

AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE  
IN DER MOLEKULAREN PATHOLOGIE  
*PROF. DR. ANJA KATRIN BOSSERHOFF*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Rolle von Repellentfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen für die Entstehung  
und Progression von Rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Anke Rüdell*

2014



AUS DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE  
IN DER MOLEKULAREN PATHOLOGIE  
*PROF. DR. ANJA KATRIN BOSSERHOFF*  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Rolle von Repellentfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen für die Entstehung  
und Progression von Rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Anke Rüdell*

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuerin: Prof. Dr. Anja Katrin Boßerhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2014

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	- 1 -
1. Einleitung .....	- 3 -
1.1. Artikulärer Knorpel .....	- 3 -
1.1.1. Chondrogenese.....	- 3 -
1.1.2. Der Aufbau des artikulären Knorpels.....	- 4 -
1.2. Rheumatoide Arthritis.....	- 5 -
1.2.1. Slit Proteine.....	- 7 -
1.2.2. Robo-Rezeptoren.....	- 8 -
1.2.3. Signaltransduktion nach Slit-Bindung an die Robo Rezeptoren.....	- 10 -
1.2.4. Transkriptionelle Regulationsmechanismen in RA.....	- 11 -
1.2.4.1. Transkriptionsfaktoren.....	- 11 -
1.2.4.2. <i>Single nucleotide polymorphisms</i> .....	- 12 -
1.2.4.3. Micro RNAs.....	- 13 -
1.2.5. Therapieansätze bei rheumatoider Arthritis .....	- 13 -
1.3. Osteoarthritis.....	- 14 -
1.3.1. Cadherine .....	- 16 -
1.3.1.1. N-Cadherin.....	- 17 -
1.3.2. Transkriptionelle Regulationsmechanismen in OA .....	- 18 -
1.3.2.1. Transkriptionsfaktoren.....	- 18 -
1.3.2.2. <i>Single nucleotide polymorphisms</i> .....	- 19 -
1.3.2.3. Micro RNAs.....	- 19 -
1.3.3. Therapieansätze bei Osteoarthritis.....	- 20 -
2. Zielsetzung.....	- 21 -
3. Material und Methoden.....	- 22 -
3.1. Material .....	- 22 -
3.1.1. Verbrauchsmaterialien .....	- 22 -
3.1.2. Geräte.....	- 25 -
3.1.2.1. Autoklaven .....	- 25 -
3.1.2.2. Blotapparaturen.....	- 25 -
3.1.2.3. Brutschränke.....	- 25 -
3.1.2.4. Gelelektrophoreseapparaturen.....	- 25 -
3.1.2.5. Heiz- und Kühlblöcke .....	- 26 -
3.1.2.6. Mikroskope.....	- 26 -
3.1.2.7. Spannungsgeräte.....	- 26 -

3.1.2.8.	Sterilwerkbänke.....	- 26 -
3.1.2.9.	Thermocycler .....	- 26 -
3.1.2.10.	Analysewaagen.....	- 27 -
3.1.2.11.	Zentrifugen.....	- 27 -
3.1.2.12.	Sonstige Geräte .....	- 27 -
3.1.3.	Bakterien.....	- 28 -
3.1.4.	Medien, Antibiotika und Puffer.....	- 28 -
3.1.4.1.	Medien zur Anzucht von E. coli und Säugerzelllinien .....	- 28 -
3.1.4.2.	Antibiotika .....	- 28 -
3.1.5.	Oligonukleotide .....	- 28 -
3.1.6.	Rekombinante Proteine, DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Antikörper.....	- 31 -
3.1.6.1.	Rekombinante Proteine.....	- 31 -
3.1.6.2.	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren .....	- 31 -
3.1.6.3.	Primäre Antikörper .....	- 31 -
3.1.6.4.	Sekundäre Antikörper.....	- 32 -
3.1.7.	MiR-Sonden, siRNA, miR und anti-miR Moleküle.....	- 33 -
3.1.8.	Puffer und Lösungen.....	- 33 -
3.1.8.1.	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung) .....	- 33 -
3.1.8.2.	Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation) .....	- 34 -
3.1.8.3.	Lösungen für Western Blot.....	- 34 -
3.1.8.4.	Lösungen und Gele für die SDS-Gelelektrophorese.....	- 34 -
3.1.8.5.	Lösung zur Isolation von Gesamtprotein (RIPA-Puffer) .....	- 35 -
3.1.8.6.	Lösungen zur Isolation von Kernproteinen .....	- 35 -
3.1.8.7.	Sonstige Lösungen und Puffer .....	- 36 -
3.1.9.	Vektoren.....	- 36 -
3.1.9.1.	pcDNA3.1.....	- 36 -
3.1.9.2.	pCRII-TOPO .....	- 36 -
3.1.9.3.	pGL2-basic und pGL3-basic.....	- 36 -
3.1.9.4.	pGL3-promoter.....	- 37 -
3.1.9.5.	pRL-TK .....	- 37 -
3.1.9.6.	pGL2-AP-1, pGL2-CRE und pGL2-NFκB .....	- 37 -
3.1.9.7.	TOP/FOP <i>flash</i> .....	- 37 -
3.1.9.8.	Klonierte Vektoren.....	- 37 -
3.1.10.	Zelllinien und primäre Zellen .....	- 38 -
3.2.	Methoden .....	- 39 -
3.2.1.	Molekular- und mikrobiologische Arbeiten .....	- 39 -

3.2.1.1.	RNA-Isolation aus Säugerzellen.....	- 39 -
3.2.1.2.	DNA-Isolation aus Säugerzellen.....	- 39 -
3.2.1.3.	Reverse Transkription .....	- 39 -
3.2.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion .....	- 40 -
3.2.1.5.	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	- 40 -
3.2.1.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	- 42 -
3.2.1.7.	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen.....	- 42 -
3.2.1.8.	Restriktion von DNA.....	- 42 -
3.2.1.9.	Klonierung und Transformation .....	- 43 -
3.2.1.10.	Mutagenese .....	- 43 -
3.2.1.11.	Plasmid-Isolation.....	- 44 -
3.2.1.12.	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	- 45 -
3.2.2.	Protein-Biochemische Arbeiten .....	- 45 -
3.2.2.1.	Proteinisolation.....	- 45 -
3.2.2.2.	Isolation von Kernproteinen.....	- 45 -
3.2.2.3.	Konzentrationsbestimmung.....	- 46 -
3.2.2.4.	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS) .....	- 46 -
3.2.2.5.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	- 46 -
3.2.2.6.	Western Blot .....	- 46 -
3.2.2.7.	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> .....	- 47 -
3.2.2.8.	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	- 47 -
3.2.2.9.	<i>Pull-down Assay</i> .....	- 48 -
3.2.2.10.	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	- 48 -
3.2.3.	Zell-basierte Arbeiten .....	- 49 -
3.2.3.1.	Zellkultur .....	- 49 -
3.2.3.2.	Transfektion .....	- 49 -
3.2.3.3.	Reportergen-Assay .....	- 50 -
3.2.3.4.	Migrations-Assay (Boyden-Kammer).....	- 51 -
3.2.3.5.	Migrations-Assay (Real-time cell analysis (RTCA)) .....	- 51 -
3.2.3.6.	Immunfluoreszenz.....	- 52 -
3.2.3.7.	Statistik .....	- 52 -
4.	Ergebnisse.....	- 54 -
4.1.	Robo3 Expressionsregulation und Signaltransduktion nach Ligandenbindung.....	- 54 -
4.1.1.	Expression der verschiedenen Robo3 Varianten in RASF.....	- 54 -
4.1.2.	Signaltransduktion nach Slit3 Bindung an Robo3B.....	- 58 -
4.2.	Herabregulation von hsa-miR-188-5p in aggressiven RASF.....	- 61 -

4.3.	Polymorphismen im <i>N-Cadherin</i> Promotor führen zu einer veränderten Expression des Gens .....	- 67 -
5.	Diskussion.....	- 75 -
5.1.	Robo3 Varianten in RASF und Signaltransduktion nach Slit3-Bindung.....	- 75 -
5.1.1.	Robo3B ist die in RASF exprimierte Robo3-Transkriptvariante .....	- 75 -
5.1.2.	Slit3-Behandlung führt zu einer verminderten AP-1 Aktivität in RASF .....	- 78 -
5.2.	hsa-miR-188-5p reguliert die Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 in aggressiven RASF.....	- 79 -
5.3.	Die genetische Variation rs11564299 führt zur Bindung von hnRNP K an den N-Cadherin Promotor .....	- 82 -
6.	Eigene Publikationen.....	- 86 -
7.	Literaturverzeichnis .....	- 87 -
8.	Anhang .....	- 105 -
8.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	- 105 -
8.2.	Danksagung.....	- 109 -
8.3.	Selbstständigkeitserklärung.....	- 110 -

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen und der Genregulation bei rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis beitragen. Bei beiden Erkrankungen kommt es zur Zerstörung des Gelenkknorpels und dadurch zu einer funktionellen Einschränkung des Gelenks. Dabei spielen aktivierte Synovialfibroblasten (SF) eine entscheidende Rolle. Diese Zellen wandern in den Knorpel ein und tragen durch die verstärkte Expression von Matrix-degradierenden Enzymen zum Abbau des Knorpels bei. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass aktivierte SF von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RASf) im Vergleich mit SF von gesunden Spendern eine höhere Expression von Rezeptoren aufweisen, die ursprünglich auf Neuronen während der Entwicklung des zentralen Nervensystems entdeckt wurden. Dazu gehören *unc-5 homolog B* und *C* (Unc5B und Unc5C), sowie ein Rezeptor der *Roundabout, Axon Guidance Receptor* Rezeptorfamilie, Robo3. Durch Bindung des Liganden Slit3 an den Robo3-Rezeptor werden RASf inhibiert und migrieren weniger. Neben diesen Rezeptoren wird auch ein aus dem Nervensystem bekanntes Cadherin, N-Cadherin, in aktivierten SF gegenüber SF von gesunden Spendern verstärkt exprimiert. N-Cadherin kann mit Robo3 interagieren und trägt damit ebenfalls zum aggressiven Phänotyp von RASf und SF von Patienten mit Osteoarthritis (OASf) bei.

Bisher war nicht bekannt, welche der Robo3-Isoformen in RASf exprimiert werden und welche Transkriptionsfaktoren an der Signaltransduktion nach Slit3-Bindung beteiligt sind. Deshalb war das Ziel des ersten Projektteils die Identifikation der exprimierten Robo3-Variante und der beteiligten Transkriptionsfaktoren. Im zweiten Projektteil wurde die Regulation der Expression der überexprimierten Rezeptoren durch micro RNAs (miRs) untersucht. Dabei lag der Fokus auf miRs, die in RASf weniger exprimiert werden als in SF von gesunden Spendern, was eine stärkere Expression ihrer Zielgene ermöglicht. Ziel des zweiten Projektteils war somit die Identifikation einer in RASf fehlregulierten miR sowie die Aufklärung ihrer Rolle für die Expression von Unc5B, Unc5C und Robo3. Im dritten Projektteil wurde die Bedeutung von N-Cadherin für die Entstehung und Progression von Osteoarthritis untersucht. Ziel dabei war die Assoziation von SNPs mit der Erkrankung. Außerdem wurde nach einem Transkriptionsfaktor gesucht, der die Expression von N-Cadherin aufgrund des gefundenen SNPs beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte für rheumatoide Arthritis im ersten Projektteil gezeigt werden, dass RASf die Slit-bindende Robo3B Isoform exprimieren und der

Transkriptionsfaktor AP-1 in das Robo3-Slit3 *signalling* involviert ist. Durch die Beteiligung von AP-1 an der Signaltransduktion lässt sich aufgrund der bisherigen Literaturdaten schließen, dass Rho-GTPasen das Signal nach Slit3-Bindung an den Robo3-Rezeptor intrazellulär weiterleiten und dadurch die Aktin-Polymerisation beeinflusst wird. Außerdem wurde im zweiten Projektteil gezeigt, dass hsa-miR-188-5p in RASF in frühen Passagen weniger exprimiert wird als in RASF in späten Passagen. Durch diese fehlregulierte miR konnte ein ebenfalls fehlreguliertes Zielgen, KIAA1199, identifiziert werden. Da KIAA1199 ein Hyaluronsäure-depolymerisierendes Enzym ist und bereits als in RASF fehlreguliert beschrieben wurde, stellt hsa-miR-188-5p eine Möglichkeit der Regulation dieses Proteins dar. Im dritten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass das seltene Allel von rs11564299 bei Osteoarthritis protektiv ist und mit einer erhöhten N-Cadherin Expression in OASF korreliert. Damit konnte zum ersten Mal eine Beteiligung von N-Cadherin an der Ausprägung von Osteoarthritis gezeigt werden. Zudem konnte ein Transkriptionsfaktor, hnRNP K, identifiziert werden, der an das seltene Allel von rs11564299 bindet und somit zur erhöhten N-Cadherin Expression beitragen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Hinweise für neue Therapie-Optionen und Prognose-Möglichkeiten von rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis. Da RASF Robo3B stärker exprimieren als normale SF, bietet dieser Rezeptor und dessen Inhibition durch Slit einen Mechanismus für die Therapie von rheumatoider Arthritis. Ebenso könnte die Regulation von KIAA1199 durch hsa-miR-188-5p in Zukunft für die Inhibition der Aggressivität von RASF genutzt werden. Rs11564299 stellt zwar keine Therapie-Option für Osteoarthritis dar, könnte jedoch dazu beitragen, das Risiko, Osteoarthritis zu entwickeln, genauer zu beurteilen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Artikulärer Knorpel

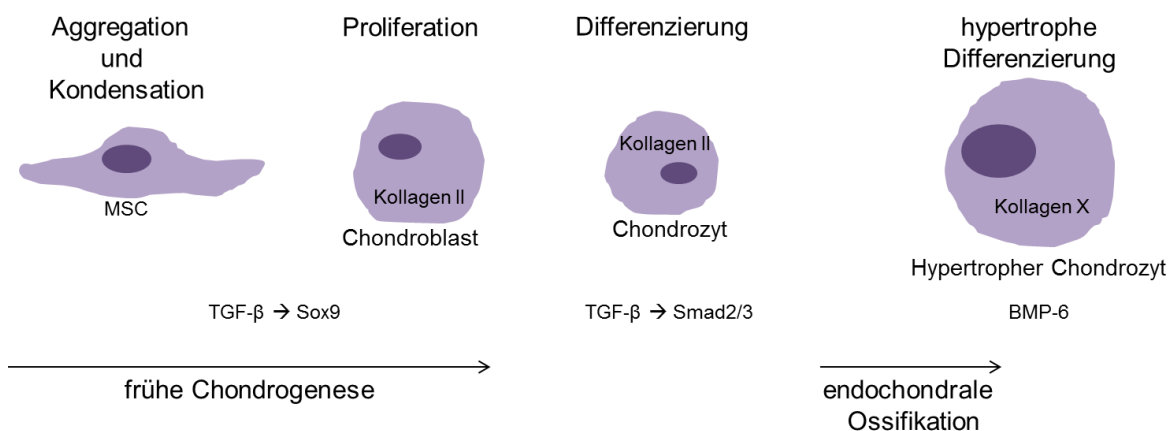
In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Ursachen in rheumatoider Arthritis (RA) und Osteoarthritis (OA) untersucht. Dabei lag der Fokus auf Zellen der Synovialmembran des Kniegelenks. Zum Verständnis dieser Erkrankungen sind allerdings auch der Aufbau und die Funktion des Knorpels von Bedeutung, da dieser im Verlauf von RA und OA zerstört und somit die Funktion des Gelenks eingeschränkt wird.

### 1.1.1. Chondrogenese

Um zu verhindern, dass Knochen bei Bewegungen in Gelenken abgerieben werden, sind die Knochenenden in Gelenken von flexiblem hyalinem Knorpel überzogen [1]. Dies dient dazu, Kräfte zu dämpfen und gleichmäßig zu verteilen [2]. Knorpel entsteht durch Chondrogenese aus mesenchymalen Stammzellen (MSC, Abbildung 1). Dies ist nicht nur während der Embryonalentwicklung wichtig, sondern auch im erwachsenen Organismus, zum Beispiel bei der Regeneration von skelettalen Gewebeschäden. Die Chondrogenese beginnt mit der Aggregation und Kondensation von mesenchymalen Vorläuferzellen. Der Wachstumsfaktor *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) ist Teil einer großen Proteinfamilie, zu der auch bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören. Mitglieder dieser Superfamilie spielen in allen Phasen der Knorpelentwicklung eine wichtige Rolle, so führt die Stimulation der TGF- $\beta$ -Rezeptoren zur Induktion der Chondrogenese [3]. Während der frühen Chondrozyten-Differenzierung proliferieren die Zellen stark und weisen eine hohe Expression von knorpelspezifischen Molekülen wie Kollagen II, N-Cadherin und Aggrecan auf [4–6]. Außerdem exprimieren die Zellen verstärkt den Transkriptionsfaktor SRY-box 9 (Sox9). Transkriptionsfaktoren der Sox Familie spielen während der Chondrogenese und der Chondrozyten-Differenzierung eine wichtige Rolle. Allerdings stimuliert TGF- $\beta$  die Kondensation der Zellen nur während der frühen Chondrogenese über Sox9 [7,8]. Während der späten Chondrogenese verhindert TGF- $\beta$  die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten über Smad2/3 [9,10].

Zur hypertrophen Differenzierung und damit zur terminalen Differenzierung kommt es während der endochondralen Ossifikation durch BMP-Stimulation [11]. Die Chondrozyten exprimieren nun Kollagen X statt Kollagen II [12]. Die Zellen nehmen an Größe zu,

mineralisieren und werden apoptotisch. Die Knorpelmatrix dient dann einwandernden Osteoblasten und Osteoclasten als Gerüst für den Aufbau von Knochen [4].

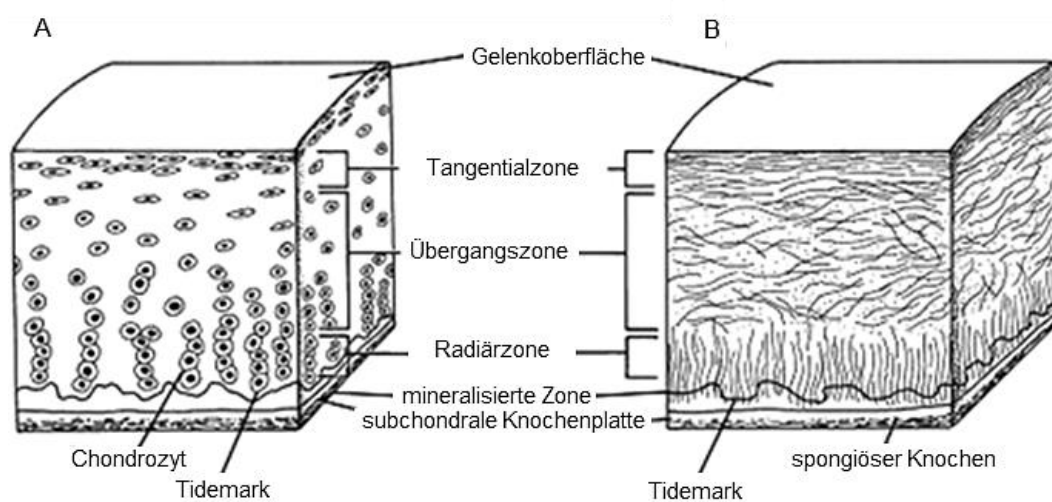


**Abbildung 1:** Schematischer Überblick über die Chondrogenese. Durch TGF- $\beta$  Stimulation von mesenchymalen Stammzellen (MSC) kommt es zu Beginn der Chondrogenese zur Aggregation und Kondensation der Zellen. Während der frühen Phase der Chondrogenese proliferieren die Zellen stark und exprimieren Kollagen II. In dieser Phase führt die TGF- $\beta$  Stimulation zu einer Induktion von Sox9. In differenzierten Chondrozyten hingegen aktiviert TGF- $\beta$  den Smad2/3 Signalweg, wodurch die hypertrophe Differenzierung inhibiert wird. Zur endochondralen Ossifikation kommt es durch BMP-6 Stimulation. Dabei differenzieren die Chondrozyten terminal und sterben durch Apoptose.

### 1.1.2. Der Aufbau des artikulären Knorpels

Ein gesunder adulter Gelenkknorpel besteht zum größten Teil aus extrazellulärer Matrix (ECM), während Chondrozyten, der einzige Zelltyp im Knorpel, nur zwei bis drei Prozent der Knorpelzusammensetzung ausmachen [2]. Der hyaline Knorpel besteht zu 65-80% aus Wasser. Die restlichen Anteile sind hauptsächlich Kollagene und Proteoglykane [2]. Kollagen II, IX und XI sind die wichtigsten Kollagene der artikulären ECM, deren verhältnismäßige Verteilung in den verschiedenen Zonen kaum variiert. Diese Kollagene bilden keine Homopolymere, sondern Heteropolymere aus allen drei Kollagenen. Die Zerstörung dieser Vernetzung scheint eine entscheidende Rolle bei degenerativen Erkrankungen zu spielen [13]. Den größten Anteil der Proteoglykane macht das Chondroitinsulfatproteoglykan Aggrecan aus. Durch Bindung von Aggrecan an Hyaluronsäure entsteht eine hydrierte gelartige Struktur, die wesentlich zur Belastbarkeit von Knorpel beiträgt [14]. Der Aufbau von artikulärem Knorpel ist in Abbildung 2A schematisch gezeigt. Ca. 10 - 20% des artikulären Knorpels sind Teil der Tangentialzone,

welche die tieferen Zonen vor Scherstress schützt. Die Kollagenfibrillen sind in dieser Zone dicht gepackt und parallel zur Knorpeloberfläche angeordnet (Abbildung 2B) [15]. Chondrozyten treten hier überwiegend einzeln auf und sind meist scheibenförmig, während sie in der tiefsten Schicht (Radiärzone) in vertikalen Säulen angeordnet und kugelförmig sind [2,16]. Die Übergangszone ist die funktionelle und anatomische Verbindung zwischen Tangentialzone und Radiärzone und macht ungefähr 40 - 60% des Knorpels aus [15]. Die Kollagenfasern sind hier dicker und schräg zur Knorpeloberfläche angeordnet (Abbildung 2B). Die Radiärzone besteht aus den dicksten Kollagenfibrillen, die senkrecht zur Knorpeloberfläche liegen (Abbildung 2B). Diese Zone macht ca. 30% des Knorpels aus [15].

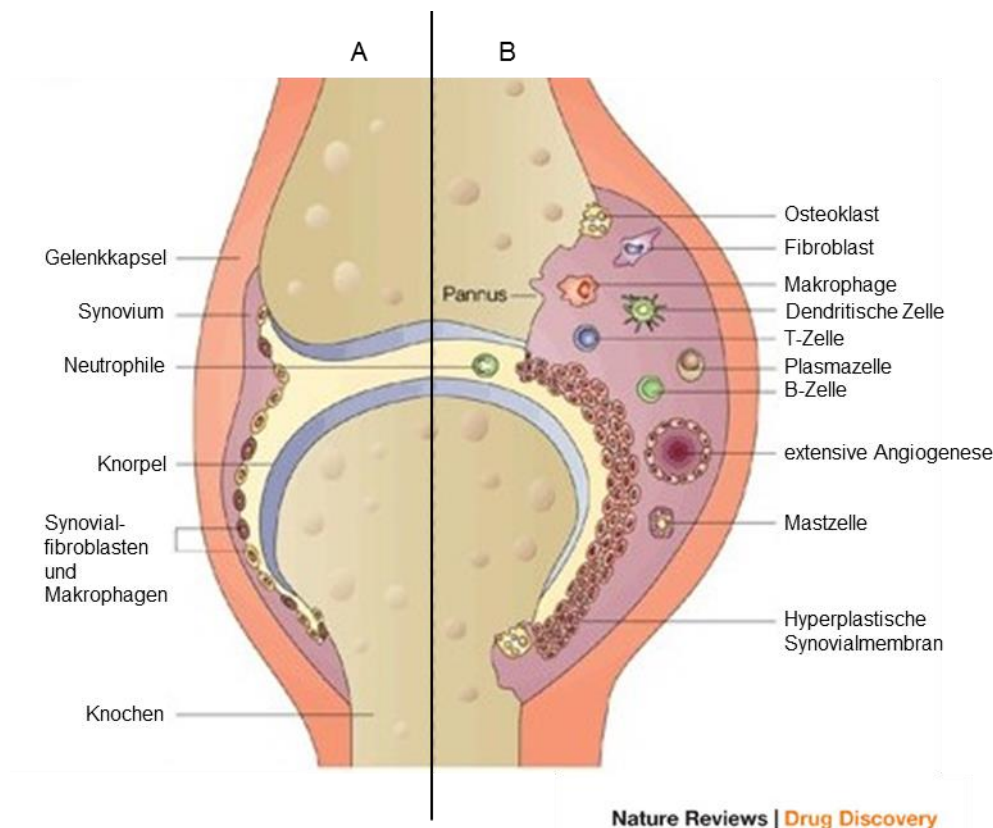


**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau von artikulärem Knorpel. **A** Zelluläre Organisation der verschiedenen Zonen des artikulären Knorpels. An der Oberfläche des Gelenks befindet sich Knorpel (Tangentialzone, Übergangszone und Radiärzone), daran schließt die mineralisierte Zone an, gefolgt von der subchondralen Knochenplatte. **B** Anordnung der Kollagenfasern im artikulären Knorpel. Tangentialzone: Hauptsächlich bestehend aus Kollagen Typ II und IX, dicht gepackt und parallel zur Knorpeloberfläche; Übergangszone: Dickere Kollagenbündel, schräg zur Oberfläche angeordnet; Radiärzone: Enthält die größten Kollagenfibrillen, senkrecht zur Knorpeloberfläche angeordnet. (Modifiziert nach Sophia Fox et al. [15])

## 1.2. Rheumatoide Arthritis

Die Zerstörung von Knorpel spielt eine entscheidende Rolle bei degenerativen Gelenkerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA). Betroffen sind hierbei vor allem Synovialgelenke, in welchen es durch die Zerstörung des Knorpels zu einer funktionellen Einschränkung der Gelenke kommt [17,18]. RA ist eine chronische, systemische,

entzündliche Autoimmunerkrankung und die häufigste Form der chronischen Arthritis. Die genauen Ursachen für RA sind unbekannt. Man geht aber davon aus, dass sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse, Rauchen [19], Übergewicht [20] und Stress [21] zur Ausprägung der Krankheit beitragen [22]. Auch humane Leukozytenantigenen (HLA)-DR Gene beeinflussen die Suszeptibilität für RA [23], weil diese Gene beispielsweise an der Antigenpräsentation beteiligt sind. CD4+ T-Zellen erkennen diese Antigene, weshalb die Assoziation von HLA-DR Genen mit RA die Beteiligung der T-Zell-Rezeptor/HLA-Bindung an den pathologischen Prozessen bei RA zeigt und die wichtige Rolle von T-Zellen bei RA verdeutlicht [24].



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau eines synovialen Gelenks. **A** Normales Gelenk. Das Synovium besteht aus ein bis drei Zellschichten. **B** Gelenk bei RA. Das Synovium besteht aus vielen Zellschichten, es kommt zur Überwucherung des Knorpels (Hyperplasie) und zur Schädigung des Knorpels und des subchondralen Knochens. (Modifiziert nach Strand et al. [25])

Die Prävalenz für RA nimmt mit steigendem Alter, unabhängig vom Geschlecht, zu. Allerdings steigt die Prävalenz ab einem Alter von 65 Jahren bei Frauen auf 15%, bei Männern jedoch nur auf 9% [1]. Eine entscheidende Rolle in der Erkrankung spielen bestimmte Zellen der Gelenkinnenhaut (Synovium), sogenannte Synovialfibroblasten

(SF). In gesunden Individuen ist das Synovium aus ein bis drei Zellschichten aufgebaut, bestehend aus SF und Makrophagen (Abbildung 3A). In diesem Gewebe produzieren SF Proteine und versorgen Gelenk und den anschließenden Knorpel mit Nähr- und Schmierstoffen wie Hyaluronsäure [26].

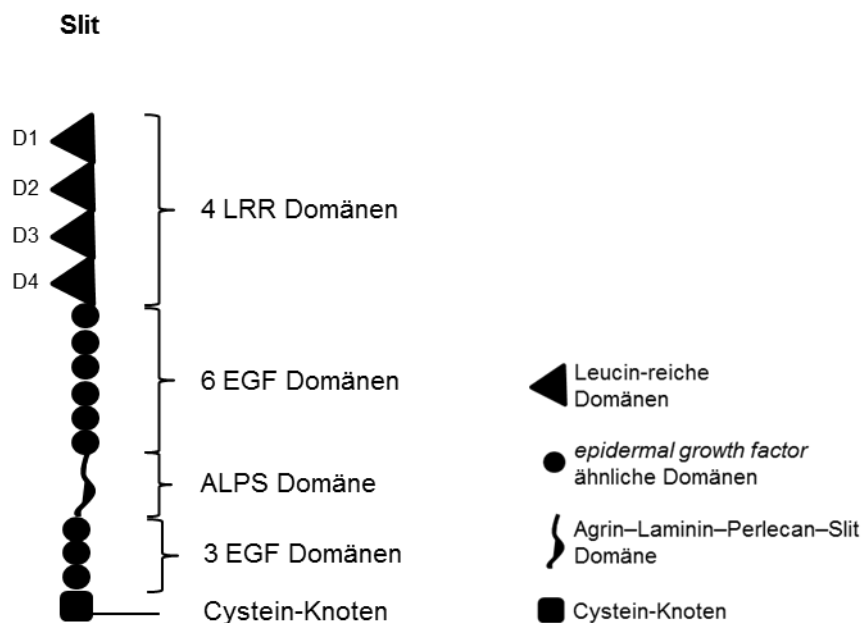
Bei RA kommt es zu einer Verdickung der Synovialmembran auf bis zu 15 Zellschichten, einer sogenannten Hyperplasie (Abbildung 3B), wobei das hyperplastische Gewebe die Knorpeloberfläche regelrecht überwuchert und Zellen des Synoviums in den Knorpel und in den subchondralen Knochen einwandern und diesen zerstören [17,27]. Die Zerstörung wird unter anderem durch die vermehrte Produktion von degradierenden Enzymen wie MMPs, Serinproteasen und Aggrecanasen gefördert [22]. Neben Enzymen werden auch Rezeptoren, wie *Roundabout*, *Axon Guidance Receptor*, *Homolog 3* (*Drosophila*) (*Robo3*), *Unc-5 Homolog B* (*C. Elegans*) (*Unc5B*) und *Unc-5 Homolog C* (*C. Elegans*) (*Unc5C*) in RASF stärker exprimiert als in nSF, was zu einer höheren Aggressivität der Zellen führt [28,29].

### 1.2.1. Slit Proteine

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Slit3 die Migration von RASF und den Knorpelabbau durch diese Zellen inhibiert [28]. Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems agiert der Ligand Slit mit seinem Rezeptor, um Neuronen das Kreuzen der Mittellinie des Nervensystems zu ermöglichen oder dieses zu verhindern [30]. Slits sind ~200 kDa große Glykoproteine der ECM [31]. Diese sogenannten Repellentfaktoren wurden ursprünglich im zentralen Nervensystem von *Drosophila* Embryonen entdeckt [32]. In Säugetieren wurden bis heute drei, zu 60% homologe Slit-Varianten, identifiziert (*Slit1-3*) [33], die an alle Robo Rezeptoren binden können [30,33]. Alle drei Slits bestehen aus vier Leucin-reichen Wiederholungen (LRR) D1-D4, neun *epidermal growth factor* (EGF) ähnlichen Domänen, die durch eine konservierte Agrin–Laminin–Perlecan–Slit (ALPS) Domäne getrennt sind und einer C-terminalen, Cystein-reichen Domäne (Abbildung 4) [34,35]. Strukturelle Untersuchungen haben gezeigt, dass das aktive Zentrum von Slit in D2 liegt, einer hochkonservierten Domäne in den verschiedenen Slit-Varianten [36]. Diese Domäne ist für die Bindung an die Robo Rezeptoren und somit für die repulsive Wirkung der Slits im zentralen Nervensystem verantwortlich. Slits werden *in vivo* und *in vitro* proteolytisch in zwei Fragmente prozessiert, in ein ~140 kDa N-terminales Fragment und in ein ~60 kDa C-terminales Fragment [33,37]. Wang et al. zeigten bereits 1999, dass die N-terminalen und C-terminalen Slit Fragmente unterschiedliche

Eigenschaften besitzen. So diffundiert das kleinere C-terminale Fragment verstärkt, während das größere N-terminale Fragment vermehrt mit Zellen assoziiert ist [37]. Während das *full-length* Protein und das N-terminale Fragment an die Robo-Rezeptoren binden und dadurch als Repellentfaktoren fungieren, ist die Funktion des C-terminalen Fragments unklar [31].

In RASF konnte ein Einfluss der Slits auf die Migration gezeigt werden. Die Behandlung mit Slit3 führt hier zu einer Inhibition der Migration und zu geringerem Knorpelabbau durch RASF [28].

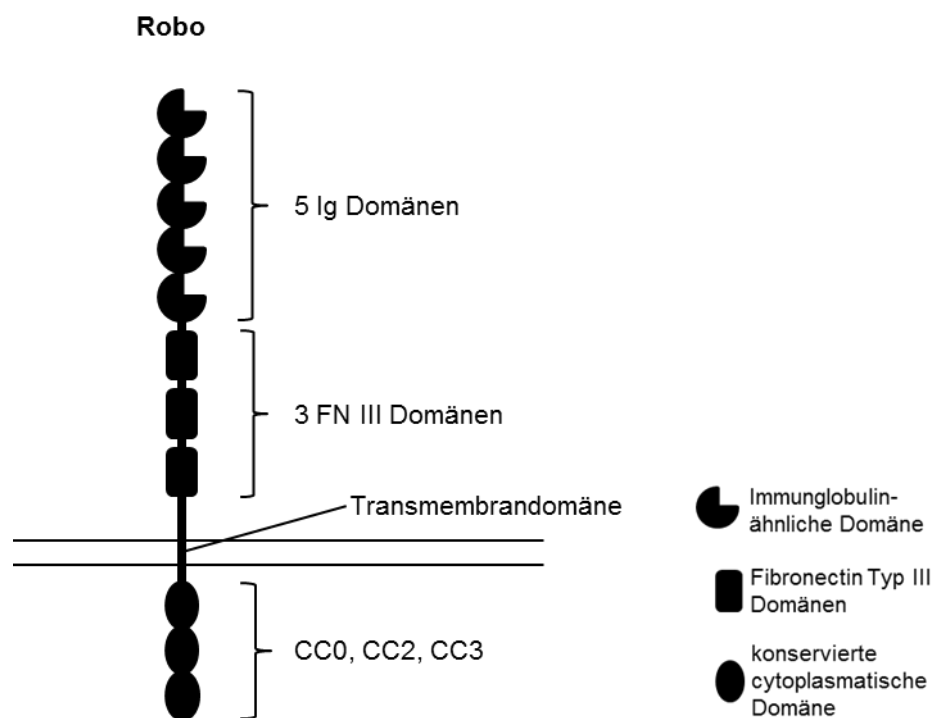


**Abbildung 4:** Schematischer Aufbau der Slit Proteine mit vier LRR Domänen (D1-D4), neun EGF Domänen, unterbrochen von einer ALPS Domäne und einer Cystein-reichen Domäne am C-terminalen Ende.

### 1.2.2. Robo-Rezeptoren

Denk et al. konnten zeigen, dass Zellen, welche den Robo3-Rezeptor exprimieren, stärker migrieren als Zellen, die kein Robo3 auf der Oberfläche haben. Repellentfaktoren und ihre Rezeptoren wurden ursprünglich im Zusammenhang mit der neuronalen Entwicklung beschrieben. Auch die Robo-Rezeptorfamilie wurde als erstes mit der Wegfindung von kommissuralen Neuronen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems entdeckt [30,38]. Robo Rezeptoren sind Zelladhäsionsmoleküle und gehören zur Immunglobulin-(Ig-) Superfamilie (Abbildung 5) mit fünf Ig-ähnlichen Domänen am N-Terminus. Diesen

folgen drei Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen, ein transmembraner Teil und bis zu vier konservierte cytoplasmatische Motive (CC0-CC3), wobei humanem und murinem Robo3 CC1 fehlt [39,40]. Die cytoplasmatischen Domänen besitzen keine katalytische Aktivität, jedoch weisen sie Phosphorylierungsregionen und andere konservierte Motive auf [41]. Die CC1 Domäne ist verantwortlich für die Bindung an *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC) [42], während CC2 eine Bindestelle für *enabled homolog (Drosophila)* (Ena) besitzt [43]. Für die Liganden-Bindung der Rezeptoren sind die Ig1 und Ig2 Domänen essentiell [44]. Die extrazellulären Domänen sind auch für die homophile Bindung der Robo-Rezeptoren verantwortlich [45]. Robo geht aber auch heterophile Bindungen mit anderen Oberflächenmolekülen ein, wie DCC oder verschiedenen Cadherinen, z.B. N-Cadherin [42,46,47]. Es wurde bereits beschrieben, dass es verschiedene Spleißvarianten von Robo3 gibt, welche in verschiedenen Stadien der Entwicklung eine Rolle spielen [48,49]. Interessanterweise wird die längste Variante, Robo3A, als nicht Slit-bindend beschrieben. Eine weitere Robo3 Variante, Robo3B, wurde hingegen als Slit-bindend beschrieben [48]. Diese Variante hat einen anderen Translationsstart als Robo3A und hat somit einen Robo3B-spezifischen N-Terminus. Eine genauere Beschreibung der Robo3-Transkriptvarianten und deren Expression in RASF folgt im Ergebnisteil 4.1.1.



**Abbildung 5:** Schematischer Aufbau der Robo-Rezeptoren mit fünf Ig-ähnlichen Domänen, drei FN III Domänen, einer Transmembrandomäne und drei konservierten cytoplasmatischen Domänen (CC0, CC2, CC3).

### 1.2.3. Signaltransduktion nach Slit-Bindung an die Robo Rezeptoren

Es ist bekannt, dass Slit über D2 an die Ig1 oder Ig2 Domäne von Robo bindet [44]. Für Slit2 wurde gezeigt, dass die Bindung über D2 in einem 1:1 Verhältnis an die ersten zwei Ig Domänen von Robo1 stattfindet [50]. Für die weitere Signaltransduktion wurden verschiedene Wege beschrieben. Wie oben bereits erwähnt, enthält die CC2 Domäne von Robo eine Bindestelle für Ena [43]. Ena wurde ursprünglich bei einer Suche nach Inhibitoren für Mutationen der Tyrosinkinase *abelson* (Abl) gefunden [51]. Ena gehört zu einer kleinen konservierten Familie von Proteinen und ist aus einer N-terminalen *enabled/VASP homology 1* (EVH1) Domäne, einer zentralen Prolin-reichen Region, mehreren SH3 Domänen und einer C-terminalen EVH2 Domäne aufgebaut. Die Prolin-reiche Region fungiert als Ligand für das Aktin-Monomer Bindeprotein Profilin, die SH3 Domänen enthalten Bindestellen für Proteine wie Abl [52,53]. Die EVH2 Domäne ist in die Bindung an F-Aktin involviert [54]. Mitglieder der Ena Proteinfamilie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktin-Cytoskeletts während der Zellmigration und der Wanderung der Wachstumskegel von Neuronen [55]. Die direkte Interaktion von Ena und Abl lässt vermuten, dass auch Abl direkt an der Signaltransduktion nach Bindung von Slit an Robo beteiligt sein könnte. Bashaw et al. konnten zeigen, dass dies der Fall ist und auch Abl direkt an eine konservierte cytoplasmatische Domäne (CC3) von Robo bindet [43]. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass sich Ena und Abl in ihrer Funktion ergänzen. Während Ena zur repulsiven Wirkung beiträgt, kehrt Abl den Effekt durch Phosphorylierung von Robo um und inaktiviert Robo [43]. 2002 zeigten Rhee et al., dass die Bindung von Slit an Robo zu einer verminderten N-Cadherin-vermittelten Zell-Adhäsion führt und Abl eine physikalische Verbindung zwischen den beiden Molekülen darstellt [46]. Ein anderer Weg der Signalweiterleitung wurde 2001 von Wong et al. beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass Rho GTPase aktivierende Proteine (GAPs) über ihre SH3 Domäne mit der intrazellulären CC3 Domäne von Robo interagieren können [56]. Eine Slit-Bindung an Robo erhöht die Bindung dieser sogenannten Slit-Robo GAPs (srGAPs), wodurch die intrinsische GTPase Aktivität der Rho-GTPase *cell division control protein 42 homolog* (Cdc42) erhöht wird, was wiederum zur Inaktivierung von Cdc42 führt [56]. Diese Inaktivierung führt zu einer verminderten Aktivierung des *Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein* (N-WASP) und dadurch zu einer verringerten Bildung des Arp2/3 Komplexes. Da Arp2/3 die Aktinpolymerisation fördert, haben geringere Cdc42 Level eine verminderte Migrationsfähigkeit der Zellen zur Folge [56].

## 1.2.4. Transkriptionelle Regulationsmechanismen in RA

### 1.2.4.1. Transkriptionsfaktoren

Die Transkription kann auch durch eine veränderte Aktivität von Transkriptionsfaktoren moduliert werden. Der Promotor eines Gens weist dazu verschiedene Bereiche auf, die die Bindung der Polymerasen ermöglichen oder die Affinität dieser beeinflussen. Gene, die durch RNA-Polymerase II transkribiert werden, haben zum Beispiel meist zwei Promotor-Kernelemente, eine TATA-Box und ein Initiator-Element [57]. Weiter entfernt vom Transkriptionsstart findet man sogenannte *Enhancer*-Elemente. Die dort bindenden Transkriptionsfaktoren können die Polymerase Bindung an den Promotor direkt beeinflussen, da diese durch DNA-Loops in räumliche Nähe des Transkriptionsstarts gelangen [57]. Transkriptionsfaktoren sind die Modulatoren der Genexpression. Durch sie sind Zellen in der Lage, auf äußere Stimuli zu reagieren, was bei diversen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Dazu gehören u.a. Zellzykluskontrolle [58], sowie Embryonalentwicklung [59]. Aber auch bei der Entstehung und Entwicklung einer Krankheit spielen Transkriptionsfaktoren eine übergeordnete Rolle. So sind Transkriptionsfaktoren z.B. in der Gruppe der Onkogene deutlich überrepräsentiert [60]. Transkriptionsfaktoren werden meist nach der Art ihrer Domänen zu Gruppen zusammengefasst. Das macht deshalb Sinn, weil Transkriptionsfaktoren mit ähnlichen DNA-Bindedomänen oft bei ähnlichen Prozessen eine Rolle spielen [61]. Die im Folgenden aufgeführten Transkriptionsfaktoren wurden in der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang mit RA näher untersucht.

Die *Activating protein-1* (AP-1) Aktivität ist im RA Synovium im Vergleich zum gesunden Synovium erhöht [62]. Dies führt zu einer verstärkten Expression von inflammatorischen Cytokinen, wie IL-1 $\beta$  und somit zur einer erhöhten Expression von MMPs, was letztendlich zu Knorpel- und Knochenabbau führt [63]. AP-1 ist eine Transkriptionsfaktorfamilie, die aus Homodimeren von Proteinen der Jun-Familie oder Heterodimeren von Jun, Fos oder *activating transcription factor* (ATF) Proteinen besteht [64,65]. Diese Proteine weisen *basic leucin zipper* (B-ZIP) Motive auf, über welche es zur DNA-Bindung und Dimerisierung kommt. Erst durch die Dimer-Bildung kann DNA gebunden und so die Genexpression beeinflusst werden. Die Zusammensetzung von AP-1 aus den verschiedenen Proteinen beeinflusst die Bindung an die DNA, weshalb verschiedene Dimere an unterschiedliche DNA-Sequenzen binden [66].

Der Transkriptionsfaktor *Cyclic (c) AMP response element binding protein* (CREB) ist nahe mit ATF-1 oder *cAMP response element modulator* (CREM) verwandt und bindet an sogenannte *cAMP response elements* (CRE) in der DNA. Diesen Proteinen ist gemeinsam, dass sie B-ZIP Domänen für Homo- oder Heterodimerisierung besitzen [67]. CREB wird durch die Phosphorylierung an einem spezifischen Serin-Rest aktiviert und kann dann an weitere Transkriptionsaktivatoren, wie *cAMP binding protein* (CBP) oder p300, binden [68,69]. Es wurde gezeigt, dass CREB in TNF- $\alpha$  stimulierten SF verstärkt phosphoryliert vorliegt, was für eine Beteiligung von CREB an der veränderten Genexpression in RASF sprechen könnte [70].

Für *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) wurde eine Rolle bei der Degradierung von Knorpel durch RASF bereits 1998 durch eine Induktion der Expression von MMP-1 gezeigt [71]. NF $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der aus Homo- oder Heterodimeren fünf verschiedener Proteine besteht: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF $\kappa$ B1) und p100/52 (NF $\kappa$ B2), wobei das p65/p50 Heterodimer das häufigste Dimer ist. Diese Proteine besitzen alle eine 300 Aminosäuren lange konservierte aminoterminal Rel Homologie Domäne (RHD), die für die Dimerisierung, DNA-Bindung, Bindung an den Inhibitor I $\kappa$ B und die nukleäre Translokation verantwortlich ist [72].

$\beta$ -Catenin wird, verglichen mit SF aus Osteoarthritis Patienten (OASF), verstärkt in RASF exprimiert und trägt zur stabilen Aktivierung der RASF bei [73].  $\beta$ -Catenin ist ein Protein mit vielen verschiedenen Funktionen. So ist es unter anderem durch die Bindung an Cadherine und deren Verankerung am Cytoskelett in die Zelladhäsion involviert [74]. Normalerweise ist  $\beta$ -Catenin somit auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran zu finden. Durch Phosphorylierung ändert sich die Funktion von  $\beta$ -Catenin. Das Protein trägt dann zur Signaltransduktion bei, wobei  $\beta$ -Catenin mit *T-cell factor* (TCF)/*Lymphoid enhancer-binding factor* (Lef) Transkriptionsfaktoren assoziiert, in den Nucleus transloziert und dort zum Beispiel die Wnt-induzierte Transkription triggert [75]. Bauer et al. konnten außerdem zeigen, dass die Phosphorylierung und Stabilität von  $\beta$ -Catenin in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms durch die Komplexbildung von P-Cadherin mit Robo3 und Slit2 beeinflusst wird, was wiederum die Migration dieser Zellen inhibiert [47].

#### **1.2.4.2. Single nucleotide polymorphisms**

Veränderungen in der DNA-Sequenz eines Promotors können die Expression von Genen beeinflussen. Eine Möglichkeit dazu sind *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). Unter

SNPs versteht man den Austausch einzelner Basenpaare in der DNA. Sie stellen ca. 90% der Variationen im Genom dar [76]. In den vergangenen Jahren wurden immer mehr solcher SNPs identifiziert und in funktionellen Studien in Projekten wie genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) mit Phänotypen und Krankheiten assoziiert [77]. Es wurden aber auch Assoziationen von SNPs mit dem Ansprechen auf Chemotherapeutika gefunden [78] oder SNPs, die die Prävalenz für eine Krankheit beeinflussen. Ein sogenannter Suzeptibilitätslocus für RA ist z.B. ein *missense* SNP im *Protein Tyrosin Phosphatase N22 (PTPN22)* Gen, der mit einem erhöhten Risiko für RA einhergeht [79].

### 1.2.4.3. Micro RNAs

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der veränderten Genexpression in RASF im Vergleich mit nSF spielen micro RNAs (miRs). MiRs sind „kleine“ RNAs, die an spezifische Sequenzen in der mRNA binden und somit die Proteinexpression des Gens regulieren. Sie können in Krankheiten de-reguliert sein und damit die Expression ihrer Zielgene beeinflussen [80,81]. Bei RA werden miRs häufig durch Entzündungsfaktoren fehlreguliert [82–84]. Da miRs bei RA nicht nur im entzündeten Gewebe vorkommen, sondern auch in Körperflüssigkeiten wie Synovialflüssigkeit und Blut, eignen sie sich als mögliche Biomarker für die Diagnostik [82,85]. In der Literatur werden im Zusammenhang mit RA vor allem hsa-miR-146a, hsa-miR-155 und hsa-miR-223 beschrieben [82]. Hsa-miR-146a wird bei RA verstärkt in SF, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und Synovialflüssigkeit exprimiert. Dabei korreliert die Expression in PBMCs und Synovialflüssigkeit interessanterweise mit dem Schweregrad der Erkrankung [83,86]. Für mmu-miR-155 wurde bereits 2007 eine zentrale Rolle für die Immunantwort in *knock-out* Mäusen beschrieben, die ohne miR-155 keine Kollagen-induzierte Arthritis entwickelten [84,87]. Die Rolle von hsa-miR-223 ist nicht so eindeutig. Hier scheint die Bedeutung der miR vom Zelltyp abzuhängen. Während eine Expression in T-Zellen zu einer pro-inflammatorischen Reaktion führt, hat hsa-miR-223 in Monozyten den gegenteiligen Effekt und verstärkt hier anti-inflammatorische Signalwege [82].

### 1.2.5. Therapieansätze bei rheumatoider Arthritis

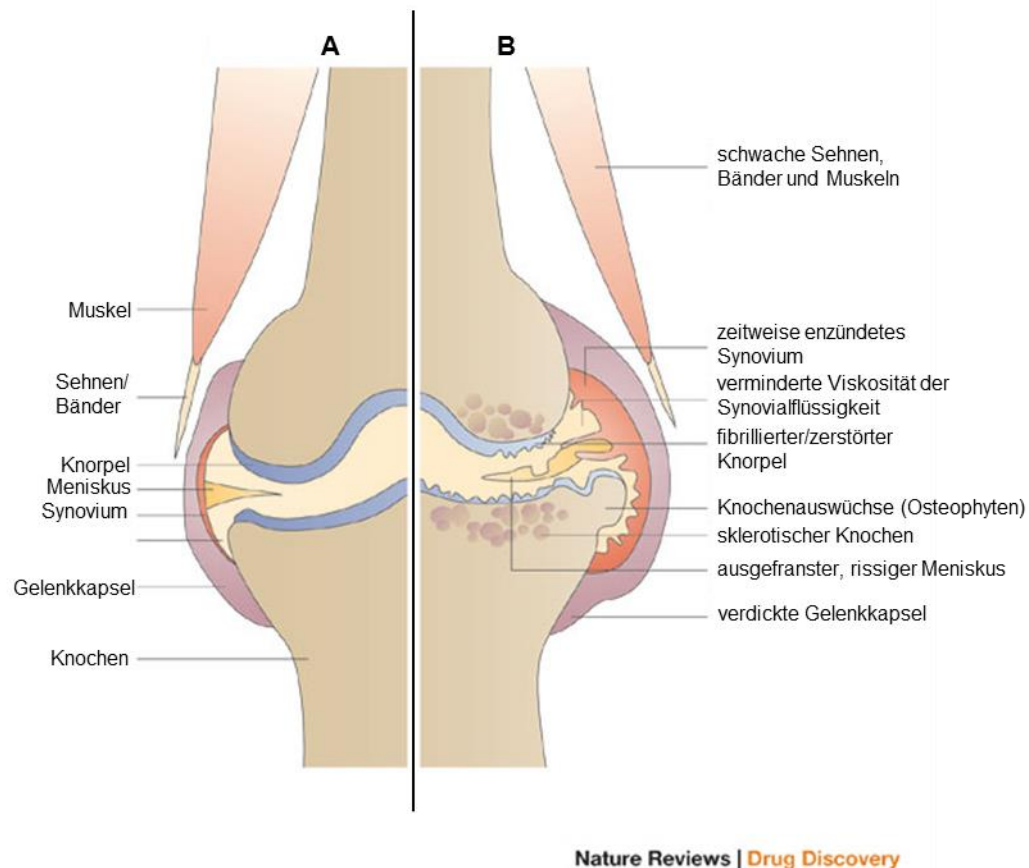
An der Entstehung von RA sind verschiedene Immunzellen und –mechanismen beteiligt. Firestein et al. konnten 1990 zeigen, dass in der Synovialmembran vermehrt Cytokine von Makrophagen und Fibroblasten wie *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF $\alpha$ ),

Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) oder Interleukin 6 (IL-6) exprimiert werden. Diese aktivieren dann über parakrine Mechanismen Zellen in ihrer Umgebung [88]. Für TNF $\alpha$  konnte bereits 1989 gezeigt werden, dass *in vitro* die Blockade dieses Cytokins mithilfe von inhibierenden Antikörpern die Produktion von anderen Cytokinen deutlich reduziert [89]. Wenig später wurde auch im Tiermodell die Bedeutung von TNF $\alpha$  bei RA deutlich. Williams et al. zeigten 1992, dass die Neutralisierung von TNF $\alpha$  bei Kollagen II-induzierter Arthritis in Mäusen durch die Gabe von Antikörpern zu einer verringerten Schwellung der Pfoten und geringerem histologischem Schweregrad der RA führt [90]. Heute sind verschiedene Medikamente zur Inhibition von TNF $\alpha$  für den Menschen zugelassen, dazu gehören Infliximab, Etanercept und Adalimumab [91]. Jedoch werden diese laut den „Überarbeitete(n) Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie“ erst nach Versagen von mindestens zwei Basistherapeutika, wie beispielsweise Methotrexat [92] oder Ciclosporin [93], verabreicht [94]. Bei Methotrexat und Ciclosporin handelt es sich um Cytostatika, die in sehr niedrigen Dosierungen zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, da sie durch die Inhibition von Cytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) immunsuppressiv wirken [95,96]. Wenn die Therapie mit Basistherapeutika nicht ausreichend ist, sind in Europa außerdem IL-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra) und inhibitorische Antikörper gegen IL-6 (Tocilizumab) zugelassen [97].

### 1.3. Osteoarthritis

OA ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die von rheumatoider Arthritis klassischerweise dadurch unterschieden wird, dass hier hauptsächlich Knorpel und Knochen durch die Krankheit betroffen sind [98]. Charakteristisch sind für OA z.B. neben der Knorpelerosion auch knöcherne Auswüchse im Gelenk, sogenannte Osteophyten, die aus Knorpel hervorgehen und schließlich verknöchern [99]. Heute geht man allerdings davon aus, dass auch bei OA nicht nur Knorpel und Knochen betroffen sind, sondern dass sich die Erkrankung auf alle Strukturen des Gelenks, wie Synovialmembran, Bänder und Sehnen auswirkt und diese Veränderungen zum Krankheitsbild beitragen (Abbildung 6) [100]. Eine Entzündung des Synoviums ist bei OA Patienten meist weniger ausgeprägt als bei RA Patienten mit starker Arthritis, jedoch vergleichbar mit der Synovitis bei milder RA [101]. Das hat zur Folge, dass auch Osteoarthritis Synovialfibroblasten (OASF) durch Cytokine aktiviert werden können, wenn auch nicht im selben Maße wie RASF [102]. Aktivierte OASF sind, wie RASF, in der Lage, in den Knorpel einzuwandern und diesen zu zerstören [29].

Generell wird bei der Klassifizierung von OA zwischen idiopathischer (primärer) OA und sekundärer OA unterschieden. Von primärer OA spricht man, wenn der Erkrankung keine eindeutige Ursache zugeordnet werden kann, während sekundärer OA andere Faktoren wie Verletzungen oder metabolische Störungen zugrunde liegen [103]. Als Risikofaktoren gelten hierbei erworbene Ursachen wie Fehlstellungen der Gelenke durch Unfälle oder Übergewicht, aber auch zunehmendes Alter und genetische Faktoren [2,103]. Es ist davon auszugehen, dass meist mehrere Faktoren für das Auftreten einer Arthrose verantwortlich sind. Mithilfe von Studien mit Geschwistern und Zwillingen wurde gezeigt, dass genetische Faktoren bis zu 50% zum Risiko beitragen, OA zu entwickeln [104,105]. Die Prävalenz für OA korreliert eindeutig mit dem Alter der Patienten. Generell ist die Prävalenz für Männer vor dem 50. Lebensjahr höher als bei Frauen [98]. In dieser Altersgruppe beeinflusst auch der Bildungsstatus die Prävalenz. Ein niedrigeres Bildungsniveau korreliert mit einer höheren Wahrscheinlichkeit eine Arthrose zu entwickeln. Das ist unter anderem auf Berufe zurückzuführen, die die Gelenke beanspruchen. Ab einem Lebensalter von 50 Jahren steigt das Risiko für Frauen OA zu entwickeln [98]. Mit 65 Jahren leiden ca. die Hälfte aller Frauen und ein Drittel der Männer unter OA, unabhängig vom Bildungsstatus [1]. Da die Prävalenz für Osteoarthritis (OA) mit steigendem Alter zunimmt, wurde der Zusammenhang zwischen Altern und Knorpelschaden bereits eingehend untersucht. Es wurde gezeigt, dass sich die Oberflächenmarker auf alternden und OA Chondrozyten verändern. Diese reagieren weniger stark auf *transforming growth factor-β* (TGF-β). Dies ist auf eine geringere Expression des *TGF-beta receptor type-1* (TGFBR1) zurückzuführen, wodurch nachfolgende Signalweiterleitungen für katabole Prozesse (Matrixsynthese) nicht aktiviert werden. Stattdessen werden durch Bindung an *Serine/threonine-protein kinase receptor R3* (ACVRL1), einem weiteren TGF-β Rezeptor, anabole Prozesse, wie Matrixmetalloproteinase (MMP) Produktion, aktiviert [16,106]. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) untersucht. Dabei zeigte sich, dass OA Chondrozyten DNA-Schäden in mitochondrialer DNA aufweisen, welche zu einem erhöhten Level an ROS in den Zellen und Zelltod führen könnten [107]. Goodwin et al. konnten zeigen, dass Mitochondrien in Chondrozyten nach Verletzungen erhöhte Mengen an ROS produzieren und dass durch gezielte Inhibition dieser Produktion der Zelltod der Chondrozyten verhindert werden kann. Dies spricht für eine Beteiligung der Mitochondrien an stoßbedingten Knorpelschäden [108].



**Abbildung 6:** Synoviales Gelenk. Vergleich normal (A) und OA (B). Bei OA kommt es zu massiven Knorpelschäden. Im späteren Verlauf sind außerdem Knochen, Synovialmembran, Sehnen und Bänder betroffen. (Modifiziert nach Wieland et al. [109])

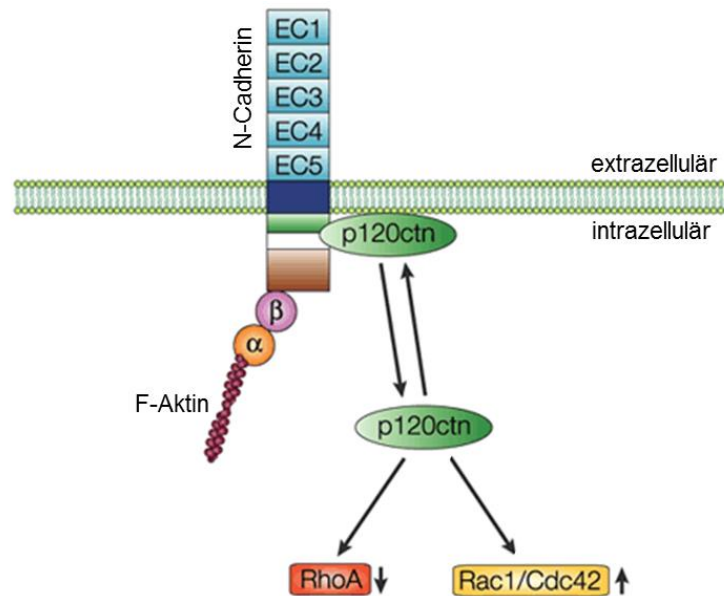
### 1.3.1. Cadherine

Cadherine werden bei der Kondensation von MSCs während der Chondrogenese stark exprimiert (s. 1.1.1). Cadherine sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsionsmoleküle, die in fast allen Geweben vorkommen und Zellen untereinander und in der ECM verankern [110] und somit auch bei Prozessen wie Migration eine Rolle spielen. Beim Menschen gibt es mehr als 80 Mitglieder der Cadherin-Familie [111]. Die klassischen Cadherine kommen assoziiert mit *Adherens junctions* vor und vermitteln Zell-Zell-Kontakte [111]. Cadherine setzen sich aus sich wiederholenden extrazellulären Cadherin-Motiven (EC), bestehend aus je ~110 Aminosäureresten, einer Transmembrandomäne und einer  $\beta$ -Catenin-bindenden cytoplasmatischen Domäne zusammen [74]. Cadherine lassen sich in verschiedene Subfamilien einteilen. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Cadherinen des Typ I. Klassische Typ I Cadherine, wie neuronales (N-) oder retinales (R-) Cadherin,

gehen bevorzugt homophile Bindungen ein, die meistens stärker sind als heterophile Bindungen zwischen den verschiedenen Cadherinen [112]. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Histidin-Alanin-Valin- (HAV-) Sequenz in EC1 besitzen, die im Fall von E-Cadherin essentiell für die homophile Bindung ist [113]. Durch Cadherin-vermittelte Zell-Zell- oder Zell-Matrixverbindungen tragen diese Moleküle zu Prozessen wie Migration und Invasion bei. Aufgrund ihrer Funktion bei Zell-Zell-Kommunikation und *-signalling* spielen Cadherine bei den verschiedensten Krankheiten eine wichtige Rolle. Dazu zählen unter anderem viele Tumorarten [114,115], Erkrankungen des Nervensystems [116,117] und Autoimmunerkrankungen [118]. So führt eine veränderte Cadherin Expression in Tumoren häufig zu stärkerer Migration und Invasion der Zellen [115,119].

#### **1.3.1.1. N-Cadherin**

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der N-Cadherin Expression in OASF näher untersucht. Im Folgenden werden Aufbau und Funktion dieses Zelladhäsionsmoleküls näher beschrieben (Abbildung 7). N-Cadherin wird vom *CDH2* Gen (Lokalisation: 18q11) kodiert und gehört zur Gruppe der klassischen Cadherine. Es wurde 1982 von Grunwald et al. zum ersten Mal beschrieben [120]. Der *N-Cadherin* Promotor besitzt keine CATT oder TATA Box, weist aber einen hohen GC-Gehalt und Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren auf wie z.B. eine NF $\kappa$ B-Bindestelle [121,122]. N-Cadherin ist ein transmembranes Glykoprotein, das nach post-translationalen Veränderungen im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat extrazellulär homophile Bindungen und intrazellulär Bindungen mit verschiedenen Adaptermolekülen eingeht [123,124]. Dazu gehören die Catenine p120 Catenin,  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin. Die Phosphorylierung von p120 Catenin reduziert die N-Cadherin-vermittelte Adhäsion durch Regulation der Aktivität von kleinen G-Proteinen, wie RhoA, Rac und Cdc42 [111,125,126].  $\beta$ -Catenin wiederum bindet im dephosphorylierten Zustand an  $\alpha$ -Catenin, wodurch der gesamte Komplex mit dem Cytoskelett verankert wird [111]. Neben homophilen Bindungen und heterophilen Komplexen mit anderen Cadherinen, geht N-Cadherin auch Bindungen mit anderen Oberflächenmolekülen, z.B. Robo Rezeptoren, ein [46,112]. Für die Rolle in OA sind die verschiedenen Bindungen deshalb interessant, weil eine Veränderung der N-Cadherin Expression dadurch auch die Migrationsfähigkeit von RASF und OASF durch schwächere oder stärkere Verbindung der Zellen untereinander verändern könnte.



**Abbildung 7:** Schematischer Überblick über die Interaktion von N-Cadherin mit p120 Catenin, α-Catenin und β-Catenin. Die Verankerung von N-Cadherin mit F-Aktin findet über α-Catenin und β-Catenin statt, während p120 Catenin die Aktivität von kleinen G-Proteinen wie Rho und Cdc42 beeinflusst. (Modifiziert nach Fukata et al.[127])

### 1.3.2. Transkriptionelle Regulationsmechanismen in OA

#### 1.3.2.1. Transkriptionsfaktoren

Die Auswirkungen dieses SNPs auf die OA Progression wurden in fortführenden Experimenten genauer analysiert. Dabei wurde unter anderem die Rolle des Transkriptionsfaktors ETS 1 Proto-Onkoproteins untersucht. ETS 1 ist Teil einer Transkriptionsfaktorfamilie, deren Mitglieder ursprünglich über Sequenzhomologien mit einem Proteinprodukt des v-ets Onkogens identifiziert wurden. Dieses Proteinprodukt wird vom E26 (*E twenty six*) avian erythroblastosis Virus kodiert, die sogenannte ETS-Domäne [128]. Das ETS 1 Protein kann in sechs Domänen (A-F) unterteilt werden. Die Domänen A-D und F sind regulatorische Elemente, während die E-Domäne die DNA-Bindedomäne, also die ETS-Domäne, ist [129]. Die ETS-Domäne besteht aus 85 Aminosäuren, bildet drei α-Helices und vier β-Stränge (H1-S1-S2-H2-H3-S3-S4). Sie erkennt spezifisch DNA-Sequenzen, die ein GGAA/T Kernelement aufweisen [130]. Auf die Rolle von ETS 1 als Transkriptionsfaktor in OASF wird im Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen.

### 1.3.2.2. *Single nucleotide polymorphisms*

Da in Projekten wie Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) immer mehr Haplotypen mit einem Phänotyp, wie beispielsweise einer Erkrankung, assoziiert werden [93], konnten in den letzten Jahren auch immer mehr Genloci identifiziert werden, die die Suszeptibilität für OA beeinflussen. Zum Beispiel wurde ein SNP im Promotor von *growth/differentiation factor 5* (GDF5) mit OA assoziiert, wobei die seltene Variante zu einem erhöhten Risiko führt [131]. Weil OA eine polygenetische Erkrankung ist, konnten bisher aber nur moderate bis niedrige Effekte durch die assoziierten Gene nachgewiesen werden und die Mehrheit der Kandidatengene konnte nicht zum besseren Verständnis der Erkrankung beitragen [132]. Eine Möglichkeit zur Assoziation von Merkmalen mit Krankheiten stellen Kohorten-Studien dar, bei welchen eine große Anzahl an Individuen gesammelt wird, die das gleiche Merkmal aufweisen. Solche Merkmale können Ereignisse im Leben sein, wie Zeitpunkt der Einschulung oder Scheidung, aber auch räumliche Kriterien oder das Vorhandensein eines Stimulus können hier eine Rolle spielen. In diesen Studien werden Kohorten dann über einen längeren Zeitraum hinsichtlich eines Ereignisses, wie das Auftreten einer Krankheit, beobachtet und mit einer Kontroll-Kohorten-Gruppe verglichen [133]. Dadurch sollen Zusammenhänge zwischen Exposition und Auftreten einer Krankheit identifiziert werden. Für die Identifizierung von Suszeptibilitätsloci werden jedoch gewöhnlich *case-control* Studien verwendet. Der Unterschied zu Kohortenstudien besteht darin, dass die Studienteilnehmer aufgrund einer Erkrankung in die Studie eingeschlossen und nicht vor dem Auftreten einer Erkrankung bereits beobachtet werden. In *case-control* Studien werden somit genetische Variationen einer Gruppe mit einer bestimmten Krankheit und eine gesunde Kontrollgruppe miteinander verglichen [134]. Auch in der vorliegenden Arbeit wird ein SNP beschrieben, der mithilfe einer *case-control* Studie mit OA assoziiert werden konnte.

### 1.3.2.3. *Micro RNAs*

Wie bereits beschrieben, kann sich die Expression verschiedener Gene in Zellen bei Erkrankungen des Organismus ändern (s. 1.2.4). So konnte auch im Fall von OA ein Einfluss von miRs auf die Ausprägung der Erkrankung gezeigt werden. Mmu-miR-455 wird beispielsweise während der Chondrogenese und in adultem Knorpel exprimiert, wodurch das TGF- $\beta$  *signalling* über die direkte Regulation von beispielsweise Smad2 reguliert wird. In OA Chondrozyten wurde eine verstärkte Expression von mmu-miR-455 gefunden, welche zur Pathologie von OA beiträgt [135]. Park et al. konnten außerdem

zeigen, dass hsa-miR-127-5p ein wichtiger Regulator für die MMP-13 Produktion ist und die IL-1 $\beta$ -induzierte Hochregulation von MMP-13 in Chondrozyten mit einer Herabregulation von hsa-miR-127-5p korreliert [136].

### **1.3.3. Therapieansätze bei Osteoarthritis**

Auch wenn nicht jede Form der Osteoarthritis einer Therapie bedarf, stehen bei schmerzhaften Arthrosen neben operativen Maßnahmen auch konservative Therapien zu Verfügung. Zu diesen gehören laut den Empfehlungen der „Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft“ allgemeine und physikalische Maßnahmen wie Gewichtsreduktion bei Übergewicht oder Krankengymnastik [137]. Außerdem werden zur Pharmakotherapie verschiedene Wirkstoffgruppen eingesetzt. Am häufigsten kommen dabei Analgetika (z.B. Paracetamol) und Antiphlogistika wie nicht-steroidale Antirheumatika (z.B. Ibuprofen) eingesetzt [137]. Die weiterführende Therapie besteht aus Orthopädietechnik (z.B. Pufferabsätze, Gehstock) und schließlich der operativen Therapie, zu welcher die Glättung des Knorpels gehört, bis hin zur Endoprothetik [137]).

## 2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Ursachen für die degenerativen Gelenkerkrankungen rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis untersucht. Es wurde bisher gezeigt, dass RASF und OASF, verglichen mit nSF, eine veränderte Genexpression aufweisen und außerdem aggressiver sind als diese. Zu den fehlregulierten Genen gehören die aus der Entwicklung des zentralen Nervensystems bekannten Rezeptoren *unc-5 homolog B* und *C* (Unc5B und Unc5C), *Roundabout*, *Axon Guidance Receptor*, *Homolog 3* (*Drosophila*) (Robo3), sowie N-Cadherin. Die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der verschiedenen untersuchten Proteine und Erkrankungen zur besseren Strukturierung in drei Teilbereiche unterteilt.

Ziel des ersten Teils war, herauszufinden, welche der Robo3 Isoformen in RASF im Vergleich mit nSF erhöht exprimiert wird, weil bisherige Veröffentlichungen zwar eine verstärkte Expression von Robo3 in RASF zeigen, die Transkriptvariante jedoch bisher unbekannt war. Da bekannt ist, dass Slit3 die Migration und somit die Aggressivität von RASF inhibiert, wurde außerdem untersucht, welche Transkriptionsfaktoren an der Signaltransduktion nach Liganden-Bindung an den Robo3 Rezeptor beteiligt sind.

Im zweiten Teil wurde die Hypothese einer gemeinsamen Regulation der Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C untersucht. Ziel war es, eine in RASF de-regulierte miR und deren Zielgene, neben Robo3, Unc5B und dUnc5C, zu identifizieren.

Im dritten Teil wurden Ursachen der erhöhten N-Cadherin Expression in OASF im Vergleich mit nSF untersucht. Ziel war hierbei die Assoziation eines oder mehrerer SNPs im CDH2 Promotor mit OA und die Identifikation an der veränderten Genexpression beteiligter Transkriptionsfaktoren.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Verbrauchsmaterialien

Active motif, La Hulpe, Belgium	ChIP-IT® Express Enzymatic Shearing Kit
Affymetrix, Santa Clara, CA, USA	GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Immun-Blot™ PVDF Membran, PrecisionPlus Protein™ Standards Kaleidoscope™
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKern® LE Agarose
Braun, Frankfurt am Main	Aqua injectabile
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
Corning Incorporated, Corning, USA	Corning® 25cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen Corning® 75cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen Corning® 175cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen 6-well cell culture cluster
Dako, Hamburg	Envision™ Detection Systems Peroxidase/DAB
Exiqon, Vedbaek, Dänemark	miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)
Euro-Diagnostica, Malmö, Schweden	sGAG quantitative kit
GE Healthcare, Buckinghamshire, England	Amersham Hyperfilm™ MP
J.T.Baker, Griesheim	alle nicht aufgeführten Chemikalien in flüssiger Form, Ethanol, Methanol

Life technologies, Darmstadt	<p><u>Ambion:</u>  mirVana™ miRNA Isolation Kit,  mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit,  mirVana™ qRT-PCR Primer Sets for Normalization,  mirVana™ qRT-PCR Primer Sets</p> <p><u>Invitrogen:</u>  Lipofectamine® LTX Reagent,  Lipofectamine® Plus™ Reagent,  Ready-Load™ 100bp und 1kb DNA Ladder, pcDNA3 Vektor,  SilverQuest™ Silver Staining Kit,  SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit,  TOPO® TA Cloning Kit Dual Promoter</p>
Merck, Darmstadt	Hemacolor Fixierlösung, Farbreagenz rot/blau
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter
Neuro Probe, Gaithersburg, USA	Polykarbonat-Membranen für Boydenkammer (Porengröße 8µm)
New England Biolabs, Ipswich, USA	Antarktische Phosphatase, NEB 10-beta Competent <i>E.coli</i> , NEBuffer für Restriktionsenzyme, Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase
OMNI Life Sciences GmbH & Co. KG, Bremen	CIM plate
PAA Laboratories GmbH, Pasching	Trypsin
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötale Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin (P/S)
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit

Promega, Heidelberg	Dual-Luciferase® Reporter Assay System pGL3-basic und pGL3-control Vektor, pRL-TK Vektor
Qiagen, Hilden	HiPerFect Transfection Reagent, HiSpeed™ Plasmid MIDI Kit, QIAamp DNA Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, siRNAs
Roche Diagnostics, Mannheim	<i>BM Blue POD Substrate</i> , dN6 Primer, Ethidiumbromid, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, LightCycler® Kapillaren, RNase A, T4 Polynukleotidkinase, Taq®-DNA Polymerase
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x denaturierend
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität, 5-Aza-2'-Desoxycytidin, Acrylamid 40% Lösung, Ampicillin (Amp), Bromphenolblau, bovines Serumalbumin (BSA), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate Buffered Saline (PBS), Oligonukleotide, SDS, TEMED, Tween-20
TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real time)

Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	Vectashield® Mounting Medium with DAPI
VWR, Darmstadt	96- <i>well</i> Platten für BCA-Messungen, E.Z.N.A. MicroElute Total RNA Kit (Omega Bio-tek), E.Z.N.A.® Total RNA Kit I (Omega Bio-tek), Kaiser's Glycerin Gelatine, Lab-Tek™ Chamber Slides
Whatman International Ltd., Maidstode, England	Whatman 3MM Filterpapier
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

### 3.1.2. Geräte

#### 3.1.2.1. Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetztenberg	Tischautoklav Modell 2540 EL Autoklav 2540 EK
-------------------------------	--

#### 3.1.2.2. Blotapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
------------------------------------	--------------------------------------

#### 3.1.2.3. Brutschränke

Heraeus, Hanau	Zellinkubatur CO <sub>2</sub> -Auto Zero, Begasungsbrutschrank BB6220, CO <sub>2</sub> Inkubator HeraCell 240
----------------	---

#### 3.1.2.4. Gelelektrophoreseapparaturen

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Wide Mini Sub® Cell GT
------------------------------------	------------------------

### **3.1.2.5. Heiz- und Kühlblöcke**

Eppendorf, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer comfort, Thermomixer compact
--------------------	--

### **3.1.2.6. Mikroskope**

Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim	DM IL Type 090-135.001
Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert 200, Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop

### **3.1.2.7. Spannungsgeräte**

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	PowerPac Basic, PowerPac HC
GE Healthcare Life Science, Freiburg	Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301

### **3.1.2.8. Sterilwerkbanken**

Heraeus, Hanau	LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18
----------------	------------------------------------

### **3.1.2.9. Thermocycler**

MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® II, LightCycler® 480

**3.1.2.10. Analysewaagen**

Sartorius, Göttingen R160P,  
L2200S

**3.1.2.11. Zentrifugen**

Eppendorf, Hamburg MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R  
Heraeus, Hanau Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0  
Kisker, Steinfurt Tischzentrifuge  
Roche Diagnostics, Mannheim LC Carousel Centrifuge

**3.1.2.12. Sonstige Geräte**

Amixa GmbH, Köln Nucleofector® I  
Bachhofer, Reutlingen UV-Transilluminator IL 350 K, 245nm  
BD Bioscience, San Jose, USA FACS Canto  
Berthold, München Lumat LB 9507,  
Centro LB 960 Microplate Luminometer  
BRAND GMBH + CO KG, Wertheim Neubauer *improved* Zählkammer  
Bühler, Edmund, Tübingen Schüttler SM25  
Heidolph, Kelheim Magnetrührer MR 2000,  
MR 2002, Vortexer REAX 2000  
IKA-Labortechnik, Staufen Schüttler IKA-Vibrax VXR  
MWG Biotech, Ebersberg ELISA-Reader Emax  
Roche Diagnostics, Mannheim xCelligence RTCA DP Instrument  
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Nanodrop®ND-1000-UV/Vis  
Spektralphotometer  
Savant, New York, USA Speedvac Concentrator SC 110  
WTW, Weilheim pH-Meter pH522

### 3.1.3. Bakterien

NEB 10-beta Competent *Escherichia coli* (High Efficiency): Stamm K12, DH10 $\beta$ <sup>TM</sup>-Derivat

### 3.1.4. Medien, Antibiotika und Puffer

#### 3.1.4.1. Medien zur Anzucht von *E. coli* und Säugerzelllinien

Lysogeny Broth Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl → in H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert → für Agarplatten: Zugabe von 15 g/l Agar → zur Selektion: Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	Zusätze: 10% FKS, 0,1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

#### 3.1.4.2. Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O (-20°C)
-------------------------------	--

### 3.1.5. Oligonukleotide

Alle humanen Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Aus den lyophilisierten Primern wurde mit ddH<sub>2</sub>O eine 100µM Stammlösung hergestellt. Diese wurde bei -20°C gelagert. Für (quantitative *real-time*) PCR Analysen wurden 20µM Lösungen des *forward* und des *reverse* Primers hergestellt. Die Oligonukleotide für EMSAs (AP-1, CREB und NFκB *Consensus Oligonucleotides*) wurden von Promega bezogen. Primer für PCR und qRT-PCR mit den jeweiligen *Annealing*- und

Messtemperaturen sind in Tabelle 1 aufgelistet. In Tabelle 2 wurden die Primer für *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Primer für PCR und qRT-PCR.

Gen	Primersequenzen ( <i>forward</i> <i>reverse</i> )	Annealing- / Mess- Temperatur [°C]
hβ-Aktin	5'-CTACGTGGCCCTGGACTTCGAGC-3' 5'-GATGGAGCCGCGATCCACACGG-3'	60 / 86
hCDH2	5'-TGGATGAAGATGGCATGG-3' 5'-AGGTGGCCACTGTGCTTAC-3'	60 / 81
hCDH2 Luc Mutagenese  (je 5'-[Phos])	5'-GCCTCTGATTACAAGGAGGAATAGTCT AGTC-3'  5'-CTATTATTTATTATTAGCAAGATTTGGCT G-3'	72
hCol1A1	5'-CGGCTCCTGCTCCTCTT-3' 5'-GGGGCAGTTCTTGGTCTC-3'	60 / 86
hCol12A1	5'-TGAGGCAGAAGTTGACCCAC-3' 5'-GTAGGCCCATCCGTTGTAGG-5'	60 / 77
hGREM2	5'-CGCTTCTCTTATGGGCGTCT-3' 5'-CCAGAACATCCTGCAATGACG-3'	60 / 84
hhnRNP K	5'-CAACCAGCCAGCTCCCGCTC-3' 5'-CCACCCCGACCAGGAGGCAT-3'	60 / 83
hsa-miR-188-5p (RT)	5'-CGCGCCTGCAGGTCGACAATTAACCCT CACTAAAGGGCCCCTCCUCCUTG-3'	-
hsa-miR-188-5p (PCR)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGA GCAUCCCUUGCA-3'	60 / 78
hITGA7	5'-GCTGTGGCTGCCCTCCATCCCTTC-3' 5'-CCCTCTAGGTTAAGGCACTTCCGGG-3'	60 / 84
hKIAA1199	5'-TCTCTGCCAGATACAGCCCT-3' 5'-AGGGCCCCAGATCCTATTGT-3'	60 / 88

hRobo3	5'-TACTGGCGCCGGAAACAGCG-3' 5'-GCCCATGGGTGGCCTGGAAC-3'	60 / 85
hRobo3A	5'-TGGAGGGGCTTACGGCTCCC-3' 5'-ATCCTCCCGCACAGTGGCCA-3'	60 / 88
hRobo3B	5'-ATTTCCCTGTCTGAACGCTCTGCGC-3' 5'-GGACACGGAAGGCTCCGGGT-3'	60 / 88
hU6 (RT)	5'-CGCGCCTGCAGGTCGACAATTAACCCT CACTAAAGGGCGTATATGTGCTGC-3'	-
hU6 (PCR)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGA GGTGCTCGCTTC-3'	60 / 78
hUnc5B	5'-TTCACGGGCGAGTCCTATTC-3' 5'-TCGGCTCCTCCACCAAGTAT-3'	60 / 87
hUnc5C	5'-ACATCAAGGCACAAGACAAG-3' 5'-TCTCCAACAACGACTGGGTC-3'	60 / 83

Tabelle 2: Primer für ELISA und EMSA.

Gen/ Verwendung	Primersequenzen
AP-1 <i>Consensus</i> <i>Oligonucleotide</i>	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' 5'-AAGGCCGACTGAGTAGTTCGC-3'
hCDH2 Variante A ELISA	5'-[Btñ]TATTCCTTCTTGTA-3' 5'-TTACAAGAAGGAATA-3'
hCDH2 Variante G ELISA	5'-[Btñ]TATTCCTCCTTGTA-3' 5'-TTACAAGGAGGAATA-3'
hCDH2 Variante A EMSA	5'-TTCCTTCTTGTA-3' 5'-TACAAGAAGGAA-3'
hCDH2 Variante G EMSA	5'-TTCCTCCTTGTA-3' 5'-TACAAGGAGGAA-3'
CREB <i>Consensus</i> <i>Oligonucleotide</i>	5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3' 5'-GATCGAGAGACTGCAGTCCGTTAGAGA-3'
NFκB <i>Consensus</i> <i>Oligonucleotide</i>	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' 5'-CGGACCCTTTCAGGGGAGTTGA-3'

### 3.1.6. Rekombinante Proteine, DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Antikörper

#### 3.1.6.1. Rekombinante Proteine

rekombinantes humanes (rh) IL-1 $\beta$  R&D Systems, Minneapolis, USA  
eingesetzte Konzentration: 10 ng/ml Bestellnummer: 201-LB

rekombinantes murines (rm) Slit3 R&D Systems, Minneapolis, USA  
eingesetzte Konzentration: 100 ng/ml Bestellnummer: Q9WVB4

#### 3.1.6.2. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

5-Aza-2'-Desoxycytidin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Eingesetzte Konzentration: 5  $\mu$ M Bestellnummer: A3653

#### 3.1.6.3. Primäre Antikörper

$\beta$  Aktin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Western Blot 1:4000 in 3% BSA-PBS Bestellnummer: A5441

$\beta$ -Catenin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Immunfluoreszenz 1:2000 in 1% BSA-PBS Bestellnummer: C2206

Novocastra ETS-1 Oncoprotein, Leica Biosystems, Wetzlar  
EMSA 6  $\mu$ l / Ansatz Bestellnummer: NCL-ETS-1  
ChIP 5  $\mu$ l / Ansatz

KIAA1199, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Western Blot 1:3000 in Bestellnummer: SAB2105467  
3% Milchpulver-TBS-T

hnRNP K, Acris Antibodies GmbH, Herford  
ELISA 1:500 in Inkubationspuffer (MIA Bestellnummer: AP12520PU-N  
ELISA, Roche)  
Western Blot 1:500 in  
5% Milchpulver-TBS-T

hnRNP K,  
EMSA 10 µl / Ansatz  
ChIP 1,5 µl / Ansatz

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Bestellnummer: R8903

N-Cadherin,  
Western Blot 1:500 in  
5% Milchpulver-TBS-T

Life technologies, Darmstadt (Zymed)  
Bestellnummer: 18-0224

Robo3B,  
Migration/GAG: 1:500  
FACS 1:50  
*Pull-down* 1:500 in TBS-T  
Western Blot 1:500 in  
5% Milchpulver-TBS-T

BioGenes GmbH, Berlin  
Antikörper aus Tier 21034, außer für FACS  
aus Tier 21035

#### **3.1.6.4. Sekundäre Antikörper**

anti-*goat* AP,  
Western Blot 1:30000 in TBS-T

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München  
Bestellnummer: A4187

anti-*mouse* AP,  
Western Blot 1:3000 in TBS-T

Cell Signaling Technology, Inc.,  
Danvers, MA, USA  
Bestellnummer: 7056S

anti-*rabbit* AP,  
Western Blot 1:4000 in TBS-T

Cell Signaling Technology, Inc.,  
Danvers, MA, USA  
Bestellnummer: 7054S

anti-*rabbit* FITC,  
Immunfluoreszenz 1:50

Dako, Hamburg  
Bestellnummer: F020502-2

anti-*rabbit* HRP,  
ELISA 1:1000 in ELISA-Puffer

Cell Signaling Technology, Inc.,  
Danvers, MA, USA  
Bestellnummer: 7074

### 3.1.7. MiR-Sonden, siRNA, miR und anti-miR Moleküle

Die verwendeten kommerziellen *small* RNAs wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Verwendete miR-Sonden, siRNAs, miRs und anti-miRs (Inhibitoren).

Firma	Name (Katalognummer)	Target-Sequenz (wenn bekannt)
Qiagen, Hilden	siRobo3 (SI02645223)	5'-GACGACAGATATTACAACGAA-3'
	sihnRNP K (SI00300468)	keine Herstellerangaben
	siCDH2 (SI02757335)	5'-CAGATCGATATATGCAGCAAA-3'
	hsa-miR-188-5p mimic (MSY0000457)	keine Herstellerangaben
Life technologies, Darmstadt (Ambion)	hsa-miR-188-5p Inhibitor (MH12963)	keine Herstellerangaben
Exiqon, Vedbaek, Dänemark	hsa-miR-188-5p (38531-01)	5'-DIG- CCCTCCACCATGCAAGGGATG-3'

### 3.1.8. Puffer und Lösungen

#### 3.1.8.1. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-3% (w/v) Agarose gelöst in 1x TAE
DNA-Gel-Ladepuffer	40% (v/v) Saccharose 0,25% (w/v) Xylencyanol 0,25% (w/v) Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	0,04% (w/v) in H <sub>2</sub> O

**3.1.8.2. Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)**

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung II	0,2 M NaOH 1% SDS
Lösung III	60 ml KOAc (5 M) 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H <sub>2</sub> O

**3.1.8.3. Lösungen für Western Blot**

Western Blot Transferpuffer	10% (v/v) Methanol 25 mM Tris 190 mM Glycin
PBS (10x)	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → einstellen auf pH 7,4 → für PBS-T: + 0,2 % (v/v) Tween20
TBS (10x)	100 mM Tris 150 mM NaCl → einstellen auf pH 7,5 → für TBS-T: + 0,2 % (v/v) Tween20
Blockingreagenz	5% Milchpulver-TBS-T (0,1%)

**3.1.8.4. Lösungen und Gele für die SDS-Gelelektrophorese**

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
---------------------	--

Trenngel (10%)	2,5 ml Acrylamid 40% 3,75 ml Tris pH 8,8 (1 M) 3,6 ml H <sub>2</sub> O 100 µl SDS (40%) 50 µl APS 10 µl TEMED
Sammelgel (4%)	375 µl Acrylamid 40% 450 µl Tris pH 6,8 (1 M) 2,85 ml H <sub>2</sub> O 37,5 µl SDS (40%) 25 µl APS 3,5 µl TEMED

### 3.1.8.5. Lösung zur Isolation von Gesamtprotein (RIPA-Puffer)

RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (w/v) Nonidet® P40 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1% (w/v) SDS Proteaseinhibitoren
-------------	--

### 3.1.8.6. Lösungen zur Isolation von Kernproteinen

Puffer 1	10 mM Hepes pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA
Puffer 2	1 mM EGTA 1 mM EDTA 0,4 M NaCl 20 mM Hepes



#### **3.1.9.4. pGL3-promoter**

Im pGL3-promoter Vektor ist dem Luciferase-Gen ein SV-40 Promotor vorgeschaltet. Mögliche regulierende Bereiche eines beliebigen Promotors können vor den SV-40 Promotor kloniert werden, wodurch die Regulation der Genexpression durch beispielsweise SNPs oder die Bindung von Transkriptionsfaktoren untersucht werden kann.

#### **3.1.9.5. pRL-TK**

Der pRL-TK Vektor (Promega) enthält das *Renilla* Luciferase-Gen aus *Renilla reniformis* hinter einem *herpes simplex virus thymidine kinase* (HSV-TK) Promotor. Dieser Promotor führt zu niedrigen bis moderaten *Levels* der *Renilla* Luciferase Konzentration und eignet sich somit als Kontroll-Reportervektor bei Co-transfizierten Säugerzelllinien.

#### **3.1.9.6. pGL2-AP-1, pGL2-CRE und pGL2-NFκB**

Die Vektoren pGL2-AP-1, pGL2-CRE und pGL2-NFκB wurden von der Firma Promega bezogen und ermöglichen die Messung der Promotoraktivität über optimale Bindestellen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren.

#### **3.1.9.7. TOP/FOPflash**

Der TOPflash-Vektor enthält TCF Bindestellen im Promotor vor einem Luciferase Gen. Mithilfe dieses Vektors kann der Einfluss von β-Catenin auf die Transkription untersucht werden. Als Kontrolle wurde der FOPflash-Vektor verwendet, in welchen die TCF Bindestellen mutiert sind und β-Catenin somit keinen Einfluss auf die Transkription haben sollte.

#### **3.1.9.8. Klionierte Vektoren**

Verschiedene Vektoren wurden durch Klonierung hergestellt (s. Tabelle 4). Im Fall von Umklonierungen aus dem Synthesevektor pMA-T wurde das Fragment von der Firma Geneart (Life technologies) synthetisiert, in den pMA-T Vektor subcloniert und dann über

die entsprechenden Schnittstellen in den Zielvektor eingebracht. Eine Übersicht der klonierten Vektoren ist in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4:** Übersicht über klonierte Vektoren.

Synthesevektor	Zielvektor	Fragment (Länge)	Enzyme zur Restriktion (NEB)	Name des klonierten Vektors
pMA-T	pcDNA3.1	Robo3A (4161 bp)	NheI, XhoI	pcDNA3.1-Robo3A
pMA-T	pcDNA3.1	Robo3B (4095 bp)	NheI, XhoI	pcDNA3.1-Robo3B
pMA-T	pGL3-promoter	rs11564299 (200 bp)	KpnI, NheI	pGL3-promoter-rs11564299_VarA

### 3.1.10. Zelllinien und primäre Zellen

HSE humane Zelllinie aus SV-40 immortalisierten rheumatoiden Synovialfibroblasten

K4Im humane Zelllinie aus SV-40 immortalisierten Synovialfibroblasten

501 Mel humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase

Die Zelllinien HSE und K4Im wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Aicher (Zentrum für Regenerationsbiologie und Regenerative Medizin (ZRM), Orthopädische Universitätsklinik, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

RASF/ OASF rheumatoide Synovialfibroblasten/Osteoarthritis Synovialfibroblasten, isoliert aus Synovialmembran direkt nach Knieoperationen und kultiviert von Passage 1 bis 12 (Passage 1-4 = frühe RASF, Passage 6-12 = späte RASF). Freundlicherweise wurden diese Zellen von Prof. Dr. Straub (Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Molekular- und mikrobiologische Arbeiten**

#### **3.2.1.1. RNA-Isolation aus Säugerzellen**

RNA wurde mithilfe des E.Z.N.A.® Total RNA Kit I oder bei kleiner Zellzahl mittels des E.Z.N.A. MicroElute Total RNA Kit (Omega Bio-tek, VWR) gewonnen. Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 40 µl bzw. 15 µl DEPC Wasser eluiert und nach Vermessen der Konzentration mit dem Nanodrop (Peqlab) bei -20°C für kurze Zeiträume gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Isolation von miR wurde das mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life technologies, Ambion) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Bestimmung der Konzentration am Nanodrop (Peqlab) wurde die miR bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (s. 3.2.1.3).

#### **3.2.1.2. DNA-Isolation aus Säugerzellen**

Zur Isolation von genomischer DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die genomische DNA wurde bis zur Verwendung in Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) bei 4°C gelagert (s. 3.2.1.4).

#### **3.2.1.3. Reverse Transkription**

Für die Transkription von mRNA in cDNA wurden pro Reaktion 500 ng RNA in folgendem Ansatz eingesetzt:

- 4 µl First Strand buffer (5x)
- 2 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl dN<sub>6</sub> Primer (2 mg/ml, Random Hexamer Primer)
- ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach Denaturierung der RNA bei 70°C für 5 min wurde 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (Life technologies, Invitrogen) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der Transkriptase für 10 min bei 70°C folgte ein RNA-Verdau

durch Zugabe von 1 µl RNase A und Inkubation für 20 min bei 37°C. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.2.1.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Vervielfältigung bestimmter DNA-Fragmente erfolgte durch eine PCR. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt:

- 1 µl cDNA/gDNA (s. 3.2.1.2 und 3.2.1.3)
- 0,5 µl Primer (*forward*)
- 0,5 µl Primer (*reverse*)
- 0,5 µl dNTPs
- 5 µl 10X Fast Start Puffer
- 42 µl ddH<sub>2</sub>O
- 0,5 µl Fast Start Taq

Es wurde pro Primerpaar zusätzlich eine Negativkontrolle mit ddH<sub>2</sub>O statt DNA pipettiert. Die verschiedenen Ansätze wurden im PCR-Cycler bei folgenden Temperaturen inkubiert:

Denaturierung	5 min bei 95°C
Amplifikation	30 s – 1 min bei 95°C
(40 Zyklen)	1 min bei X°C (s. Tabelle 1)
	1 min pro kb bei 72 °C
Finale Elongation	5 min bei 72°C

Das PCR-Produkt wurde über Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (s. 3.2.1.6).

#### 3.2.1.5. Quantitative *real-time* PCR

Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) erfolgte mithilfe des LightCycler® II Systems (Roche Diagnostics) bzw. des LightCycler® 480 Systems (Roche Diagnostics) zur Quantifizierung von mRNA oder micro RNA (miR). Nach Transkription (s. Reverse Transkription) der mRNA in cDNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 10 ng cDNA Template (s. 3.2.1.3)
- 0,5 µl *forward* Primer (20 µM)
- 0,5 µl *reverse* Primer (20 µM)
- 10 µl TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ (LightCycler® II) bzw.  
10 µl Light-Cycler® 480 SYBR Green I Master (LightCycler® 480)
- ad 20 µl dd H<sub>2</sub>O

Programm für LightCycler® II:

Denaturierung: 20°C/sec auf 95°C, 30 sec  
(1 Zyklus)

Amplifikation: 20°C/sec auf 95°C, 15 sec  
(40 Zyklen) 20°C/sec auf X°C, 5 sec (s. Tabelle 1)  
20°C/sec auf 72°C, 10 sec

Messtemperatur: 20°C/s auf X°C (s. Tabelle 1)

Schmelzpunktanalyse: 20°C/sec auf 95°C, 15 sec  
(1 Zyklus) 20°C/sec auf 65°C, 15 sec  
20°C/sec auf 95°C, 15 sec  
0,1°C/sec auf 40°C

Programm für LightCycler® 480:

Denaturierung: 4,4°C/sec auf 95°C, 10 min  
(1 Zyklus)

Amplifikation: 4,4°C/sec auf 95°C, 10 sec  
(45 Zyklen) 2,2°C/sec auf X°C, 10 sec (s. Tabelle 1)  
4,4°C/sec auf 72°C, 20 sec

Messtemperatur: 4,4°C/sec auf X°C, 1 sec (s. Tabelle 1)

Schmelzpunktanalyse: 4,4°C/sec auf 95°C, 5 sec  
(1 Zyklus) 2,2°C/sec auf 65°C, 60 sec  
0,11°C/sec auf 97°C  
2,2°C/sec auf 40°C, 30 sec

Als Referenzgen für RNA wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Für miRNA wurde U6 als Kontrolle eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der gerätspezifischen Software (Roche).

### **3.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden ihrer Größe nach über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Je nach Fragmentgröße wurden hierbei unterschiedliche Konzentrationen an Agarose verwendet. Je größer das DNA-Fragment, desto geringer die Agarose-Konzentration (<100 bp  $\rightarrow$  3% Agarose; bis >1 kb  $\rightarrow$  0,8% Agarose). Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und in einen Gelschlitten gegossen. Nach Auspolymerisieren des Gels wurden die DNA-Proben, versetzt mit 1/10 Volumen Probenpuffer, in die Taschen des Gels pipettiert und bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Zur Detektion der DNA wurde das Gel anschließend für 10 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Dabei interkaliert Ethidiumbromid in die DNA und fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht (245 nm) im sichtbaren Bereich.

### **3.2.1.7. DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau oder PCR erfolgte mithilfe des *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

### **3.2.1.8. Restriktion von DNA**

Eine Restriktion erfolgte mit spezifischen Enzymen zum Ausschneiden von Fragmenten aus Vektoren oder zum Erhalten von Überhängen an PCR-Produkten, über welche dann spezifisch kloniert werden konnte.

Restriktionsansatz: - 1  $\mu$ g Plasmid/PCR-Produkt  
- 1  $\mu$ l Enzym 1  
- 1  $\mu$ l Enzym 2  
(- 2  $\mu$ l 10 x BSA (New England Biolabs GmbH))  
- 2  $\mu$ l Restriktionspuffer (New England Biolabs GmbH)  
- ad 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O  
Inkubation für 3 h bei 37 °C

Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben für 20 min bei 65°C oder 90°C inaktiviert. Die Kontrolle und Aufreinigung der Plasmide erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.1.6 und 3.2.1.7).

### 3.2.1.9. Klonierung und Transformation

Tabelle 4 enthält eine Übersicht über die klonierten Vektoren mit den verwendeten Enzymen. Für Klonierungen wurden zuerst der Zielvektor und das gewünschte Fragment mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (s. 3.2.1.8). Nach Aufreinigung über ein 1% Agarosegel (s.3.2.1.7) wurden das Promotorfragment und der Zielvektor ligiert.

Ligationsansatz:

- 1 x Vektor
- 5 x Fragment
- 2 µl T4 Ligationspuffer (New England Biolabs GmbH)
- 1 µl T4 Ligase (New England Biolabs GmbH)
- ad 20 µl dH<sub>2</sub>O

Im Anschluss an die Inkubation bei 16°C über Nacht, erfolgte die Transformation in DH10β kompetente Bakterien. Dazu wurden 50 µl Bakterien mit 20 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert, worauf ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C folgte. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die transformierten Bakterien in 900 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C und 350 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgte die Vermehrung einzelner Kolonien in 5 ml LB-Medium mit Amp (Konzentration: 50 mg/ml). Nach Aufreinigung wurde mit entsprechenden Enzymen verdaut und positive Klone wurden weiter vermehrt.

### 3.2.1.10. Mutagenese

Nach Klonierung des Vektors pGL3-promoter-rs11564299\_VarA (Tabelle 4), erfolgte die Herstellung der Variante G von rs11564299 durch Mutagenese des Nukleotids an Position chr18:25760028 (A → G). Dazu wurden 5'-phosphorylierte Primer verwendet (Tabelle 2), wobei der *forward* Primer die Mutation enthielt. Mit diesen Primern wurde eine PCR mit einer *Phusion High-Fidelity* DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

---

Denaturierung	5 min bei 95°C
Amplifikation	1 min bei 95°C
(40 Zyklen)	1 min bei X°C (s. Tabelle 1)
	2,5 min bei 72 °C
Finale Elongation	5 min bei 72°C

Nach Ligation des PCR-Produkts mithilfe einer T4-Ligase (New England Biolabs GmbH) über Nacht bei 16°C erfolgte die Vervielfältigung des Plasmids in kompetenten Bakterien durch Transformation (s. Klonierung und Transformation). Nach Aufreinigung wurde der mutierte Vektor pGL3-promoter-rs11564299\_VarG mittels Sequenzierung durch die Firma Entelechon (Eurofins MWG Operon) überprüft.

#### **3.2.1.11. Plasmid-Isolation**

Zur Überprüfung von Klonierungen erfolgte die Aufreinigung geringer Mengen an Plasmiden wie folgt: 1 ml einer LB-Amp Kultur wurde 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in Lösung 1 (s. Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)) resuspendiert und maximal 5 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung 2 (s. Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)) und vorsichtiges Mischen. Im Anschluss wurden 150 µl Lösung 3 (s. Lösungen für die Isolation von Plasmiden (Mini-Präparation)) hinzu pipettiert, geschüttelt und 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 900 µl 100% EtOH für 10 min auf Eis gefällt. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Nach vollständigem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl H<sub>2</sub>O + RNase A gelöst und 20 min bei 37°C inkubiert.

Für die Aufreinigung größerer Mengen wurde die Plasmid-DNA aus 50 ml LB-Amp Kulturen mithilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Plasmid-DNA wurde bis zur Verwendung (s.3.2.3.2) bei 4°C oder -20°C gelagert.

### **3.2.1.12. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

Für die ChIP wurde das ChIP-IT® Express Enzymatic Shearing Kit (Active motif) nach Herstellerangaben verwendet. Die ChIP wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

- hnRNP K (Sigma-Aldrich): 1,5 µg
- ETS-1 (Leica Biosystems): 5 µl
- Polymerase II (Pol II, Active motif): 1,5 µg

Als Negativkontrolle wurde humanes IgG (Active motif) verwendet. Die isolierte chromosomale DNA wurde bei -20°C gelagert. Zur Quantifizierung des isolierten Chromatins erfolgte mithilfe von qRT-PCR im LightCycler® II System und Auftrennung über ein Agarosegel (s.3.2.1.5 und 3.2.1.6).

## **3.2.2. Protein-Biochemische Arbeiten**

### **3.2.2.1. Proteinisolation**

Pellets von primären Zellen und Zelllinien wurden in 70-200 µl RIPA-Puffer (je nach Zellmenge) für 15 min bei 4°C schüttelnd inkubiert und so homogenisiert. Nicht lösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min entfernt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mithilfe des BCA Protein Assay Kit (s. 3.2.2.3). Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

### **3.2.2.2. Isolation von Kernproteinen**

Zellen wurden von T75 Zellkulturflaschen abgelöst, wenn diese zu ~90% konfluent bewachsen waren und bei 3.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer 1 (s. Lösungen zur Isolation von Kernproteinen) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl 10% NP-40 wurde 1 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Puffer 2 (s. Lösungen zur Isolation von Kernproteinen) resuspendiert. Auf die schüttelnde Inkubation für 15 min bei 4°C folgte die Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde zu je 10 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mithilfe des BCA Protein Assay Kit (s. 3.2.2.3). Die Kernproteine wurden dann bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.2.2.3. Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlysaten erfolgte mithilfe des BCA Protein Assay Kit (Pierce/Peribo Science) nach Herstellerangaben. Durch Reduktion von  $\text{Cu}_{2+}$  zu  $\text{Cu}_+$  kommt es zu einer Farbreaktion mit Bicinchonsäure (BCA), wobei ein violetter Komplex gebildet wird. Durch photometrische Messung bei 562 nm kann dieser Farbwechsel in einem ELISA-Reader (MWG Biotech) quantifiziert werden. Durch Verwendung eines parallel angesetzten Standards wurde so die Proteinkonzentration bestimmt.

### **3.2.2.4. Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC/MS)**

Unbekannte Proteine wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Oefner (Institut für Funktionelle Genomik, Universität Regensburg) mittels LC/MS nach Shevchenko et al. identifiziert [138].

### **3.2.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte bei  $0,8 \text{ mA/cm}_2$  über 7,5 – 10% Polyacrylamidgele (s.3.1.8.4). Dazu wurden 15 – 40  $\mu\text{g}$  Protein mit 4x denaturierendem Ladepuffer für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend über das SDS-PAGE-Gel aufgetrennt.

### **3.2.2.6. Western Blot**

Western Blots dienen zum Nachweis der Proteinexpression. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE (s.3.2.2.5) erfolgte das Blotten auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad) für 45 min bei 15 V. Die Membran wurde anschließend in entsprechender Blockierlösung (s. 3.1.6.2) für 1 h bei RT blockiert und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit dem primären Antikörper (s. 3.1.6.2) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit Puffer gewaschen und 1 h mit dem entsprechenden sekundären (s. 3.1.6.4), Alkaline Phosphatase (AP)–konjugierten Antikörper inkubiert. Darauf folgte die Entwicklung des Blots mit BCIP/NBT (Zymed) bis klare Banden zu sehen waren.

### 3.2.2.7. *Electrophoretic mobility shift assay*

Der durchgeführte *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) beruht auf der Bindung von hnRNP K oder ETS-1 an <sup>32</sup>P-gelabelte Oligonukleotide, die den SNP rs1156429 enthalten. Dazu wurden zwei doppelsträngige Oligomere generiert, die entweder Variante A (5'-TACAAGAAGGAA-3') oder Variante G (5'-TACAAGGAGGAA-3') enthalten. Außerdem erfolgten EMSAs mit AP-1-, CRE- oder NFκB-Sonden (Promega), um die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren in den jeweiligen Zelllinien zu ermitteln. Die ds-Oligonukleotide wurden mittels einer T4 Polynukleotidkinase (Roche Diagnostics) und [<sup>32</sup>P]ATP[γP] (Amersham, GE Healthcare) am 3'-Ende radioaktiv markiert. Eine Bindung der Sonden an Kernproteine wurde durch Inkubation von Kernproteinen in 5 x *mobility shift* Puffer (1 µg of poly(dI-dC)(dI-dC), 40% Glycerin, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 25 mM DTT, 250 mM KCl, 25 mM Hepes/KOH, pH 7.9) mit der DNA-Sonde für 10 min vor der Auftrennung über ein 6% nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel ermöglicht. Für Verdrängungsexperimente wurden nicht markierte Oligonukleotide in 400 x molarem Überschuss 10 min bei Raumtemperatur mit den Kernproteinen bzw. rekombinantem hnRNP K inkubiert, bevor die radioaktiv-markierten Sonden zugegeben wurden. *Supershifts* wurden durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen hnRNP K (Sigma) oder ETS-1 (Sigma) für 10 min vor Zugabe der radioaktiv-markierten Sonden erzeugt. Die DNA-Protein-Komplexe wurden dann über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel bei 250 V, 50 mA und 100 W für 1,5 h aufgetrennt. Zur Detektion wurde das Gel bei 75°C für 1 h 45 min im Vakuum getrocknet und anschließend mit einem Röntgenfilm für ein bis 14 Tage bei -80°C inkubiert und schließlich entwickelt.

### 3.2.2.8. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Für die quantitative Messung der Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion von *CDH2* wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) etabliert. Hierfür wurden komplementäre DNA-Oligonukleotide generiert, die entweder die seltene (B-5'-TATTCCTTCTTGTA-3' und 5'-TTACAAGAAGGAATA-3') oder die häufige Variante (B-5'-TATTCCTCCTTGTA-3' und 5'-TTACAAGGAGGAATA-3') des SNPs in der Mitte enthielten (s. Tabelle 2). Die *forward* Sequenz enthielt jeweils ein Biotin am 5'-Ende. Durch Erhitzen für 5 min bei 95 °C und Auskühlen über Nacht im Heizblock erfolgte das *Annealing* der DNA-Oligonukleotide. Die dsDNA-Oligonukleotide wurden anschließend an Streptavidinplatten gekoppelt. Dazu wurden 10 µl der dsDNA-Oligonukleotide in 100 µl Inkubations-Puffer (MIA ELISA, Roche applied science) pro *well*

für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimal Waschen mit 250 µl Inkubations-Puffer wurden mit 250 µl Inkubations-Puffer 1 h bei RT blockiert. Darauf folgte die Inkubation der Kernproteine (s. 3.2.2.2), 6 µg pro *well*, in 150 µl Inkubations-Puffer für 1 h bei RT. Nach dreimal Waschen mit Inkubations-Puffer wurden die *wells* mit dem jeweiligen Antikörper für 1 h bei RT inkubiert, entweder ETS-1 (1:500 in Inkubations-Puffer) oder hnRNP K (1:500 in Inkubations-Puffer). Nach dreimal Waschen mit Inkubations-Puffer folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-*mouse* HRP (Cellsignaling) oder anti-*rabbit* HRP (Cellsignaling) 1:1000 in Inkubations-Puffer) für 30 min bei RT. Nach dreimal Waschen mit Inkubations-Puffer wurde mit 250 µl ABTS Lösung 20-30 min entwickelt und im ELISA-Reader (MWG Biotech) quantifiziert.

### 3.2.2.9. *Pull-down Assay*

Je 50 µl Streptavidin-*Beads* (GE Healthcare Europe GmbH) wurden dreimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der *Beads* über Nacht mit 5'-biotinylierten Oligonukleotiden (s. Tabelle 2) in 200 µl PBS bei 4°C im 360°-Schüttler. Zeitgleich wurden 25 µg Kernproteine (s.3.2.2.2) in 200 µl PBS mit 50 µl gewaschenen Streptavidin-*Beads* über Nacht im 360°-Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min bei 2000 rpm) wurde der Überstand zu den wieder dreimal mit 1 ml PBS gewaschenen Oligonukleotid-gekoppelten Streptavidin-*Beads* gegeben und 4 h im 360° Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach dreimal Waschen mit 1 ml PBS erfolgte die Auftrennung der Proteine über ein 10% Polyacrylamidgel (s. 3.2.2.5) und die Färbung mithilfe des *SilverQuest™ Silver Staining Kits* (Life Technologies). Differentielle Banden wurden ausgeschnitten und per LC/MS freundlicherweise von Prof. Dr. Oefner (Institut für Funktionelle Genomik, Universität Regensburg) analysiert (s. 3.2.2.4).

### 3.2.2.10. *In situ* Hybridisierung

Mittels *in situ* Hybridisierung (ISH) wurden die Expression und zelluläre Verteilung von hsa-miR-188-5p in Synovium-Gewebeschnitten über DIG-gelaberte Sonden sichtbar gemacht. Verwendet wurde dazu das *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit (FFPE)*, das mit folgenden Änderungen nach Herstellerangaben verwendet wurde: die Färbereaktion wurde, statt mit der vorgeschlagenen Methode, mithilfe eines anderen Reagens durchgeführt. Auf Schritt 11 des Hersteller-Protokolls, dreimal Waschen mit PBS, folgte zweimal Waschen mit NBT-Puffer. Als AP-Substrat wurde *BM Blue POD*

*Substrate* (Roche) verwendet. Dieses wurde 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 2 mM Levamisol versetzt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm wurde je 1 ml des Überstands gleichmäßig auf den Gewebeschnitten verteilt und für 2 h bei 30°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit zweimal Waschen mit KTBT-Puffer gestoppt. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Präparate mit Glycerin Gelatine eingedeckelt und am Lichtmikroskop ausgewertet.

### **3.2.3. Zell-basierte Arbeiten**

#### **3.2.3.1. Zellkultur**

Primäre Zellen und Zelllinien (s. 3.1.10. Zelllinien und primäre Zellen) wurden in DMEM (Sigma-Aldrich) mit 10% FKS und P/S (PAN) in T75-Zellkulturflaschen (Corning Incorporated) kultiviert. Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dies erfolgte durch Abnahme des Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml PBS (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-PBS (Sigma-Aldrich) vom Flaschenboden abgelöst und mit 9 ml DMEM + 10% FKS + P/S aus der Flasche in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 1.200 rpm wurden die Zellen in DMEM + 10% FKS + P/S resuspendiert und verdünnt in T75-Zellkulturflaschen ausgesät. Die primären Zellen (RASf und OASf) wurden bis Passage 10 kultiviert (Passage 1-4 = frühe Passage; Passage 6-10 = späte Passage). Die Inkubation der Zellen erfolgte in feuchter Umgebung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Zum Aussäen einer definierten Zellzahl wurden die Zellen nach der Resuspendierung mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Brand) gezählt und auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Behandlung mit rhIL-1β erfolgte für 48 h, mit erneuter Zugabe von rhIL-1β nach 24 h. Zur Untersuchung der Promotormethylierung wurden die Zellen für 48 h mit 5 μM 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Sigma-Aldrich) behandelt. Die Zellen wurden in verschiedenen Assays eingesetzt.

#### **3.2.3.2. Transfektion**

Für siRNA/miR Transfektionen wurden 100.000 Zellen pro 6-*well* in 2 ml DMEM mit 10% FKS und P/S ausgesät und Lipofectamin RNAiMAX (Life technologies) als Reagens verwendet (s 3.2.3.1). Folgende Ansätze wurden hergestellt und sofort im Verhältnis 1:1 gemischt:

- 90 pmol siRNA oder miRNA in 150 µl DMEM ohne Phenolrot + P/S
- 9 µl Lipofectamin RNAiMAX in 150 µl DMEM ohne Phenolrot + P/S

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT und die Transfektion der Zellen mit 250 µl des Gemisches. Die Zellen wurden je nach siRNA/miR für 24 h bis sieben Tage inkubiert. Bei Inkubation über 72 h wurden die Zellen alle 48 – 72 h nachtransfiziert.

Um Zellen mit Expressions- oder Reporter-genvektoren zu transfizieren, wurde Lipofectamin LTX (Life technologies) verwendet. Dazu wurden folgende Komponenten für zwei 6-wells gemischt und für 10 min bei RT inkubiert:

- Ansatz 1:
- 1 µg Plasmid
  - ad 34 µl DMEM ohne Phenolrot + P/S
  - 6 µl Lipofectamin Plus

- Ansatz 2:
- 5 µl Lipofectamin LTX
  - 35 µl DMEM ohne Phenolrot + P/S

Anschließend wurden Ansatz 1 und Ansatz 2 vermischt, für 30 min bei RT inkubiert und je 40 µl in 2 ml DMEM + 10% FKS + P/S in jedes 6-well gegeben. Die Zellen wurden je nach Plasmid für 24–72 h im Brutschrank inkubiert. Darauf folgten funktionelle Assays (s. beispielsweise Boyden-Kammer und Real-time cell analysis (RTCA)) oder RNA-/Proteinisolation (s. 3.2.1.1).

### 3.2.3.3. Reporter-gen-Assay

Für einen Reporter-gen-Assay wurden, abhängig von den verwendeten Zellen,  $1 \times 10^5$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Reporter-gen-Vektoren (s. 3.1.8.7) mithilfe von Lipofectamin LTX (Life Technologies, Invitrogen) transfiziert. Zur Normalisierung wurden die Zellen zusätzlich mit 0,2 µg pRL-TK Plasmid (Promega) transfiziert. Die Behandlung mit Slit3 erfolgte 4 h nach Transfektion der Zellen mit dem Reporter-gen-Konstrukt für 20 h. Nach 24 bis 48 h erfolgte die Lyse der Zellen. Die Luciferase- und Renilla-Aktivität wurden in einem Assay (Dual-Luciferase Reporter Assay; Promega) mit einem Luminometer (Berthold) gemessen.

#### **3.2.3.4. Migrations-Assay (Boyden-Kammer)**

Boyden-Kammer-Assays sind die klassische Methode zur Untersuchung des migratorischen Potentials von Zellen. Dazu wurden vor Versuchsbeginn Gelatinefilter hergestellt. Dafür wurden Polykarbonat-Filter (Porengröße 8 µm, Neuro Probe) für 20 min in 0,5% Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, abfiltriert und zweimal mit dd H<sub>2</sub>O gespült. Schließlich wurden die Polykarbonat-Filter 1 h in 5 mg/ml Gelatine gekocht, erneut filtriert und 1 h bei 100°C getrocknet.

24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen gesplittet, um möglichst aktive Zellen zu erhalten (s. 3.2.3.1). Am Versuchstag erfolgte der Zusammenbau der unteren und oberen Kammer der Boyden-Kammer. Dazu wurden 210 µl Fibroblasten-konditioniertes Medium (FKM) in die untere Kammer pipettiert, ein Gelatinefilter luftblasenfrei darauf gelegt und anschließend die obere Kammer darauf geschraubt. Im nächsten Schritt wurde die Zellzahl auf 60.000 Zellen pro ml in DMEM ohne FKS eingestellt und gegebenenfalls mit rmSlit3 (100 ng/ml, R&D Systems) oder α-Robo3B (1:500, BioGenes) behandelt. Von dieser Zellsuspension wurden 800 µl in die obere Kammer gegeben und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Färbung der Filter erfolgte mit der Hemacolor® Schnellfärbung (Merck). Dazu wurde je 1 min in jeder Lösung inkubiert, in H<sub>2</sub>O gewaschen und die Filter mit den Zellen nach oben auf Objektträgern getrocknet. Die migrierten Zellen wurden am Lichtmikroskop gezählt. Dies erfolgte in fünf Gesichtsfeldern, aus welchen schließlich der Mittelwert gebildet wurde.

#### **3.2.3.5. Migrations-Assay (Real-time cell analysis (RTCA))**

Die Bestimmung des migratorischen Potentials von Zellen erfolgte alternativ zur Boyden-Kammer auch mittels CIM-Platten (OMNI Life Sciences) im xCELLigence System von Roche Diagnostics. CIM Platten bestehen aus einer oberen und einer unteren Kammer, welche durch eine Membran (Porengröße 8 µm) getrennt sind. In diesem System wird über Goldelektroden an der Unterseite der Membran die Impedanz gemessen, die sich verändert, wenn Zellen an der Membranunterseite adhären. Dazu wurde in die unteren Kammern der CIM-Platte 160 µl Fibroblasten-konditioniertes Medium (FKM) pipettiert und nach Schließen der CIM-Platte in die oberen Kammern 25 µl DMEM mit P/S und ohne FKS gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C im Brutschrank. Währenddessen wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen pro ml eingestellt. Nach erfolgter Hintergrund-Messung der Impedanz in zellfreien Kammern wurden 20.000 Zellen in 100 µl in jede Kammer

gegeben und je nach Experiment mit rmSlit3 (100 ng/ml, R&D Systems) oder  $\alpha$ -Robo3B (1:500, BioGenes) behandelt. Nach Inkubation bei RT für 30 min erfolgten die Messungen im xCELLigence System.

Programm: - 50 Messungen alle 5 min  
- 100 Messungen alle 15 min  
- 100 Messungen alle 60 min

Über Änderungen der Impedanz wurden so in Echtzeit Unterschiede im migratorischen Verhalten der Zellen gemessen und über den Zellindex (CI), einen dimensionslosen Parameter, aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der Gerät-spezifischen RTCA Software (Roche).

### **3.2.3.6. Immunfluoreszenz**

Um die zelluläre Verteilung von Proteinen in Zellen sichtbar zu machen, wurden Immunfluoreszenz-Assays ausgeführt. Dazu wurden Zellen auf „Lab Teks“ (Chamber cover slides) ausgesät. Nach Inkubation für 24 h im Brutschrank wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und mit -20°C kaltem Aceton für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung der unspezifischen Proteine für eine Stunde in der feuchten Kammer durch Zugabe von 1% BSA/PBS. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem primären AK (s. 3.1.6.3) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (FITC-anti-rabbit 1:40, s. 3.1.6.4) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit *VectaShield Slide Mounting Medium* eingedeckelt. Durch die darin enthaltene DAPI Lösung wurden die Zellkerne angefärbt. Die Analyse der Fluoreszenzfärbung (Wellenlänge des Exzitationsmaximums: 495nm, Emissionsmaximum: 528nm) erfolgte am Axio Imager Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop (Axiovision, Carl Zeiss, Oberkochen).

### **3.2.3.7. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software (GraphPad software, Inc., San Diego, USA). Alle Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw.

prozentualer Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's paired t-test oder One-way ANOVA durchgeführt (p-value:  $< 0,001 = ***$ ;  $0.001$  to  $0.01 = **$ ;  $0.01$  to  $0.05 = *$ ;  $>0.05 = ns$ ).

## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in drei Teilprojekte gliedern. Im ersten Teil (4.1) wurde die Expression verschiedener Robo3 Transkriptvarianten in RASF untersucht. Da eine dieser Varianten in der Lage ist, den Liganden Slit3 zu binden, wurde zudem analysiert, welche Transkriptionsfaktoren die Effekte der Ligandenbindung vermitteln. Der zweite Teil (4.2) beschäftigt sich mit der Untersuchung von fehlregulierten miRs in RASF, die potentiell Robo3 und weitere Repellent-Rezeptoren binden können sowie der Identifikation weiterer Zielgene. Der dritte Teil (4.3) beschäftigt sich mit der Regulation der N-Cadherin Expression in OASF, einem Robo3-bindenden Molekül. Dabei wurde zum Einen untersucht, welchen Einfluss von SNPs im *CDH2* Promotor auf die Expression N-Cadherin besitzen. Zum Anderen wurde die Auswirkung dieser SNPs für die Erkrankung analysiert.

### 4.1. Robo3 Expressionsregulation und Signaltransduktion nach Ligandenbindung

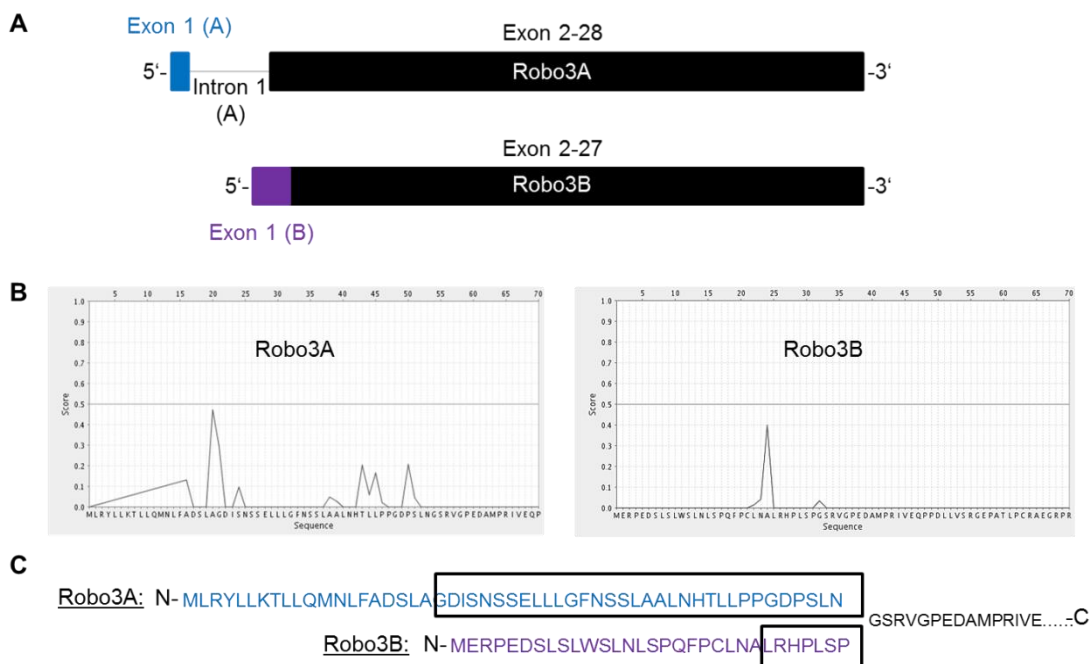
In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Expression von verschiedenen Rezeptoren für Repellentfaktoren wie Robo3, *unc-5 homolog B* (Unc5B) und Unc5C in RASF untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Rezeptoren stärker in RASF in frühen Passagen als in RASF in späten Passagen oder nSF exprimiert werden. Dies wiederum führt zu einer höheren Aggressivität der Zellen, die sich durch vermehrte Migration und verstärkten Abbau von Knorpel zeigt [28,29].

#### 4.1.1. Expression der verschiedenen Robo3 Varianten in RASF

In der Literatur sind verschiedene Robo3 Transkriptvarianten beschrieben, wobei nur Robo3A und Robo3B für das *full-length* Protein kodieren. Von diesen Varianten ist nur Robo3B in der Lage, Slit zu binden [48]. Es ist außerdem bereits bekannt, dass RASF durch die Behandlung mit Slit3 in der Migration inhibiert werden [28]. Jedoch ist bisher unbekannt, welcher der Robo3 Varianten in RASF exprimiert wird. Ziel dieses Teilprojekts war es, die in RASF exprimierte Transkriptvariante von Robo3 zu identifizieren.

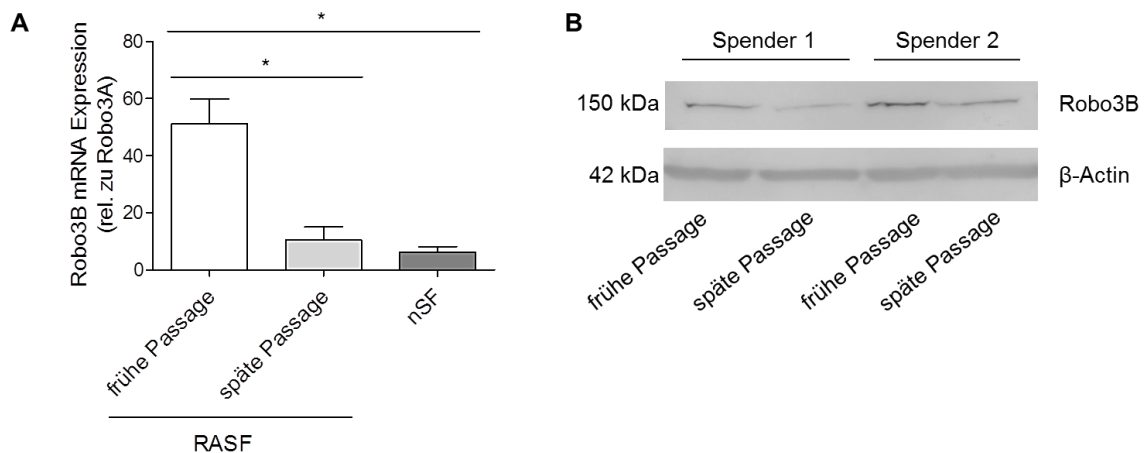
Eine Datenbankanalyse zeigte, dass Robo3A und Robo3B annähernd die gleiche Länge haben, weshalb eine Unterscheidung aufgrund der Größe mittels Western Blot nicht

möglich war. Robo3A besteht aus 1.386 Aminosäuren, Robo3B weist eine Länge von 1.364 Aminosäuren auf (ENSEMBL) [139]. In Abbildung 8A sind beide Varianten schematisch dargestellt. Robo3A und Robo3B unterscheiden sich nur am 5'-Ende voneinander, wobei Robo3B die kürzere Variante ist und ein alternatives Exon 1 im Vergleich zu Robo3A besitzt [48]. Dabei liegt der Robo3B Translationsstart in Intron 1 von Robo3A, wodurch Exon 1 von Robo3B ab Aminosäure 32 identisch mit Exon 2 von Robo3A ist. Ab dieser Stelle sind beide Isoformen identisch. Zur Unterscheidung der beiden Varianten bleiben insgesamt folglich nur die Aminosäuren der beiden ersten Exons. Nach Abspaltung des Signalpeptids bleiben bei Robo3A 33 Aminosäuren, die nur in Robo3A vorkommen. Robo3B besitzt 31 spezifische Aminosäuren, von welchen die ersten 24 Aminosäuren unter Verwendung der PrediSi Software ([www.predisi.de](http://www.predisi.de)) als Signalpeptid vorhergesagt werden und bei der Prozessierung abgespalten werden (Abbildung 8B und C). Robo3B besitzt somit im Vergleich zu Robo3A sieben spezifische Aminosäuren (Abbildung 8C).



**Abbildung 8:** **A** mRNA-Sequenzunterschiede zwischen Robo3A und Robo3B. Die beiden Transkriptvarianten haben jeweils ein alternatives Exon 1, wobei Exon 1 von Robo3B in Intron 1 von Robo3A beginnt und Robo3 B dadurch um ein Exon kürzer ist als Robo3A. **B** Signalpeptidvorhersage mit der PrediSi Software ([www.predisi.de](http://www.predisi.de)). Für Robo3A werden die ersten 20 Aminosäuren als Signalpeptid vorhergesagt. Im Fall von Robo3B ergibt sich keine eindeutige Signalpeptidsequenz, die Software zeigt aber eine mögliche Schnittstelle bei Aminosäure 24 an. **C** N-terminale Sequenzen von Robo3A und Robo3B im Vergleich. Die schwarzen Boxen markieren die spezifischen Bereiche von Robo3A und Robo3B nach Abspaltung des vorhergesagten Signalpeptids.

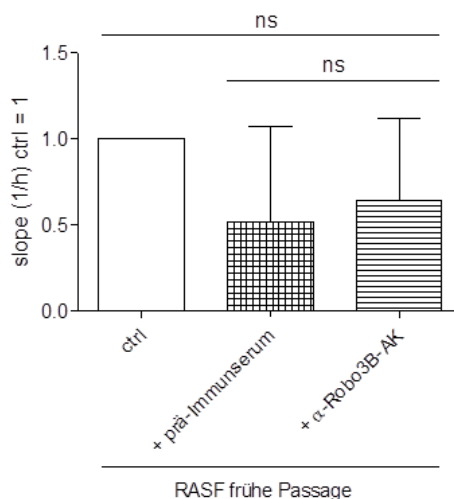
Um zu untersuchen, welche Robo3 Variante in RASF exprimiert wird, wurde die Expression von Robo3A und Robo3B auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR bestimmt (s. 3.2.1.5). Dazu wurden Primer *designed*, die spezifisch für die jeweilige Variante waren. Im Fall von Robo3B bindet der *forward* Primer spezifisch im ersten Exon von Robo3B. Der *reverse* Primer bindet hingegen in Exon 2, welches bei beiden Transkriptvarianten identisch ist. Für Robo3A ließ sich eine solche Kombination nicht etablieren, weshalb hier der *forward* und der *reverse* Primer in Exon 1 von Robo3A binden. Es zeigte sich, dass Robo3B relativ zu Robo3A in RASF in größerer Menge nachweisbar war und die Expression von Robo3B über den Passagenverlauf dem Verlauf der Gesamtexpression von Robo3 in RASF entspricht (Abbildung 9A). Robo3B wird somit in RASF in früher Passage signifikant stärker exprimiert als in RASF in später Passage (Abbildung 9A). Die Bestätigung der Robo3B Expression auf Proteinebene erfolgte durch Western Blots (s. 3.2.2.6). Da keine kommerziellen Robo3B-spezifischen Antikörper erhältlich waren, wurde hierzu ein spezifischer Antikörper generiert und durch die Firma BioGenes in Kaninchen produziert (s. 3.1.6.2). Da nach Abspaltung der vorhergesagten Signalsequenz nur sieben Aminosäuren (Aminosäure 25-31) zur Unterscheidung von Robo3A und Robo3B in Frage kamen, war nicht klar, ob diese Peptidgröße ausreichen würde, um einen spezifischen Antikörper zu gewinnen. Deshalb wurde ein Peptid aus den Aminosäuren 18-31 für die Antikörpersynthese ausgewählt (Abbildung 8C).



**Abbildung 9: A** mRNA Expression von Robo3B relativ zu Robo3A über den Passagenverlauf. Robo3B wird stärker in RASF in frühen Passagen exprimiert als in RASF in späten Passagen oder nSF, während Robo3A von allen SF nur gering exprimiert wird. (RASF: n=3, nSF: n=2) **B** Im Western Blot mit spezifischen Robo3B-Antikörpern konnte eine stärkere Proteinexpression von Robo3B in RASF in frühen Passagen im Vergleich mit RASF in späten Passagen gezeigt werden.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (n=2)

Im Western Blot (s. 3.2.2.6) mit RASF Proteinlysaten lieferte der Robo3B Antikörper ( $\alpha$ -Robo3B-AK) spezifische Banden. Robo3B wird auch auf Proteinebene in RASF in früher Passage stärker exprimiert als in RASF in später Passage. (Abbildung 9B). Der  $\alpha$ -Robo3B-AK wurde auch für Immunfluoreszenz- und immunhistochemische Färbungen getestet, wies in diesen Assays allerdings starke Hintergrundfärbungen auf, die durch verschiedene Verdünnungen des Antikörpers oder mittels unterschiedlicher *Blocking*-Reagenzien nicht zu beseitigen waren. Bei FACS-Analysen zur Bestimmung der Menge an exprimiertem Robo3B Rezeptor war kein Unterschied zur Kontrolle mit prä-Immunsereum messbar. Für diese drei Analysetechniken lieferte der  $\alpha$ -Robo3B-AK somit keine spezifischen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

In Migrations-Assays mittels RTCA (s. 3.2.3.5) wurde des Weiteren getestet, ob der  $\alpha$ -Robo3B-AK auch als inhibierender Antikörper gegen aggressive RASF wirken kann. Dabei zeigte sich, dass der  $\alpha$ -Robo3B-AK weder aktivierende noch inhibierende Wirkung auf das migratorische Verhalten der RASF besitzt. Die Experimente zeigten vielmehr, dass schon die Behandlung mit prä-Immunsereum zu einer Inhibition der Migration von RASF in frühen Passagen führt und der Effekt nach  $\alpha$ -Robo3B-AK Behandlung kein spezifischer Effekt des Antikörpers ist (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Migrations-Assays im RTCA System zeigten keine signifikanten Effekte auf das Migrationsverhalten von RASF nach  $\alpha$ -Robo3B-AK Behandlung. Außerdem zeigte bereits die Behandlung mit prä-Immunsereum hemmende Effekte, wodurch die vorhandene Tendenz in Richtung geringerer Migrationsfähigkeit nach  $\alpha$ -Robo3B-AK möglicherweise nicht auf den AK, sondern auf das Serum zurückzuführen war. (n=2)

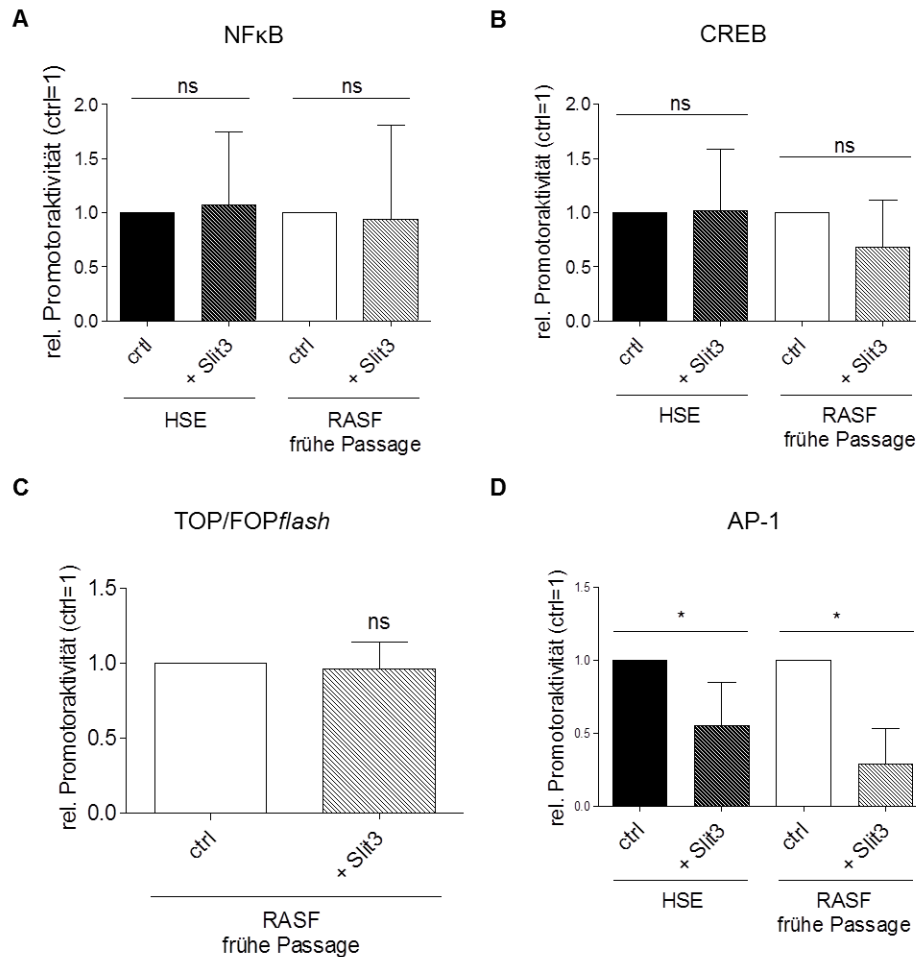
In diesem Teil der Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass Robo3B in RASF exprimiert wird, während Robo3A fast nicht nachweisbar ist. Robo3B wird zudem stärker in RASF in frühen Passagen exprimiert als in RASF in späten Passagen oder nSF, was mit der von Denk et al. publizierten Gesamtexpression von Robo3 vergleichbar ist [28]. Der generierte spezifische  $\alpha$ -Robo3B-AK kann zum Proteinnachweis im Western Blot verwendet werden und bestätigt die Robo3B Expression auf Proteinebene. In FACS-, Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Analysen konnte keine Spezifität des Antikörpers nachgewiesen werden. In funktionellen Assays zeigte der  $\alpha$ -Robo3B-AK weder aktivierende noch inhibierende Aktivität.

#### 4.1.2. Signaltransduktion nach Slit3 Bindung an Robo3B

Neben der erhöhten Expression von Robo3 in RASF in frühen Passagen, konnten Denk et al. zudem zeigen, dass die aggressiven Zellen in ihrer Fähigkeit zu migrieren und Knorpel abzubauen durch die Behandlung mit Slit3 inhibiert werden können [28]. Nachdem in Abschnitt 4.1.1 gezeigt wurde, dass tatsächlich die Slit-bindende Robo3B Transkriptvariante in RASF in frühen Passagen exprimiert wird, stellte sich die Frage der Weiterleitung des Signals nach Liganden-Bindung an den Rezeptor. In diesem Projektteil wurde deswegen die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren untersucht, die möglicherweise Rückschlüsse auf Signaltransduktionswege zulassen. Die untersuchten Transkriptionsfaktoren, AP-1, CREB, NF $\kappa$ B und  $\beta$ -Catenin wurden aufgrund ihrer bereits beschriebenen Funktionen in RA oder ihrer veränderten Aktivität im entzündlichen Milieu ausgewählt (s. 1.2.4) [62,70,71].

Mittels Reporter-gen-Assays (s. 3.2.3.3) wurde die Aktivität eines Promotors mit Bindestellen für entweder NF $\kappa$ B, CREB, TCF oder AP-1 über ein nachgeschaltetes Luciferase-Gen in HSE und RASF quantitativ bestimmt. HSE sind SV-40-immortalisierte RASF, die hier als Modellzelllinie dienen. Die Behandlung mit Slit3 zeigte keinen eindeutigen Einfluss auf die Regulation der Promotoraktivität durch NF $\kappa$ B (Abbildung 11A) und CREB (Abbildung 11B). Um die potentiellen Effekte von Slit3 auf  $\beta$ -Catenin in RASF in frühen Passagen zu untersuchen, wurden Reporter-gen-Assays mit TOP/FOPflash-Vektoren durchgeführt. Der TOPflash-Vektor enthält Bindestellen für Lef-TCF. Im FOPflash-Vektor sind diese Bindestellen mutiert, sodass Lef-TCF nicht mehr binden kann. Stabilisiertes  $\beta$ -Catenin transloziert in den Kern und bindet an Lef-TCF (s. 1.2.4.1). Lef-TCF wiederum kann nur im Komplex mit  $\beta$ -Catenin an die Bindestellen im Promotor binden und somit die Transkription des nachgeschalteten Luciferase-Gens beeinflussen

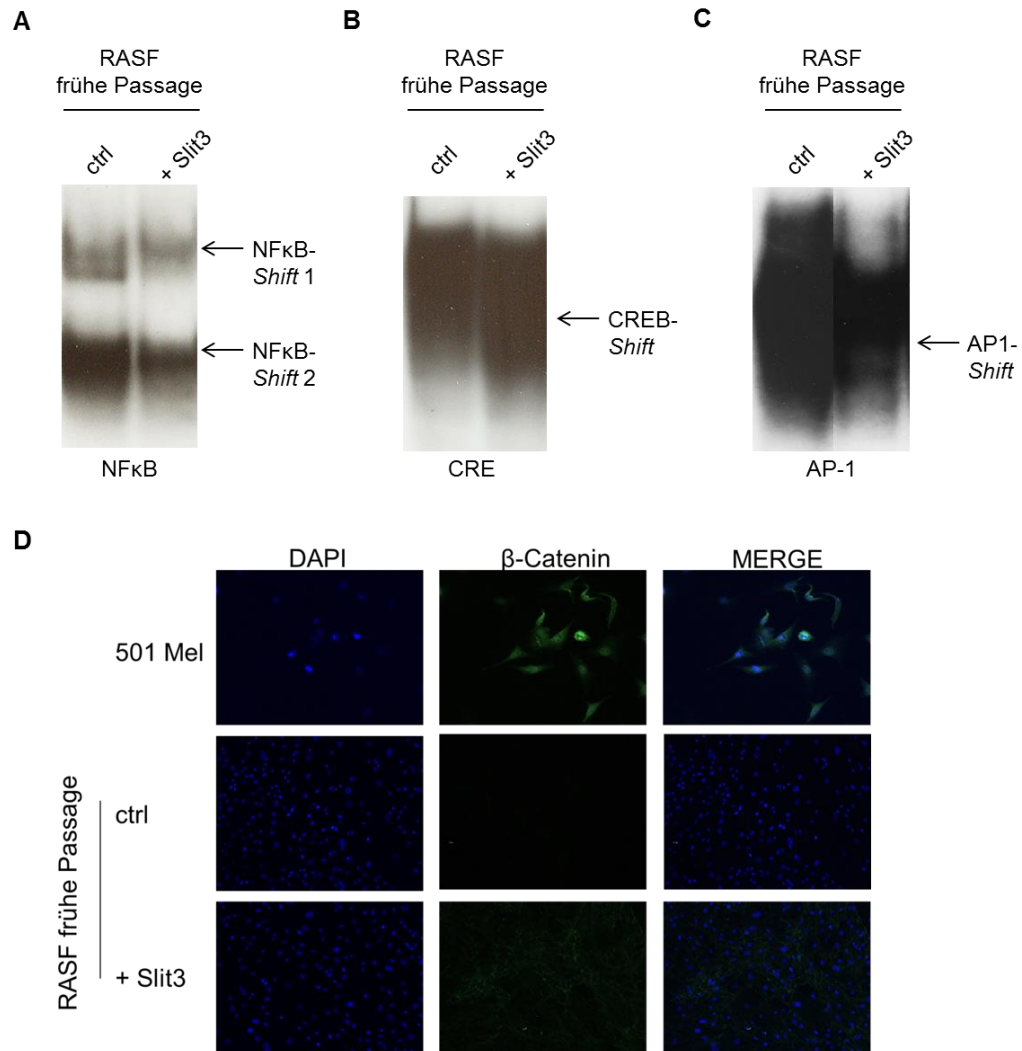
[140]. Mithilfe dieses Assays kann demzufolge die Menge an  $\beta$ -Catenin im Nucleus bestimmt werden. Jedoch zeigte sich auch für  $\beta$ -Catenin keine veränderte Aktivität nach Slit3 Behandlung. In Reportergergen-Assays für AP-1 zeigte sich hingegen, dass in HSE und RASF in frühen Passagen die Behandlung mit Slit3 zu einer signifikant geringeren Promotoraktivität durch AP-1 führt (Abbildung 11D).



**Abbildung 11:** **A+B** Reportergergen-Assays für NFκB und CREB mit HSE (n=3) und RASF (n=2) in frühen Passagen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Promotoraktivität nach Slit3 Behandlung. **C** Die Aktivität von  $\beta$ -Catenin wurde mittels der TOP/FOP-Konstrukte in RASF in frühen Passagen bestimmt. Dabei konnte keine veränderte Promotoraktivität durch  $\beta$ -Catenin festgestellt werden (n=2). **D** Reportergergen-Assays zur Untersuchung der AP-1 Aktivität zeigten eine signifikant schwächere Aktivität von AP-1 nach Slit3 Behandlung in HSE (n=3) und RASF (n=2) in frühen Passagen.

Zur Bestätigung der Reportergergen-Assay Ergebnisse wurden für NFκB, CREB und AP-1 außerdem EMSAs durchgeführt (s. 3.2.2.7). Im Fall von NFκB zeigte sich hier ein anderes Ergebnis als in den Reportergergen-Assays. In EMSAs konnte eine geringere NFκB-Bindung an die EMSA-Sonde nach Slit3 Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 12A). Für

CREB zeigte sich keine eindeutige Veränderung der Bindekapazität an die EMSA-Sonde (Abbildung 12B). AP-1 zeigte nach Slit3 Behandlung, in Übereinstimmung mit den Reporteragen-Assays, eine geringere Bindung an die AP-1 Sonde (Abbildung 12C).



**Abbildung 12:** A-C EMSAs mit NFκB, CRE und AP-1 Sonden. Die *Shifts* durch NFκB und AP-1 zeigten eine verminderte Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren nach Slit3-Behandlung. Die zwei NFκB *Shifts* kommen durch verschiedene Dimere des Transkriptionsfaktors zustande. Die Bindung von CREB an die Sonde veränderte sich nicht. (n=2) D Immunfluoreszenz-Färbungen von β-Catenin zeigten, dass in RASF in frühen Passagen fast kein β-Catenin exprimiert wird. Die Positivkontrolle (Mel501) zeigte eine klare Färbung.

Da in den TOP/FOPflash Reporteragen-Assays keine Induktion der Luciferase-Aktivität gemessen werden konnte, jedoch bereits gezeigt wurde, dass in RASF eine erhöhte Menge β-Catenin in RASF im Vergleich mit OASF exprimiert wird und dies zur Aktivierung der RASF beiträgt [73], wurde die Menge an β-Catenin im Nucleus von RASF mittels Immunfluoreszenz untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine Melanomzelllinie (501 Mel)

ausgewählt, da metastasierende Melanomzelllinien eine hohe Menge an  $\beta$ -Catenin aufweisen [141]. Diese zeigten in der Immunfluoreszenz eine klare Färbung von  $\beta$ -Catenin (Abbildung 12D). In Immunfluoreszenz-Assays mit RASF in früher Passage mit und ohne Slit3 Behandlung konnte hingegen fast kein  $\beta$ -Catenin im Nucleus nachgewiesen werden (Abbildung 12D).

Zusammenfassend konnte in diesem Projektteil mittels Reporteragen-Assays, EMSAs und Immunfluoreszenz-Assays gezeigt werden, dass ausschließlich die AP-1 Aktivität durch die Behandlung mit Slit3 in zwei unabhängigen Assays gehemmt wird. NF $\kappa$ B, CREB und  $\beta$ -Catenin zeigten keine oder nur geringe Aktivitätsänderungen bzw. uneinheitliche Ergebnisse in verschiedenen Assays. Damit spielt AP-1 als einziger der untersuchten Kandidaten eine Rolle bei der Slit/Robo-Signalweiterleitung.

#### **4.2. Herabregulation von hsa-miR-188-5p in aggressiven RASF**

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, weisen RASF in frühen Passagen eine erhöhte Robo3 Expression im Vergleich zu RASF in späten Passagen und nSF auf. In unserer AG wurden neben Robo3 noch weitere Repellent-Rezeptoren, wie Unc5B und Unc5C, untersucht. Diese weisen über die Passagierung (s. 3.2.3.1) der RASF einen ähnlichen Expressionsverlauf wie Robo3 auf [29]. Über die Regulation dieser verstärkten Repellent-Rezeptor Expression in RASF ist noch nichts bekannt. Da miRs auch bei der Entstehung und Progression von RA eine Rolle spielen [82–84], wurde die Möglichkeit der gemeinsamen Regulation der Rezeptoren durch miRs in Betracht gezogen. Ziel war es dabei, eine miR zu finden, die in den 3'UTRs aller drei Rezeptoren bindet und weitere Zielgene dieser miR in RASF zu identifizieren.

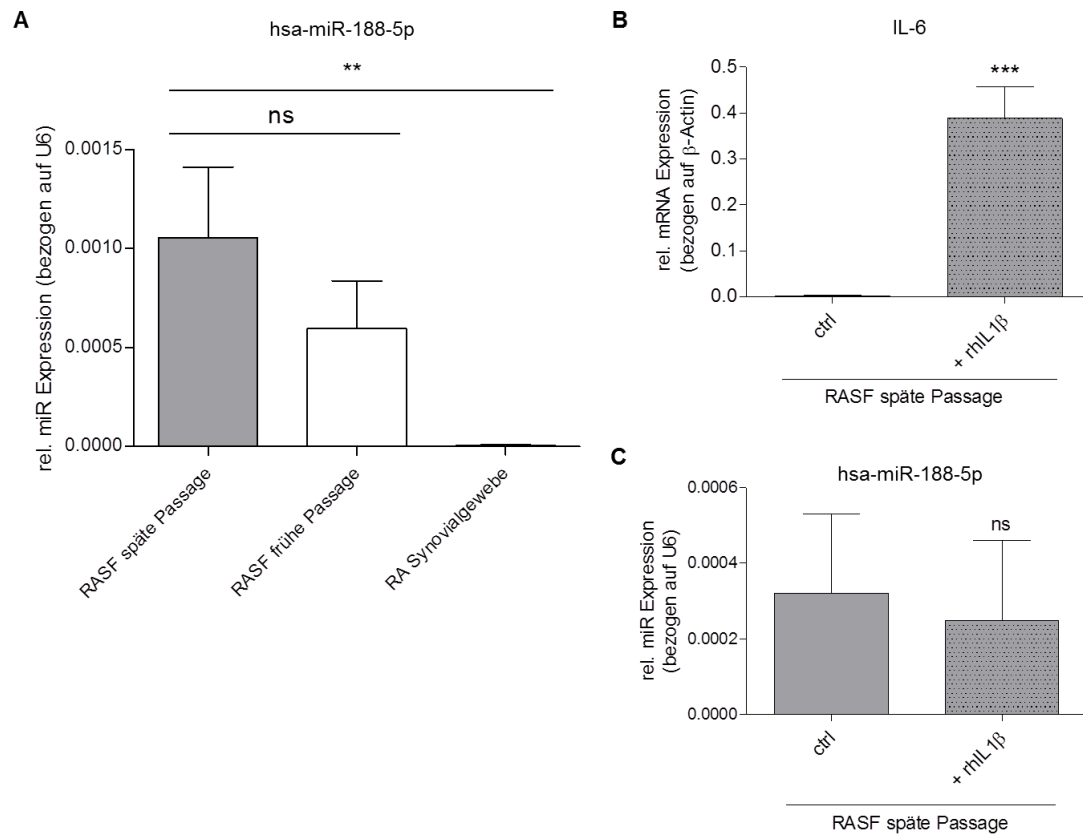
Zuerst wurde nach miR Bindestellen gesucht, die im 3'UTR von Robo3, Unc5B und Unc5C vorhanden waren. Die *in silico* Analysen zeigten, dass hsa-miR-188-5p in allen drei 3'UTRs binden kann (Abbildung 13). MiRs regulieren die Expression ihrer Zielgene klassischerweise dadurch herab, dass sie im 3'-UTR der jeweiligen mRNA binden und die Translation der mRNA inhibieren. Zur Regulation der Repellent-Rezeptoren kamen aus diesem Grund miRs in Frage, die in inflammatorischem Milieu herabreguliert sind und somit die erhöhte Expression ihrer Zielgene ermöglichen. Für hsa-miR-188-5p wurde beispielsweise beschrieben, dass die Expression dieser miR in der glatten Muskulatur der Atemwege durch IL-1 $\beta$  Behandlung herabreguliert wird [142]. Für IL-1 $\beta$  wurde bereits gezeigt, dass dieses Cytokin bei RA vermehrt exprimiert wird und über parakrine

Mechanismen die Expression anderer Proteine beeinflussen kann [88]. Basierend auf dieser Datenlage entstand die Hypothese, dass IL-1 $\beta$  die Expression von hsa-miR-188-5p in RASF negativ beeinflussen und somit die Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C positiv regulieren könnte.

3' gggaggugguacguUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
4367 bp: 5' cggggaaggggaguAGGGAUg 3'	<b>Robo3</b>
3' gggagGUGGUACGUUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
4438 bp: 5' gguggCUCCUAGAAAGGGAUg 3'	<b>Unc5B</b>
3' gggaggugguacguUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
3521 bp: 5' acaucaaaauuggacAGGGAUg 3'	<b>Unc5C</b>

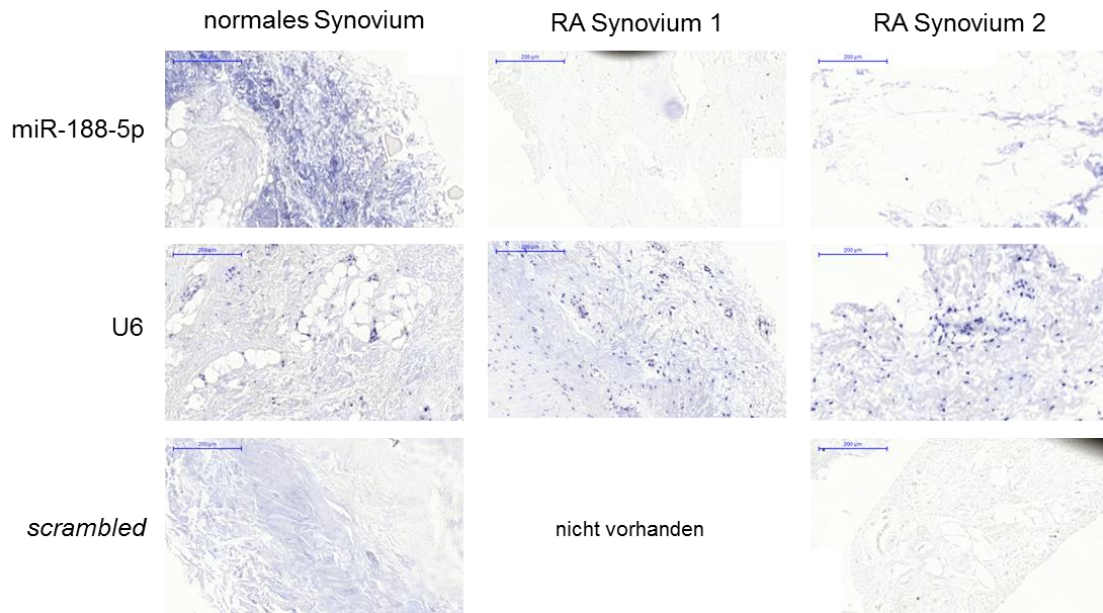
**Abbildung 13:** Bindestelle von hsa-miR-188-5p im 3'UTR von Robo3, Unc5B und Unc5C. (<http://www.microrna.org>)

Aufgrund der vorhergesagten Bindestellen in allen drei 3'UTRs wurde die Expression von hsa-miR-188-5p in RASF in früher und später Passage per qRT-PCR (s. 3.2.1.5) bestimmt und verglichen. Dabei zeigte sich, dass entsprechend der Hypothese hsa-miR-188-5p in RASF in früher Passage im Vergleich zu RASF in später Passage weniger stark exprimiert wird (Abbildung 14A). Ein noch deutlicherer, signifikanter Unterschied der hsa-miR-5p Expression zu RASF in späten Passagen wurde in RA Synovialgewebe gefunden (Abbildung 14A). Um den Einfluss von inflammatorischen Cytokinen auf die hsa-miR-188-5p Expression zu untersuchen, wurden RASF in später Passage bis zu 16 h mit rhIL-1 $\beta$  behandelt. Da bekannt ist, dass IL-1 $\beta$  die Expression von IL-6 induziert [143], wurde nach der Behandlung als Kontrolle die IL-6 Expression in den RASF bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Cytokin Behandlung ausreichend war, um die Genexpression zu verändern, weil die IL-6 Expression signifikant anstieg (Abbildung 14B). Die hsa-miR-188-5p Expression nach rhIL-1 $\beta$  Behandlung ließ jedoch keine signifikante Herabregulation der miR in den behandelten Zellen im Vergleich zu Unbehandelten erkennen (Abbildung 14C). Trotz bereits publizierter Regulation der hsa-miR-188-5p Expression durch IL-1 $\beta$  in der glatten Muskulatur der Atemwege [142], scheint die Behandlung von RASF in späten Passagen mit IL-1 $\beta$  in diesem Zelltyp nicht ausreichend für die Änderung der Expression von hsa-miR-188-5p. Demnach müssen hier andere Faktoren an der Regulation der miR beteiligt sein.



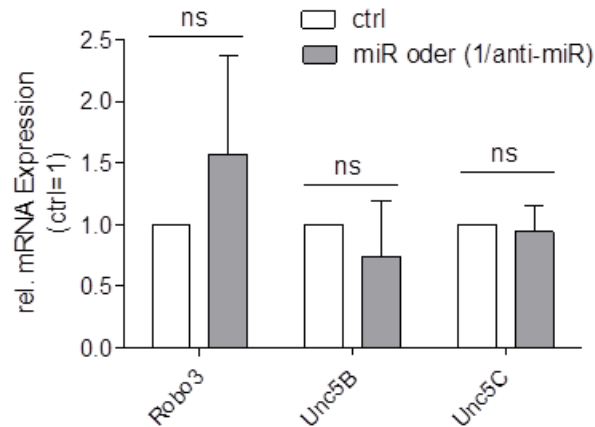
**Abbildung 14:** **A** RASF in später Passage (n=3) weisen eine höhere Expression von hsa-miR-188-5p auf als RASF in früher Passage (n=3) oder RA Synovialgewebe (n=5). **B** Die IL-6 Expression in RASF in später Passage steigt nach IL-1 $\beta$  Behandlung signifikant an. (n=3) **C** Nach IL-1 $\beta$  Behandlung von RASF in später Passage ist eine Herabregulation der hsa-miR.188-5p im Vergleich zur Kontrolle nicht zu erkennen. (n=3)

Nach Untersuchung der hsa-miR-188-5p Expression *in vitro* wurde die Expression auch in Gewebeschnitten des Synoviums von RA Patienten und gesunden Spendern mittels *in situ* Hybridisierung analysiert. Als Kontrolle wurden eine U6 Sonde und eine *scrambled* Sonde verwendet. Die Positivkontrolle U6 zeigte eine vergleichbar starke Färbung in gesundem und RA Gewebe, während die *scrambled* Sonde nur Hintergrundfärbung aufwies. Die miR-188-5p Sonde hingegen zeigte eine deutlich stärkere Färbung in gesunden Gewebeschnitten, während RA Gewebe nur eine sehr geringe Färbung aufweist (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** *In situ* Hybridisierung mit Sonden für miR-188-5p und U6, sowie *scrambled* als Kontrolle. Die Kontrollfärbung mit U6 Sonden zeigt eine ähnliche Färbung in normal und RA Synovium. Die *scrambled* Sonde zeigte nur eine leichte unspezifische Färbung in allen Gewebeschnitten. Das Synovium aus gesunden Spendern weist jedoch eine stärkere und gleichmäßigere Färbung durch die miR-188-5p Sonde auf als RA Synovium. (n=3)

Um den regulatorischen Effekt von hsa-miR-188-5p genauer zu untersuchen, wurden RASF in früher Passage mit hsa-miR-188-5p und RASF in später Passage mit anti-miR-188-5p transfiziert (s. 3.2.3.2). Die Transfektion mit der anti-miR sollte die Funktion der jeweiligen miR inhibieren und in diesem Fall zu einer stärkeren Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C in RASF in späten Passagen führen, während durch die Transfektion von RASF in frühen Passagen mit der miR mit einer verminderten Zielgenexpression zu rechnen ist. Die mRNA Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C wurde im Anschluss an die Transfektion mittels qRT-PCR bestimmt (s. 3.2.1.5). Zum Vergleich der Expressionsänderung der Gene durch miR und anti-miR Transfektion wurde der Quotient der mit anti-miR transfizierten RASF verwendet ( $1/x$ ) und die Expressionsdaten von RASF in frühen und späten Passagen zusammengefasst. Zu erwarten war eine negative Regulation der Gene, da hsa-miR-188-5p in RASF früher Passage im Vergleich mit RASF in später Passage herabreguliert ist. Dabei zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression der drei Rezeptoren durch Transfektion mit hsa-miR-188-5p oder anti-miR-188-5p (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Die Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C ändert sich nicht signifikant nach Transfektion mit hsa-miR-188-5p oder anti-miR-188-5p. (n=5)

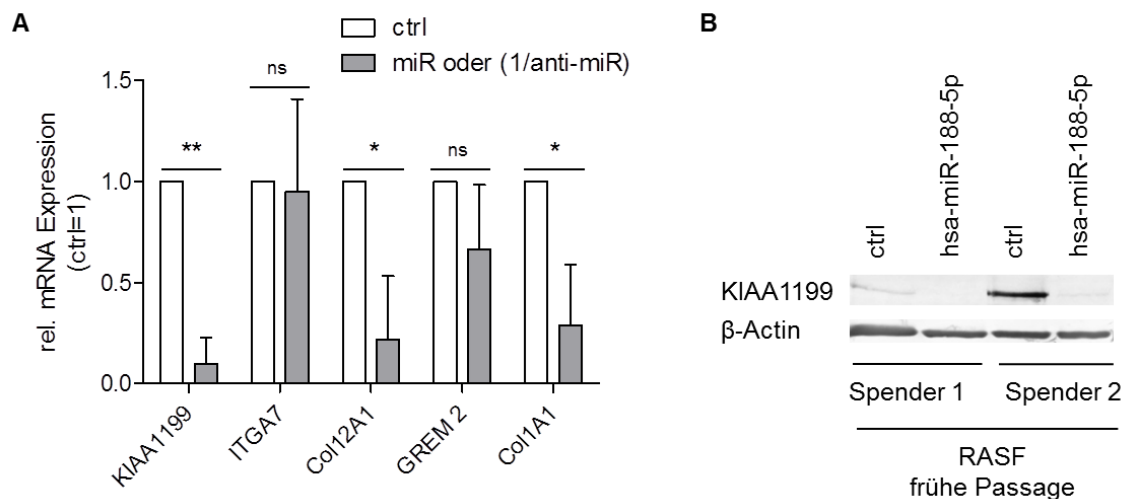
Da die Expression von hsa-miR-188-5p in RA Synovialgewebe im Vergleich zu RASF in späten Passagen jedoch eindeutig herabreguliert war (Abbildung 14A), wurde das Expressionsprofil von (anti-) hsa-miR-188-5p transfizierten RASF mithilfe eines *GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array* (Affymetrix) bestimmt, um weitere Zielgene der miR zu identifizieren. Dieser *Array* liefert Expressionsdaten zum gesamten Genom und ist durch die Verwendung von neun bis elf Sonden pro Gen, die unabhängig voneinander gemessen werden, sehr genau [144]. Dadurch sollten weitere Zielgene von hsa-miR-188-5p in RASF identifiziert werden. Die Auswertung des *Array* zeigte, dass hsa-miR-188-5p die Expression einer ganzen Reihe von Genen beeinflusst. Aus diesen regulierten Genen wurden solche zur weiteren Untersuchung ausgewählt, die die stärkste Regulation aufwiesen oder über mehrere unabhängige Sonden erkannt wurden (Daten nicht gezeigt). Von diesen weisen *KIAA1199*, *Integrin alpha 7 (ITGA7)* und *Gremlin 2 (GREM2)* eine hsa-miR-188-5p Bindestelle im 3'UTR auf (Abbildung 17). *MessengerRNAs* ohne Bindestelle für hsa-miR-188-5p waren *Collagen12A1 (Col12A1)* und *Collagen1A1 (Col1A1)*. Die Regulation dieser Gene müsste demnach indirekt über die Regulation anderer Gene erfolgen.

	3' ggGAGGUGGUAC---GUUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
5288 bp:	5' gcCUCUGGAAUGGCUCAGGGAUu 3'	<b>KIAA1199</b>
	3' gggaggugguacgUUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
3903 bp:	5' caaagguggggagAAGGGAUc 3'	<b>ITGA7</b>
	3' ggGAGGUGGUACGUUCCCUAc 5'	hsa-miR-188-5p
2029 bp:	5' caCACAGAUAGGGGAGGGAUu 3'	<b>GREM2</b>

**Abbildung 17:** *In silico* Bindestellen für hsa-miR-188-5p im 3'UTR der mRNAs von KIAA1199, ITGA7 und GREM2. (<http://www.microrna.org>)

Zur Verifikation der Regulation dieser Gene durch hsa-miR-188-5p, wurde die mRNA Expression nach (anti-) hsa-miR-188-5p Transfektion mittels qRT-PCR (s. 3.2.1.5) ermittelt. Dabei zeigte sich weder für ITGA7 noch für GREM2 eine signifikante Expressionsänderung (Abbildung 18A). Die Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 wird dagegen signifikant durch die hsa-miR-188-5p herabreguliert. Die stärkste Regulation weist jedoch KIAA1199 auf (Abbildung 18A). Aufgrund dessen, dass KIAA1199 am stärksten durch hsa-miR-188-5p reguliert wurde und als einziges der analysierten und signifikant regulierten Gene eine Bindestelle im 3'UTR aufwies, wurde nur von KIAA1199 die Proteinexpression nach hsa-miR-188-5p Transfektion mittels Western Blot untersucht (s. 3.2.2.6). Die Western Blot Daten bestätigten die bereits auf mRNA gezeigten Expressionsdaten. Auch die Proteinexpression nimmt nach miR Transfektion ab (Abbildung 18B).

Zusammengefasst konnte in Teil 4.2 gezeigt werden, dass hsa-miR-188-5p in RASF in frühen Passagen und RA Synovialgewebe geringer exprimiert wird als in RASF in späten Passagen, welche im Expressionsprofil nSF am ähnlichsten sind. Durch einen *GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array* wurden verschiedene Zielgene der miR identifiziert, von welchen die Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 in RASF durch hsa-miR-188-5p mittels qRT-PCR verifiziert werden konnte. Für KIAA1199 wurde die deutlichste Regulation der Expression gefunden. Diese Regulation wurde zusätzlich auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt.



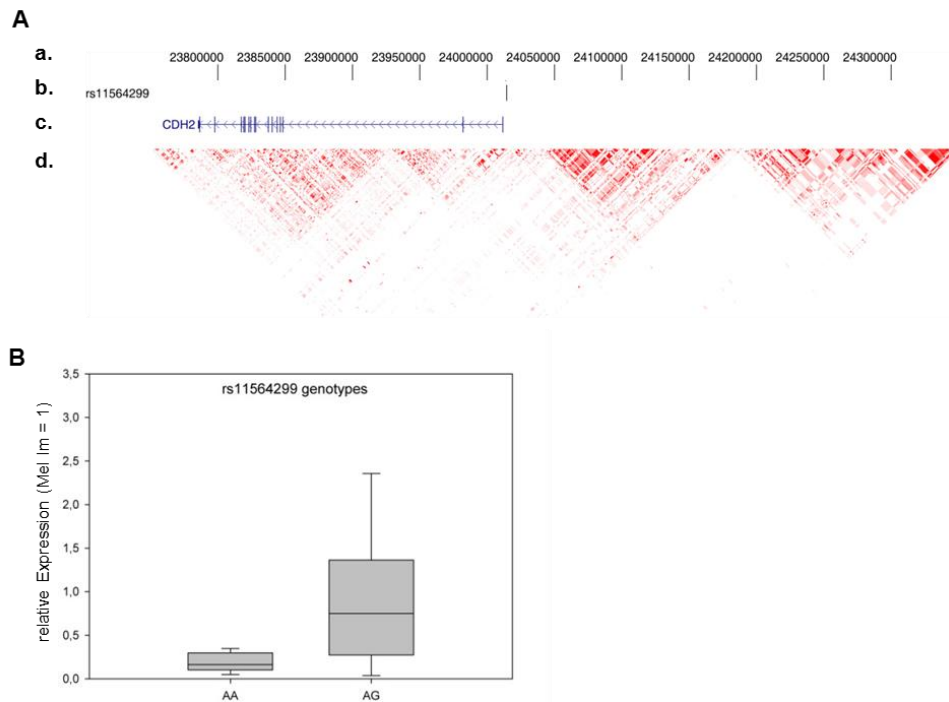
**Abbildung 18:** **A** mRNA Expression der aus dem *GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array* mittels qRT-PCR verifizierten Gene. Zum Vergleich der Expression von miR und anti-miR transfizierten RASF wurde der Quotient der anti-miR transfizierten Zellen (1/anti-miR) verwendet. Die Expression von KIAA1199, Col12A1 und Col1A1 wurde signifikant durch hsa-miR-188-5p herabreguliert. KIAA1199 wies jedoch die eindeutigste Regulation auf. Die Expression von ITGA7 und GREM2 wurde nicht signifikant durch hsa-miR-188-5p beeinflusst. (n=4) **B** Durch Western Blots konnten mRNA Daten von KIAA1199 auch auf Proteinebene bestätigen; KIAA1199 wurde somit auch auf Proteinebene durch hsa-miR-188-5p herabreguliert.

#### 4.3. Polymorphismen im *N-Cadherin* Promotor führen zu einer veränderten Expression des Gens

Dieser Arbeit vorhergehende Expressionsstudien durch Simone Hofmeister zeigten, dass ein Robo3-bindendes Zelladhäsionsmolekül, N-Cadherin, in RASF und OASF in frühen Passagen stärker exprimiert wird als in nSF (Daten nicht gezeigt). Da sich die Expression in RASF und OASF in frühen Passagen und späten Passagen im Gegensatz zu beispielsweise Robo3, Unc5B oder Unc5C nicht wieder dem Level in nSF annähert, wurde nach möglichen genetischen Gründen für eine stärkere Expression von N-Cadherin in RASF und OASF im Vergleich zu nSF gesucht. In Zusammenhang mit veränderter Genexpression wurden bereits verschiedene SNPs in Promotorregionen beschrieben, wie beispielsweise im *RUNX2* Promotor. Hier verändern SNPs in der Promotorregion die Transkriptionsfaktorbindung [145]. Aufgrund der bisherigen Datenlage entstand die Hypothese, dass ein oder mehrere SNPs im *CDH2* Promotor die Expression des Gens beeinflussen und die Ausprägung von RA oder OA verändern könnten. Ziel dieses Teilprojektes war es, SNPs im *CDH2* Promotor mit RA zu assoziieren und deren Einfluss auf die Expression von N-Cadherin aufzuklären.

Zur Untersuchung der Hypothese, dass SNPs in der Promotorregion von *CDH2* die Entstehung und Progression von RA oder OA beeinflussen, wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stark (Institut für Epidemiologie und Präventivmedizin, Universität Regensburg) verschiedene SNPs im *CDH2* Gen (Abbildung 19A a) in einem RA-, einem OA- und einem Kontrollkollektiv analysiert. Es konnte keine signifikante Assoziation der untersuchten SNPs mit RA gezeigt werden. Jedoch zeigte sich, dass der SNP rs11564299 bei einer Regressionsanalyse mit Korrektur für Alter und Geschlecht eine signifikante Assoziation ( $p = 5.0 \times 10^{-3}$ ) mit dem OA-Risiko aufweist. Das Risiko, OA zu entwickeln, ist mit der seltenen Variante (Var G) geringer, als mit der häufigen Variante (Var A). Rs11564299 liegt 2.583 bp vor dem Translationsstart im Promotor des *CDH2* Gens (Abbildung 19A b). In Abbildung 19A c wurde die Lage von *CDH2* schematisch dargestellt, wobei die senkrechten Striche Exons markieren. Da viele SNPs abhängig voneinander vererbt werden und sogenannte Haplotypen bilden, existieren Datenbanken wie HapMap, die zeigen, welche SNPs in einem *linkage disequilibrium* (LD) stehen und bevorzugt gemeinsam vererbt werden [146]. Aufgrund der Entfernung des SNPs rs11564299 zum Translationsstart von N-Cadherin wurde mit einer HapMap Suche nach einem SNP gesucht, der näher am Translationsstart liegt. Dabei ergab sich ein schwaches LD mit rs11083255 (Abbildung 19A d), der 1.719 bp vor dem Translationsstart lag. Beide SNPs zeigen dieselbe Richtung der Assoziation mit OA, sind also protektiv.

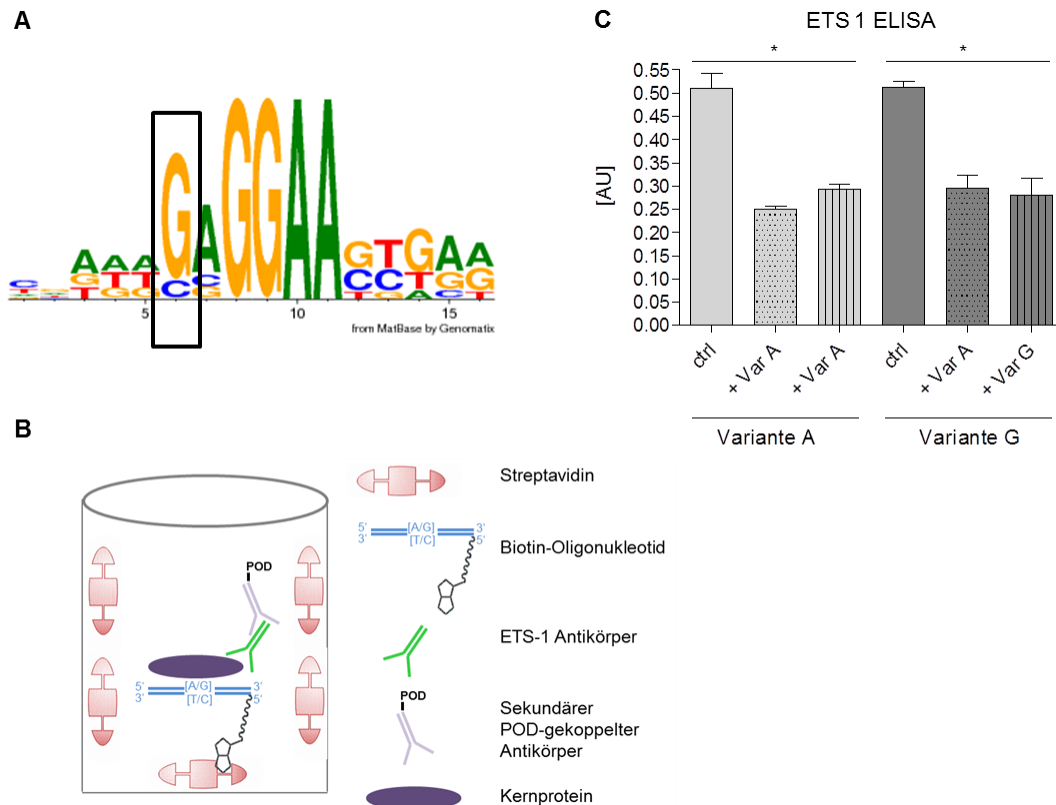
Aufgrund dieser Daten wurden die nachfolgenden Untersuchungen nur noch in OASF durchgeführt. Ziel war somit, den Einfluss des SNPs mit der stärksten Assoziation mit OA, rs11564299, auf die Expression von N-Cadherin aufzuklären. Um den Effekt eines SNPs zu beurteilen, gibt es verschiedene Parameter. Zum Einen wird der *odds ratio* (OR) angegeben, welcher die Stärke der Assoziation beschreibt. Zum Anderen wird der p-Wert angegeben. Wobei  $p \leq 0,05$  als signifikant gilt. Im Fall von rs11564299 und rs11083255 ist jeweils das seltene Allel protektiv, jedoch nicht völlig unabhängig voneinander ( $p = 0,040$ , OR = 0,69 für rs11564299 nach Korrektur für rs11083255;  $p = 0,166$ , OR = 0,61 für rs11083255 nach Korrektur für rs11564299). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die N-Cadherin Expression mit dem SNP-Status korreliert. Dazu wurden die mRNA Expressionslevel in verschiedenen Spendern mit bekanntem SNP-Status mittels qRT-PCR bestimmt (s. 3.2.1.5). Im Vergleich zu OASF mit der häufigeren Variante (Var A) exprimierten OASF mit dem seltenen Allel (Var G) verstärkt N-Cadherin (Abbildung 19B).



**Abbildung 19:** **A** Schematische Darstellung der genomischen Region von *CDH2* (<http://genome.ucsc.edu/>). a. Lokalisation von *CDH2* auf Chromosom 18 von 23.750 kb bis 24.350 kb. b. Relative Position von rs11564299. c. *CDH2* Exon-Intron-Struktur. d. LD Plot mit CEU Proben in *HapMap phase II release 22* mit paarweisen  $r^2$ -values. Rot entspricht perfektem LD ( $r^2=1$ ), weiß entspricht  $r^2=0$ . Es zeigte sich ein schwaches LD mit rs11083255. **B** Genotyp-abhängige Expression von N-Cadherin in OASF. N-Cadherin wird verstärkt in heterozygoten (A/G) OASF im Vergleich zu homozygot (A/A) OASF exprimiert. (modifiziert nach Ruedel et al. [147])

In weiteren Analysen sollte die Bedeutung von rs11564299 für die Genregulation untersucht werden. Dazu wurde mithilfe von SNPInspector (Genomatix Software GmbH, München) analysiert, welche Auswirkungen ein Basenaustausch von A nach G an dieser Stelle auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion hat. Diese *in silico* Analysen zeigten, dass das G-Allel zu neuen Transkriptionsfaktorbindestellen im *CDH2* Promotor führt. Durch den Basenaustausch entsteht unter anderem eine ETS Bindestelle (Abbildung 20A). Hier zeigte sich, dass ETS 1 nach einem Nukleotidaustausch von A nach G besser an den Promotor binden sollte. Um diese Bindung nachzuweisen, wurde ein ELISA etabliert. Dazu wurden spezifische Oligonukleotide generiert, die entweder Variante A oder Variante G enthalten und deren *forward* Oligonukleotide biotinyliert sind (s. 3.2.2.8). Nach *Annealing* der komplementären Nukleotidsequenzen, wurde mit diesen ds-Oligonukleotiden und einem spezifischen ETS 1 Antikörper der ELISA durchgeführt (Abbildung 20B). Die Ergebnisse lieferten keinen Hinweis auf einen Unterschied in der Bindungsintensität zwischen der Variante A- und Variante G-Sonde an

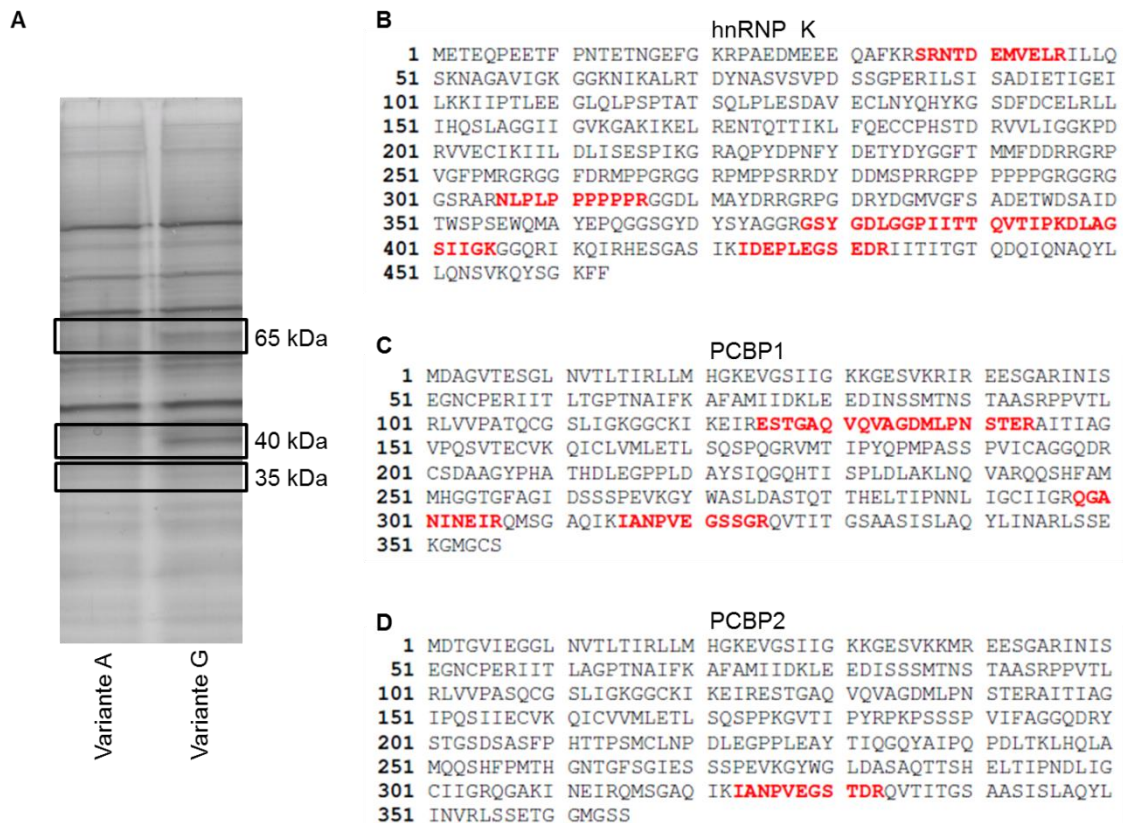
ETS 1. Auch die Verdrängung mit nicht-biotinylierten Sonden zeigte keine differentielle Bindung des Transkriptionsfaktors an eine der beiden Varianten (Abbildung 20C). Dadurch konnte ETS 1 als Transkriptionsfaktor, der selektiv an die seltene G-Variante von rs11564299 bindet, ausgeschlossen werden.



**Abbildung 20:** **A** *In silico* Analyse der ETS 1 Bindestelle um rs11564299. Eine Bindung von ETS 1 an den CDH2 Promotor sollte nur bei der seltenen G-Variante möglich sein. **B** Schematischer Aufbau des ELISAs. Die wells waren für diesen ELISA mit Streptavidin beschichtet. Die biotinylierten Oligonukleotide konnten dadurch über die Bindung an Streptavidin ebenfalls in den wells verankert werden. Daran gebundene Proteine konnte dann durch spezifische primäre und entsprechende POD-gelabelte Antikörper im ELISA-Reader quantitativ vermessen werden. (s. 3.2.2.8) **C** Der ELISA mit ETS 1 spezifischen Antikörpern zeigte keine Varianten-spezifische Bindung an Variante A oder Variante G. (n=2; AU: adsorption unit (modifiziert nach Ruedel et al. [147]))

Da die *in silico* Analyse im Fall der ETS 1 Bindestelle nicht zutreffend war, sollte der Transkriptionsfaktor, der spezifisch an das seltene Allel binden konnte, mittels eines *pull-down Assays* aus Kernproteinen isoliert werden (s. 3.2.2.9). Dazu wurden die gleichen Oligonukleotide, die auch im ELISA eingesetzt wurden, verwendet. Die an die Oligonukleotide gebundenen Proteine wurden über ein PAA-Gel aufgetrennt und Silber gefärbt (3.2.2.9). Die Banden, die selektiv im *pull-down Assay* mit den Oligonukleotiden

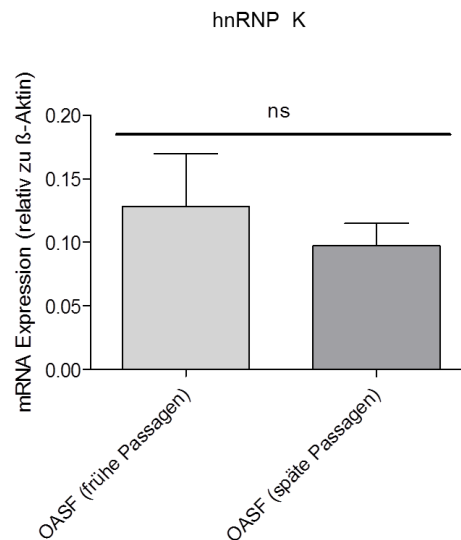
des seltenen Allels zu sehen waren, wurden ausgeschnitten und per LC-MS analysiert (s. 3.2.2.4, Abbildung 21A). Dabei konnte die Bande bei ca. 65 kDa als *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (hnRNP K) identifiziert werden. Die übereinstimmenden Sequenzen wurden in Abbildung 21B in Rot gekennzeichnet. Ebenfalls in Rot gekennzeichnet wurden die übereinstimmenden Sequenzen der 40 kDa und 35 kDa Banden mit *Poly(rC)-binding protein 1* (PCBP1) und *Poly(rC)-binding protein 2* (PCBP2) (Abbildung 21D).



**Abbildung 21:** A Pull-down mit Oligonukleotiden die spezifisch für Variante A oder Variante G waren. Nach Auftrennung über ein PAA-Gel und Silberfärbung wurden die differentiellen Banden der G-Variante bei 65 kDa, 40 kDa und 35 kDa ausgeschnitten und per LC-MS analysiert. B Die Bande bei 65 kDa weist nach Abgleich mit einer Protein-Datenbank (Uniprot [148]), mit 13% die beste Übereinstimmung mit einem Protein auf. Sie konnte als hnRNP K identifiziert werden. C Die Bande bei 40 kDa zeigte eine 11-prozentige Übereinstimmung mit PCBP1. D Die Bande mit dem geringsten Molekulargewicht (35 kDa) zeigte auch die geringste Übereinstimmung mit einem Protein. Nur 3% der Sequenz von PCBP2 konnten identifiziert werden. (modifiziert nach Ruedel et al. [147])

Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um Proteine aus einer Proteinfamilie, die an Poly-Cystein Regionen in der DNA binden können. Da diese Proteine alle an ähnliche DNA-Bereiche binden können, wurde nur das Protein mit der größten Sequenz-

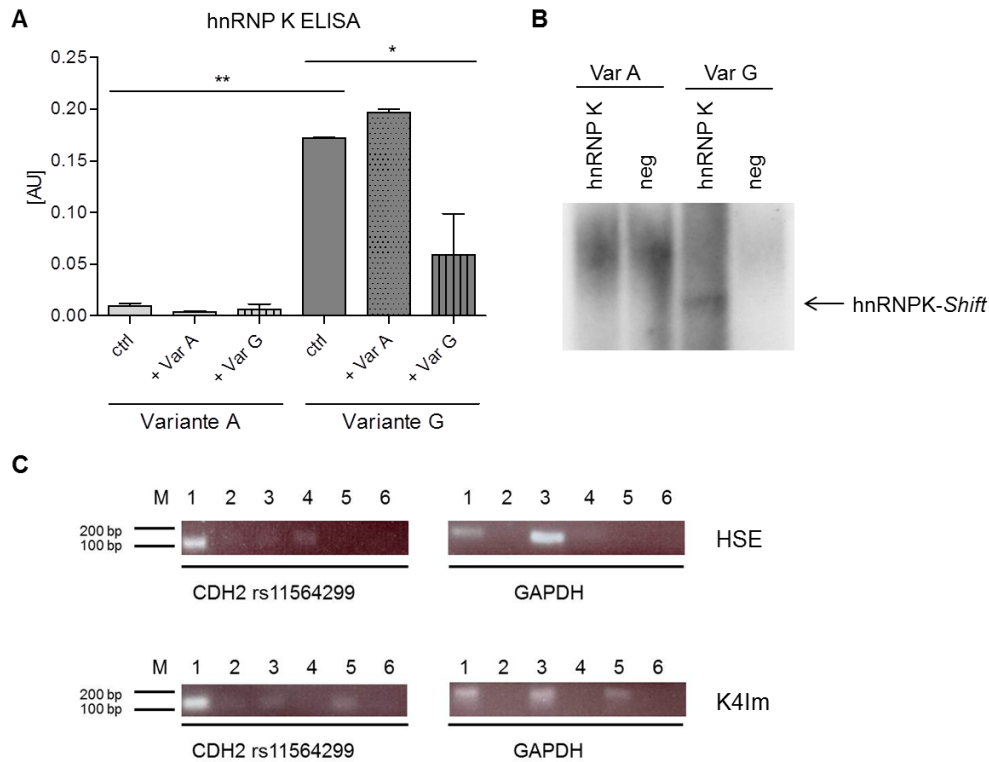
Übereinstimmung mit der Protein-Datenbank Uniprot [148], hnRNP K, für weitere Tests ausgewählt. Die Expression von hnRNP K in OASF wurde per qRT-PCR bestimmt (s. 3.2.1.5). Dabei stellte sich heraus, dass sich die hnRNP K Expression über mehrfaches Passagieren der Zellen nicht verändert und die Expression somit keiner Regulation durch das Passagieren in Zellkultur unterliegt (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** mRNA Expression von hnRNP K in OASF in frühen und späten Passagen. Die Expression bleibt über den Passagenverlauf konstant. (modifiziert nach Ruedel et al. [147])

Der bereits mit ETS 1 etablierte ELISA wurde nun analog mit einem spezifischen hnRNP K Antikörper durchgeführt (s. 3.2.2.8). Dabei zeigte sich, dass hnRNP K eine differentielle Bindung an die Varianten von rs11564299 aufweist, wobei hnRNP K nur die seltene G-Variante des SNPs bindet (Abbildung 23A). Auch bei Verdrängung mit nicht-biotinylierten Oligonukleotiden konnte eine Bindung im ELISA nur mit Variante G und nicht mit Variante A vermindert werden (Abbildung 23A). Als Negativkontrolle wurde der ELISA außerdem mit Einzelstrang-Oligonukleotiden durchgeführt. Hier konnte keine Bindung von hnRNP K an eine der beiden Varianten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). HnRNP K bindet folglich nur an doppelsträngige DNA. Zur weiteren Bestätigung der Bindung von hnRNP K an das seltene Allel von rs11564299 wurde ein EMSA mit rekombinantem hnRNP K durchgeführt (s. 3.2.2.7). Hier wiesen ebenfalls nur Sonden mit der G-Variante eine selektive Bindung an hnRNP K auf, während bei Sonden für Variante A kein *Shift* zu sehen war (Abbildung 23B). Um eine direkte Interaktion von hnRNP K mit dem *CDH2* Promotor im Zellkern nachzuweisen, wurde ein ChIP Assay durchgeführt (s. 3.2.1.12). Verwendet wurden dafür zwei Zelllinien, HSE, welche heterozygot für rs11564299 ist (A/G) und K4Im. K4Im sind SV-40 immortalisierte SF aus

einem gesunden Spender und sind homozygot für das häufige Allel (A/A). Es zeigte sich hier, dass nur in HSE Zellen eine Bindung von hnRNP K an Chromatin mit spezifischen hnRNP K Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Abbildung 23C). Es konnte folglich gezeigt werden, dass hnRNP K in verschiedenen Assays (ELISA und ChIP) selektiv an das seltene G-Allel von rs11564299 bindet.



**Abbildung 23:** **A** Der ELISA mit hnRNP K spezifischen Antikörpern zeigte eine Bindung von hnRNP K ausschließlich an Variante G und nicht an Variante A. Auch in kompetitiven Ansätzen konnte eine Verdrängung nur mit der seltenen G-Variante gezeigt werden. (n=2) **B** EMSAs mit rekombinantem hnRNP K und spezifischen Sonden für Variante A und Variante G zeigten eine Bindung exklusiv an Variante G. (n=1) **C** Mithilfe eines ChIP Assays mit der heterozygoten Zelllinie HSE (A/G) und der homozygoten Zelllinie K4Im (A/A) konnte eine direkte Bindung von hnRNP K an Chromatin nur in HSE nachgewiesen werden. 1: Input, 2: IgG Antikörper, 3: Pol II Antikörper, 4: hnRNP K Antikörper, 5: ETS-1 Antikörper, 6: H<sub>2</sub>O Kontrolle. (n=3) (modifiziert nach Ruedel et al. [147])

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieses Teilprojekts, dass der SNP rs11564299 bei OA protektiv ist und zu einer erhöhten N-Cadherin Expression in OASF mit dem seltenen G-Allel führt im Vergleich zu OASF mit dem häufigen A-Allel. Außerdem konnte hnRNP K als Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der selektiv an das seltene G-Allel

bindet. Funktionell konnten jedoch bisher keine Effekte durch die Promotorbindung nachgewiesen werden.

Die in diesem Abschnitt zusammengefassten Daten zur hnRNP K Promotorbindung konnten bereits im *FASEB Journal* unter dem Titel „*N-cadherin promoter polymorphisms and risk of osteoarthritis*“ publiziert werden (s. 6 Eigene Publikationen).

## 5. Diskussion

### 5.1. Robo3 Varianten in RASF und Signaltransduktion nach Slit3-Bindung

Bereits 2010 konnten Denk et al. zeigen, dass Robo3 in Synovialfibroblasten aus Patienten mit rheumatoider Arthritis (RASF) in früher Passage stärker exprimiert wird als in RASF in später Passage und nSF [28]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Migration der RASF in frühen Passagen und der Abbau von Knorpel durch diese Zellen durch Slit3 inhibiert wird [28]. In der Literatur sind zwei Transkriptvarianten von Robo3 beschrieben, von welchen nur eine in der Lage ist, Slit zu binden [48]. Aufgrund dessen wurde im ersten Projektteil untersucht, welche Robo3-Variante in RASF exprimiert wird und welche Transkriptionsfaktoren durch Slit-Bindung reguliert werden.

#### 5.1.1. Robo3B ist die in RASF exprimierte Robo3-Transkriptvariante

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Expression der Robo3 Isoformen in RASF beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass von den beiden *full-length* Robo3 Varianten, die sich am 5'-Ende unterscheiden, nur die kürzere Robo3B-Isoform verstärkt in RASF, im Vergleich zu nSF, exprimiert wird (Abbildung 9). Da die Sequenz von Robo3B in Intron 1 von Robo3A beginnt, ist anzunehmen, dass die Robo3 Varianten unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte haben und unter der Kontrolle von alternativen Promotoren stehen. Man geht heute davon aus, dass 30 - 50% der humanen Gene unter der Kontrolle von alternativen Promotoren stehen [149]. Durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren und Transkriptionsstarts unterscheiden sich die Varianten meist am N-Terminus. Es können dadurch beispielsweise alternative erste Exons verwendet werden. Das heißt, die entstehenden Proteine unterscheiden sich nur durch das erste Exon. Eine andere Möglichkeit, die zum gleichen Proteinprodukt führt, sind Tandem Promotoren, die nahe beieinander liegen und denselben Transkriptionsstart nutzen [150]. Die Nutzung alternativer Promotoren führt oft zu Isoformen mit unterschiedlicher biologischer Funktion oder zu Entwicklungs- und Gewebe-spezifischer Expression [151]. So konnten Harada et al. zeigen, dass die Cytochrom P-450 Aromatase gewebespezifisch durch die Nutzung unterschiedlicher Promotoren exprimiert wird [152]. Dieser Mechanismus wurde auch schon für ein anderes Mitglied der Robo-Familie beschrieben. So wird die Robo1 Expression durch die Nutzung alternativer Promotoren und Transkriptionsstarts reguliert [153]. Dabei entstehen, wie auch im Fall von Robo3,

Isoformen mit verschiedenen N-Termini, welche während der neuronalen Entwicklung räumlich unterschiedlich exprimiert werden [153]. Auch die Robo3 Isoformen werden unterschiedlich stark in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert [48,49]. So wird Robo3var2 (entspricht Robo3B) zum Beispiel im Zebrafisch während der frühen Entwicklung (Tag1 und 2) im Rhombencephalon und in spinalen Neuronen exprimiert, während die Expression von Robo3A im gleichen Entwicklungsstadium im paraxialen Mesoderm exprimiert wird [49]. Robo3A und Robo3B sind über verschiedene Spezies konserviert. So existieren beide Varianten in Mensch, Maus und Zebrafisch [48]. Dies legt nahe, dass beide Robo3 Varianten eine wichtige Rolle für den Organismus spielen. Challa et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass die beiden Robo3 Isoformen unterschiedliche Funktionen haben. So spielt Robo3A beim Auswachsen von Motoneuronen eine Rolle, während Robo3B die dorsoventrale Entwicklung beeinflusst [49]. Ein weiterer wichtiger Unterschied der beiden Isoformen ist, dass nur Robo3B Slit binden kann [48]. Die verschiedenen Funktionen der Robo3 Varianten legen eine spezifische Regulation der Expression beider Isoformen nahe. Über diese Regulation ist bisher allerdings nichts bekannt.

Da die beiden Robo3 Varianten vermutlich verschiedene Promotoren aufweisen, könnte die Methylierung des Robo3A Promotors in RASF eine Rolle spielen. Diese Art der Regulation wurde bereits für Robo1 beschrieben, wo die Methylierung des einen Promotors zu einer geringeren Expression der entsprechenden Isoform in verschiedenen humanen Tumoren führt [154]. Bei DNA-Methylierungen handelt es sich um epigenetische Veränderungen der DNA. Dabei werden Cytosine in Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) – reichen Regionen methyliert. Da viele Transkriptionsfaktoren nicht an methylierte DNA-Sequenzen binden können, wird so die Genexpression inhibiert [155]. Dass die Expression verschiedener Isoformen eines Gens über solche Methylierungen reguliert werden kann, wurde bereits für andere Gene gezeigt. So weisen beispielsweise die drei *Exchange Protein Directly Activated By cAMP 2 (Epac2)* Isoformen gewebespezifische Expressionsmuster auf, die durch Promotormethylierung kontrolliert werden [156]. Eine Kontrolle der Nutzung von unterschiedlichen Promotoren konnte auch für Runx1 gezeigt werden. Hier ist der distale Promotor während der hämatopoetischen Entwicklung hypomethyliert, was in diesem Fall die Expression einer weiteren Variante zusätzlich zur dominanten mRNA Isoform ermöglicht [157]. Diese Form zur Kontrolle der Promotornutzung ist auch für Robo3 denkbar. Es wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass der *Robo3* Promotor in invasiven Zervixkarzinomen methyliert ist und Robo3 so inaktiviert wird [158]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Experimente zur Promotormethylierung mit der Modellzelllinie HSE durchgeführt. Dabei wurden die Zellen

mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin behandelt. 5-Aza-2'-Desoxycytidin wird anstelle von Cytosin in DNA eingebaut, wodurch eine Methylierung nicht mehr möglich ist. Allerdings zeigte die Behandlung mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin in HSE wenig bis keine Effekte auf die Robo3 Expression (Daten nicht gezeigt). Dies schließt jedoch eine Involvement der Promotormethylierung bei der Regulation der Robo3 Varianten Expression nicht aus. Zum Einen konnte der tatsächliche Einbau von 5-Aza-2'-Desoxycytidin in die DNA und die daraus folgende Demethylierung nicht überprüft werden, weil in RASF bisher keine Gene beschrieben sind, bei welchen Promotormethylierungen die Expression beeinflussen. Zum Anderen kann sich das Methylierungsmuster von Zellen bei *in vitro* Kultivierung ändern [159]. Dadurch wären Effekte durch Methylierung in über einen längeren Zeitraum kultivierten Zellen generell schwer nachweisbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Transkription der beiden Robo3 Isoformen stellt die Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsfaktorbindestellen in den beiden Promotoren dar. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von Proteinvarianten, die in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder Geweben exprimiert werden, auf diese Weise reguliert wird. Dabei weisen spezifisch exprimierte Isoformen andere Transkriptionsfaktorbindestellen auf, als ubiquitär vorkommende [160]. Eine Kontrolle von Proteinvarianten über unterschiedliche Bindestellen im Promotor ermöglicht außerdem die Regulation der Isoformen durch äußere Einflüsse wie Hypoxie [161]. Eine *in silico* Analyse des *Robo3A* und des *Robo3B* Promotors mittels der MatInspector Software (Genomatix Software GmbH, München) zeigte, dass ca. 20% der ermittelten signifikanten Transkriptionsfaktorbindestellen in beiden Promotoren vorhanden sind, während ca. 80% nur im Promotor einer Variante vorkommen (Daten nicht gezeigt). Diese Art der Regulation würde eine spezifische Expression der Robo3 Isoformen in verschiedenen Entwicklungsstadien, unterschiedlichen Geweben und Krankheiten möglich machen.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass RASF in frühen Passagen im Vergleich mit RASF in späten Passagen und nSF eine erhöhte Robo3B mRNA Expression aufweisen. Auch auf Proteinebene konnte dies mit einem dafür generierten Robo3B-spezifischen Antikörper bestätigt werden. Die Expression der Isoformen scheint auf der Nutzung verschiedener Promotoren zu beruhen. Der Beweis für eine Regulation der Isoformen Expression von Robo3 in RASF über verschiedene Transkriptionsfaktoren steht allerdings noch aus und muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

### 5.1.2. Slit3-Behandlung führt zu einer verminderten AP-1 Aktivität in RASF

Da die Slit-bindende Robo3B-Variante in RASF in frühen Passagen exprimiert wird und Denk et al. eine Inhibition der Migration von RASF durch Slit3 gezeigt haben [28], wurde außerdem die Signaltransduktion nach Slit3 Bindung an den Robo3 Rezeptor untersucht (s. 4.1.2). Bisher wurden verschiedene Wege der Signalweiterleitung beschrieben (s. 1.2.3). Zum Beispiel werden durch Robo-Slit Bindung Rho GTPase aktivierende Proteine (srGAPs) aktiviert, was zu einer Inaktivierung von *cell division control protein 42 homolog* (Cdc42) und dadurch letztendlich zur De-Polymerisierung des Aktin-Cytoskeletts führt [56]. Auch im Zusammenhang mit der Signaltransduktion über *abelson* (Abl) und *enabled homolog (Drosophila)* (Ena) wurden Rho-GTPasen beschrieben [162]. Unabhängig vom Induktor regulieren Rho-GTPasen über weitere Faktoren die Aktin-Polymerisation und somit auch die Migration von Zellen [163,164]. Hier wurden bereits Transkriptionsfaktoren beschrieben, die am Ende der Signalkaskade stehen und die Expression von Genen regulieren, die die Migrationsfähigkeit beeinflussen. Bereits 1999 zeigten Li et al., dass die Aktivierung von Cdc42 und Rho zu einer Aktivierung von AP-1 führt [165].

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren untersucht, um herauszufinden, welche an der Signaltransduktion nach Robo-Slit Bindung in RASF beteiligt sind. Dafür wurden neben AP-1 Reporter-Gen-Assays und EMSAs, solche auch für CREB und NFκB durchgeführt. CREB und NFκB wurden zwar nicht im Zusammenhang mit Aktin-Polymerisation beschrieben, jedoch zeigten Takeba et al., dass CRE in RA Patienten verstärkt phosphoryliert vorliegt und an der veränderten Genexpression beteiligt ist [70]. Für NFκB wurde bereits gezeigt, dass dessen Aktivität die MMP Produktion in RASF steigert und somit ebenfalls zum Krankheitsbild beiträgt [71]. Die beobachtete Doppelbande im NFκB EMSA (Abbildung 12A) lässt darauf schließen, dass verschiedene Heterodimere des Transkriptionsfaktors in RASF vorhanden sind. Jedoch zeigte die Slit3-Behandlung im EMSA nur eine leichte Reduktion der Bindung an die NFκB-Sonden, jedoch war in den Reporter-Gen-Assays (Abbildung 11A) kein Einfluss von Slit3 auf die Promotoraktivität messbar. Im Fall von CREB war in den Reporter-Gen-Assays (Abbildung 11B) und im EMSA (Abbildung 12B) kein eindeutiger Effekt durch Slit3-Behandlung zu erkennen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass CREB und NFκB eine Rolle bei der Signaltransduktion nach Slit3 an Robo3 spielen, weil nach Slit3 Behandlung in beiden Assays entweder kein Effekt sichtbar war oder die Ergebnisse der beiden Assays nicht konsistent waren. Zusätzlich wurde die Rolle von β-Catenin hinsichtlich der Robo/Slit-Signaltransduktion untersucht. Hier zeigten Reporter-Gen-Assays

keinen Effekt durch Slit3-Behandlung (Abbildung 11C). Entgegen der in der Literatur beschriebenen verstärkten Expression von  $\beta$ -Catenin in RASF im Vergleich mit OASF [73], zeigte sich bei Immunfluoreszenz-Färbungen in RASF in früher Passage, dass sehr wenig bis kein  $\beta$ -Catenin im Cytosol und Nucleus der gefärbten Zellen zu finden war, weshalb auch in den Reportergen-Assays keine veränderte Genexpression sichtbar sein konnte (Abbildung 12D). Allein die AP-1 Aktivität wurde durch Slit3 Bindung an den Robo3 Rezeptor konstant in den Reportergen-Assays und EMSAs verringert (Abbildung 11D und Abbildung 12C). Wong et al. zeigten 2001 bereits, dass die Slit-Robo-Bindung zu einer verstärkten Interaktion von srGAPs und Robo führt, wodurch es zu einer Inaktivierung von Cdc42 kommt [56]. Da die Aktivierung der Rho-GTPasen zu einer Aktivierung von AP-1 führt [165], würde die Inaktivierung von Cdc42 zu einer geringeren AP-1 Aktivität führen. Dies wiederum hat die Stabilisierung des Zytoskeletts und eine geringere Migration der Zellen zur Folge [163]. Dieser Mechanismus stellt auch in RASF eine plausible Erklärung für die Inhibition der Migration durch Slit3 dar.

AP-1 ist somit ein potentieller Kandidat für die Signalweiterleitung nach der Robo-Slit Bindung. Da bereits beschrieben wurde, dass die Aktivierung von Rho-GTPasen wie Cdc42 und Rho die AP-1 Aktivität steigern und diese GTPasen auch bei der neuronalen Migration nach der Slit-Robo-Bindung eine Rolle spielen [56,165], ist davon auszugehen, dass die Signalweiterleitung nach der Bindung von Slit3 an Robo3 in RASF über die Inaktivierung der Rho-GTPasen und AP-1 zu einer Inhibition der Migration führt.

## **5.2. hsa-miR-188-5p reguliert die Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 in aggressiven RASF**

In diesem Teil der Arbeit wurde die Regulation der Expression der Repellent-Rezeptoren Robo3, Unc5B und Unc5C untersucht. Da alle drei Rezeptoren in RASF in frühen Passagen stärker exprimiert werden als in RASF in späten Passagen oder nSF, wurde hierbei die Möglichkeit einer gemeinsamen Regulation analysiert [28,29]. Der Fokus lag dabei auf miRs, welche eine gemeinsame Expressionregulation der drei Rezeptoren ermöglichen könnten. Ziel war deshalb die Identifikation einer miR, die im 3'UTR der Rezeptoren binden kann. Zudem galt es herauszufinden, ob auch andere Zielgene dieser miR in RASF fehlreguliert sind.

Es wurde für mehrere miRs gezeigt, dass sie in RA Patienten fehlreguliert sind. So sind beispielsweise hsa-miR-146a, hsa-miR-155 und hsa-miR-223 als in RA fehlreguliert

beschrieben (s. 1.2.4.3) [82]. Auch für andere Erkrankungen wurde bereits gezeigt, dass das Expressionsmuster von miRs durch Cytokine verändert wird, was dann eine verstärkte oder verminderte Expression der Zielgene zur Folge hat. Bei Leberfibrose kommt es zum Beispiel zur Fehlregulation von hsa-miR-29. Die miR wird in entzündlichem Milieu durch Cytokine herabreguliert, was zu einer verstärkten Expression von Col1A1 führt [166]. Die Regulation, der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren (Robo3, Unc5B und Unc5C) über eine miR, setzt eine De-Regulation der miR bei RA voraus. Robo3, Unc5B und Unc5C weisen eine Bindestelle für hsa-miR-188-5p im 3'UTR auf (s. 4.2). Speziell für diese miR wurde publiziert, dass sie in der glatten Muskulatur der Atemwege durch Cytokin-Behandlung herabreguliert wird [142]. Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Hinweise für eine Beteiligung von hsa-miR-188-5p an der veränderten Genexpression in RASF. So konnte hier erstmals gezeigt werden, dass hsa-miR-188-5p in RASF invers zu den verstärkt exprimierten Rezeptoren Robo3, Unc5B und Unc5C reguliert ist. Allerdings wurde die Expression der miR durch IL-1 $\beta$  Behandlung in RASF nicht beeinflusst (Abbildung 14C). Es ist jedoch möglich, dass die Expression von hsa-miR-188-5p in RASF nicht allein durch IL-1 $\beta$  beeinflusst wird, sondern weitere Stimuli, die *in vivo* vorhanden sind, benötigt werden. Außerdem wird die Expression von Robo3, Unc5B und Unc5C nur schwach durch hsa-miR-188-5p beeinflusst. Die Rezeptoren werden somit vermutlich nicht allein über die Bindung dieser miR reguliert.

Aufgrund der Tatsache, dass hsa-miR-188-5p unabhängig davon aber eine eindeutige Regulation in RASF aufweist (Abbildung 14A), wurde ein *GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array* (Affymetrix) mit hsa-miR-188-5p oder anti-miR-188-5p transfizierten RASF durchgeführt und die regulierten Gene genauer untersucht. Interessanterweise besaßen nicht alle der regulierten Gene eine Bindestelle für hsa-miR-188-5p. Demzufolge können manche dieser Gene nur indirekt über die veränderte Expression anderer Gene reguliert sein. Die zur Bestätigung mittels qRT-PCR ausgewählten Gene waren *KIAA1199*, *ITGA7*, *GREM2*, *Col12A1* und *Col1A1A1*, von welchen nur *KIAA1199*, *ITGA7* und *GREM2* eine hsa-miR-188-5p Bindestelle aufweisen. Die miR Bindestellen liegen bei diesen drei mRNAs im 3'UTR. Die fünf Gene wurden nicht nur aufgrund ihrer vergleichsweise starken Regulation ausgewählt, sondern auch wegen ihrer bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen. Nachdem keine Regulation der Rezeptoren *Robo3*, *Unc5B* und *Unc5C* gezeigt werden konnte, wurden in nachfolgenden Experimenten auch *ITGA7* und *GREM2* als durch hsa-miR-188-5p regulierte Gene ausgeschlossen (Abbildung 18A). Auch für diese Gene konnte keine eindeutige Regulation durch hsa-miR-188-5p gezeigt werden.

Jedoch wird die Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 signifikant durch die hsa-miR-188-5p herabreguliert (Abbildung 18A). Col1A1 und Col12A1 sind Bestandteile der ECM. Während Col1A1 zu den fibrillären Kollagenen gehört, zählt Col12A1 zu den *fibril-associated collagens with interrupted triple helices* (FACIT). Col1A1 liegt in der ECM als eine Triple-Helix aus zwei Col1A1 Strängen und einer Col1A2 Kette vor und ist das häufigste Kollagen in Vertebraten [167]. Col1A1 ist Bestandteil der ECM in Haut, Knochen, Bändern sowie Sehnen und es wurde bereits eine Zunahme der Expression von Col1A1 in Zusammenhang mit Inflammation und Fibrose beschrieben [166]. Col12A1 hingegen bildet Homotrimere aus drei Col12A1 Strängen, wird von Fibroblasten synthetisiert und Co-lokalisiert mit Col1 [168]. Die Funktion dieser Co-Lokalisation ist allerdings unbekannt. Es wird aber vermutet, dass Col12A1 die Interaktion von Col1A1 mit der restlichen ECM beeinflusst und somit die Matriceigenschaften verändert [169]. Das letzte ausgewählte und signifikant regulierte Protein war KIAA1199. KIAA1199 wurde als eine von 1.087 langen cDNAs identifiziert, welche für Proteine mit großer molekularer Masse kodieren und durchschnittlich 872 Aminosäuren lang sind [170]. Mutationsstudien legten nahe, dass die KIAA1199 Expression für ein normales Gehör notwendig ist [171]. Weitere Untersuchungen zeigten auch eine Rolle von KIAA1199 bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten [172,173]. Erst 2013 wurde eine weitere Funktion von KIAA1199 publiziert. Yoshida et al. beschrieben KIAA1199 als Hyaluronsäure-depolymerisierendes Protein, einhergehend mit einer potentiell wichtigen Rolle bei der Entstehung und Progression von RA [174]. Durch die Depolymerisierung von Hyaluronsäure kommt es zum Abbau von Knorpel, weil Hyaluronsäure ein wichtiger Bestandteil der ECM ist und dort zu Querverknüpfungen von Aggrecan und somit zur Stabilität und Flexibilität von Knorpel beiträgt [14]. Über die Regulation der Expression von KIAA1199 in RA ist bisher nichts bekannt.

Aufgrund der bisherigen Literatur können diese drei im *Array* und den nachfolgenden Analysen regulierten Gene grundsätzlich mit Entzündung, ECM oder Arthritis in Verbindung gebracht werden und könnten dadurch an der Entstehung oder Progression von RA beteiligt sein. KIAA1199 wies in den durchgeführten Experimenten die stärkste Regulation auf mRNA Ebene auf, welche zusätzlich mittels Western Blot auf Proteinebene bestätigt werden konnte (Abbildung 18). Da bereits beschrieben wurde, dass die verstärkte KIAA1199 Expression in RASF zum Knorpelabbau durch diese Zellen beiträgt [174], stellt die hsa-miR-188-5p eine potentielle Möglichkeit zur Expressionsregulation des Proteins dar. In der Literatur wird KIAA1199 auch in Zusammenhang mit Progression von verschiedenen Tumoren gebracht, z.B. durch Beeinflussung der Migration oder der zellulären Mortalität [175,176]. Es wurde diesbezüglich gezeigt, dass KIAA1199 in vielen Tumoren verstärkt exprimiert wird und dass ein KIAA1199 *knock-down* in Tumorzellen zu

einer geringeren Invasion führt, während eine Überexpression in minimal invasiven Zellen zu einer Erhöhung des invasiven Potentials führt [172].

Zusammenfassend konnte in diesem Projektteil gezeigt werden, dass die Rezeptoren Robo3, Unc5B und Unc5C, die ursprünglich zur Identifikation der in RASF de-regulierten hsa-miR-188-5p geführt haben, nicht durch diese reguliert werden. Allerdings konnte mittels eines cDNA-Arrays gezeigt werden, dass die mRNA Expression von KIAA1199, Col1A1 und Col12A1 durch hsa-miR-188-5p reguliert werden. Da KIAA1199 in RASF stärker exprimiert wird als in nSF, könnte in diesen Zellen eine erhöhte KIAA1199 Expression zu einer verstärkten Migration führen und somit die Aggressivität beeinflussen. KIAA1199 könnte damit in der Prognostik ein Indikator für RA sein und bietet darüber hinaus über die Regulation durch hsa-miR-188-5p einen möglichen Therapieansatz für die Erkrankung. Dies muss jedoch in weiterführenden Analysen untersucht werden.

### **5.3. Die genetische Variation rs11564299 führt zur Bindung von hnRNP K an den N-Cadherin Promotor**

In Expressionstudien in unserer Arbeitsgruppe fiel auf, dass RASF im Vergleich mit nSF eine erhöhte N-Cadherin Expression aufweisen. Diese erhöhte Expression gleicht sich auch über die Passagierung der Zellen in Kultur nicht wieder an das normale Level an, wie es beispielsweise bei Robo3 in RASF der Fall ist [28]. Eine Hypothese war, dass Polymorphismen im *CDH2* Promotor, die veränderte N-Cadherin Expression bedingen. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Polymorphismen im Promotor eines Gens für eine veränderte Genexpression verantwortlich sein können. So ändern beispielsweise SNPs in der Promotorregion von *RUNX2* die Expression des Proteins durch veränderte Transkriptionsfaktor-Bindung [145]. Auch für verschiedene Cadherine wurde bereits gezeigt, dass SNPs in der Promotorregion die Expression dieser Cadherine beeinflussen [177]. Des Weiteren wurde in vielen Studien der Einfluss genetischer Variationen im Promotor verschiedener Gene auf die Suszeptibilität gegenüber Erkrankungen beschrieben (s. 1.2.4 und 1.3.2) [178,179]. Ziel dieses Projektteils war es, herauszufinden, ob ein oder mehrere SNPs im *CDH2* Promotor mit einem veränderten RA-Risiko assoziiert sind und in welcher Weise diese dann das N-Cadherin Expressionslevel beeinflussen. Da die Assoziation eines SNPs mit der einer erhöhten N-Cadherin Expression und des RA-Risikos jedoch nicht gefunden wurde, sondern die Assoziation mit OA, wurde die Funktion des assoziierten SNPs und dessen Bedeutung in OASF untersucht

Zur Untersuchung der Hypothese wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stark (Institut für Epidemiologie und Präventivmedizin, Universität Regensburg) der Promotor des *CDH2* Gens auf SNPs hin analysiert. Dabei zeigte sich, dass verschiedene SNPs im Promotor dieses Gens existieren, jedoch nur rs11564299 (A→G) eine signifikante Assoziation mit OA aufweist. Das seltene G-Allel des SNPs korreliert in OASF mit einer erhöhten Expression von N-Cadherin. Dieses Ergebnis kann die Funktion der generell erhöhten N-Cadherin Expression in OASF im Vergleich zu nSF nicht erklären. Jedoch könnte die verstärkte N-Cadherin Expression eine Art Schutzmechanismus der Zellen darstellen. Etwas Vergleichbares wurde bereits für nicht-Myozyten im Herz gezeigt, welche *placental growth factor* (PGF) bei koronaren Herzkrankheiten verstärkt exprimieren und während der Hypertrophie Angiogenese und Fibroblastenproliferation fördern um die Herzfunktion zu gewährleisten [180]. Damit stellt die erhöhte Genexpression hier keine Ursache der Krankheit dar, sondern ist eine Art Schutzreaktion der Zellen auf einen pathologischen Stimulus. Dies könnte auch die generell erhöhte N-Cadherin Expression in OASF und gleichzeitig den protektiven Effekt der noch höheren Expression durch rs11564299 erklären. Die Funktion der hohen N-Cadherin Expressionslevel kann im Fall von OASF die Veränderung der Zell-Zell-Adhäsion sein. Eine veränderte N-Cadherin Expression kann zu Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte und somit zu Veränderungen des Zellaufbaus und der Zellmotilität führen [181,182]. Für Gliomzellen und Zellen der glatten arteriellen Muskulatur wurde beispielsweise gezeigt, dass die N-Cadherin Expressionslevel die Migrationsfähigkeit der Zellen beeinflussen [183,184]. So ist dieses Zelladhäsionsmolekül in den migrierenden Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen herabreguliert, was zu der verstärkten Migration führt. Da OASF im Vergleich zu nSF verstärkt migrieren, könnte der protektive Effekt von rs11564299 durch die stärkere Expression von N-Cadherin und der daraus folgenden verminderten Migration der Zellen zustande kommen [29].

Auf diesen Ergebnissen basierend, wurde die Hypothese, dass im Fall von rs11564299 durch das seltene Allel eine Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor entsteht, untersucht. Durch diese neue Bindestelle kann es zu der verstärkten Expression von N-Cadherin in OASF mit der seltenen SNP Variante kommen. Schon der Austausch einer einzelnen Base in der DNA kann zu einer veränderten Transkriptionsfaktor-Bindung führen [185]. Mithilfe der SNPInspector Software (Genomatix Software GmbH, München) wurde eine ETS 1 Bindestelle identifiziert, die durch die seltene G-Variante von rs11564299 entsteht (Abbildung 20A). Allerdings wies der *in silico* vorhergesagte Transkriptionsfaktor im ELISA keine differentielle Bindung an die eine oder andere Variante auf. Dass im Fall von ETS 1 kein Unterschied in der Bindekapazität an eine der

Varianten zu sehen war, lässt sich damit erklären, dass das Kernmotiv für die ETS 1 Bindung (GGAA/T), entgegen der Ergebnisse der SNPInspector Software, auch ohne den SNP vorhanden ist. Somit scheint rs11564299 die Affinität lediglich gering ändern zu können, was mit den durchgeführten Methoden möglicherweise nicht mehr messbar war. ETS 1 wurde damit als verantwortlicher Transkriptionsfaktor ausgeschlossen.

Zur Identifikation des gesuchten Faktors wurde schließlich ein *pull-down* mit Variantenspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt und per LC-MS in Zusammenarbeit mit der AG Oefner (Prof. Dr. Oefner, Institut für Funktionelle Genomik, Universität Regensburg) analysiert. Dadurch konnten hnRNP K, PCBP1 und PCBP2 als differentiell bindende Faktoren identifiziert werden. Von diesen Proteinen wurde hnRNP K für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt. HnRNP K ist ein 65 kDa großes Protein, das strukturell mit vier anderen Poly(C)-bindenden Proteinen (PCBPs) verwandt ist. Die Proteine beinhalten alle drei K-Homologie (KH) Domänen, die für RNA- und DNA-Bindung verantwortlich sind [186]. Außerdem enthält hnRNP K ein Kernlokalisierungssignal, sowie eine Kerntransportdomäne [187,187,188]. HnRNP K wurde sowohl als Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA-bindend [189,190], als auch RNA-bindend beschrieben [191] und kann als Transkriptionsfaktor agieren [189]. Interessanterweise wurde hnRNP K nicht nur im Nucleus gefunden, sondern auch im Cytoplasma und in Mitochondrien [188,192]. Für die verschiedenen Kompartimente wurden neben der DNA-/RNA-Bindekapazität auch andere Funktionen von hnRNP K beschrieben. Inoue et al. identifizierten hnRNP K als Mediator zellulärer Chemotaxis [193]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein *knock-down* von hnRNP K in einer Fibrosarkomzelllinie zu geringerer Metastasierung nach Transplantation in Nacktmäusen führt [194]. Außerdem wurde gezeigt, dass ein *knock-down* von hnRNP K das Auswachsen von Neuronen inhibiert, was ebenfalls für eine Regulation der Migrationsfähigkeit von Zellen spricht [195]. HnRNP K wurde auch als Teil von termed (tr) eRNA Komplexen identifiziert [196]. TreRNA Komplexe kontrollieren die Genexpression durch Verstärkung der Expression benachbarter Gene im Nucleus [197]. Durch geringere Expression von hnRNP K wird dieser Komplex nicht mehr gebildet. Dadurch wird die Expression, der durch treRNA-Komplexe regulierten Proteine inhibiert, womit es wiederum zur Inhibition der Migration kommen kann [196]. Eine Rolle bei RA oder OA konnte bisher nicht gezeigt werden.

Diese Arbeit liefert den ersten Hinweis, dass hnRNP K an der Regulation der Genexpression in OASF beteiligt sein könnte. Aufgrund der bisherigen Daten zu hnRNP K war dieses Protein ein interessanter Kandidat für weitergehende Untersuchungen. Mit Antikörpern gegen hnRNP K konnte im ELISA, anders als im Fall von ETS 1, die

differentielle Bindung an die seltene Variante von rs11564299 gezeigt werden. Zum Beweis der Bindung von hnRNP K an Chromatin im Zellkern wurde schließlich eine ChIP durchgeführt. Für die ChIP wurden die Zelllinien HSE und K4Im verwendet, da HSE Zellen heterozygot (A/G) für rs11564299 sind, während K4Im homozygot (A/A) für das häufige Allel sind. Nur in HSE war die Bindung an Chromatin nachzuweisen, was den Beweis lieferte, dass hnRNP K auch im Zellkern nur an die seltene Variante bindet. hnRNP K scheint damit der gesuchte Faktor zu sein und kann potentiell zu der erhöhten N-Cadherin Expression beitragen. Bei der homozygoten (A/A) Zelllinie K4Im war in der ChIP überraschenderweise eine Bindung von ETS 1 an den *GAPDH* Promotor zu sehen. Dies konnte nach Sequenzierung des *GAPDH* Promotorteils aus der ChIP damit erklärt werden, dass dieser Promotor in K4Im eine Mutation aufwies, durch welche eine neue ETS 1 Bindestelle generiert wurde. Diese Mutation hat jedoch keinen Einfluss auf die hnRNP K Bindung an den *CDH2* Promotor.

Einschränkungen der *case-control* Studie sind: (1) Da keine Wiederholungsstudie für die genetische Assoziation vorhanden ist, besteht die Möglichkeit, dass die Assoziation von rs11564299 mit OA falsch positiv ist. Allerdings wird das Ergebnis durch die Korrelation mit der veränderten N-Cadherin Expression gestützt. (2) Die Stärke des Effekts des seltenen Allels auf OA ist klein (OR = 0,63), jedoch wurde bereits früher gezeigt, dass Assoziationen von häufigen Varianten meistens einen OR von unter 1,5 aufweisen [198]. (3) Bei den Kontrollen wurden zwar arthritische und degenerative Gelenkerkrankungen zum Zeitpunkt der Studie ausgeschlossen, allerdings kann der prä-klinische Zustand die Ergebnisse beeinflussen. (4) Aufgrund der Markerauswahl wurde nicht das gesamte *CHD2* Gen auf SNPs hin untersucht. In weiteren Untersuchungen sollten in Genomweiten Assoziationsstudien die Daten für das gesamte Gen eingeschlossen werden. Außerdem sollten außer Fibroblasten auch andere, an OA beteiligte Zelltypen, in die Analyse aufgenommen werden, sowie ein möglicher Einfluss von anderen bekannten Risikofaktoren wie *body-mass* Index, mechanischer Stress oder Mikroverletzungen des Gelenks, untersucht werden.

Zusammengefasst konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit der SNP rs11564299 als ein Risikofaktor für OA identifiziert und mit einer erhöhten Expression von N-Cadherin korreliert werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass hnRNP K als Transkriptionsfaktor selektiv an das seltene Allel von rs11564299 binden kann und dadurch mitverantwortlich für die veränderte N-Cadherin Genexpression ist. Der genaue Einfluss von N-Cadherin auf die Entstehung und Progression von OA muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 6. Eigene Publikationen

T. Schubert, A.E. Denk, **A. Ruedel**, S. Kaufmann, E. Hustert, P. Bastone, A.K. Bosserhoff, Fragments of SLIT3 inhibit cellular migration, *Int. J. Mol. Med.* 30 (2012) 1133–1137.

**A. Ruedel**, K. Stark, S. Kaufmann, R. Bauer, J. Reinders, J. Rovensky, S. Blazickova, P.J. Oefner, A.K. Bosserhoff, N-cadherin promoter polymorphisms and risk of osteoarthritis, *FASEB J* (2013).

**A. Ruedel**, S. Hofmeister, A.-K. Bosserhoff, Development of a model system to analyze chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Int J Clin Exp Pathol* 6 (2013) 3042–304.

### Buchbeiträge:

**A. Ruedel**, A.K. Bosserhoff. Transfection methods. *Methods Navigator; Cell Biology Protocols Module*, Editor: P. Michael Conn, Elsevier (2012). *In press*.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Robert Koch-Institut (Hrsg), Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010", Robert-Koch-Inst, Berlin, 2012.
- [2] S. Söder, T. Aigner, Arthrose, Pathologe 32 (2011) 183–192.
- [3] R. Tuli, Transforming Growth Factor- $\beta$ -mediated Chondrogenesis of Human Mesenchymal Progenitor Cells Involves N-cadherin and Mitogen-activated Protein Kinase and Wnt Signaling Cross-talk, Journal of Biological Chemistry 278 (2003) 41227–41236.
- [4] M.J. Zuscik, M.J. Hilton, X. Zhang, Di Chen, R.J. O'Keefe, Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress, J. Clin. Invest. 118 (2008) 429–438.
- [5] P.M. van der Kraan, E.N. Blaney Davidson, A. Blom, van den Berg, W.B., TGF- $\beta$  signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads, Osteoarthritis Cartilage 17 (2009) 1539–1545.
- [6] S.A. Oberlender, R.S. Tuan, Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis, Development 120 (1994) 177–187.
- [7] K. Oka, S. Oka, R. Hosokawa, P. Bringas, H.C. Brockhoff, K. Nonaka, Y. Chai, TGF- $\beta$  mediated Dlx5 signaling plays a crucial role in osteo-chondroprogenitor cell lineage determination during mandible development, Developmental Biology 321 (2008) 303–309.
- [8] H. Akiyama, M.-C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl, B. de Crombrughe, The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6, Genes Dev 16 (2002) 2813–2828.
- [9] R. Ballock, A. Heydemann, L.M. Wakefield, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, TGF- $\beta$ 1 Prevents Hypertrophy of Epiphyseal Chondrocytes: Regulation of Gene Expression for Cartilage Matrix Proteins and Metalloproteases, Developmental Biology 158 (1993) 414–429.
- [10] C.M. Ferguson, Smad2 and 3 Mediate Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Inhibition of Chondrocyte Maturation, Endocrinology 141 (2000) 4728–4735.
- [11] C.D. Grimsrud, P.R. Romano, M. D'Souza, J.E. Puzas, P.R. Reynolds, R.N. Rosier, R.J. O'Keefe, BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation, J Bone Miner Res 14 (1999) 475–482.

- [12] G. Shen, The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage, *Orthod Craniofac Res* 8 (2005) 11–17.
- [13] D. Eyre, Collagen of articular cartilage, *Arthritis Res.* 4 (2002) 30–35.
- [14] C. Kiani, L. Chen, Y.J. Wu, A.J. Yee, B.B. Yang, Structure and function of aggrecan, *Cell Res* 12 (2002) 19–32.
- [15] A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function, *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* 1 (2009) 461–468.
- [16] P.M. van der Kraan, E.N. Blaney Davidson, W.B. van den Berg, A role for age-related changes in TGF $\beta$  signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis, *Arthritis Research & Therapy* 12 (2010) 201.
- [17] E.H. Noss, M.B. Brenner, The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis, *Immunol. Rev.* 223 (2008) 252–270.
- [18] C.S. Bonnet, Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation, *Rheumatology* 44 (2005) 7–16.
- [19] B.J. Harrison, A.J. Silman, N.J. Wiles, D.G. Scott, D.P. Symmons, The association of cigarette smoking with disease outcome in patients with early inflammatory polyarthritis, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 323–330.
- [20] D.P. Symmons, C.R. Bankhead, B.J. Harrison, P. Brennan, E.M. Barrett, D.G. Scott, A.J. Silman, Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1955–1961.
- [21] M. Cutolo, R.H. Straub, Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Neuroimmunomodulation* 13 (2006) 277–282.
- [22] G.S. Firestein, Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature* 423 (2003) 356–361.
- [23] G.T. Nepom, P. Byers, C. Seyfried, L.A. Healey, K.R. Wilske, D. Stage, B.S. Nepom, HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes, *Arthritis Rheum.* 32 (1989) 15–21.
- [24] C.M. Weyand, J.J. Goronzy, Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA polymorphisms in phenotypic variants of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res* 2 (2000) 212–216.
- [25] V. Strand, R. Kimberly, J.D. Isaacs, Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions, *Nat Rev Drug Discov* 6 (2007) 75–92.

- [26] U. Müller-Ladner, C. Ospelt, S. Gay, O. Distler, T. Pap, Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts, *Arthritis Res. Ther.* 9 (2007) 223.
- [27] E. Neumann, S. Lefèvre, B. Zimmermann, S. Gay, U. Müller-Ladner, Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts, *Trends in Molecular Medicine* 16 (2010) 458–468.
- [28] A.E. Denk, S. Kaufmann, K. Stark, J. Schedel, T. Lowin, T. Schubert, A.K. Bosserhoff, Slit3 inhibits Robo3-induced invasion of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010) R45.
- [29] T. Schubert, A. Denk, U. Magdefrau, S. Kaufmann, P. Bastone, T. Lowin, J. Schedel, A.K. Bosserhoff, Role of the netrin system of repellent factors on synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Int J Immunopathol Pharmacol* 22 (2009) 715–722.
- [30] C. Sabatier, A.S. Plump, Le Ma, K. Brose, A. Tamada, F. Murakami, E.Y.-H.P. Lee, M. Tessier-Lavigne, The divergent Robo family protein rig-1/Robo3 is a negative regulator of slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons, *Cell* 117 (2004) 157–169.
- [31] K.T. Nguyen Ba-Charvet, K. Brose, L. Ma, K.H. Wang, V. Marillat, C. Sotelo, M. Tessier-Lavigne, A. Chédotal, Diversity and specificity of actions of Slit2 proteolytic fragments in axon guidance, *J. Neurosci.* 21 (2001) 4281–4289.
- [32] T. Kidd, K.S. Bland, C.S. Goodman, Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in *Drosophila*, *Cell* 96 (1999) 785–794.
- [33] K. Brose, K.S. Bland, K.H. Wang, D. Arnott, W. Henzel, C.S. Goodman, M. Tessier-Lavigne, T. Kidd, Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance, *Cell* 96 (1999) 795-806.
- [34] A. Itoh, T. Miyabayashi, M. Ohno, S. Sakano, Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system, *Molecular Brain Research* 62 (1998) 175–186.
- [35] J.M. Rothberg, J.R. Jacobs, C.S. Goodman, S. Artavanis-Tsakonas, slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains, *Genes & Development* 4 (1990) 2169–2187.
- [36] J.A. Howitt, N.J. Clout, E. Hohenester, Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit, *EMBO J* 23 (2004) 4406–4412.

- [37] K.H. Wang, K. Brose, D. Arnott, T. Kidd, C.S. Goodman, W. Henzel, M. Tessier-Lavigne, Biochemical Purification of a Mammalian Slit Protein as a Positive Regulator of Sensory Axon Elongation and Branching, *Cell* 96 (1999) 771–784.
- [38] M. Seeger, G. Tear, D. Ferres-Marco, C.S. Goodman, Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline, *Neuron* 10 (1993) 409–426.
- [39] D. Bagnard, *Axon Growth and Guidance*, Springer Science + Business Media, 2008.
- [40] J.C. Jen, Mutations in a Human ROBO Gene Disrupt Hindbrain Axon Pathway Crossing and Morphogenesis, *Science* 304 (2004) 1509–1513.
- [41] T. Kidd, K. Brose, K.J. Mitchell, R.D. Fetter, M. Tessier-Lavigne, C.S. Goodman, G. Tear, Roundabout Controls Axon Crossing of the CNS Midline and Defines a Novel Subfamily of Evolutionarily Conserved Guidance Receptors, *Cell* 92 (1998) 205–215.
- [42] E. Stein, Hierarchical Organization of Guidance Receptors: Silencing of Netrin Attraction by Slit Through a Robo/DCC Receptor Complex, *Science* 291 (2001) 1928–1938.
- [43] G.J. Bashaw, T. Kidd, D. Murray, T. Pawson, C.S. Goodman, Repulsive Axon Guidance, *Cell* 101 (2000) 703–715.
- [44] Z. Liu, K. Patel, H. Schmidt, W. Andrews, A. Pini, V. Sundaresan, Extracellular Ig domains 1 and 2 of Robo are important for ligand (Slit) binding, *Molecular and Cellular Neuroscience* 26 (2004) 232–240.
- [45] B. Hivert, Robo1 and Robo2 Are Homophilic Binding Molecules That Promote Axonal Growth, *Molecular and Cellular Neuroscience* 21 (2002) 534–545.
- [46] J. Rhee, N.S. Mahfooz, C. Arregui, J. Lilien, J. Balsamo, M.F. VanBerkum, Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 798–805.
- [47] K. Bauer, A. Dowejko, A.-K. Bosserhoff, T.E. Reichert, R. Bauer, Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line, *Carcinogenesis* 32 (2011) 935–943.
- [48] L. Camurri, E. Mambetisaeva, D. Davies, J. Parnavelas, V. Sundaresan, W. Andrews, Evidence for the existence of two Robo3 isoforms with divergent biochemical properties, *Molecular and Cellular Neuroscience* 30 (2005) 485–493.
- [49] A.K. Challa, M.L. McWhorter, C. Wang, M.A. Seeger, C.E. Beattie, Robo3 isoforms have distinct roles during zebrafish development, *Mechanisms of Development* 122 (2005) 1073–1086.

- [50] C. Morlot, N.M. Thielens, Ravelli, R. B. G., W. Hemrika, R.A. Romijn, P. Gros, S. Cusack, A.A. McCarthy, Structural insights into the Slit-Robo complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007) 14923–14928.
- [51] F.B. Gertler, A.R. Comer, J.L. Juang, S.M. Ahern, M.J. Clark, E.C. Liebl, F.M. Hoffmann, enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties, *Genes & Development* 9 (1995) 521–533.
- [52] M. Reinhard, K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B.M. Jockusch, U. Walter, The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins, *EMBO J.* 14 (1995) 1583–1589.
- [53] F.B. Gertler, K. Niebuhr, M. Reinhard, J. Wehland, P. Soriano, Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics, *Cell* 87 (1996) 227–239.
- [54] C. Bachmann, L. Fischer, U. Walter, M. Reinhard, The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 23549–23557.
- [55] L.M. Lanier, M.A. Gates, W. Witke, A.S. Menzies, A.M. Wehman, J.D. Macklis, D. Kwiatkowski, P. Soriano, F.B. Gertler, Mena is required for neurulation and commissure formation, *Neuron* 22 (1999) 313–325.
- [56] K. Wong, X.R. Ren, Y.Z. Huang, Y. Xie, G. Liu, H. Saito, H. Tang, L. Wen, S.M. Brady-Kalnay, L. Mei, J.Y. Wu, W.C. Xiong, Y. Rao, Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway, *Cell* 107 (2001) 209–221.
- [57] G.M. Cooper, *The Cell. A molecular approach*, 2nd ed., ASM Press; Sinauer Associates, Washington, D.C, Sunderland (Mass.), op. 2000.
- [58] B.D. Dynlacht, Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle, *Nature* 389 (1997) 149–152.
- [59] Y. Ghavi-Helm, E.E.M. Furlong, Analyzing Transcription Factor Occupancy During Embryo Development Using ChIP-seq, in: B. Deplancke, N. Gheldof (Eds.), *Methods in Molecular Biology, Gene Regulatory Networks*, Humana Press, Totowa, NJ, 2012, pp. 229–245.
- [60] S.J. Furney, D.G. Higgins, C.A. Ouzounis, N. Lopez-Bigas, Structural and functional properties of genes involved in human cancer, *BMC Genomics* 7 (2006) 3.
- [61] N.M. Luscombe, S.E. Austin, H.M. Berman, J.M. Thornton, An overview of the structures of protein-DNA complexes, *Genome Biol* 1 (2000) REVIEWS001.

- [62] H. Asahara, K. Fujisawa, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Maeda, M. Asanuma, N. Ogawa, H. Inoue, T. Sumida, K. Nishioka, Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium, *Arthritis Rheum* 40 (1997) 912–918.
- [63] P. Borden, R.A. Heller, Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7 (1997) 159–178.
- [64] R. Chiu, W.J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter, M. Karin, The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes, *Cell* 54 (1988) 541–552.
- [65] D.R. Cohen, P.C. Ferreira, R. Gentz, Franza, B R Jr, T. Curran, The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes, *Genes Dev* 3 (1989) 173-184.
- [66] L. Steinmuller, G. Cibelli, J.R. Moll, C. Vinson, G. Thiel, Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities, *Biochem J* 360 (2001) 599–607.
- [67] T.E. Meyer, J.F. Habener, Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element Binding Protein (CREB) and Related Transcription-Activating Deoxyribonucleic Acid-Binding Proteins, *Endocrine Reviews* 14 (1993) 269–290.
- [68] J.C. Chrivia, R.P. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M.R. Montminy, R.H. Goodman, Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature* 365 (1993) 855–859.
- [69] G.A. Gonzalez, M.R. Montminy, Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133, *Cell* 59 (1989) 675–680.
- [70] Y. Takeba, N. Suzuki, S. Wakisaka, M. Takeno, A. Kaneko, T. Asai, T. Sakane, Involvement of cAMP responsive element binding protein (CREB) in the synovial cell hyperfunction in patients with rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol* 18 (2000) 47–55.
- [71] M.P. Vincenti, C.I. Coon, C.E. Brinckerhoff, Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 41 (1998) 1987–1994.
- [72] A. Oeckinghaus, S. Ghosh, The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (2009) a000034.
- [73] C.Y. Xiao, Y.F. Pan, X.H. Guo, Y.Q. Wu, J.R. Gu, D.Z. Cai, Expression of beta-catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, *Scand J Rheumatol* 40 (2011) 26–33.

- [74] H. Oda, M. Takeichi, Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction, *J. Cell Biol.* 193 (2011) 1137–1146.
- [75] J. Behrens, von Kries, J P, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, W. Birchmeier, Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature* 382 (1996) 638–642.
- [76] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, Gabor Miklos, G L, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M.L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y.H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N.N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J.F. Abril, R. Guigó, M.J. Campbell, K.V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y.H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C.

- Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh, X. Zhu, The sequence of the human genome, *Science* 291 (2001) 1304–1351.
- [77] W.G. Feero, A.E. Guttmacher, T.A. Manolio, Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease, *N Engl J Med* 363 (2010) 166–176.
- [78] A. Vazquez, L.F. Grochola, E.E. Bond, A.J. Levine, H. Taubert, T.H. Muller, P. Wurl, G.L. Bond, Chemosensitivity Profiles Identify Polymorphisms in the p53 Network Genes 14-3-3 and CD44 That Affect Sarcoma Incidence and Survival, *Cancer Research* 70 (2010) 172–180.
- [79] A. Hinks, A. Barton, S. John, I. Bruce, C. Hawkins, Griffiths, Christopher E M, R. Donn, W. Thomson, A. Silman, J. Worthington, Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 1694–1699.
- [80] H. He, K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G.A. Calin, C.-G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R.T. Kloos, C.M. Croce, de la Chapelle, Albert, The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 19075–19080.
- [81] A. Care, D. Catalucci, F. Felicetti, D. Bonci, A. Addario, P. Gallo, M.-L. Bang, P. Segnalini, Y. Gu, N.D. Dalton, L. Elia, Latronico, Michael V G, M. Hoydal, C. Autore, M.A. Russo, Dorn, Gerald W 2nd, O. Ellingsen, P. Ruiz-Lozano, K.L. Peterson, C.M. Croce, C. Peschle, G. Condorelli, MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy, *Nat Med* 13 (2007) 613–618.
- [82] M. Ammari, C. Jorgensen, F. Apparailly, Impact of microRNAs on the understanding and treatment of rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 25 (2013) 225–233.
- [83] K. Murata, H. Yoshitomi, S. Tanida, M. Ishikawa, K. Nishitani, H. Ito, T. Nakamura, Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Arthritis Res Ther* 12 (2010) R86.
- [84] A. Rodriguez, E. Vigorito, S. Clare, M.V. Warren, P. Couttet, D.R. Soond, S. van Dongen, R.J. Grocock, P.P. Das, E.A. Miska, D. Vetrie, K. Okkenhaug, A.J.

- Enright, G. Dougan, M. Turner, A. Bradley, Requirement of bic/microRNA-155 for Normal Immune Function, *Science* 316 (2007) 608–611.
- [85] F. Olivieri, M.R. Rippo, A.D. Procopio, F. Fazioli, Circulating inflamma-miRs in aging and age-related diseases, *Front. Genet.* 4 (2013).
- [86] K.M. Pauley, M. Satoh, A.L. Chan, M.R. Bubb, W.H. Reeves, E.K.L. Chan, Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients, *Arthritis Research & Therapy* 10 (2008) R101.
- [87] S. Blüml, M. Bonelli, B. Niederreiter, A. Puchner, G. Mayr, S. Hayer, M.I. Koenders, van den Berg, Wim B., J. Smolen, K. Redlich, Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice, *Arthritis & Rheumatism* 63 (2011) 1281–1288.
- [88] G.S. Firestein, J.M. Alvaro-Gracia, R. Maki, J.M. Alvaro-Garcia, Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.* 144 (1990) 3347–3353.
- [89] F.M. Brennan, D. Chantry, A. Jackson, R. Maini, M. Feldmann, Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis, *Lancet* 2 (1989) 244–247.
- [90] R.O. Williams, M. Feldmann, R.N. Maini, Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 9784–9788.
- [91] B. Manger, Stellungnahme zur Präparatewahl bei TNF-Inhibitoren, *Z. Rheumatol. (Zeitschrift für Rheumatologie)* 64 (2005) 88–89.
- [92] B.N. Cronstein, Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis, *Pharmacological Reviews* 57 (2005) 163–172.
- [93] G.A. Wells, D. Haguenaer, B. Shea, M.E. Suarez-Almazor, V. Welch, P. Tugwell, J. Peterson, Cyclosporine for treating rheumatoid arthritis, in: , *Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 1996.
- [94] B. Manger, Überarbeitete Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, *Zeitschrift für Rheumatologie* 61 (2002) 694–697.
- [95] M. Brody, I. Bohm, R. Bauer, Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 31 (1993) 667–674.
- [96] E.P. Prens, T. van Joost, J.P. Hegmans, K. t Hooft-Benne, O.E. Ysselmuiden, R. Benner, Effects of cyclosporine on cytokines and cytokine receptors in psoriasis, *J Am Acad Dermatol* 33 (1995) 947–953.
- [97] European Medicines Agency, EMA. <http://www.ema.europa.eu/ema/>.

- [98] K.D. Brandt, M. Doherty, L.S. Lohmander, *Osteoarthritis*, 2nd ed., Oxford Univ. Press, Oxford, 2003.
- [99] D.T. Felson, Osteophytes and progression of knee osteoarthritis, *Rheumatology* 44 (2005) 100–104.
- [100] R.F. Loeser, S.R. Goldring, C.R. Scanzello, M.B. Goldring, Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ, *Arthritis Rheum* 64 (2012) 1697–1707.
- [101] B. Haraoui, J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, M.P. Faure, J. Martel-Pelletier, Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs, *Arthritis Rheum* 34 (1991) 153–163.
- [102] R. Rollín, F. Marco, J.A. Jover, J.A. García-Asenjo, L. Rodríguez, L. López-Durán, B. Fernández-Gutiérrez, Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls, *Rheumatol Int* 28 (2008) 757–764.
- [103] M. Rabenberg, *Arthrose*, Robert-Koch-Institut, Berlin, 2013.
- [104] J. Loughlin, The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status, *ERM* 7 (2005).
- [105] A.M. Valdes, D. McWilliams, N.K. Arden, S.A. Doherty, M. Wheeler, K.R. Muir, W. Zhang, C. Cooper, R.A. Maciewicz, M. Doherty, Involvement of different risk factors in clinically severe large joint osteoarthritis according to the presence of hand interphalangeal nodes, *Arthritis & Rheumatism* 62 (2010) 2688–2695.
- [106] E.N. Blaney Davidson, D.F.G. Remst, E.L. Vitters, H.M. van Beuningen, A.B. Blom, M.-J. Goumans, W.B. van den Berg, P.M. van der Kraan, Increase in ALK1/ALK5 Ratio as a Cause for Elevated MMP-13 Expression in Osteoarthritis in Humans and Mice, *The Journal of Immunology* 182 (2009) 7937–7945.
- [107] J. Kim, M. Xu, R. Xo, A. Mates, G.L. Wilson, A.W. Pearsall, V. Grishko, Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes, *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) 424–432.
- [108] W. Goodwin, D. McCabe, E. Sauter, E. Reese, M. Walter, J.A. Buckwalter, J.A. Martin, Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death, *J. Orthop. Res.* (2010) n/a.
- [109] H.A. Wieland, M. Michaelis, B.J. Kirschbaum, K.A. Rudolphi, Osteoarthritis — an untreatable disease?, *Nat Rev Drug Discov* 4 (2005) 331–344.
- [110] M. Takeichi, The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis, *Development* 102 (1988) 639–655.

- [111] L.D. Derycke, M.E. Bracke, N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling, *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 463–476.
- [112] A.K. Prakasam, V. Maruthamuthu, D.E. Leckband, Similarities between heterophilic and homophilic cadherin adhesion, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 15434–15439.
- [113] V. Noë, J. Willems, J. Vandekerckhove, F.V. Roy, E. Bruyneel, M. Mareel, Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides, *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 1) (1999) 127–135.
- [114] G. Berx, F. van Roy, Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2009) a003129.
- [115] G. Li, K. Satyamoorthy, M. Herlyn, N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells, *Cancer Res* 61 (2001) 3819-3825.
- [116] J. Arikath, L.F. Reichardt, Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity, *Trends Neurosci* 31 (2008) 487–494.
- [117] A. Bahloul, M.-C. Simmler, V. Michel, M. Leibovici, I. Perfettini, I. Roux, D. Weil, S. Nouaille, J. Zuo, C. Zadro, D. Licastro, P. Gasparini, P. Avan, J.-P. Hardelin, C. Petit, Vezatin, an integral membrane protein of adherens junctions, is required for the sound resilience of cochlear hair cells, *EMBO Mol Med* 1 (2009) 125–138.
- [118] E.H. Noss, S.K. Chang, G.F.M. Watts, M.B. Brenner, Modulation of matrix metalloproteinase production by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts after cadherin 11 engagement, *Arthritis & Rheumatism* 63 (2011) 3768–3778.
- [119] E.H. Van Aken, P. Papeleu, P. de Potter, E. Bruyneel, J. Philippe, S. Seregard, A. Kvanta, J.-J. de Laey, M.M. Mareel, Structure and function of the N-cadherin/catenin complex in retinoblastoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (2002) 595–602.
- [120] G.B. Grunwald, R.S. Pratt, J. Lilien, Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells, *J. Cell. Sci.* 55 (1982) 69–83.
- [121] S. Kuphal, A.K. Bosserhoff, Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma, *Oncogene* (2005).
- [122] B. Li, N.E. Paradies, R.W. Brackenbury, Isolation and characterization of the promoter region of the chicken N-cadherin gene, *Gene* 191 (1997) 7–13.
- [123] T. El Sayegh, A. Kapus, C. McCulloch, Beyond the epithelium: Cadherin function in fibrous connective tissues, *FEBS Letters* 581 (2007) 167–174.

- [124] M. Ozawa, Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin, *The Journal of Cell Biology* 111 (1990) 1645–1650.
- [125] P.Z. Anastasiadis, A.B. Reynolds, The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer, *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 8) (2000) 1319–1334.
- [126] I. Grosheva, M. Shtutman, M. Elbaum, A.D. Bershadsky, p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion, *J. Cell. Sci.* 114 (2001) 695-707.
- [127] M. Fukata, K. Kaibuchi, Rho-family GTPases in Cadherin-mediated Cell-Cell adhesion, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 887–897.
- [128] F.D. Karim, L.D. Urness, C.S. Thummel, M.J. Klemsz, S.R. McKercher, A. Celada, C. van Beveren, R.A. Maki, C.V. Gunther, J.A. Nye, The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence, *Genes Dev.* 4 (1990) 1451–1453.
- [129] J. Dittmer, The biology of the Ets1 proto-oncogene, *Mol. Cancer* 2 (2003) 29.
- [130] J.A. Nye, J.M. Petersen, C.V. Gunther, M.D. Jonsen, B.J. Graves, Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif, *Genes Dev.* 6 (1992) 975–990.
- [131] A.M. Valdes, E. Evangelou, Kerkhof, H. J. M., A. Tamm, S.A. Doherty, K. Kisand, I. Kerna, A. Uitterlinden, A. Hofman, F. Rivadeneira, C. Cooper, E.M. Dennison, W. Zhang, K.R. Muir, Ioannidis, J. P. A., M. Wheeler, R.A. Maciewicz, van Meurs, J. B., N.K. Arden, T.D. Spector, M. Doherty, The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance, *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (2011) 873–875.
- [132] J. Loughlin, Genetics of osteoarthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 23 (2011) 479–483.
- [133] L. Gordis, *Epidemiology*, 4th ed., Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2009.
- [134] T.A. Pearson, How to Interpret a Genome-wide Association Study, *JAMA* 299 (2008) 1335.
- [135] T.E. Swingle, G. Wheeler, V. Carmont, H.R. Elliott, M.J. Barter, M. Abu-Elmagd, S.T. Donell, R.P. Boot-Handford, M.K. Hajhosseini, A. Munsterberg, T. Dalmay, D.A. Young, I.M. Clark, The expression and function of microRNAs in chondrogenesis and osteoarthritis, *Arthritis Rheum* 64 (2012) 1909–1919.
- [136] S.J. Park, E.J. Cheon, M. Lee, H.A. Kim, MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase-13 expression and IL-1beta-induced catabolic effects in human chondrocytes, *Arthritis Rheum* (2013).

- [137] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Empfehlungen zur Therapie von degenerativen Gelenkerkrankungen, 2008. <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/TE/AZ/PDF/Gelenkerkrankungen.pdf#page=1&view=fitB>.
- [138] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem* 68 (1996) 850–858.
- [139] P. Flicek, I. Ahmed, M.R. Amode, D. Barrell, K. Beal, S. Brent, D. Carvalho-Silva, P. Clapham, G. Coates, S. Fairley, S. Fitzgerald, L. Gil, C. Garcia-Giron, L. Gordon, T. Hourlier, S. Hunt, T. Juettemann, A.K. Kahari, S. Keenan, M. Komorowska, E. Kulesha, I. Longden, T. Maurel, W.M. McLaren, M. Muffato, R. Nag, B. Overduin, M. Pignatelli, B. Pritchard, E. Pritchard, H.S. Riat, Ritchie, G. R. S., M. Ruffier, M. Schuster, D. Sheppard, D. Sobral, K. Taylor, A. Thormann, S. Trevanion, S. White, S.P. Wilder, B.L. Aken, E. Birney, F. Cunningham, I. Dunham, J. Harrow, J. Herrero, Hubbard, T. J. P., N. Johnson, R. Kinsella, A. Parker, G. Spudich, A. Yates, A. Zadissa, Searle, S. M. J., *Ensembl 2013, Nucleic Acids Research* 41 (2012) D48.
- [140] Q. Eastman, R. Grosschedl, Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals, *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999) 233–240.
- [141] T. Sinnberg, M. Menzel, D. Ewerth, B. Sauer, M. Schwarz, M. Schaller, C. Garbe, B. Schitteck, C. Gottardi,  $\beta$ -Catenin Signaling Increases during Melanoma Progression and Promotes Tumor Cell Survival and Chemoresistance, *PLoS ONE* 6 (2011) e23429.
- [142] A.R. Kuhn, K. Schlauch, R. Lao, A.J. Halayko, W.T. Gerthoffer, C.A. Singer, MicroRNA Expression in Human Airway Smooth Muscle Cells: Role of miR-25 in Regulation of Airway Smooth Muscle Phenotype, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 42 (2010) 506–513.
- [143] M. Harigai, M. Hara, A. Kitani, K. Norioka, T. Hirose, W. Hirose, K. Suzuki, M. Kawakami, K. Masuda, M. Shinmei, Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically increase the production of interleukin 6 in human synovial fibroblast, *J Clin Lab Immunol* 34 (1991) 107–113.
- [144] I. Affymetrix, Data Sheet, GeneChip PrimeView Human Gene Expression Array.
- [145] D. Napierala, X. Garcia-Rojas, K. Sam, K. Wakui, C. Chen, R. Mendoza-Londono, G. Zhou, Q. Zheng, B. Lee, Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation, *Mol Genet Metab* 86 (2005) 257–268.
- [146] F.S. Collins, Variations on a Theme: Cataloging Human DNA Sequence Variation, *Science* 278 (1997) 1580–1581.

- [147] A. Ruedel, K. Stark, S. Kaufmann, R. Bauer, J. Reinders, J. Rovensky, S. Blazickova, P.J. Oefner, A.K. Bosserhoff, N-cadherin promoter polymorphisms and risk of osteoarthritis, *FASEB J* (2013).
- [148] The UniProt Consortium, Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013, *Nucleic Acids Research* 41 (2012) D43.
- [149] Singer, Gregory A C, J. Wu, P. Yan, C. Plass, Huang, Tim H M, R.V. Davuluri, Genome-wide analysis of alternative promoters of human genes using a custom promoter tiling array, *BMC Genomics* 9 (2008) 349.
- [150] T.A. Ayoubi, Van De Ven, W J, Regulation of gene expression by alternative promoters, *FASEB J* 10 (1996) 453–460.
- [151] D. Baek, C. Davis, B. Ewing, D. Gordon, P. Green, Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters, *Genome Res* 17 (2007) 145–155.
- [152] N. Harada, T. Utsumi, Y. Takagi, Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 11312–11316.
- [153] H.F. Nural, W. Todd Farmer, G.S. Mastick, The Slit receptor Robo1 is predominantly expressed via the Dutt1 alternative promoter in pioneer neurons in the embryonic mouse brain and spinal cord, *Gene Expression Patterns* 7 (2007) 837–845.
- [154] A. Dallol, E. Forgacs, A. Martinez, Y. Sekido, R. Walker, T. Kishida, P. Rabbitts, E.R. Maher, J.D. Minna, F. Latif, Tumour specific promoter region methylation of the human homologue of the Drosophila Roundabout gene DUTT1 (ROBO1) in human cancers, *Oncogene* 21 (2002) 3020–3028.
- [155] A. Jeltsch, Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases, *Chembiochem* 3 (2002) 274–293.
- [156] E.A. Hoivik, S.L. Witsoe, I.R. Bergheim, Y. Xu, I. Jakobsson, A. Tengholm, S.O. Doskeland, M. Bakke, DNA methylation of alternative promoters directs tissue specific expression of Epac2 isoforms, *PLoS ONE* 8 (2013) e67925.
- [157] B.R. Webber, M. Iacovino, S.H. Choi, J. Tolar, M. Kyba, B.R. Blazar, DNA methylation of Runx1 regulatory regions correlates with transition from primitive to definitive hematopoietic potential in vitro and in vivo, *Blood* 122 (2013) 2978–2986.
- [158] G. Narayan, C. Goparaju, H. Arias-Pulido, A.M. Kaufmann, A. Schneider, M. Durst, M. Mansukhani, B. Pothuri, V.V. Murty, Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression, *Mol Cancer* 5 (2006) 16.

- [159] A. Meissner, T.S. Mikkelsen, H. Gu, M. Wernig, J. Hanna, A. Sivachenko, X. Zhang, B.E. Bernstein, C. Nusbaum, D.B. Jaffe, A. Gnirke, R. Jaenisch, E.S. Lander, Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells, *Nature* (2008).
- [160] S. Pal, R. Gupta, H. Kim, P. Wickramasinghe, V. Baubet, L.C. Showe, N. Dahmane, R.V. Davuluri, Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development, *Genome Research* 21 (2011) 1260–1272.
- [161] S.X.L. Zhang, T.R. Searcy, Y. Wu, D. Gozal, Y. Wang, Alternative promoter usage and alternative splicing contribute to mRNA heterogeneity of mouse monocarboxylate transporter 2, *Physiol Genomics* 32 (2007) 95–104.
- [162] D.J. Forsthoefel, E.C. Liebl, P.A. Kolodziej, M.A. Seeger, The Abelson tyrosine kinase, the Trio GEF and Enabled interact with the Netrin receptor Frazzled in *Drosophila*, *Development* 132 (2005) 1983–1994.
- [163] A.J. Ridley, Rho GTPases and cell migration, *J Cell Sci* 114 (2001) 2713–2722.
- [164] C.D. Nobes, A. Hall, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell* 81 (1995) 53–62.
- [165] S. Li, B.P. Chen, N. Azuma, Y.L. Hu, S.Z. Wu, B.E. Sumpio, J.Y. Shyy, S. Chien, Distinct roles for the small GTPases Cdc42 and Rho in endothelial responses to shear stress, *J Clin Invest* 103 (1999) 1141–1150.
- [166] J. Liu, A.N. Eischeid, X.-M. Chen, S.M. Srinivasula, Col1A1 Production and Apoptotic Resistance in TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Phenotype of 603B Cells, *PLoS ONE* 7 (2012) e51371.
- [167] K.P. O'Brien, E. Seroussi, P. Dal Cin, R. Sciot, N. Mandahl, J.A. Fletcher, C. Turc-Carel, J.P. Dumanski, Various regions within the alpha-helical domain of the COL1A1 gene are fused to the second exon of the PDGFB gene in dermatofibrosarcomas and giant-cell fibroblastomas, *Genes Chromosomes Cancer* 23 (1998) 187–193.
- [168] D.R. Gerecke, P.F. Olson, M. Koch, J.H. Knoll, R. Taylor, D.L. Hudson, M.F. Champlaud, B.R. Olsen, R.E. Burgeson, Complete primary structure of two splice variants of collagen XII, and assignment of alpha 1(XII) collagen (COL12A1), alpha 1(IX) collagen (COL9A1), and alpha 1(XIX) collagen (COL19A1) to human chromosome 6q12-q13, *Genomics* 41 (1997) 236–242.
- [169] T. Nishiyama, A.M. McDonough, R.R. Bruns, R.E. Burgeson, Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability, *J Biol Chem* 269 (1994) 28193–28199.

- [170] M. Nakayama, Protein-Protein Interactions Between Large Proteins: Two-Hybrid Screening Using a Functionally Classified Library Composed of Long cDNAs, *Genome Research* 12 (2002) 1773–1784.
- [171] S. Abe, S.-i. Usami, Y. Nakamura, Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss, *Journal of Human Genetics* 48 (2003) 564-570.
- [172] N.A. Evensen, C. Kuscu, H.-L. Nguyen, K. Zarrabi, A. Dufour, P. Kadam, Y.-j. Hu, A. Pulkoski-Gross, W.F. Bahou, S. Zucker, J. Cao, Unraveling the Role of KIAA1199, a Novel Endoplasmic Reticulum Protein, in Cancer Cell Migration, *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 105 (2013) 1402–1416.
- [173] S. Matsuzaki, F. Tanaka, K. Mimori, K. Tahara, H. Inoue, M. Mori, Clinicopathologic Significance of KIAA1199 Overexpression in Human Gastric Cancer, *Ann Surg Oncol* 16 (2009) 2042–2051.
- [174] H. Yoshida, A. Nagaoka, A. Kusaka-Kikushima, M. Tobiishi, K. Kawabata, T. Sayo, S. Sakai, Y. Sugiyama, H. Enomoto, Y. Okada, S. Inoue, KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013) 5612–5617.
- [175] K. Birkenkamp-Demtroder, A. Maghnoij, F. Mansilla, K. Thorsen, C.L. Andersen, B. Øster, S. Hahn, T.F. Ørntoft, Repression of KIAA1199 attenuates Wnt-signalling and decreases the proliferation of colon cancer cells, *Br J Cancer* 105 (2011) 552-561.
- [176] E. Michishita, G. Garces, J. Barrett, I. Horikawa, Upregulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality, *Cancer Letters* 239 (2006) 71–77.
- [177] K. Kuraoka, N. Oue, H. Yokozaki, Y. Kitadai, R. Ito, H. Nakayama, W. Yasui, Correlation of a single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter with tumorigenesis and progression of gastric carcinoma in Japan, *Int. J. Oncol.* 23 (2003) 421–427.
- [178] F. Waldron-Lynch, C. Adams, C. Amos, D.K. Zhu, M.F. McDermott, F. Shanahan, M.G. Molloy, F. O'Gara, Tumour necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families, *Genes Immun* 2 (2001) 82–87.
- [179] S. Shirasawa, SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease, *Human Molecular Genetics* 13 (2004) 2221–2231.

- [180] F. Accornero, van Berlo, J. H., M.J. Benard, J.N. Lorenz, P. Carmeliet, J.D. Molkentin, Placental Growth Factor Regulates Cardiac Adaptation and Hypertrophy Through a Paracrine Mechanism, *Circulation Research* 109 (2011) 272–280.
- [181] A.I. Ivanov, N.G. Naydenov, Dynamics and Regulation of Epithelial Adherens Junctions, pp. 27–99.
- [182] C. Collinet, T. Lecuit, Stability and Dynamics of Cell–Cell Junctions, pp. 25–47.
- [183] R. Blindt, Downregulation of N-cadherin in the neointima stimulates migration of smooth muscle cells by RhoA deactivation, *Cardiovascular Research* 62 (2004) 212–222.
- [184] F. Pégliion, S. Etienne-Manneville, N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors, *celladhesion* 6 (2012) 327–332.
- [185] L.C. Li, R.M. Chui, M. Sasaki, K. Nakajima, G. Perinchery, H.C. Au, D. Nojima, P. Carroll, R. Dahiya, A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities, *Cancer Res.* 60 (2000) 873–876.
- [186] H. Siomi, M.J. Matunis, W.M. Michael, G. Dreyfuss, The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif, *Nucl Acids Res* 21 (1993) 1193–1198.
- [187] W.M. Michael, The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein, *The EMBO Journal* 16 (1997) 3587-3598.
- [188] K. Bomsztyk, I. van Seuning, H. Suzuki, O. Denisenko, J. Ostrowski, Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein, *FEBS Letters* 403 (1997) 113–115.
- [189] E.F. Michelotti, G.A. Michelotti, A.I. Aronsohn, D. Levens, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 2350–2360.
- [190] J. Ostrowski, Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci, *Nucleic Acids Research* 31 (2003) 3954–3962.
- [191] T. Thisted, Optimized RNA Targets of Two Closely Related Triple KH Domain Proteins, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and alpha CP-2KL, Suggest Distinct Modes of RNA Recognition, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 17484–17496.
- [192] A. Dzwonek, M. Mikula, J. Ostrowski, The diverse involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mitochondrial response to insulin, *FEBS Lett.* 580 (2006) 1839–1845.
- [193] A. Inoue, S.Y. Sawata, K. Taira, R. Wadhwa, Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: Identification of hnRNP-K as a potential target

- for metastasis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (2007) 8983–8988.
- [194] R. Gao, Y. Yu, A. Inoue, N. Widodo, S.C. Kaul, R. Wadhwa, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP-K) Promotes Tumor Metastasis by Induction of Genes Involved in Extracellular Matrix, Cell Movement, and Angiogenesis, *Journal of Biological Chemistry* 288 (2013) 15046–15056.
- [195] E.J. Hutchins, B.G. Szaro, c-Jun N-Terminal Kinase Phosphorylation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Regulates Vertebrate Axon Outgrowth via a Posttranscriptional Mechanism, *J. Neurosci.* 33 (2013) 14666-14680.
- [196] K. Gumireddy, A. Li, J. Yan, T. Setoyama, G.J. Johannes, U.A. Ørom, J. Tchou, Q. Liu, L. Zhang, D.W. Speicher, G.A. Calin, Q. Huang, Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step, *EMBO J* (2013).
- [197] U.A. Ørom, T. Derrien, M. Beringer, K. Gumireddy, A. Gardini, G. Bussotti, F. Lai, M. Zytnicki, C. Notredame, Q. Huang, R. Guigo, R. Shiekhattar, Long Noncoding RNAs with Enhancer-like Function in Human Cells, *Cell* 143 (2010) 46–58.
- [198] C.S. Ku, E.Y. Loy, Y. Pawitan, K.S. Chia, The pursuit of genome-wide association studies: where are we now?, *J Hum Genet* 55 (2010) 195–206.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Name</b>
μ	Mikro-
A	Adenin
Abl	<i>abelson</i>
ACVRL1	<i>Serine/threonine-protein kinase receptor R3</i>
Ago	Argonaut
AK	Antikörper
ALPS	Agrin–Laminin–Perlecan–Slit
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
AP-1	Activating protein-1
ATF	<i>activating transcription factor</i>
AU	<i>Adsorption unit</i>
BCA	Bicinchonsäure
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
B-ZIP	<i>basic leucin zipper</i>
CBP	<i>cAMP binding protein</i>
CC	konservierte cytoplasmatische Domäne
CDH2	N-Cadherin
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CI	Zellindex
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Col12A1	Collagen12A1
Col1A1	Collagen1A1
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRE	<i>cAMP response elements</i>
CREB	<i>Cyclic © AMP respinonse element binding protein</i>
CREM	<i>cAMP response element modulator</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

---

DRGC8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene8</i>
DTT	Dithiothreitol
EC	extrazelluläres Cadherin-Motiv
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
Ena	<i>enabled homolog (Drosophila)</i>
Epac 2	<i>Exchange Protein Directly Activated By cAMP 2</i>
EtOH	Ethanol
EVH1	<i>enabled/VASP homology 1</i>
FACIT	<i>fibril-associated collagens with interrupted triple helices</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKM	Fibroblasten-konditioniertes Medium
FKS	Fötale Kälberserum
FNIII	Fibronectin Typ III
fw	forward
g	Gramm
GAG	Glucosaminoglukan
GAP	Rho GTPase aktivierende Proteine
GDF5	<i>growth/differentiation factor 5</i>
GREM2	Gremlin-2
GWAS	Genom-weiten Assoziationsstudien
HAV	Histidin-Alanin-Valin
HLA	humanes Leukozyten Antigen
hnRNP K	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HSV-TK	<i>herpes simplex virus thymidine kinase</i>
IL	Interleukin
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
ITGA7	Integrin alpha 7
Kb	Kilobase
KH	K-Homologie
l	Liter
LC/MS	Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie
LD	<i>linkeage disequilibrium</i>
m	Milli-
miR	Micro RNA

---

MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MSC	mesenchymalen Stammzellen
N-Cadherin	neuronales Cadherin
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nSF	normale Synovialfibroblasten
N-WASP	<i>Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein</i>
OA	Osteoarthritis
OASF	Osteoarthritis Synovialfibroblasten
OR	<i>odds ratio</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PACT	<i>protein activator of PKR</i>
PAZ	<i>piwi-argonaute-zwille</i>
PBMCs	mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCBP	Poly©-bindendes Protein
PCBP	Poly©-bindendes Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGF	<i>placental growth factor</i>
PIWI	<i>RnaseH-like P-element induced wimpy testis</i>
pre-miR	<i>precursor</i> micro RNA
pri-miR	primäre micro RNA
PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22 (Lymphoid)</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RASF	Rheumatoide Arthritis Synovialfibroblasten
rh	rekombinant human
RHD	Rel Homologie Domäne
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
rm	rekombinant murin
RNA	Ribonukleinsäure
Robo	<i>roundabout</i> Rezeptor
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	reverse Transkription
RTCA	<i>Real-time cell analysis</i>
rv	reverse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Synovialfibroblasten

---

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Sox9	SRY-box 9
srGAP	Slit-Robo GAPs
T	Thymin
TGFBR1	<i>TGF-beta receptor type-1</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
tr	termed
TRBP	<i>human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
v/v	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
Var A	häufige Variante
Var G	seltene Variante
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
$\alpha$ -Robo3B	Robo3B Antikörper

## 8.2. Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff, die mir während der gesamten Zeit mit Rat zur Seite gestanden hat und mir die Möglichkeit gegeben hat, auch eigene Ideen zu verfolgen und diese mit ständiger Diskussionsbereitschaft unterstützt und ausgebaut hat.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie der Universität Regensburg durchführen zu können.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an die gesamte AG Bosserhoff für die angenehme Zeit im Labor und die vielen aufheiternden Worte. Danke, dass ihr immer Zeit hattet, Probleme und Fragen zu diskutieren! Ein besonderer Dank gilt auch meinen Laborkollegen Sibylla und Daniel, die mich unterstützt haben, wenn es nötig war und sich mit mir über Erfolge gefreut haben. Auch bei Simone möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass wir gemeinsam „unsere“ Synovialfibroblasten unter die Lupe genommen haben.

Vielen Dank an alle Kollegen und Freunde, die die Zeit im Labor und auch außerhalb so schön gemacht haben und damit auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke für die schöne Zeit!

Ein sehr großes Dankeschön geht an meine Kollegen Steffi, Alex, Cori, Miri und Lisa, die durch Korrekturlesen und konstruktive Kritik diese Arbeit verbessert haben. Danke, dass ihr euch die Zeit genommen habt!

Vielen Dank auch an Volker für das schnelle und aufmerksame Korrekturlesen!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ein Studium und die Promotion gar nicht möglich gewesen wären. Danke auch an meinen Bruder Tobias für die Unterstützung. Vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

### 8.3. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Anke Rüdell geboren am 28.09.1984 in Heilbronn-Neckargartach erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....  
(Datum, Ort)

.....  
(Unterschrift)