v) Ethanol
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	20 ml 50x TAE (Millipore, Schwalbach) EDTA · Na ₂ · 2H ₂ O 18,61 g/l Eisessig 60,05 g/L Tris 242,28 g/L 980 ml H ₂ O dest
Tris-gepufferte Saline (TBS)	7,7 mM Tris HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl

9.5. Primer und siRNAs

Die in Tabelle 6 angegebenen Primer wurden als Lyophilisat von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und in RNase freiem Wasser rekonstituiert.

In den PCR-Versuchen wurden die jeweiligen Primer in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l eingesetzt.

Tabelle 6 Primer

Primerbezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'
Mouse SENP7 fwd	GGG GAC CAG CAA CAA GAA TA
Mouse SENP7 rev	CTT CAC CGG ACT CTT CAA GC
GAPDH fwd	TCC TGC ACC ACC AAC TGC TT
GAPDH rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
huTNF fwd	TAC CCC CTC CTT CAG ACA CC
huTNF rev	GCC CTT CAT AAT ATC CCC CA
M13 fwd (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA GTG
M13 rev (-27)	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G
SP6 fwd	TAC GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7 rev	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG
Human SUMO2 fwd	GGG CAA CCA ATC AAT GAA AC
Human SUMO2 rev	AGT CAG GAT GTG GTG GAA CC
Human SENP7 fwd	CCG AAA TCA TCA CAG AAG
Human SENP7 rev	CAG GAC ACC CTC GGA TAT
Human SENP5 fwd	CCC AAC ACC ACT GAT CTG AA
Human SENP5 rev	GCA GCC TTT CCA GTT TTC AC

Die in Tabelle 7 aufgeführten siRNAs (nach der Publikation von di Baccio *et al.*¹⁰³) wurden als Lyophilisat von der Firma Qiagen, Hilden bezogen. In den Versuchen wurden die siRNAs zusammen als siRNA-Mix nach dem Standardprotokoll für eine Lipofection mit Lipofectamine 2000 eingesetzt.

Tabelle 7 Verwendete siRNA

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'
SENP5 RNAi 133	GAA AGC TAA GCT GGG AAG GCA
SEBP5 RNAi 1111	GGG AGT GTA CAG AGC TGA TTA

9.6. Antikörper

Die in der Tabelle 8 aufgeführten Antikörper wurden für Western Blot (WB)-Analysen, histologische Färbungen (HC) oder immunohistochemischen Färbungen (IC) in der angegebenen Verdünnung verwendet.

Tabelle 8 Antikörper

Antikörper-spezifität	Typ	Größe des Zielproteins in [kDa]	Verdünnung im WB/HC/IC	Bezugsquelle
Anti-SEN7	<i>Polyclonal rabbit</i>	112	1:500 (WB) 1:300 (HC/IC)	Abcam AB5906
Anti-SEN7	<i>Polyclonal rabbit</i>	112	1:500 (WB)	Abgent AP1241a
Anti-SEN7	<i>Monoclonal rabbit</i>	112	1:500 (WB)	Novus Biologicals NB100-92106
Anti-SEN5 (C-Terminal)	<i>Polyclonal rabbit</i>	87	1:500 (WB) 1:300 (HC/IC)	Abcam AB58420
Anti-SUMO2/3	<i>Polyclonal rabbit</i>	11	1:300 (WB) 1:300 (HC)	Chemicon Ab3876
Anti-SEN5	<i>Polyclonal rabbit</i>	87	1:500 (WB) 1:500 (IC)	Abcam Ab58420
Anti-GAPDH-HRP	HRP gekoppelt <i>goat</i>	37	1:1000 (WB)	Cell-Signaling #3683
Anti-β-Actin	<i>Monoclonal rabbit</i>	43	1:5000 (WB)	Sigma A5441
Anti-gamma Tubulin	<i>Monoclonal mouse</i>	50	1:1000 (WB)	Sigma T9026
Anti-Golgi Protein 58k	<i>Monoclonal mouse</i>	58	1:250 (IC)	Abcam AB 6284
Anti-Biotinylated- <i>mouse</i> IgG	<i>mouse</i>	-	1:100 (HC)	Vector BA-2001
Anti-Biotinylated <i>rabbit</i> IgG	- <i>rabbit</i>	-	1:300 (HC)	Vector BA-2001

Antikörper-spezifität	Typ	Größe des Zielproteins in [kDa]	Verdünnung im WB/HC/IC	Bezugsquelle
Anti-Streptavidin <i>rabbit</i> (Biotin)	<i>rabbit</i>	-	1:1000 (IC)	Invitrogen
Anti-F4/80 FITC	<i>Rat monoclonal</i>	-	1:1000 (IC)	Abcam
Alexa Fluor 488 anti- <i>rabbit</i> IgG	<i>rabbit</i>	-	1:1000 (IC)	Invitrogen A11008
Anti- <i>rabbit</i> IgG	HRP gekoppelt <i>goat</i>	-	1:5000 (WB)	Dako Cytomation, Hamburg
Anti- <i>mice</i> IgG	HRP gekoppelt <i>horse</i>	-	1:5000 (WB)	Dako Cytomation, Hamburg

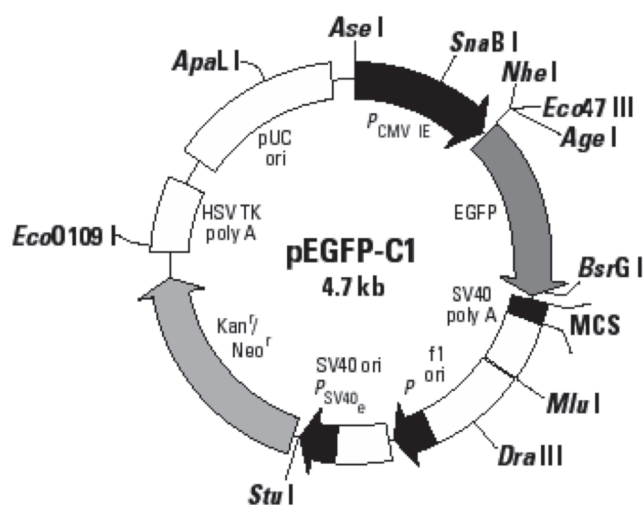
9.7. Expressionsvektoren und Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Expressionskonstrukte verwendet. Die Tabelle 9 fasst die verwendeten Konstrukte zusammen, welche in den Abbildungen 27 und 28 schematisch durch Vektorkarten dargestellt sind.

Tabelle 9 Verwendete Konstrukte

Bezeichnung	Expressionsvektor	Sequenz	Herkunft
SENP5GFP	pEGFC-C1 Das <i>Insert</i> wurde über Sall und XbaI in den Vektor eingebracht	humanes SENP5 Gen ID: 205564	Di Bacco <i>et al.</i> 2006 ¹⁰³
SENP1GFP	pEGFP-C1 Das <i>Insert</i> wurde über BglII und EcoRI in den Vektor eingebracht	humanes SENP1 Gen ID: 29843	Meinecke <i>et al.</i> ¹
SENP7CMV	CMV-Sport6 Das <i>Insert</i> wurde über ASP718I und XbaI in den Vektor eingebracht.	murines SENP7 Gen MGI:1913565	Bezogen über das Deutsche Zentrum für Krebsforschung, Heidelberg aus Mausretina cDNA Über eine Restriktion mit Sall und NotI in die MCS des CMV-Sport6 Konstruktes eingebracht

A)



B)

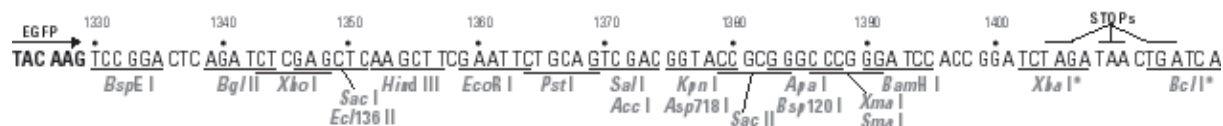


Abbildung 29 Vektorkarte des pEGFP-C1 Klonierungsvektors

(Vektorkarte, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) A) Schematische Darstellung des Klonierungsvektors und ausgewählte Restriktionsschnittstellen. SV40ori, SV40 Promotorregion, Kan/Neo (Kanamycin/Neomycinresistenz), EGFP (*enhanced green fluorescing protein*), CMV (*CMV enhancer promotor*), pUCori (*Puc origin of replication*), SV40polyA (*SV40 polyadenylation site*), HSVpolyA (*HSV polyadenylation site*). B) Schematische Darstellung der *multiple cloning site* (MCS) des Vektors mit den in ihr befindlichen Restriktionsschnittstellen.

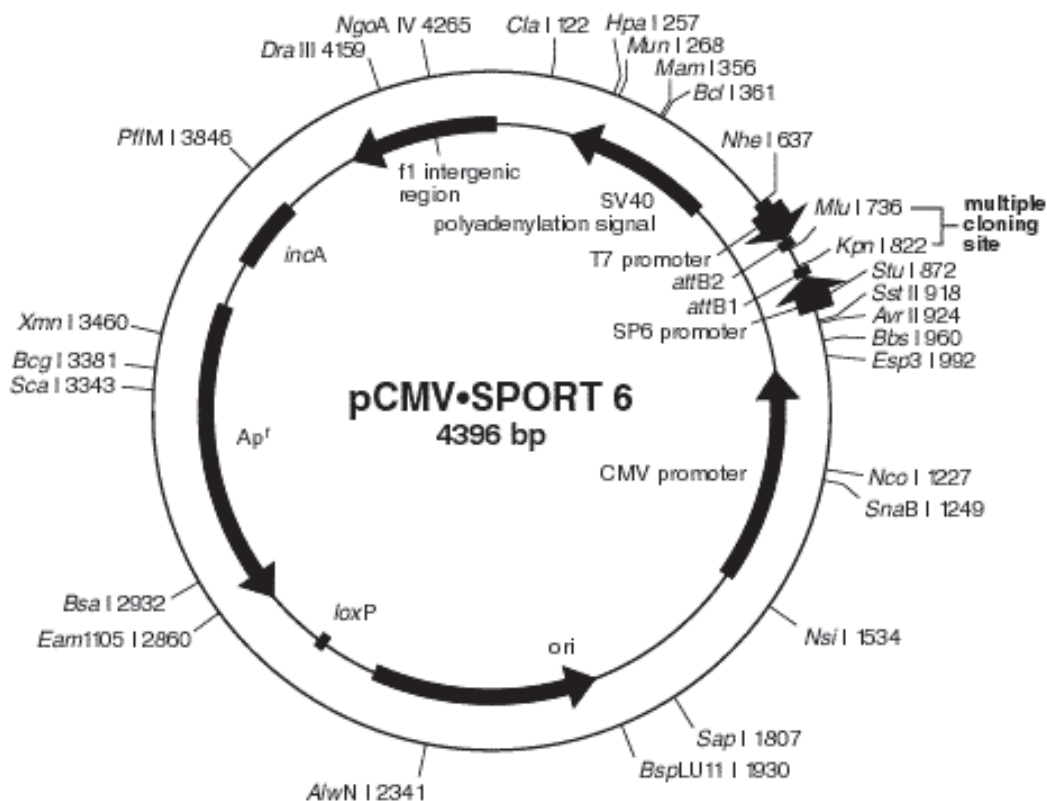


Abbildung 30 Vektorkarte des pCMV-Sport6 Klonierungsvektors

Dargestellt ist das Expressionskonstrukt unter Vorherhebung für die Klonierung bedeutsamer Regionen wie die Restriktionsschnittstellen, SV40ori, SV40 Promotorregion, Ampicillinresistenz und des CMV Promotors (CMV) (Abbildung nach Addgene).

Der Expressionsvektor pCMV-Sport6 hat eine Größe von 4396 Nukleotiden (siehe Abbildung 28). Dieser Vektor besitzt einen CMV-Promotor und zur Selektion in *E. coli* einen kodierenden Abschnitt für die Ampicillinresistenz.

9.8. *Kompetente Bakterien*

Zur Klonierung von Plasmiden wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 10 Kompetente Bakterien

Bezeichnung	Herkunft
Top-10	Invitrogen, Darmstadt
XL1-Gold	Stratagene, Waldbronn
One Shot stbl3	Invitrogen, Karlsruhe

10. Methoden

10.1. Tierversuche

10.1.1. Entkalkung und Einbettung von murinen Hinterpfoten für histologische Untersuchungen

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten aus murinen Hinterpfoten für die nachfolgenden immunhistologischen Untersuchungen, mussten diese von den Mäusen abpräpariert, entkalkt und geschnitten werden. Hierzu wurde das folgende Protokoll verwendet:

Die Hinterpfoten der verwendeten Versuchsmäuse wurden freipräpariert und je nach Dicke des Präparates 24 h bei 4°C mit 4% PFA fixiert. Nach der Fixierung des Gewebes wurden die Hinterpfoten in 15 ml Falconröhrchen weiterinkubiert. Die Entkalkung der Knochen verlief über folgende Schritte: Zum Entfernen des PFA wurden die fixierten Präparate dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 10% EDTA/PBS auf die Präparate gegeben und diese für 6-8 Wochen bei Raumtemperatur inkubiert. Das 10%ige EDTA wurde alle 3-4 Tage erneuert und der Fortschritt der Entkalkung kontrolliert. Hierzu konnte die Konsistenz des Knochens durch vorsichtiges Anstechen mit einer Kanüle überprüft werden. Nach der Entkalkung der Präparate wurden diese 24 h in PBS gelagert. Auch hier wurde das PBS dreimal gewechselt. Die entkalkten Präparate wurden nun entwässert und in Zedernholzöl überführt. Hierzu lagerte man diese einen Tag in PBS, anschließend etwa 12 h in 70%igem Alkohol (zweimaliges Wechseln des Alkohols), 12 h in 90%igem Alkohol (zweimalig wechseln). Weitere 24 h später in 96%igem Alkohol und 24 h später in 100%iger Alkohol für 24 h. Dann wurden die entwässerten Präparate in Zedernholzöl (Roth, Karlsruhe) überführt. Wiederum einen Tag später wurden die Präparate in bei 60°C gelöstes Paraffin (Roth, Karlsruhe) gegeben. Zuerst 24 h in einem 1:2 Gemisch aus Zedernholzöl und Paraffin bei 48°C. Danach 8 h in einem ersten Paraffinbad bei 60°C anschließend 16 h in einem zweiten Paraffinbad bei 60°C und abschließend 4 h im dritten Paraffinbad bei 60°C. Die nun paraffinierten Präparate wurden am Excelsior ES (Thermo Fisher, Oberhausen) Einbettautomat in Paraffin eingebettet und am Micro HM355S Mikrotom (Thermo Fisher, Oberhausen) in 4 µm dicke Präparate geschnitten.

10.2. Histologische Methoden

10.2.1. Vorbereitung von humanem Synovialgewebe für histologische Untersuchungen

Zur Einbettung verwendetes Synovialgewebe wurde mit PBS gewaschen und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Im Anschluß wurde das fixierte Gewebe dreimal für 30 min mit PBS gewaschen und in Paraffin eingebettet. Während Endoprothesenoperationen wurden Gewebeproben der operierten RA- und OA-Patienten entnommen und diese in PBS gelagert. Ein Teil dieser Proben wurde zur Isolierung von primären Synovialfibroblasten für die Zellkultur verwendet, der übrige Teil des Synovialgewebes wurde in Paraffin eingebettet, um in Gewebeschnitten Verwendung zu finden. Um Gewebeproben von RA- und OA-Patienten in Paraffin einzubetten, wurden sie jeweils für 24 h in 70-, 90-, 96- und 100%igem Ethanol entwässert. Der verwendete Alkohol wurde hierbei zweimal täglich gewechselt. Anschließend wurden die Präparate für 24 h in Zedernholzöl (Merck, Karlsruhe) bei RT und anschließend für 24 h in einem 50:50 Gemisch aus Zederholzöl und Paraffin bei 48°C gegeben. Für jeweils weitere 12 h wurden die Proben nacheinander in fünf verschiedene Paraffinbäder bei 60°C getaucht und anschließend achsengerecht in passende Blockformen eingebettet, bei 4°C gehärtet und anschließend am Mikrotom (Leica) geschnitten oder bei RT gelagert. Am Mikrotom wurden von den Paraffinblöcken, nach Kühlung auf 4°C, 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt und diese im 40°C warmen Wasserbad vereinzelt und entfaltet. Anschließend wurden die Präparate auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

10.3. Immunologische Methoden

10.3.1. Immunhistologische Färbung von Paraffinschnitten

Zum Nachweis von Proteinen in Gewebeproben wurden diese mit spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 8) markiert. Die wie in Abschnitt 10.1.1 eingebetteten und geschnittenen humanen Gewebeproben und Mauspfoten wurden wie nachfolgend erläutert gefärbt. Zuerst wurde das Paraffin durch 5 min dreimaliges Inkubieren in Xylolbädern entfernt. Anschließend wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration inkubiert.

2 min in 100%igem Alkohol
2 min in 96%igem Alkohol
2 min in 80%igem Alkohol
2 min in 70%igem Alkohol
zweimal 2 min Aqua dest.
dreimal 5 min in TBS

Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte mit Trypsin-EDTA bedeckt und 15 min bei 37°C inkubiert. Ein Abfließen des Trypsin-EDTA und somit ein Austrocknen der Schnitte wurde verhindert, indem diese zuvor mit dem Wachsstift, PAP-Pen (Kisker, Steinfurt) umkreist wurden. Dieser bildete eine Barriere um die Schnitte. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in Aqua dest. und 5 min in TBS gewaschen, die Objektträger in eine feuchte Inkubationskammer überführt, mit Blockierungslösung bedeckt (ca. 50µl je Schnitt, 10% *horse* serum in TBS) und bei RT für 30 min inkubiert. Nach der Blockierung wurde der primäre AK in Blockierungslösung entsprechend den Angaben in Tabelle 8 verdünnt und nach Abnehmen des Blockierungsserums auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte 1-2 h bei 37°C im Brutschrank oder ÜN bei 4°C in einer feuchten Inkubationskammer. Anschließend wurde dreimal 5 min mit TBS gespült. Der sekundäre AK wurde in 1%iger Blockierungslösung angesetzt (siehe Tabelle 8). Die Schnitte wurden mit den entsprechenden sekundären AK 30 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation, 30 min vor Gebrauch, wurde das alkalische Phosphatase Reagenz (Linaris, Wertheim) nach Herstellerangaben angesetzt. Nach der Inkubation mit dem sekundären AK wurde die AK-Lösung abgenommen und die Schnitte mit einigen Tropfen des alkalischen Phosphatase Reagenz bedeckt und in der Feuchtkammer 30 min inkubiert und anschließend dreimal 3 min in TBS gewaschen. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurden die Lösungen

des Substratkits (*Vector laboratories*, Lörach) nach Angaben des Herstellers vorbereitet. 30 min Inkubation mit dem Substrat bei RT lichtgeschützt und 1 min Waschen mit Leitungswasser folgte. Zu einer Gegenfärbung der Zellkerne wurde Methylgrün (5-10 min, RT) verwendet. Die Schnitte wurden 1 min in Aqua dest. gewaschen und in zwei kurzen Schritten in 96%igem Alkohol inkubiert. Abschließend folgten 3 Schritte mit jeweils 3 min Xylol bevor die Schnitte mit DPX (Sigma Aldrich, München) eingedeckelt wurden.

10.3.2. Immunhistochemische Färbung von Zellen

Um die Lokalisation eines Proteins nachweisen zu können, wurden in dieser Arbeit immunhistochemische Färbungen an fixierten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Zellen mit 70-80%iger Konfluenz auf *chamber slides* oder Deckgläschen in 6 Lochplatten ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden in den Zellkulturschalen kultiviert, stimuliert bzw. transfiziert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Hierbei ist darauf zu achten, die Zellen nicht austrocknen zu lassen. Anschließend wurden die Zellen mit 4%igem PFA für 20 min auf Eis fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Permeabilisierung 20 min mit Triton X-100 bedeckt. Erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernte das Triton X-100 von den Zellen. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die fixierten Zellen mit Blockierungslösung (1% BSA, 5% *goat* Serum) in PBS für 30 min bei RT oder ÜN bei 4°C inkubiert. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und der primäre AK in entsprechender Verdünnung (Tabelle 8) in Blockierungslösung auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und der sekundäre AK auf die Zellen gegeben. Auch dieser wurde in Blockierungslösung verdünnt und 1 h bei 37°C inkubiert. Wiederum wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI (1:10.000 in Blockierungslösung) oder die Färbung des Zytoskelettes durch das Pilzgift Phalloidin, welches F-Aktin im Zytoskelett markiert (1:1000 in Blockierungsserum), das im letzten Waschschrift für 5 min auf die Zellen gegeben wurde. Nach 5 min Inkubation wurde mit Aqua dest. gespült und die Deckgläschen mit Moviol (Sigma Aldrich, München) eingedeckelt. Die Visualisierung erfolgte am Olympus BX51 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar).

10.3.3. Extraktion von Gesamtprotein

Zur Isolation von Proteinen aus adhärennten Zellen wurden diese nach einmaligem Waschen mit PBS mit NP-40 Proteinlysepuffer, der mit 1x *Complete Protease Inhibitor* (Roche

Diagnostics, Mannheim) und 1 mM DTT versetzt wurde, auf Eis mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gekratzt und 15 min auf dem Drehrad (Carl Roth, Karlsruhe) bei 4°C inkubiert. Mittels Zentrifugation (10 min, 14.000g, 4°C) wurden die Zelltrümmer pelletiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentrationen im Überstand bestimmt (siehe Kapitel 10.3.4). Sofern eine Lagerung der Proteinextrakte nötig war wurden diese bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

10.3.4. Quantitative Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Proteinextrakte wurde nach Lowry mit dem *DC Protein Assay Kit* (Carl Roth, Karlsruhe) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard für eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration diente eine Reihe an BSA Lösungen mit definierter Konzentration von 0-10 µg/ml. Die optische Dichte der Standardreihe und der Proteinextrakte wurde bei 540 nm mit dem *1420 Multilabel Counter Victor3* gemessen. Anhand der BSA-Standardreihe konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

10.3.5. SDS-Gelelektrophorese

Um ein Protein in den Proteinextrakten mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen, wurden die Proteinextrakte (siehe Kapitel 10.3.3 und 10.3.4) elektrophoretisch ihrer Größe nach mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Mini PROTEAN® 3 System*, BioRad, München) (siehe unten) aufgetrennt. Definierte Proteinmengen wurden mit 6x Laemmly Protein-Probenpuffer versetzt um einen Stapelungseffekt an der Grenze vom Sammelgel mit neutralem pH-Wert zum Trenngel mit basischem pH-Wert zu verhindern¹⁶⁵. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die denaturierten Proteinextrakte wurden in die Taschen des Sammelgels pipettiert und bei 30 mA pro Gel elektrophoretisch getrennt. Als Größenstandard fand der Proteinmarker *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) Verwendung.

Gelansatz (für jeweils etwa 4 Mini-Gele mit einer Dicke von 1mm):

	<i>Sammelgel (4%):</i>	<i>Trenngel (8%)</i>	<i>Trenngel (10%)</i>	<i>Trenngel (12%)</i>
<i>Aqua dest.</i>	<i>4,65 ml</i>	<i>9,3 ml</i>	<i>8,9 ml</i>	<i>6,6 ml</i>
<i>30% Acrylamid</i>	<i>1 ml</i>	<i>5,3 ml</i>	<i>6,7 ml</i>	<i>8,0 ml</i>
<i>Tris-Puffer</i>	<i>1,88 ml (1 M)</i>	<i>5 ml (1,5 M)</i>	<i>5 ml (1,5 M)</i>	<i>5 ml (1,5 M)</i>
	<i>pH 6,8</i>	<i>pH 8,8</i>	<i>pH 8,8</i>	<i>pH 8,8</i>
<i>10% SDS (v/v)</i>	<i>75 µl</i>	<i>0,2 ml</i>	<i>0,2 ml</i>	<i>0,2 ml</i>
<i>10% APS (v/v)</i>	<i>37,5 µl</i>	<i>0,2 ml</i>	<i>0,2 ml</i>	<i>0,2 ml</i>
<i>TEMED</i>	<i>7,5 µl</i>	<i>8 µl</i>	<i>8 µl</i>	<i>8 µl</i>

10.3.6. Western-Blot zum immunhistologischen Nachweis von Proteinen

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine durch das *Mini Trans-Blot® cell* System (BioRad, München) mit einem *wet* Tank-Blot Verfahren auf eine proteinbindende Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Millipore, Schwalbach) oder eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Das SDS-Gel in dem sich die, der Größe nach aufgetrennten Proteine befinden, wurde aus der Laufkammer entfernt und 5-10 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Dieser Schritt kann bei kleinen Proteinen den Transfer aus dem Gel deutlich erhöhen, da vor dem Blotten das überschüssige SDS aus dem Gel gewaschen wird. Zwischenzeitig wird die Membran vorbereitet:

PVDF Membran: 1 min in Methanol schwenken, 1 min in H₂O

Nitrozellulose: kurzes Befeuchten im Transferpuffer

Der Blot wird in der Blotkammer folgendermaßen zusammengesetzt: Vom Minuspol zum Pluspol hin wird die Kammer mit zwei in Transferpuffer befeuchteten Filterpapieren (*Whatmanpaper*), dem Gel, der Membran und erneut zwei Filterpapieren zusammengesetzt. Hierbei ist besonders auf eine luftblasenfreie Schichtung und eine Benetzung mit Transferpuffer zu achten. Dieser Aufbau wird in die mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer gesetzt und ein Eispack zur Kühlung hinzugegeben. Der Transfer der Proteine aus dem

Polyacrylamidgel auf die PVDF- oder Nitrozellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch bei 200 V und 340 mA für 1,5 h.

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Membran kann eine vollständige Proteinübertragung aus dem Gel mit einer Comassiefärbung überprüft werden. Hierzu wird das Gel für 10 min mit Comassie (Sigma Aldrich, St.Gallen) inkubiert und danach in TBS gewaschen. Proteine erscheinen im gefärbten Gel als blaues Bandenmuster.

Zur Visualisierung der Übertragungsrates von Proteinen auf die Membran kann die Membran mit Ponceau S gefärbt werden, welches nach 1 min Inkubation deutlich die übertragenen Proteine auf der Membran rot anfärbt. Nach Abspülen der Färbung mit TBS kann mit der AK-Färbung begonnen werden.

Die auf eine Membran übertragenen Proteine wurden über das hier aufgeführte Protokoll mittels AK detektiert, die gegen das zu untersuchende Protein gerichtet waren. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert. Nach erfolgter Blockierung wurde die Membran entweder für 1-2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C ÜN mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockierlösung (Tabelle 5) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS gewaschen und für 1 h mit einem entsprechenden HRP-konjugierten sekundären Antikörper in Blockierlösung geschwenkt.

In drei Waschschritten (je 10 min mit TBS-T) wurde erneut gewaschen und die Membran für 1 min mit *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung (ECL Western Blotting System, GE Healthcare, Freiburg), entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Zur Detektion wurde die feuchte Membran in Folie eingeschlagen und mit einem Röntgenfilm (*Hyperfilm*, HE Healthcare, Freiburg) bedeckt. Die an den sekundären AK gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) katalysiert die Oxidation des Luminols im ECL und löst damit eine Lumineszenz aus, die den auf die Membran gelegten Hyperfilm belichtet. Der Film wurde nach einer Expositionszeit von 1-20 min (in Abhängigkeit von der Intensität der zu erwartenden Bande) in der Entwicklermaschine *Optimax TypTR* (MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

Da sich die Proteine auf der Membran mehrfach mit unterschiedlichen AK markieren lassen ist es möglich mehrere unterschiedliche Proteine nachzuweisen. Um den Antikörperkomplex wieder von der Membran zu lösen, wurde das folgende Protokoll verwendet: Die Membran wurde 10 min in *Stripping*-Puffer inkubiert, um folgend in 10 mM Tris pH 8,8 und dann in TBS für 10 min gewaschen zu werden. Nach dieser Behandlung konnten die Proteine auf der PVDF-Membran erneut blockiert und mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert werden.

10.4. Zellbiologische Methoden

10.4.1. Zellkultur

Bei den Zellkulturarbeiten wurde an der Sterilbank *HeraSafe* (Heraeus, Hanau) gearbeitet. Inkubiert wurden die Zellen im *Forma direct heat CO₂ Inkubator* (Thermo Fischer, Dreieich) unter Standardbedingungen (37°C, 5% Kohlendioxid, 95% relative Luftfeuchtigkeit). Bei Konfluenz der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Cölbe) versetzt und bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Alle abgelösten Zellen wurden in Kulturmedium aufgenommen, gewaschen und in neue Zellkulturflaschen überführt oder für die entsprechenden Versuche eingesetzt. Zellzahlen wurden mit der Neubauer Zählkammer am Mikroskop bestimmt. Alternativ wurde die Bestimmung der Zahl der verwendeten Zellen mit dem Casy Modell TT Cell Counter (Roche Diagnostic, Mannheim) Zählsystem durchgeführt. Für die Experimente wurden die primären Zellen zwischen Passage 3 und 9 eingesetzt.

10.4.2. Isolierung und Kultivierung von primären Synovialfibroblasten aus humanem Synovialgewebe

Zur Untersuchung der Proteinexpression, der Lokalisation von Proteinen wie auch der funktionellen Konsequenzen veränderter Stimuli wurden Zellkulturexperimente in humanen Synovialfibroblasten (SF) durchgeführt. Hierzu mussten die RASF und OASF aus den entsprechenden Synovialgeweben isoliert und kultiviert werden. Synovialgewebe von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis wurde nach indizierten chirurgischen Eingriffen in der Orthopädischen Klinik des KMG Klinikums Kyritz und der Klinik für Rheumatologie im St. Josef- Stift Sendenhorst entnommen und in sterilem PBS bis zur Isolierung der Fibroblasten gelagert. Zur Isolierung der Synovialfibroblasten wurde das Gewebe in eine sterile Schale gegeben und mittels Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurde es in 50 ml Röhrchen gegeben und mit der sterilen Dispase-Lösung für 2 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das grobe Gewebe entnommen und das Medium über einen 40 µm Filter gegeben um die schwebenden Gewebestücke zu entfernen. Die im Medium enthaltenen Synovialfibroblasten wurden mittels Zentrifugation (1200 x g, 10 min) pelletiert, in supplementiertem DMEM aufgenommen und danach in eine entsprechende Zellkulturflaschen überführt und kultiviert. Osteoarthritische

Synovialfibroblasten (OASF) wurden im Rahmen dieser Arbeit als Vergleich zu den RASF eingesetzt. Zur Kultivierung wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose* mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin als Zusatz verwendet. Rheumatoid Arthritische Synovialfibroblasten (RASF) wurden ebenfalls aus Gewebe, dass bei einer Prothesenoperation entnommen wurde kultiviert. Wie bei den OASF wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose* mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin als Zusatz verwendet.

10.4.3. Isolierung und Kultivierung von primären murinen Maussynovialfibroblasten

Die verwendeten Maussynovialfibroblasten der wt bzw. hTNFtg Mäuse wurden aus den Gelenken der entsprechenden Mäuse isoliert. Nach Abtrennen der Hinterläufe wurden die Beine von Fell und Haut befreit, der Tarsus freipräpariert (entfernen der Zehen und Abtrennung der Pfote in Höhe des Sprunggelenkes) und in PBS bei 4°C gelagert.

Während der Isolation wurde 75 mg Dispase II unter Schütteln in 37°C warmem DMEM gelöst und steril filtriert (0,2 µm Filter). In 5 ml mit Dispase II versetztem Medium wurden die präparierten Pfoten in einer sterilen Zellkulturplatte mit einem Skalpell zerkleinert. Das derart gewonnene Gewebe wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 15-20 ml Dispase Lösung bedeckt und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Um die Ausbeute bei der Präparation zu optimieren, wurde die Lösung alle 15 min stark gevortext. Die Lösung mit den gewonnenen Zellen wurden durch einen 40 µm Filter gegeben und (14000g/10 min/4 °C) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen und in 5 ml DMEM mit 10x FCS und Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in eine T-25 Zellkulturflasche gegeben. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

10.4.4. Kryokonservierung von Zellen

Kultivierte Zellen konnten in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung in der Zellkultur gelagert werden. Das Medium der Zellen wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen um das Medium vollständig zu entfernen. 1 ml Trypsin wurde auf die Zellen gegeben und die Gewebekulturflasche 5 min bei 37°C inkubiert. 10 min Zentrifugation bei 1500 rpm pelletierten die abgelösten Zellen. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen, der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 900 µl FCS und 10% DMSO in CryoPure Einfriergefäße (Saerstedt, Nürnberg) überführt. Die Zellen wurden in einen Cryo

Freezing Container (Thermo Scientific, Schwerte) gelagert und mindestens einen Tag bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen dauerhaft in einen Cryo 100 Stickstoffcontainer (Thermo, Bonn) zur Lagerung überführt.

Um eingefrorene Zellen aus der Stickstofflagerung wieder in die Zellkultur zu überführen wurden diese möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um den Stress des Auftauprozesses für die Zellen zu minimieren, wurden 10 ml DMEM mit Zusätzen (10% FCS/Penstrep) in 15 ml Reaktionsgefäß (BD, Heidelberg) vorgelegt und die aufgetauten Zellen zügig in das Reaktionsgefäß überführt. Eine anschließende Zentrifugation 10 min, 1500rpm) pelletierte die Zellen. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in den entsprechenden Nährmedien aufgenommen, in eine Gewebekulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlendioxid, 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Mediumwechsel am Folgetag sollte DMSO Reste im Medium entfernen.

10.4.5. Transfektion von kultivierten Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Einbringung von Fremd-DNA oder siRNA in eukaryotische Zellen verwendet. Zum Einen die Lipofektion (hier mit Lipofectamine 2000, Invitrogen, Karlsruhe) zum Anderen die Nukleofektion (hier mit der AMAXA-Methode, LONZA, Köln).

Transfektionen der primären Fibroblasten wurden mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Lipofektion wurde nach 4 h durch den Austausch des DNA-Lipofectamin-Gemisches mit frischem Kulturmedium beendet.

Zur Nukleofektion von Plasmiden in primäre Synovialfibroblasten wurde das *AMAXA Nukleofector Kit* (Lonza, Basel) verwendet¹⁶⁶. Je Ansatz wurden 82,5 µl *Nucleofector Solution* und 18,3 µl *Supplement* angesetzt. Die zu transfizierende DNA wurde bei RT aufgetaut. Das Medium wurde von den zu transfizierenden Zellen abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin und Inkubation von 5 min bei 37 °C wurden die Zellen von der Kulturflasche abgelöst. Mittels Zugabe von 200 µl FCS wurde die Trypsinisierung gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Unter Verwendung der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und in Abhängigkeit vom Versuch in entsprechender Menge in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Diese Zellen wurden in einem 10 min Zentrifugationsschritt pelletiert (200 g), der Überstand abgenommen und das Zellpellett kurz getrocknet und maximal 15 min in der Solution des AMAXA kits inkubiert. Die Zellen wurden in 100 µl der *Solution* des AMAXA kits aufgenommen und 3 µg DNA in die Zellsolution gegeben. In dieser

Lösung wurden die Zellen blasenfrei resuspendiert und in eine der im Kit enthaltenen AMAXA Reaktionsküvette überführt. Die Küvette wurde in den AMAXA *Nucleofector* eingesetzt und unter Verwendung von Programm U23 (für primäre Fibroblasten) transformiert. Die Küvette wurde nach erfolgter elektroporetischer Transfektion umgehend entnommen und 500 µl vorgewärmtes DMEM Medium mit FCS und Penicillin/Streptomycin auf die Zellen gegeben. Mittels einer AMAXA Pipetten wurden die transfizierten Zellen in ein 6er Zellkulturschale ausgesät.

10.4.6. Bestimmung der Proliferationsrate eukaryotischer Zellen

Das *BrdU Cell Proliferation Kit* von Millipore (Schwalbach) wurde zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen verwendet. Hierbei wird Bromdesoxyuridin (BrdU), ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin, in neu synthetisierte DNA Stränge aktiv proliferierender Zellen eingebaut.

Für einen Proliferationsversuch wurden 10.000 Zellen je well einer 96er Zellkulturschale in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurde für weitere 24 h BrdU zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Zusatz von BrdU. Anschließend wurden die Proben nach Herstellerangaben fixiert und der Einbau von BrdU nach dem Standardprotokoll des *BrdU Cell Proliferation Kit* analysiert. Die Messung der Proben erfolgte bei 450/550 nm mit dem 1420 Multilabel Counter Victor3 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim).

10.4.7. Bestimmung der Apoptoserate eukaryotischer Zellen

Zur Quantifizierung der Apoptose wurde der *Caspase 3/7 Assay* (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Mit Hilfe dieses Assays wurde die Caspase 3 und 7 Aktivität mittels eines fluorometrischen Substrats bestimmt. Zur Untersuchung der Wirkung von endogenen SENPs wurden 10.000 Zellen je well einer 96er auf einer Kulturplatte in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Die Apoptose wurde nach einer Inkubation der Zellen für 16 h mit 100 ng/ml rhFas Ligand (rhFasL; Bender MedSystems, Wien) bestimmt. Hierzu wurde der Assaypuffer mit dem Substrat in einem Verhältnis von 1:100 angesetzt und jeweils 100 µl pro Zellkulturschale auf die Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde inkubiert und im Abstand von 1 h die Emission bei 521 nm gemessen. Zum Abzug des Hintergrundsignales wurden jeweils ein leeres well sowie unbehandelte Zellen mitgemessen. Die Messung der Proben wurde bei allen Versuchsansätzen mit dem *1420 Multilabel Counter Victor3* durchgeführt.

10.4.8. Bestimmung der murinen pro-MMP-9 Sekretion eukaryotischer Zellen

Zur Ermittlung der murinen pro-MMP-9 Level wurden Überstände aus den Zellkulturschalen abgenommen und in einer Verdünnung, die das Nachweismaximum des ELISA-Kits nicht überschreiten durfte, in einem Quantikine murine pro-MMP-9 ELISA (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Bestimmung der murinen pro-MMP-9 Level erfolgte am *1420 Multilabel Counter Victor 3* bei einer Wellenlänge von 459/540 nm.

10.5. Molekularbiologische Methoden

10.5.1. Isolation von GesamtRNA und Reverse Transkription von cDNA

Um durch PCR-Ansätze die transkriptionelle Aktivität eines Genes bestimmen zu können, wurde GesamtRNA aus kultivierten Synovialfibroblasten nach dem folgenden Protokoll isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Extraktion der GesamtRNA aus den verschiedenen primären Synovialfibroblasten wurde mit dem Kit-System *Mini RNA Isolation II* (Zymo Research, Orange, USA) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Eluiert wurde die Gesamt mRNA in 30 μ l RNase freiem Wasser. Vor der reversen Transkription wurde die isolierte GesamtRNA für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis überführt. Die GesamtRNA wurde mittels der *M-MLV-Reverse Transkriptase* (Promega, Mannheim) wie folgt in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Synthese der cDNA erfolgte für 1,5 h bei 37°C in einem Thermoschüttler (HLC Biotech, Pforzheim).

8 μ l	<i>5x First Strand Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)</i>
2 μ l	<i>Random Hexamers (100 pmol/μl, Promega, Mannheim)</i>
4 μ l	<i>BSA (1 mg/ml, Promega, Mannheim)</i>
2 μ l	<i>dNTPs (80 mM, Peqlab, Erlangen)</i>
4 μ l	<i>DTT (100 mM, Invitrogen, Karlsruhe)</i>
1 μ l	<i>RNAse-Inhibitor (Promega, Mannheim)</i>
2 μ l	<i>M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim)</i>
500 ng	<i>Gesamt-RNA</i>
ad 40 μ l	<i>RNase freies Wasser</i>

10.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die semi-quantitative Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte aus cDNA (siehe 10.5.1) eingesetzt. PCR-Reaktionen wurden entweder im 25 μ l oder im 50 μ l Reaktionsansatz durchgeführt. Verwendung fanden die *Taq*-Polymerase

(Qiagen, Düsseldorf) und die *Pfx*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe). Die *Taq*-Polymerase wurde in den Versuchen zur transkriptionellen Expression von SUMO-2/3, SENP5 und SENP7 eingesetzt, die *Pfx*-Polymerase fand in den Versuchen zur Klonierung der Expressionsvektoren Verwendung.

Protokoll 1: Ansatz 25 μ l (*Taq*-Polymerase):

2,5 μ l 10x PCR-Puffer
1 μ l 10 mM dNTP Mix
1 μ l for Primer (10 pmol/ μ l)
1 μ l rev Primer (10 pmol/ μ l)
0,5 μ l *Taq*-Polymerase
2,5 μ l cDNA
ad 25 μ l RNase freies Wasser

Protokoll 2: Ansatz 50 μ l (*Pfx*-Polymerase)

5 μ l 10x *Pfx* Amplification Buffer
1,5 μ l 10 mM dNTPs (10 mM)
1 μ l Mg_2SO_4
1,5 μ l 1 Primer mix (10 μ M)
 ≥ 1 μ l cDNA
1 μ l Platinum® *Pfx* DNA Polymerase
ad 50 μ l DEPC Wasser

Die PCR wurde im *iCycler* von BioRad (München) mit dem entsprechenden Programm durchgeführt:

PCR humanes SUMO-2/3:

<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min		
<i>Denaturierung</i>	95°C	1 min		25 Zyklen
<i>Primerhybridisierung</i>	62°C	1 min		
<i>Elongation</i>	72°C	30 sec		
<i>Finale Elongation</i>	72°C	5 min		
<i>Lagerung</i>	4°C	∞		

PCR humanes SENP5:

<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min		
<i>Denaturierung</i>	95°C	1 min		30 Zyklen
<i>Primerhybridisierung</i>	62°C	1 min		
<i>Elongation</i>	72°C	1 min		
<i>Finale Elongation</i>	72°C	5 min		
<i>Lagerung</i>	4°C	∞		

PCR murines SENP5:

<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min		
<i>Denaturierung</i>	95°C	1 min		30 Zyklen
<i>Primerhybridisierung</i>	62°C	1 min		
<i>Elongation</i>	72°C	1 min		
<i>Finale Elongation</i>	72°C	5 min		
<i>Lagerung</i>	4°C	∞		

PCR humanes SENP7:

<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min		30 Zyklen
<i>Denaturierung</i>	95°C	1 min		
<i>Primerhybridisierung</i>	62°C	1 min		
<i>Elongation</i>	72°C	30 sec		
<i>Finale Elongation</i>	72°C	5 min		
<i>Lagerung</i>	4°C	∞		

PCR murines SENP7:

<i>Initiale Denaturierung</i>	95°C	5 min		30 Zyklen
<i>Denaturierung</i>	95°C	45 sec		
<i>Primerhybridisierung</i>	55°C	45 sec		
<i>Elongation</i>	72°C	30 sec		
<i>Finale Elongation</i>	72°C	5 min		
<i>Lagerung</i>	4°C	∞		

10.5.3. Genotypisierung der hTNFtg Maus

Um eine Unterscheidung zwischen hTNFtg und wt Mäusen treffen zu können, wurde genomische DNA aus Mausgewebe isoliert. Schwanzspitzen bzw. Gewebeproben aus Ohrstanzungen der zu genotypisierenden Mäuse wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verwahrt und mittels des *REDExtract-N-AmpTMTissue PCR Kits* (Sigma-Aldrich, München) wie folgt aufbereitet. 100 µl Extraktionslösung und 25 µl Gewebepreparationslösung wurden zu jeder Probe pipettiert und auf einem Thermoschüttler bei 37°C für 1 h bei 600 rpm geschüttelt. Abschließend wurden die Proben auf 95°C für 4 min erhitzt und mit 100 µl Neutralisationslösung vermengt. Diese Extrakte wurden bei 4°C aufbewahrt oder direkt in einer Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Es wurde je Mausbiopsie ein PCR-Ansatz mit GAPDH Primern als Kontrolle sowie ein Ansatz mit huTNF Primern angesetzt (Tabelle 6). Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit DEPC-Wasser als *template* mitgeführt. Zur Genotypisierung wurde der *Mastermix Red-Taq* (Sigma Aldrich, München) nach folgendem Protokoll eingesetzt:

Protokoll (Genotypisierungen): Ansatz 20 µl

10 µl	Red Taq Mastermix (Reaktionspuffer, dNTPs und Taq-Polymerase)
1 µl	for Primer (10 pmol/µl)
1 µl	rev Primer (10 pmol/µl)
1-2 µl	genomische DNA
ad 20 µl	RNase freies Wasser

PCR-Programm

Initiale Denaturierung	95°C	4 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	35 Zyklen
Primerhybridisierung	58,5°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	10°C	∞	

10.5.4. Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Grössenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese mit 0,8 bis 3%igen Agarosegelen in TAE-Puffer. Zur anschließenden Visualisierung der Banden mit UV-Licht wurde dem Agarosegel 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die PCR-Amplifikate wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und anschließend im Agarosegel bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwendeten Größenstandards, DNA-Marker *100 bp Ladder* bzw. *1 kb DNA Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) wurden zur Ermittlung der Fragmentgrößen herangezogen. Die Dokumentation erfolgte mit dem Dokumentationssystem *Infinity Modell 1000* (Peqlab, Erlangen).

10.5.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Sollten aufgetrennte DNA-Fragmente oder Plasmide in nachfolgenden Experimenten verwendet werden, so wurden diese auf einem UV-Tisch visualisiert, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *NucleoSpin Extract Kit* (Macherey & Nagel, Düren) entsprechend den Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt.

10.5.6. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit gewonnener DNA bzw. RNA wurden die Proben in DEPC-Wasser oder TE-Puffer verdünnt. Im Eppendorf Photometer plus (Eppendorf, Hamburg) wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen DEPC/TE-Puffer als Leerwert gemessen. Das Verhältnis zwischen der optischen Dichte von 260 nm und 280 nm lieferte einen Eindruck über die Reinheit der Probe (ein Verhältnis der beiden Werte von 1,8 entspricht reiner DNA). In der Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte von 1 bei 260 nm als 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 37 µg/ml Einzelstrang-RNA angenommen.

10.5.7. Restriktionsverdau

DNA- Doppelstränge können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an bestimmten DNA-Erkennungssequenzen enzymatisch geschnitten werden. Sollten in den durchgeführten Klonierungen Vektoren linearisiert werden oder Transformationen auf die erfolgte Insertion eines DNA-Konstruktes überprüft werden, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon Rot) bezogen. Unter Verwendung der zu den Restriktionsenzymen gehörenden Puffer, wurde die Plasmid-DNA oder das PCR-Amplifikat mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für 1,5 h bei 37°C inkubiert und der Ansatz anschließend elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt (10.5.4).

Restriktionsansatz:

250 ng bis 1µg	DNA
1 µl	Restriktionsendonuklease
2 µl	10 x Puffer
ad 20 µl	dd H ₂ O

10.5.8. Ligation

Zur Einbringung eines DNA-Inserts in einen linearisierten Expressionsvektor, wurde eine Ligation durchgeführt. In der Ligation wurde die T4-DNA Ligase von Invitrogen (Karlsruhe) mit dem entsprechenden Ligationspuffer verwendet. Der linearisierte Expressionsvektor und das DNA-Insert wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 4°C ÜN inkubiert.

Ligationsansatz:

5 µl	Puffer (2x)
1 µl	T4 Ligase
50 ng (0,025 pmol)	Vektor (3kb)
50 ng (0,076 pmol)	Insert (1kb)
auf 20 µl	DEPC

10.5.9. Transformation von Bakterien

Zur gezielten Vermehrung der Expressionsvektoren wurden diese mittels einer chemischen Transformation in *Escherichia coli* (*E. coli*) eingebracht und vermehrt. Zur chemischen Transformation wurden die chemisch kompetenten *E. coli* (siehe Tabelle 10) auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 2 bis 5 µl des Ligationsansatzes wurden die Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 30 sec bei 42°C, gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem *Lysogeny Broth* (LB)-Medium (*LB Broth ultrapure*; USB Corporation, Cleveland, USA) folgte die Inkubation des Transformationsansatzes für 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 300 rpm. Innerhalb dieses

Zeitraumes können Bakterien die den, mit einer Antibiotikaresistenz ausgestatteten Expressionsvektor aufgenommen haben, die Antibiotikaresistenz ausbilden. Der Transformationsansatz wurde abschließend auf LB-Agarplatten (*LB Agar ultrapure*; USB Corporation, Cleveland, USA), die 100 µg/ml Ampicillin oder 100 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert. *E. coli* Bakterien, die einen Expressionsvektor aufgenommen haben werden durch das Antibiotikum selektiert. Nach der Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht konnten gezielt einzelne Kolonien mittels einer Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB-Medium (mit Antibiotika) bei 37°C unter Schütteln vermehrt werden.

10.5.10. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den *E. coli* Bakterien, wurde diese nach dem folgenden Protokoll aufgearbeitet. Einzelne Kolonien der transformierten *E. colis* wurden mit einer Pipettenspitze gezielt gepickt. Diese Klone wurden in 3 ml LB-Medium (mit Antibiotika) ÜN bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden diese Kulturen bei 4000 rpm 10 min pelletiert und mit 200 µl Plasmid-Puffer I resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 µl Plasmid-Puffer II und Inkubation für 5 min bei RT wurden die Bakterien lysiert. Diese Lyse wurde mit 200 µl Plasmid-Puffer III für 10 min auf Eis gestoppt. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 18000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurde unter Schwenken die im Überstand befindliche Plasmid-DNA ausgefällt. Eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 18000 g und 4°C pelletierte diese Plasmid-DNA. Zur Reinigung wurde das erhaltene Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 18000 g) getrocknet. Wichtig war die vollständige Beseitigung (durch Trocknung) der Alkoholreste. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl DEPC resuspendiert. Im Anschluss an diese Minipräparation erfolgte ein Kontrollverdau mittels Restriktionsendonukleasen (siehe 10.5.7) und eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNA. Positive Klone wurden für eine Maxipräparation ausgewählt. Diese wurden in 150 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) ÜN bei 37°C geschüttelt, bei 4000 rpm pelletiert und mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 100 µl TAE-Puffer resuspendiert.

10.5.11. Sequenzierung der DNA

Zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurde bei der Firma GATC-Biotech (Konstanz) mit den firmeneigenen Primern sequenziert. In Abhängigkeit von den verwendeten Vektoren wurden passende Primerkombinationen gewählt, in der Regel wurden M13 *forward* und *reverse* Primer verwendet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mittels *Alignment* mit der Originalsequenz des *inserts* überprüft, das mit Hilfe von *ExpASY Proteomics tools* (<http://www.expasy.ch/tools/>) erstellt wurde.

10.6. Statistik

Die gemessenen Werte in den Versuchen zur Proliferation, Apoptose und murinen pro-MMP-9 Sekretion wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur statistischen Analyse und Darstellung wurden die Programme *Microsoft Office Excel 2010* und *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ zwischen den verglichenen Gruppen, wurde als statistisch signifikant erachtet und im Diagramm durch einen Signifikanzstern gekennzeichnet.

11. Literaturverzeichnis

1. Meinecke, I., *et al.* Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5073-5078 (2007).
2. Niedermeier, M., Pap, T. & Korb, A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **24**, 527-540 (2010).
3. Aletaha, D., *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* **69**, 1580-1588 (2010).
4. Billings, P.B., Hoch, S.O., White, P.J., Carson, D.A. & Vaughan, J.H. Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 7104-7108 (1983).
5. Kalden, J.R. & Gay, S. Retroviruses and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol* **98**, 1-5 (1994).
6. Stransky, G., *et al.* Virus-like particles in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **32**, 1044-1048 (1993).
7. Lunardi, C., *et al.* Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol* **28**, 936-948 (1998).
8. Arend, W.P. & Firestein, G.S. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol* (2012).
9. Brennan, P. & Silman, A. Why the gender difference in susceptibility to rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* **54**, 694-695 (1995).
10. Brenol, C.V., Veit, T.D., Chies, J.A. & Xavier, R.M. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol* **52**, 82-91 (2012).
11. Mitsunaga, S., *et al.* Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens* (2012).
12. Ronninger, M., *et al.* Interaction Analysis between HLA-DRB1 Shared Epitope Alleles and MHC Class II Transactivator CIITA Gene with Regard to Risk of Rheumatoid Arthritis. *PLoS One* **7**, e32861 (2012).
13. De Santis, M. & Selmi, C. The therapeutic potential of epigenetics in autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* **42**, 92-101 (2012).
14. Maciejewska-Rodrigues, H., *et al.* Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *J Autoimmun* **35**, 15-22 (2010).
15. Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P.V., Georgiou, I. & Drosos, A.A. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev* (2011).
16. Pundt, N., Peters, M.A., Wunrau, C. & Pap, T. [Gene therapy in rheumatoid arthritis: new aspects]. *Dtsch Med Wochenschr* **133**, 1737-1741 (2008).
17. van den Berg, W.B., van de Loo, F.A., Otterness, I., Arntz, O. & Joosten, L.A. In vivo evidence for a key role of IL-1 in cartilage destruction in experimental arthritis. *Agents Actions Suppl* **32**, 159-163 (1991).
18. Gitter, B.D., Labus, J.M., Lees, S.L. & Scheetz, M.E. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology* **66**, 196-200 (1989).
19. Nishimoto, N. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **18**, 277-281 (2006).
20. Muller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. Activation of synoviocytes. *Curr Opin Rheumatol* **12**, 186-194 (2000).
21. Ahrens, D., Koch, A.E., Pope, R.M., Stein-Picarella, M. & Niedbala, M.J. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **39**, 1576-1587 (1996).

22. Pap, T., *et al.* Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 1226-1232 (2000).
23. Cope, A.P. T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **10 Suppl 1**, S1 (2008).
24. Ospelt, C., Neidhart, M., Gay, R.E. & Gay, S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* **9**, 2323-2334 (2004).
25. Fassbender, H.G., Simmling-Annefeld, M. & Stofft, E. [Transformation of synovial cells in rheumatoid arthritis (author's transl)]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **64**, 193-212 (1980).
26. Firestein, G.S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* **39**, 1781-1790 (1996).
27. Pundt, N., *et al.* Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. *Arthritis Res Ther* **11**, R16 (2009).
28. Umlauf, D., Frank, S., Pap, T. & Bertrand, J. Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* **67**, 4197-4211 (2010).
29. Bosma, M.J. & Carroll, A.M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* **9**, 323-350 (1991).
30. Muller-Ladner, U., *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* **149**, 1607-1615 (1996).
31. Lefevre, S., *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* **15**, 1414-1420 (2009).
32. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R. & Gay, S. Gene therapy in rheumatoid arthritis: how to target joint destruction? *Arthritis Res* **1**, 5-9 (1999).
33. Pap, T., *et al.* Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res* **2**, 59-64 (2000).
34. Muller-Ladner, U., Ospelt, C., Gay, S., Distler, O. & Pap, T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* **9**, 223 (2007).
35. Okura, T., *et al.* Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* **157**, 4277-4281 (1996).
36. Muller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. Cellular pathways of joint destruction. *Curr Opin Rheumatol* **9**, 213-220 (1997).
37. Gaber, T., Dziurla, R., Tripmacher, R., Burmester, G.R. & Buttgerit, F. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* **64**, 971-980 (2005).
38. Westra, J., *et al.* Role for CaMKII inhibition in rheumatoid arthritis: effects on HIF-1-induced VEGF production by rheumatoid synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* **1173**, 706-711 (2009).
39. Taylor, P.C. & Sivakumar, B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **17**, 293-298 (2005).
40. Pap, T., Muller-Ladner, U., Gay, R.E. & Gay, S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**, 361-367 (2000).
41. Kannan, K., Ortmann, R.A. & Kimpel, D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**, 167-181 (2005).
42. Keffer, J., *et al.* Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* **10**, 4025-4031 (1991).
43. Sternlicht, M.D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516 (2001).
44. Visse, R. & Nagase, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839 (2003).
45. Uria, J.A., Jimenez, M.G., Balbin, M., Freije, J.M. & Lopez-Otin, C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* **273**, 9769-9777 (1998).

46. Balbin, M., *et al.* Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* **107**, 45-53 (1999).
47. Tjaderhane, L., *et al.* The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* **77**, 1622-1629 (1998).
48. Yuan, W. & Varga, J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* **276**, 38502-38510 (2001).
49. Kim, H.S., Luo, L., Pflugfelder, S.C. & Li, D.Q. Doxycycline inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 via Smad and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 840-848 (2005).
50. Liu, J., *et al.* BMP2 induces PANC-1 cell invasion by MMP-2 overexpression through ROS and ERK. *Front Biosci* **17**, 2541-2549 (2012).
51. Kang, T., Nagase, H. & Pei, D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res* **62**, 675-681 (2002).
52. Pei, D. & Weiss, S.J. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* **375**, 244-247 (1995).
53. Sato, H., *et al.* Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* **385**, 238-240 (1996).
54. Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5578-5582 (1990).
55. Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.X. & Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 480-498 (2007).
56. Bartok, B. & Firestein, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* **233**, 233-255 (2010).
57. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257 (1972).
58. Pope, R.M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* **2**, 527-535 (2002).
59. Gareau, J.R. & Lima, C.D. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 861-871 (2010).
60. Bergink, S. & Jentsch, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* **458**, 461-467 (2009).
61. Ouyang, J., Valin, A. & Gill, G. Regulation of transcription factor activity by SUMO modification. *Methods Mol Biol* **497**, 141-152 (2009).
62. Saitoh, H. & Hinchey, J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**, 6252-6258 (2000).
63. Bohren, K.M., Nadkarni, V., Song, J.H., Gabbay, K.H. & Owerbach, D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* **279**, 27233-27238 (2004).
64. Guo, D., *et al.* A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* **36**, 837-841 (2004).
65. Melchior, F. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626 (2000).
66. Ciechanover, A., Finley, D. & Varshavsky, A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* **24**, 27-53 (1984).
67. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**, 8206-8214 (1983).

68. Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A. & Haas, A.L. Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. *J Biol Chem* **257**, 13964-13970 (1982).
69. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141 (2002).
70. Matunis, M.J., Coutavas, E. & Blobel, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**, 1457-1470 (1996).
71. Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. & Melchior, F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88**, 97-107 (1997).
72. Johnson, E.S. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-382 (2004).
73. Gill, G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-2059 (2004).
74. Meulmeester, E. & Melchior, F. Cell biology: SUMO. *Nature* **452**, 709-711 (2008).
75. Xu, Z. & Au, S.W. Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J* **386**, 325-330 (2005).
76. Okuma, T., Honda, R., Ichikawa, G., Tsumagari, N. & Yasuda, H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 693-698 (1999).
77. Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., Kemp, G.D. & Hay, R.T. Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* **274**, 10618-10624 (1999).
78. Gong, L., Li, B., Millas, S. & Yeh, E.T. Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* **448**, 185-189 (1999).
79. Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G. & Chen, Y. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14373-14378 (2004).
80. Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J. & Lima, C.D. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**, 345-356 (2002).
81. Hochstrasser, M. Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science* **289**, 563-564 (2000).
82. Melchior, F., Schergaut, M. & Pichler, A. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* **28**, 612-618 (2003).
83. Huang, B.B., Xiu, B., Lu, H.N., Qin, W. & Liang, A.B. [Effect of hypoxia on HIF-1alpha and its sumoylation in Jurkat cells.]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **31**, 394-397 (2010).
84. Agbor, T.A., *et al.* Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1 promotes glycolysis in hypoxia. *J Biol Chem* **286**, 4718-4726 (2011).
85. Wang, J., Wang, Y. & Lu, L. De-SUMOylation of CTCF in hypoxic stress-induced human corneal epithelial cells. *J Biol Chem* (2012).
86. Vertegaal, A.C. SUMO chains: polymeric signals. *Biochem Soc Trans* **38**, 46-49 (2010).
87. Skilton, A., Ho, J.C., Mercer, B., Outwin, E. & Watts, F.Z. SUMO chain formation is required for response to replication arrest in *S. pombe*. *PLoS One* **4**, e6750 (2009).
88. Yang, S.H., Galanis, A., Witty, J. & Sharrocks, A.D. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J* **25**, 5083-5093 (2006).
89. Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. & Yeh, E.T. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia. *Cell* **131**, 584-595 (2007).
90. Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 947-956 (2007).

91. Mahajan, R., Gerace, L. & Melchior, F. Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* **140**, 259-270 (1998).
92. Shen, L.N., Geoffroy, M.C., Jaffray, E.G. & Hay, R.T. Characterization of SENP7, a SUMO-2/3-specific isopeptidase. *Biochem J* **421**, 223-230 (2009).
93. Drag, M., Mikolajczyk, J., Krishnakumar, I.M., Huang, Z. & Salvesen, G.S. Activity profiling of human deSUMOylating enzymes (SENPs) with synthetic substrates suggests an unexpected specificity of two newly characterized members of the family. *Biochem J* **409**, 461-469 (2008).
94. Gong, L. & Yeh, E.T. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* **281**, 15869-15877 (2006).
95. Lima, C.D. & Reverter, D. Structure of the human SENP7 catalytic domain and poly-SUMO deconjugation activities for SENP6 and SENP7. *J Biol Chem* **283**, 32045-32055 (2008).
96. Mukhopadhyay, D., Arnautov, A. & Dasso, M. The SUMO protease SENP6 is essential for inner kinetochore assembly. *J Cell Biol* **188**, 681-692 (2010).
97. Han, Y., *et al.* SENP3-mediated de-conjugation of SUMO2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress. *J Biol Chem* **285**, 12906-12915 (2010).
98. Zunino, R., Braschi, E., Xu, L. & McBride, H.M. Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem* **284**, 17783-17795 (2009).
99. Li, S.J. & Hochstrasser, M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251 (1999).
100. Yeh, E.T. SUMOylation and De-SUMOylation: wrestling with life's processes. *J Biol Chem* **284**, 8223-8227 (2009).
101. Hay, R.T. SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol* **17**, 370-376 (2007).
102. Kim, J.H. & Baek, S.H. Emerging roles of desumoylating enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 155-162 (2009).
103. Di Bacco, A., *et al.* The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* **26**, 4489-4498 (2006).
104. Ding, X., *et al.* Overexpression of SENP5 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncol Rep* **20**, 1041-1045 (2008).
105. Alegre, K.O. & Reverter, D. Swapping small ubiquitin-like modifier (SUMO) isoform specificity of SUMO proteases SENP6 and SENP7. *J Biol Chem* **286**, 36142-36151 (2011).
106. Wu, S.Y. & Chiang, C.M. p53 sumoylation: mechanistic insights from reconstitution studies. *Epigenetics* **4**, 445-451 (2009).
107. Lee, M.H., Mabb, A.M., Gill, G.B., Yeh, E.T. & Miyamoto, S. NF-kappaB induction of the SUMO protease SENP2: A negative feedback loop to attenuate cell survival response to genotoxic stress. *Mol Cell* **43**, 180-191 (2011).
108. Rabellino, A., *et al.* The SUMO E3-ligase PIAS1 regulates the tumor suppressor PML and its oncogenic counterpart PML-RARA. *Cancer Res* **72**, 2275-2284 (2012).
109. Stindt, M.H., Carter, S., Vigneron, A.M., Ryan, K.M. & Vousden, K.H. MDM2 promotes SUMO-2/3 modification of p53 to modulate transcriptional activity. *Cell Cycle* **10**, 3176-3188 (2011).
110. Fakhfakh Karray, E., Bendhifallah, I., Zakraoui, L. & Hamzaoui, K. Association of small ubiquitin-like modifier 4 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Tunisian population. *Clin Exp Rheumatol* **29**, 751 (2011).
111. Um, J.W. & Chung, K.C. Functional modulation of parkin through physical interaction with SUMO-1. *J Neurosci Res* **84**, 1543-1554 (2006).
112. Steffan, J.S., *et al.* SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* **304**, 100-104 (2004).

113. Ahn, K., *et al.* Ubc9 gene polymorphisms and late-onset Alzheimer's disease in the Korean population: a genetic association study. *Neurosci Lett* **465**, 272-275 (2009).
114. Li, Y., *et al.* Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 259-264 (2003).
115. Takahashi, K., Ishida, M., Komano, H. & Takahashi, H. SUMO-1 immunoreactivity co-localizes with phospho-Tau in APP transgenic mice but not in mutant Tau transgenic mice. *Neurosci Lett* **441**, 90-93 (2008).
116. Zhang, Y.Q. & Sarge, K.D. Sumoylation of amyloid precursor protein negatively regulates Abeta aggregate levels. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 673-678 (2008).
117. Noso, S., *et al.* Genetic heterogeneity in association of the SUMO4 M55V variant with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 3582-3586 (2005).
118. Fallah, S., Jafarzadeh, M. & Hedayati, M. No association of the SUMO4 polymorphism M55V variant in type 2 diabetes in Iranian subjects. *Diabetes Res Clin Pract* **90**, 191-195 (2010).
119. Podolsky, R., Prasad Linga-Reddy, M.V. & She, J.X. Analyses of multiple single-nucleotide polymorphisms in the SUMO4/IDDM5 region in affected sib-pair families with type I diabetes. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S16-20 (2009).
120. Sang, Y., Zong, W., Liu, M. & Yan, J. Association of SUMO4 M55V polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* **23**, 1083-1086 (2010).
121. Bawa-Khalife, T. & Yeh, E.T. SUMO Losing Balance: SUMO Proteases Disrupt SUMO Homeostasis to Facilitate Cancer Development and Progression. *Genes Cancer* **1**, 748-752 (2010).
122. Kaikkonen, S., *et al.* SUMO-specific protease 1 (SEN1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* **23**, 292-307 (2009).
123. Xu, Y., *et al.* SUMO-specific protease 1 regulates the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells with the upregulated expression of CDK inhibitors. *Cancer Lett* **309**, 78-84 (2011).
124. Choi, H.K., *et al.* Reversible SUMOylation of TBL1-TBLR1 regulates beta-catenin-mediated Wnt signaling. *Mol Cell* **43**, 203-216 (2011).
125. Yates, K.E., Korbel, G.A., Shtutman, M., Roninson, I.B. & DiMaio, D. Repression of the SUMO-specific protease Senp1 induces p53-dependent premature senescence in normal human fibroblasts. *Aging Cell* **7**, 609-621 (2008).
126. Chiu, S.Y., Asai, N., Costantini, F. & Hsu, W. SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol* **6**, e310 (2008).
127. Meinecke, I., *et al.* Small ubiquitin-like modifier 1 [corrected] mediates the resistance of prosthesis-loosening fibroblast-like synoviocytes against Fas-induced apoptosis. *Arthritis Rheum* **60**, 2065-2070 (2009).
128. Baier, A., Meinecke, I., Gay, S. & Pap, T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **15**, 274-279 (2003).
129. Di Bacco, A. & Gill, G. SUMO-specific proteases and the cell cycle. An essential role for SENP5 in cell proliferation. *Cell Cycle* **5**, 2310-2313 (2006).
130. Alkuraya, F.S., *et al.* SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science* **313**, 1751 (2006).
131. Zhang, F.P., *et al.* Sumo-1 function is dispensable in normal mouse development. *Mol Cell Biol* **28**, 5381-5390 (2008).
132. Konisti, S., Kiriakidis, S. & Paleolog, E.M. Hypoxia-a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 153-162 (2012).
133. Altindag, O., Karakoc, M., Kocyigit, A., Celik, H. & Soran, N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* **40**, 167-171 (2007).
134. Frank. Regulation of Matrix Metalloproteinase -2 and -13 by SUMO-2/3 through the transcriptionfactor NF-κB. *Arthritis & Rheumatism (in revision)*(2012).

135. Nakajima, T., *et al.* Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* **38**, 485-491 (1995).
136. Firestein, G.S., Yeo, M. & Zvaifler, N.J. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* **96**, 1631-1638 (1995).
137. Tanaka, K., *et al.* Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* **19**, 8660-8672 (1999).
138. Franz, J.K., *et al.* Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 599-607 (2000).
139. Bossis, G. & Melchior, F. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* **21**, 349-357 (2006).
140. Nacerddine, K., *et al.* The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* **9**, 769-779 (2005).
141. Giraud, M.F., Desterro, J.M. & Naismith, J.H. Structure of ubiquitin-conjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 891-898 (1998).
142. Park, H.J., *et al.* Identification of phosphorylation sites of TOPORS and a role for serine 98 in the regulation of ubiquitin but not SUMO E3 ligase activity. *Biochemistry* **47**, 13887-13896 (2008).
143. Woo, C.H. & Abe, J. SUMO--a post-translational modification with therapeutic potential? *Curr Opin Pharmacol* **10**, 146-155 (2010).
144. Liu, B. & Shuai, K. Targeting the PIAS1 SUMO ligase pathway to control inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 505-509 (2008).
145. Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M. & McBride, H.M. The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* **120**, 1178-1188 (2007).
146. Maison, C., *et al.* The SUMO protease SENP7 is a critical component to ensure HP1 enrichment at pericentric heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 458-460 (2012).
147. Salinas, S., *et al.* SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol* **165**, 767-773 (2004).
148. Mukherjee, S. & Shields, D. Nuclear import is required for the pro-apoptotic function of the Golgi protein p115. *J Biol Chem* **284**, 1709-1717 (2009).
149. Ryan, C.M., Kindle, K.B., Collins, H.M. & Heery, D.M. SUMOylation regulates the nuclear mobility of CREB binding protein and its association with nuclear bodies in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1136-1141 (2010).
150. Dadke, S., *et al.* Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol* **9**, 80-85 (2007).
151. Yun, C., *et al.* Nucleolar protein B23/nucleophosmin regulates the vertebrate SUMO pathway through SENP3 and SENP5 proteases. *J Cell Biol* **183**, 589-595 (2008).
152. Pap, T. [Regulation of apoptosis in aggressive fibroblasts]. *Z Rheumatol* **66**, 239-240, 242 (2007).
153. Mauri, F., *et al.* Modification of Drosophila p53 by SUMO modulates its transactivation and pro-apoptotic functions. *J Biol Chem* **283**, 20848-20856 (2008).
154. How, P.C. & Shields, D. Tethering function of the caspase cleavage fragment of Golgi protein p115 promotes apoptosis via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **286**, 8565-8576 (2011).
155. Gruber, B.L., *et al.* Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* **78**, 161-171 (1996).
156. Jovanovic, D.V., *et al.* Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**, 1134-1144 (2000).
157. Miranda, K.J., Loeser, R.F. & Yammani, R.R. Sumoylation and nuclear translocation of S100A4 regulate IL-1beta-mediated production of matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* **285**, 31517-31524 (2010).

158. Yang, S.H. & Sharrocks, A.D. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **13**, 611-617 (2004).
159. Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y. & Gill, G. Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol Cell* **34**, 145-154 (2009).
160. Shiio, Y. & Eisenman, R.N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13225-13230 (2003).
161. Anckar, J., *et al.* Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* **26**, 955-964 (2006).
162. Pelisch, F., Pozzi, B., Risso, G., Munoz, M.J. & Srebrow, A. DNA Damage-induced Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K SUMOylation Regulates p53 Transcriptional Activation. *J Biol Chem* **287**, 30789-30799 (2012).
163. Chang, C.C., *et al.* Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralogue-selective binding and apoptosis modulation. *Mol Cell* **42**, 62-74 (2011).
164. Hietakangas, V., *et al.* PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 45-50 (2006).
165. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
166. Gresch, O., *et al.* New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**, 151-163 (2004).

12. Curriculum Vitae

13. Originalarbeiten

Frank S, Peters MA, Wehmeyer C, Strietholt S, Koers-Wunrau C, Heitzmann M, Hillmann A, Gay S, Kollias G, Pap T: **Regulation of Matrix Metalloproteinase -2 and -13 by SUMO-2/3 through the transcriptionfactor NF- κ B**, Arthritis & Rheumatism (in revision).

Peters MA, Wendholt D, Strietholt S, Pundt N, Korb A, Frank S, Joosten LAB, van den Berg W, Kollias G, Eckes B, Pap T: **Loss of Integrin beta 1 suppresses joint inflammation and cartilage destruction in mouse models of rheumatoid arthritis**. PNAS, Arthritis Rheum. 2012 May;64(5):1359-68.

Maciejewska-Rodrigues H, Karouzakis E, Strietholt S, Hemmatazad H, Neidhart M, Ospelt C, Gay RE, Michel BA, Pap T, Gay S, Jüngel A. **Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression**. J Autoimmun. 2010 Aug;35(1):15-22. Epub 2010 Jan 15.

Hayer S* and Pundt N*, Peters MA, Wunrau C, Kühnel I, Neugebauer K, Strietholt S, Zwerina J, Korb A, Penninger J, Joosten LAB, Gay S, Rückle T, Schett G and Pap T: **PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis**. FASEBJ, 2009 Dec;23(12):4288-98. Epub 2009 Sep 4, *equal contribution.

Meinecke I, Pap G, Mendoza H, Drange S, Ender S, Strietholt S, Gay RE, Seyfert C, Ink B, Gay S, Pap T, Peters MA. **Small ubiquitin-like modifier 1 [corrected] mediates the resistance of prosthesis-loosening fibroblast-like synoviocytes against Fas-induced apoptosis**. Arthritis Rheum. 2009 Jul;60(7):2065-70. Erratum in: Arthritis Rheum. 2009 Aug;60(8):2540.

Pundt N, Peters MA, Wunrau C, Strietholt S, Fehrmann C, Neugebauer K, Seyfert C, van Valen F, Pap T, Meinecke I: **Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle dependent**. Arthritis Res Ther. 2009;11(1):R16. Epub 2009 Feb 5.

Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S: **Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis**. Arthritis Res Ther. 2008;10(5):219. Epub 2008 Oct 10. Review.

14. Danksagung

Mein besondere Dank gilt...

- Herrn Prof. Dr. Thomas Pap für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Experimentelle Muskuloskelettale Medizin anzufertigen. Insbesondere möchte ich mich für die Gelegenheit bedanken, an internationalen, wissenschaftlichen Fachkongressen teilzunehmen.
- Herrn Prof. Dr. Andreas Püschel und Frau Prof. Dr. Eva Liebau für die Bereitschaft meine Arbeit als Zweit- und Drittgutachter/in zu betreuen.
- allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des IEMM. Für Unterstützung, Zuspruch, nette Abende am Möhnesee und Vieles mehr...
- Marvin für den Start und Anja für den Endspurt.
- Frans, Berno, Borna, Vera, Iska, Rene, Birgit, Simone, Melanie, Heidi, Jenny, Peter, Doreen, Atha, ect. pp.
- besonders den "Doktoranden"...
Christina für nette Heimfahrten, Christoph für Kopfkino und Coverversionen, Corinna für das Gegenlesen (Sorry), Svetlana für das gemeinsame SUMOylieren, Lars „Youtube“, Daniel und Daniel, Atha, Marianne, Katharina, Joanna, Heri, Mareike, Denise usw. usf...
- meinen Freunden. Marco, Dennis, Dennis², Tina, Martina, Michel, Michael, Christian, Marc, Martin, Meiko und allen Anderen denen es zuweilen sicherlich schwer fiel zu verstehen warum ich das hier eigentlich mache.
- meiner Familie. Die Hilfe durch Euch und der Rückhalt haben mich diese Arbeit gewissenhaft und ehrlich durchführen lassen. Gerade meinen Eltern danke ich mich in meiner Laufbahn stets unterstützt zu haben.
- meiner Freundin Noreen die mich auch in den schweren Stunden dieser Arbeit ertragen hat und mir genügend Kraft gab diese Arbeit abzuschließen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen habe.

Münster,