

**EXPRESSION, BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
UND BIOLOGISCHE ANALYSE DES
CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR**

The seal of the University of Würzburg is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two figures holding a banner. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin text 'SIGILLUM UNIVERSITATIS HERBOLINGENSIS' and the year '1583'.

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON

SUSANNE GEBHARDT

AUS GEIBLINGEN

WÜRZBURG 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter:

Prof. Dr. W. Sebald

2. Gutachter:

Prof. Dr. T. Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG..... 5

1.1 *CTGF* UND DIE *CCN*-PROTEIN-FAMILIE..... 5

1.1.1 Allgemeines.....5

1.1.2 Modulare Struktur der *CCN*-Proteine6

1.1.3 Isoformen des *CTGF*.....9

1.1.4 Interaktion des *CTGF* mit anderen Molekülen9

1.1.4.1 Interaktion mit der *TGF-β*-Superfamilie.....10

1.1.4.2 Wechselwirkungen mit Rezeptoren.....10

1.1.4.3 Interaktion mit weiteren Molekülen11

1.1.5 Rolle des *CTGF* in zellulären Funktionen, biologischen und pathologischen Prozessen.....12

1.1.6 *CTGF* in der Wundheilung und Fibrose14

1.1.7 Rolle des *CTGF* am Glaukom.....15

1.2 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT 19

2. MATERIAL UND METHODEN 21

2.1 ABKÜRZUNGEN 21

2.2 MATERIALIEN 23

2.2.1 Chemikalien und Enzyme23

2.2.2 Kits23

2.2.3 Bakterienstämme.....23

2.2.4 Eukaryotische Zelllinien und primäre Zellen.....24

2.2.5 Vektoren.....25

2.2.6 Oligonukleotide.....25

2.2.6.1 Oligonukleotide für die reverse Transkription25

2.2.6.2 Oligonukleotide für die Real-Time-PCR25

2.2.6.3 Oligonukleotide für die Klonierungen27

2.2.7 Antikörper28

2.2.8 Rekombinante Proteine28

2.2.9 Proteingrößenstandards29

2.2.10 Medien/Lösungen für die pro-/eukaryotische Zellkultur	30
2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	31
2.3.1 Allgemeine Zellkultur	31
2.3.1.1 Insektenzellkultur	31
2.3.1.2 Säugerzellen	32
2.3.2 Zellassays	32
2.3.2.1 Adhäsionsassay	32
2.3.2.2 Proliferationsassays	33
2.3.2.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität	33
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.4.1 Klonierung der CTGF-Konstrukte	34
2.4.2 RNA-Isolation	34
2.4.3 Reverse Transkription	34
2.4.4 Real-Time-PCR	35
2.5 AFFYMETRIX-ARRAY	36
2.5.1 Präparation der fluoreszierenden Proben	36
2.5.2 Hybridisierung, Markierung und Messung der Signale	37
2.5.3 Datenanalyse	38
2.6 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i>	38
2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.6.2 Analytische Expression	39
2.6.3 Präparative Fermentation	39
2.6.4 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung	39
2.7 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN INSEKTENZELLEN	40
2.7.1 Transfektion von <i>Sf-9</i> Zellen mit dem Baculo-Gold™ System	40
2.7.2 Plaque-Assay	40
2.7.3 Amplifikation rekombinanter Baculoviren	41
2.7.4 Expression in <i>Sf-9</i> Zellen	42
2.8 CHROMATOGRAPHISCHE TRENNVERFAHREN	42

2.8.1 Metall-Affinitäts-Chromatographie	42
2.8.1.1 Chromatographie an Ni-Chelat-Sepharose.....	42
2.8.1.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	43
2.8.2 Gelfiltrationschromatographie	44
2.8.3 <i>BMP-2</i> -Affinitätschromatographie	44
2.8.4 RP-HPLC	45
2.9 PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	46
2.9.1 SDS-PAGE.....	46
2.9.2 Proteinfärbung.....	47
2.9.3 Western Blot.....	48
2.9.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.9.5 Thrombinspaltung	50
2.9.6 Massenspektrometrie.....	50
2.10 OBERFLÄCHEN-PLASMON-RESONANZ-MESSUNGEN MIT DER BIACORE TECHNIK	50
3. ERGEBNISSE.....	53
3.1 PRÄPARATION UND AUFREINIGUNG DER <i>CTGF</i> -KONSTRUKTE.....	54
3.1.1 Expressionssystem <i>E.coli</i> Origami B(DE3).....	54
3.1.2 Expression in Insekten <i>Sf-9</i> Zellen.....	59
3.1.2.1 Expression des <i>hCTGF-IGF</i>	59
3.1.2.2 Präparation und Reinigung des <i>hCTGF-VWC</i>	61
3.1.2.3 Präparation und Reinigung des <i>hCTGF-TSP1</i>	66
3.1.2.4 Präparation und Reinigung der <i>hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne</i>	67
3.1.2.5 Präparation und Reinigung der <i>hCTGF-C-terminalen Doppeldomäne</i>	71
3.1.2.6 Präparation und Reinigung des <i>hCTGF</i>	72
3.1.3 Expression in HEK-Zellen	75
3.2 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG	77
3.2.1 Oberflächenplasmonresonanzanalyse	77
3.2.2 Effekt auf die <i>BMP-2</i> induzierte ALP-Aktivität	79
3.2.3 Adhäsionsassay	81

3.3 BIOLOGISCHE AKTIVITÄT.....	84
3.3.1 Proliferation der Zelllinie Eahy926	84
3.3.2 Proliferation der humanen Tenon-Fibroblasten	85
3.4 RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON <i>CTGF</i> STIMULIERTEN PRIMÄREN HUMANEN TENONFIBROBLASTEN.....	87
3.4.1 Biologische Interpretation durch Kategorieanalyse mittels Gene Ontology	90
3.4.1.1 Differentiell exprimierte Gene in der Zellproliferation	95
3.4.1.2 Differentiell exprimierte Gene in der Wundheilung und Inflammation	96
3.4.1.2 Differentiell exprimierte Gene der EZM	100
3.4.2 Validierung der Affymetrix-Analysen mittels semiquantitativer Real-Time-RT- PCR.....	102
3.5 EXPRESSION DER REZEPTOREN DER <i>TGF-β</i> -FAMILIE IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	103
3.5.1 TGF-β-Rezeptorbesatz verschiedener Zelllinien.....	103
3.5.2 Expression der TGF-β-Rezeptoren in humanen Myeloma-Zelllinien	106
4. DISKUSSION	109
4.1 EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG DER <i>CTGF</i> -PROTEINE	110
4.2 GENEXPRESSIONSANALYSE AN HUMANEN FIBROBLASTEN	113
5. ZUSAMMENFASSUNG	121
6. LITERATURVERZEICHNIS	125
ANHANG	I
TABELLARISCHE ÜBERSICHT DER >2 DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENE.....	I
DANKSAGUNG.....	VII
LEBENS LAUF	IX
SCHRIFTENVERZEICHNIS	XI
ERKLÄRUNG.....	XIII

1. Einleitung

1.1 *CTGF* und die *CCN*-Protein-Familie

1.1.1 Allgemeines

CTGF (*connective tissue growth factor*) ist Mitglied der cysteinreichen *CCN*-Protein-Familie von Wachstumsfaktoren, bestehend aus sechs Mitgliedern. *CYR61* (*cysteinrich 61/CCN1*), *CTGF* (*CCN2*) und *NOV* (*nephroblastoma overexpressed/CCN3*) waren namensgebend für diese Proteingruppe. Die Proteine *WISPI-3* (*wnt inducible secreted proteins/CCN4-6*) komplettieren die Proteinfamilie. Die *CCN*-Proteine zeigen eine hohe Sequenzhomologie (40-60%) und die Konservierung von 38 Cysteinen (Abb. 2) (Perbal, B., 2001; Planque, N. et al., 2003). Eine Vielzahl an Funktionen und biologischen Prozessen, z.B. Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Modellierung der extrazellulären Matrix, wird durch die Mitglieder dieser Proteinfamilie vermittelt (Perbal, B., 2004). Überdies sind die *CCN*-Proteine an komplexeren biologischen Prozessen, wie Wundheilung, Angiogenese und Chondrogenese, als auch an pathologischen Vorgängen, z.B. Fibrose und Tumorgenese, beteiligt (Lau, L. F. et al., 1999). *FISPI2*, das murine *CTGF*, wurde als Sekretionsprotein, kodiert von einem durch Serum induzierbaren „Immediate early gene“, in Mäuse-Fibroblasten identifiziert (Ryseck, R. P. et al., 1991). Das humane Ortholog wurde 1991 in konditioniertem Medium von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) entdeckt. Aufgrund der mitogenen und chemotaktischen Eigenschaften in Fibroblasten wurde das Protein *Connective tissue growth factor* genannt (Bradham, D. M. et al., 1991). Eine Vielzahl an Zelllinien, wie Fibroblasten, Endothelzellen, vaskuläre „smooth muscle“ Zellen, Mesangialzellen, Osteoblasten und Chondrozyten, exprimieren *CTGF* (Grotendorst, G. R., 1997; Shimo, T. et al., 1998; Hishikawa, K. et al., 1999; Wahab, N. A. et al., 2001; Nishida, T. et al., 2003; Safadi, F. F. et al., 2003).

1.1.2 Modulare Struktur der *CCN*-Proteine

Die Proteine der *CCN*-Familie sind charakterisiert durch eine Struktur mit vier Domänen. Eine Ausnahme bildet *WISP-2*, dem Domäne vier fehlt. Die Intron-Exon-Struktur der *CCN*-Gene ist konserviert, jedes Modul wird von einem separaten Exon kodiert. Dies suggeriert, dass diese Proteinfamilie wahrscheinlich durch „exon-shuffling“ entstanden ist (Ryseck, R. P. et al., 1991). Auf das N-terminale Signalpeptid folgt die Insulin-like-growth-factor bindende Domäne (IGF), die von Willebrand Faktor Typ C-Domäne (VWC), das Thrombospondin Typ I Repeat (TSP1) und die C-terminale Cystin-Knoten-Domäne (CTCK; Abb. 1). Die VWC- und TSP1-Domäne sind durch eine variable cysteinfreie Region miteinander verbunden.

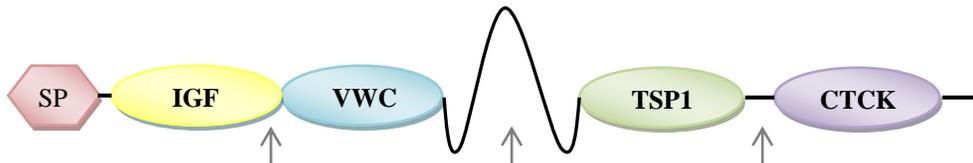


Abb. 1 Modulare Struktur der *CCN*-Proteine

Die Abbildung zeigt die modulare Struktur der *CCN*-Proteine mit den vier Domänen. SP = Signalpeptid; IGF = Insulin-like-growth-factor Bindungsdomäne; VWC= von Willebrand Typ C-Domäne; TSP1 = Thrombospondin TypI Repeat; CTCK = C-terminale Cystin-Knoten-Domäne. Graue Pfeile = Proteaseschnittstellen des *CTGF*.

IGF-Domäne

Die Insulin-like-growth-factor bindende Domäne zeigt Homologien zu der N-terminalen Region der Mitglieder der *IGFBP*-Familie (*Insulin like growth factor binding proteins*). Das in *IGFBPs* hochkonservierte Protein-Bindungsmotiv für *IGF* – GCGCCxxC - ist auch in den Proteinen der *CCN*-Familie konserviert zu finden (Abb. 2) (Bork, P., 1993). *CTGF* bindet *IGFs in vitro* mit einer 100-1000fach geringeren Affinität als die hochaffin bindenden *IGFBP1-6*. Aufgrund der Spezifität der Bindung wurde *CTGF* als *IGFBP8* zu der *IGFBP*-Familie gezählt (Kim, H. S. et al., 1997).

VWC-Domäne

Die zweite Domäne der *CCN*-Proteine zeigt Homologien zur Typ C Domäne des *van Willebrand Faktors* (*vWF*), einem multimeren komplexen Plasmaprotein (Mancuso, D. J. et

al., 1989). Sie ist durch zwei spezifische AS-Motive (CXXXCXC; CCXXXXC; Abb. 2) und das Auftreten von zehn Cysteinen charakterisiert (Pennica, D. et al., 1998; Abreu, J. G. et al., 2002). Die VWC-Domäne ist in allen *CCN*-Mitgliedern außer *WISP-3/CCN6* (4 der 10 Cysteine fehlen) konserviert (Pennica, D. et al., 1998). Diverse andere Proteine (*Thrombospondin*, *Chordin*, *Chordin-like 2*, *Crossveinless 2*, ...) enthalten ebenfalls eine VWC-Domäne (Abreu, J. G. et al., 2002). Viele dieser Proteine, die eine VWC-Domäne aufweisen, sind Modulatoren des *BMP* (*bone morphogenetic protein*)-/*TGF- β* (*transforming growth factor β*)-Signalweges (Zhang, J. L. et al., 2007). Die VWC-Domäne ermöglicht auch *CTGF* die Interaktion mit Proteinen der *TGF- β* -Superfamilie, wie *BMP-4* oder *TGF- β 1* (Abreu, J. G. et al., 2002). Zudem spielt die VWC-Domäne eine Rolle bei der Formation und Oligomerisierung von Proteinkomplexen (Bork, P., 1993).

TSP1-Repeat

Die Thrombospondin Typ I Domäne folgt unmittelbar auf die variable cysteinfreie Region (Abb. 1). Diese Domäne enthält ein konserviertes Motiv (WSxCSxxCG; Abb. 2), das zuerst in *Thrombospondin 1* identifiziert werden konnte (Tong, Z. Y. et al., 2006). Die *Thrombospondin Typ I Repeat*-Superfamilie umfasst eine große Anzahl an Mitgliedern, z.B. *F-Spondin*, *TRAP* und *Papilin* (Tucker, R. P., 2004). Dieses Modul soll die Zelladhäsion durch Interaktion mit sulfathaltigen Glykokonjugaten (z.B. Heparin und Sulfatide) fördern (Brigstock, D. R., 1999).

CTCK-Domäne

Die C-terminale Domäne enthält ein charakteristisches Knoten-Motiv. Dieses als Cystinknoten bezeichnete Strukturmotiv ist weit verbreitet und findet sich z.B bei den Proteinen der *TGF- β* -Familie, dem *nerve growth factor* (*NGF*) und dem *platelet derived growth factor* (*PDGF*).

hCTGF	M-----TAA	SMGPVRVAFV	VLLALCSRPA	V-----	-----GQNC	GP	32
hCYR61	M-----SSR	IARAL--ALV	VTLHLHLRLA	L-----	-----S-TC	AA	29
hNOV	MQSVQSTSF	LRKQCLCLTF	LLHLHLGQVA	A-----	-----TQRCP	PQ	38
hWISP1	MRWFLPWTLA	AVTAAAASTV	LATALSPAPT	TMDFTPAPLE	DTSSRPQFCK	WP	52
hWISP2	MRGTPKTHLL	AFSLLCLLSK	V-----	-----	-----RTQLCP	TP	29
hWISP3	MQGLLFS TLL	LAGLAQFCCR	VQ-GTGPLDT	TPEGRPGEVS	DAPQRKQFCH	WP	51
hCTGF	C--RCPDEPA	PRCPAGVSLV	LDGCGCCRV	AKQLGELCTE	RDPCCDPHKGL	FC	82
hCYR61	C--HCPLE-A	PKCAPGVGLV	RDGCGCCKVC	AKQLNEDCSK	TQPCDHTKGL	EC	78
hNOV	CPGRCPATP-	FTCAPGVRVAV	LDGCSCLLV	ARQRGESCS	LEPCDESSGL	YC	89
hWISP1	C--ECPSP-	PRCPLGVSLI	TDGCECCKMC	AQQLGDNCTE	AAICDPHRGL	YC	101
hWISP2	CT--CPWPP-	PRCPLGVPLV	LDGCGCCRV	ARRLGEP	LHVCDASQGL	VC	78
hWISP3	C--KCPQQ-K	PRCPPGVSLV	RDGCGCCKIC	AKQPGEICNE	ADLCCDPHKGL	YC	100
hCTGF	DF-GSPANRK	IGVCTAK-DG	APCIFGGTVY	RSGESFQSSC	KYQCTCLDGA	VG	132
hCYR61	NF-GASSTAL	KGICRAQSEG	RPC EYNSRIY	QNGESFQPN	KHQCTCIDGA	VG	129
hNOV	DRSADPSNQT	-GICTA-VEG	DNCFVFDGVIY	RSGEKFPQSC	KFQCTCRDGG	IG	139
hWISP1	DYSGDRPRYA	IGVC-AQVVG	VGCVLDGVRVY	NNGQS FQPN	KYNCTCIDGA	VG	152
hWISP2	Q-PGAGPGGR	GALCLLAEDD	SSCEVNGRLY	REGETFQPH	SIRCRCEDGG	FT	129
hWISP3	DYSVDRPRYE	TGVC-AYLVA	VGCEFNQVHY	HNGQVFQPNP	LFSCLCVSGA	IG	151
hCTGF	CMPLCSMDVR	LPSPD C P P R	RVKLP GK CCE	EWV C OEP	---K D Q---	---	172
hCYR61	CIP L C P Q E L S	LPNLG C P N P R	LVKVT G C C C E	EWV C O E D S I K	DPMEDQDGLL	GK	181
hNOV	CVPRCQLDVL	LPEPNC P A P R	KVEVP G E C C E	KWIC G P D E	---E D S L G---	---	182
hWISP1	CTPLC-LRVR	P P R L W C P H P R	R V S I P G H C C E	Q W V C E D D A - K	R P R K T A P R D T	GA	202
hWISP2	CVPLCSEDVR	L P S W D C P H P R	R V E V L G K C C P	EWV C G Q	---	---	165
hWISP3	CTPL--FIPK	LAGSH C S G A K	---G G K K S D	Q S N C S L E P L L	Q Q L S T S Y	---	192
hCTGF	-----	-----TVV	GPALAAAYRLE	DTFGPDPTMI	R-----ANCL	VQ	202
hCYR61	ELGFDASEVE	LTRNNELIAV	GKGS SLKRLP	-VFGMEPRIL	YNPLQGQKCI	VQ	232
hNOV	-----	-----	GLTLAAAYRPE	ATLGVEVS	---D S S V N C I	EQ	209
hWISP1	-----	-----FDAV	GEVEAWHR	---	-----N C I	AY	219
hWISP2	-----	-----	GGLGTTQPLP	AQGPQFSGLV	S S L P P G V P C P	EW	197
hWISP3	-----	-----	-KTMPAYR-	-----N	L P L I W K K K C L	VQ	212
hCTGF	TTEWSACSKT	CGMGI STRVT	NDNAS CRLEK	QSRLCMVRPC	EADLEENI--	KK	252
hCYR61	TTSWSQCSKT	CGTGI STRVT	NDNPE CRLVK	ETRICEVRPC	GQPVYSSL--	KK	282
hNOV	TTEWTACSKS	CGMGF STRVT	NRNRQCEMLK	QTRLCMVRPC	EQEPEQPTD-	KK	260
hWISP1	TSPWSPOSTS	CGLGVSTRIS	NVNAQCWPEQ	ESRLCNLRPC	DVDIHTLI--	KA	269
hWISP2	STAWGPCSTT	CGLGMATRVS	NQNRFCRLET	QRRLCLSRPC	PPS-----	R	241
hWISP3	ATKWTPCST	CGMGI SNRVT	NENSNC EMRK	EKRLCYIQPC	DSNILKTIKI	PK	264
hCTGF	GKKCI RTPKI	SKPIKFELSG	CTSMKTYRAK	FCGVCTDGRC	CTPHRTTTLP	VE	304
hCYR61	GKKCSKT KKS	PEPVRFTYAG	CLSVKKYRPK	YCGSCVDGRC	CTPQLRRTVK	MR	334
hNOV	GKKCLRTKKS	LKA IHLQFKN	CTSLHTYKPR	FCGVCS DGRC	CTPHNTKTIQ	AE	312
hWISP1	GKKCLAVYQP	EASMNFTLAG	CISTRSYQPK	YCGVCMDNRC	CIPYKSKTID	VS	321
hWISP2	GRS-----	-----	-----	-----	---PQ---	---	246
hWISP3	GKTCQPTFQL	SKA EK F V F S G	CSSTQSYKPT	FCGICLDKRC	CIPNKS KMIT	IQ	316
hCTGF	FKCPDGEVMK	KNMMFIKTC	CHYNC PGDND	IFESLYYRKM	YGDMA---	349	
hCYR61	FRCEDGETFS	KNVMMIQSCK	CNYNCPHANE	AAFP FY--RL	FNDIHKFRD	381	
hNOV	FQCS PGQIVK	KPVMVIGTCT	CHTNC PKNNE	AFLQ---EL	ELKTTRGKM	357	
hWISP1	FQCPDGLGFS	RQVLWINACF	CNLS CRNPND	IFADL---ES	YPDFSEIAN	367	
hWISP2	-----	-----	-----NS	AF-----	-----	250	
hWISP3	FDCPNEGSK	WKMLWITSCV	CQRNCREPGD	IFSELKIL--	-----	354	

Abb. 2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen CCN-Proteine

Die Aminosäuresequenzen der humanen CCN-Proteine wurden verglichen und graphisch dargestellt. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software „CLC Free Workbench“ durchgeführt. Konservierte AS sind durch dunkelblaue Schattierungen angezeigt. Hellere blaue Schattierungen zeigen Positionen, bei denen die AS innerhalb fünf der sechs CCN-Proteine auftreten. Orange Boxen = die konservierten Cysteine; Rote Box = IGF-Bindungsmotiv; Lila Box = TSP-Bindungsmotiv; Grüne Box = spezifischen Motive der VWC-Domäne.

1.1.3 Isoformen des *CTGF*

Der Beitrag der einzelnen Domänen an den biologischen Eigenschaften des *CTGF* ist noch nicht vollständig geklärt. *CTGF*, v.a. die cysteinfreie Region, ist für Spaltung durch Proteasen zugänglich. Das native *CTGF* kann durch Chymotrypsin in der cysteinfreien Region (AS 180-181) bzw. durch Plasmin am Ende von Domäne 1 (AS 98-99), zwischen Domäne 2 und 3 (AS 183-184) sowie Domäne 3 und 4 (AS 251-252) gespalten werden (Grotendorst, G. R. et al., 2005). Es gibt mehrere natürlich auftretende kürzere Isoformen des *CTGF*, proteolytische Fragmente des kompletten Proteins repräsentierend. Die N-terminale Doppeldomäne, die C-terminale Doppeldomäne sowie die CTCK-Domäne wurden in Gewebeproben oder Zellkultur nachgewiesen (Brigstock, D. R. et al., 1997; Boes, M. et al., 1999; Kubota, S. et al., 2001; Hinton, D. R. et al., 2004). Neben den natürlich auftretenden wurden *CTGF*-Isoformen rekombinant hergestellt. Diese Varianten des *CTGF* – nativ oder rekombinant – zeigen unterschiedliche biologische Aktivitäten. Die N-terminale Doppeldomäne von *CTGF* induziert die Differenzierung und Kollagensynthese, die C-terminale Doppeldomäne hingegen die Fibroblastenproliferation (Grotendorst, G. R. et al., 2005). Die *TSPI*-Domäne vermittelt die Adhäsion von Lebersternzellen und aktiviert die p42/44 MAP-Kinase, die *CTCK*-Domäne ist mitogen und stimuliert ebenso die Zelladhäsion (Brigstock, D. R. et al., 1997; Ball, D. K. et al., 2003; Tong, Z. Y. et al., 2006). Die biologische Bedeutung der strukturellen Heterogenität des *CTGF* könnte ein Mittel darstellen, um verschiedene Varianten zu generieren, die diverse agonistische und antagonistische Aktivitäten haben.

1.1.4 Interaktion des *CTGF* mit anderen Molekülen

Die multi-modulare Mosaik-Struktur erlaubt es dem *CTGF* mit diversen anderen Molekülen, einschließlich Proteoglykanen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und signaltransduzierenden Zelloberflächenrezeptoren, zu interagieren. Für die Interaktion zwischen den meisten dieser Moleküle und *CTGF* konnte jeweils eines der vier Module bestimmt werden (Abb. 4).

1.1.4.1 Interaktion mit der *TGF-β*-Superfamilie

CTGF bindet direkt *TGF-β1* sowie *BMP-4* und verstärkt (*TGF-β1*) bzw. schwächt (*BMP-4*) dadurch die Bindung dieser Proteine an ihre jeweiligen Rezeptoren (Abreu, J. G. et al., 2002). Nach Stimulation mit *TGF-β*, nicht durch andere Wachstumsfaktoren, wie *PDGF* oder *FGF* (*fibroblast growth factor*), wird *CTGF* in Fibroblasten selektiv stark induziert (Igarashi, A. et al., 1993). Die durch *TGF-β* stimulierte *CTGF*-Expression benötigt keine *de novo* Proteinsynthese (Grotendorst, G. R. et al., 1996). Molekulare Basis dafür ist die Präsenz eines *TGF-β*-responsiven-Elementes innerhalb des *CTGF*-Promotors (Grotendorst, G. R. et al., 1996). Überdies agiert *CTGF* als „downstream mediator“ einiger Funktionen von *TGF-β*. Die Proliferation, Differenzierung, Synthese von EZM-Proteinen und das Adhäsions-unabhängige Wachstum (anchorage independent growth) von Fibroblasten wird durch *TGF-β* über einen *CTGF*-abhängigen Weg reguliert (Frazier, K. et al., 1996; Kothapalli, D. et al., 1997; Duncan, M. R. et al., 1999; Garrett, Q. et al., 2004). Andere *TGF-β*-Funktionen, z.B. die Wachstumsinhibition von Epithelzellen, sind *CTGF*-unabhängig (Frazier, K. et al., 1996). *TGF-β* und *CTGF* werden in mehreren fibrotischen Defekten überexprimiert und sind *in vivo* und *in vitro* fibrogen (Leask, A. et al., 2002). Die funktionelle Beziehung zwischen der Aktivität von *CTGF* und *TGF-β* wurde anhand der Blockade von *TGF-β*-Effekten durch *CTGF*-Antagonisten (Antikörper, siRNA) gezeigt (Duncan, M. R. et al., 1999).

1.1.4.2 Wechselwirkungen mit Rezeptoren

Die Rezeptoren und Signalwege des *CTGF* sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Obwohl *CTGF* mit diversen Zelloberflächenmolekülen interagiert, konnte bisher kein für *CTGF* spezifischer Rezeptor bestimmt werden. Zu den bisher identifizierten Rezeptoren zählen verschiedene Integrine. *CTGF* interagiert spezifisch mit den Integrinen $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_M\beta_2$ und $\alpha_5\beta_1$ über verschiedene Domänen (Abb. 3) (Jedsadayanmata, A. et al., 1999; Leu, S. J. et al., 2003; Schober, J. M. et al., 2003; Gao, R. et al., 2004; Gao, R. et al., 2006; Heng, E. C. et al., 2006). Durch die Bindung an Integrine werden intrazelluläre Signalkaskaden, die Aktivierung von Kinasen und der Gentranskription induziert (Chen, C. C. et al., 2001).

Heparansulfatproteoglykane (HSPG), die bei der *CTGF* vermittelten Zelladhäsion beteiligt sind, können als Co-Rezeptoren von *CTGF* agieren (Gao, R. et al., 2004). Die unmittelbar vor Domäne 4 des *CTGF* liegende Heparin-bindende Konsensus-Sequenz (XBBXBX; AS 250-255) vermittelt kooperativ mit weiteren Bereichen in der CTCK-Domäne die hochaffine Bindung an Heparin (Brigstock, D. R. et al., 1997; Brigstock, D. R., 1999).

Ein weiterer potentieller Rezeptor ist das *Low-Density-Lipoproteinrezeptor related protein 1* (*LRP1*) (Segarini, P. R. et al., 2001). Die Bindung von *CTGF* an *LRP1* erfolgt in Abhängigkeit von Heparin über Modul 3 (Segarini, P. R. et al., 2001; Gao, R. et al., 2003). Zudem interagiert *CTGF* mit dem Wnt Co-Rezeptor *LRP6* über Modul 4 und blockiert dadurch den Wnt-Signalweg (Mercurio, S. et al., 2004).

Desweiteren bindet und aktiviert *CTGF* den *nerve growth factor tyrosin kinase receptor* (TrkA) (Wahab, N. A. et al., 2005).

1.1.4.3 Interaktion mit weiteren Molekülen

Neben den bereits genannten Interaktionspartnern bindet *CTGF* spezifisch über die TSP1-Domäne den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren *VEGF*₁₆₅, über die CTCK-Domäne *VEGF*₁₆₅ und *VEGF*₁₂₁. Die angiogenen Effekte des Wachstumsfaktors *VEGF*₁₆₅ werden signifikant durch *CTGF* geblockt (Inoki, I. et al., 2002).

CTGF fördert zudem die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin (Chen, Y. et al., 2004). Für die mit Fibronectin beschriebenen *CTGF*-Wechselwirkungen konnten zwei Bereiche des Proteins zugeordnet werden. Eine Region (AS 21-107), die hauptsächlich Domäne 1 des *CTGF* umfasst, sowie Domäne 4 binden Fibronectin und weisen zelladhäsive Eigenschaften auf (Hoshijima, M. et al., 2006; Pi, L. et al., 2007).

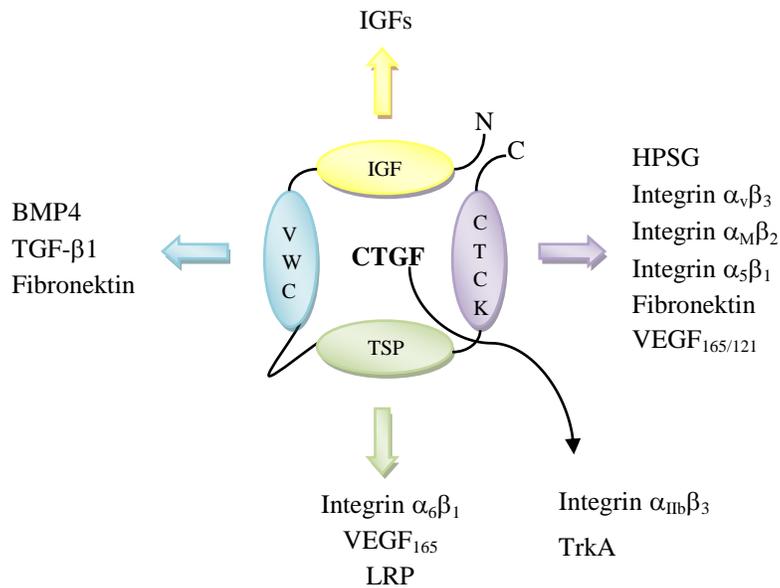


Abb. 3 Graphische Darstellung der Interaktionspartner des CTGF

Die CTGF-Interaktionspartner gehen mit verschiedenen Domänen Wechselwirkungen ein (farbige Pfeile). Für Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und TrkA wurde bisher keine Domäne zugeordnet (schwarzer Pfeil). IGF = Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor; BMP-4 = bone morphogenetic protein 4; TGF- β 1 = Transforming growth factor β 1; VEGF = Vascular endothelial growth factor; LRP = low density Lipoprotein receptor related Protein; HPSG = Heparansulfatproteoglykane.

1.1.5 Rolle des CTGF in zellulären Funktionen, biologischen und pathologischen Prozessen

In Abhängigkeit vom Zelltyp moduliert CTGF viele verschiedene Funktionen. CTGF ist ein mitogener Faktor für Chondrozyten, Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen (Frazier, K. et al., 1996; Nishida, T. et al., 1998; Shimo, T. et al., 1999; Safadi, F. F. et al., 2003). In humanen aortalen glatten Muskelzellen und Brustkrebszellen hingegen wirkt CTGF apoptotisch (Hishikawa, K. et al., 1999; Hishikawa, K. et al., 2000). Überdies stimuliert CTGF die Synthese von EZM-Proteinen (Kollagen Typ I, Fibronectin) und induziert die Bildung von Myofibroblasten (Frazier, K. et al., 1996; Grotendorst, G. R. et al., 2004). Die proliferativen und differenzierenden Antworten der Fibroblasten auf CTGF sind von weiteren Faktoren abhängig. In der Präsenz von CTGF und EGF proliferieren die Zellen, in Anwesenheit von CTGF und IGF-2 differenzieren die Zellen zu Myofibroblasten und steigern die Kollagensynthese (Grotendorst, G. R. et al., 2004). In vitro Studien haben gezeigt, dass CTGF

die Zelladhäsion und Migration begünstigt (Babic, A. M. et al., 1999). Die Zelladhäsion wird durch die Interaktion mit Integrinen und Heparansulfatproteoglykanen stimuliert, wobei der Integrintyp in Abhängigkeit vom Zelltyp variiert (Tab. 1).

Integrin	Zelltyp	Quelle
$\alpha_v\beta_3$	Endothelzellen	(Babic, A. M. et al., 1999)
	Hepatische Sternzellen	(Gao, R. et al., 2004)
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Thrombozyten	(Jedsadayanmata, A. et al., 1999)
$\alpha_6\beta_1$	Fibroblasten	(Leu, S. J. et al., 2003)
	Hepatische Sternzellen	(Tong, Z. Y. et al., 2006)
$\alpha_M\beta_2$	Periphere Blutmonozyten	(Schober, J. M. et al., 2002)
$\alpha_5\beta_1$	Pankreatische Sternzellen	(Gao, R. et al., 2006)

Tab. 1 Liste der mit *CTGF* interagierenden Integrine in Abhängigkeit vom Zelltyp

CTGF ist an mehreren physiologischen Prozessen beteiligt. *In vitro* werden durch *CTGF* angiogene Effekte und *in vivo* die Angiogenese selbst induziert (Babic, A. M. et al., 1999; Shimo, T. et al., 1999). Bei der endochondralen Ossifikation ist *CTGF* durch Stimulation der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten funktionell relevant (Nakanishi, T. et al., 2000; Nishida, T. et al., 2000). Desgleichen spielt *CTGF* in der Embryonalentwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle (Kireeva, M. L. et al., 1997; Friedrichsen, S. et al., 2003). *CTGF* knockout Mäuse sterben kurz nach der Geburt vor allem infolge der mangelnden Verknöcherung des Brustkorbs (Ivkovic, S. et al., 2003).

Neben den Funktionen in normalen biologischen Prozessen ist *CTGF* auch in einigen pathologischen Prozessen von Bedeutung. Die Expression von *CTGF* ist in arteriosklerotischen Gefäßen 50-100fach höher als in normalen Arterien (Oemar, B. S. et al., 1997). Einige Studien verbinden eine abnormale *CTGF*-Expression mit der Tumorgenese. Die Expression von *CTGF* wurde in Pankreas-, Lungen- und Leberkrebszellen, sowie bei Brustkrebs, Angiolipom, Angioleiomyom und pyogenem Granulom nachgewiesen (Frazier, K. S. et al., 1997; Igarashi, A. et al., 1998; Wenger, C. et al., 1999; Chen, P. P. et al., 2007).

1.1.6 CTGF in der Wundheilung und Fibrose

Wundheilung und Fibrose

Die Wundheilung ist ein komplexer Prozess, der die Beteiligung und Interaktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) und verschiedenen Zelltypen involviert. Die drei sich überlappenden Phasen der Wundheilung sind die inflammatorische Phase mit der Hämostase, die Granulationsphase und die reparative Phase (Li, J. et al., 2007). Alle Phasen werden direkt oder indirekt durch Zytokine reguliert. Als initiale Antwort auf eine Verletzung wird die Blutgerinnung aktiviert. Thrombozyten setzen verschiedene Mediatoren, wie *TGF- β* und *PDGF*, frei, die weitere Zellen (Neutrophile, Fibroblasten, Makrophagen) rekrutieren und aktivieren (Diegelmann, R. F. et al., 2004). In der zweiten Phase kommt es zur Initiation der Neubildung von Blutgefäßen und zur Reorganisation der Matrix. Fibroblasten sezernieren EZM-Proteine (z.B. Kollagene und Heparansulfat) und bilden ein neues Bindegewebe. Die reparative Phase ist der Abschnitt der Wundkontraktion, Reifung der Kollagenfasern und Reepithelialisierung. Fibroblasten transdifferenzieren zu Myofibroblasten, die durch die Expression von *α -smooth-muscle-Aktin* charakterisiert sind und nach Aktivierung große Mengen an EZM-Proteinen synthetisieren (Desmouliere, A. et al., 2005). Durch kontraktile Kräfte haben Myofibroblasten zudem eine entscheidende Rolle bei der Wundkontraktion (Hinz, B. et al., 2003).

Ist die Termination des Wundheilungsprozesses gestört, kann eine gesteigerte Produktion der EZM erfolgen, resultierend in einer exzessiven Ablagerung von Narbengewebe (Mutsaers, S. E. et al., 1997). Myofibroblasten, die normalerweise nach Wundverschluss in Apoptose gehen, persistieren (Desmouliere, A. et al., 1995). Ein chronischer fibrotischer Defekt kann sich entwickeln, der zum Verlust der jeweiligen Organfunktion führen kann. Die exzessive Narbenbildung ist mit diversen Krankheitsbildern assoziiert, z.B. Leberzirrhose, Arteriosklerose, Morbus Crohn, Stenosen, Keloide und hypertrophe Narben der Haut (Diegelmann, R. F. et al., 2004).

CTGF in der Wundheilung und Fibrose

CTGF weist zahlreiche Eigenschaften auf, die eine potentielle Rolle in der Wundheilung spielen, einschließlich der Stimulation der Zellproliferation, Zelladhäsion, Angiogenese und Produktion der EZM, und wird durch *TGF- β* , einen Schlüsselfaktor der normalen Wundheilung, induziert (s. 1.1.4.1 und 1.1.5).

Während der Geweberegeneration *in situ* wird die *TGF- β* - und *CTGF*-Expression koordiniert reguliert, wobei *CTGF* sechs Tage später als *TGF- β* maximal exprimiert wird (Igarashi, A. et al., 1993). Ein anhaltendes Ungleichgewicht der an der Wundheilung beteiligten Faktoren führt zu pathologischen Fibrosen. In fibrotischen Defekten, z.B. Fibrose bei vitreoretinalen Funktionsstörungen, Skleroderma, Leberzirrhose oder Lungenfibrose, wird *CTGF* konstitutiv überexprimiert (Igarashi, A. et al., 1995; Allen, J. T. et al., 1999; Williams, E. J. et al., 2000; Kuiper, E. J. et al., 2006). Die für fibrotische Erkrankungen charakteristische exzessive Deposition der EZM wird von *CTGF* durch Stimulation der Synthese von EZM-Komponenten (Kollagen TypI, Fibronectin) und Modulation der Expression von EZM-modifizierenden Proteinen (Hochregulierung der *tissue inhibitor metalloproteinase 1 (TIMP1)*, *TIMP-3* und *Matrixmetalloprotease 2*; Inhibition der *TIMP-2*-Expression) gefördert (Frazier, K. et al., 1996; McLennan, S. V. et al., 2004; Yang, M. et al., 2007). *CTGF* induziert zudem die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Grotendorst, G. R. et al., 2004). *In vivo* induzieren *CTGF* und *TGF- β* gemeinsam eine fortwährende fibrotische Antwort, während ein Faktor allein nur einen geringen Effekt erzielt (Mori, T. et al., 1999). Eine Blockade der *CTGF*-Expression durch siRNA zeigte therapeutisches Potential zur Prävention von Leberfibrosen (Li, G. et al., 2006). *CTGF* ist somit gleichzeitig Marker und Mediator von Fibrosen.

1.1.7 Rolle des *CTGF* am Glaukom

Ein spezielles fibrotisches Problem tritt bei der Behandlung von Glaukomerkrankungen auf. Das Glaukom, veraltet „grüner Star“ genannt, ist eine chronische Durchblutungsstörung des Sehnervs, die meist durch eine krankhafte Erhöhung des Augeninnendrucks verursacht wird. (Lenzen-Schulte, M., 2006). Der erhöhte Augeninnendruck, ausgelöst durch einen fehlerhaften Abfluss des Kammerwassers, bewirkt eine Unterversorgung der Sehnervenfasern (Abb. 4).

Der Patient verliert zunehmend an Sehvermögen. Weltweit erblinden jährlich etwa 6,7 Millionen Menschen an Glaukom (Grehn, F., 2005).

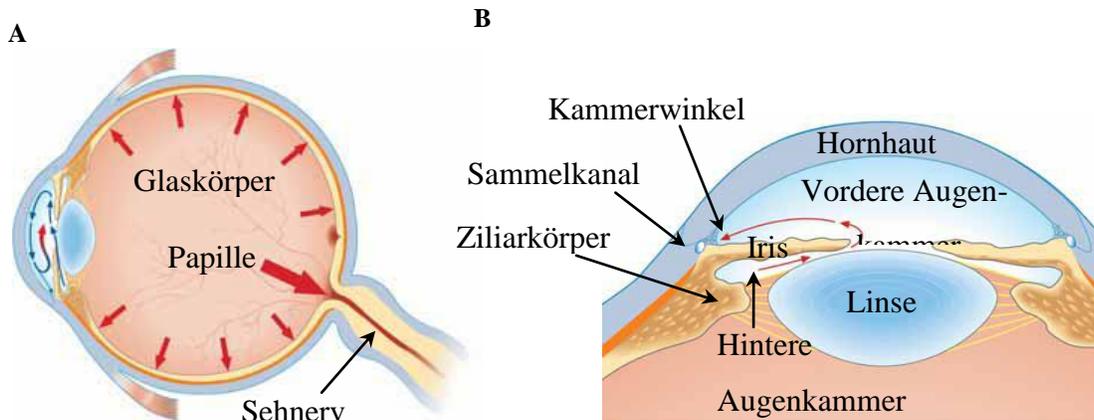


Abb. 4 Querschnitt durch den menschlichen Augapfel

(A) Erhöhter Augeninnendruck stört die Durchblutung des Sehnervs, der dadurch irreversibel geschädigt werden kann. (B) Im Ziliarkörper des Auges wird das Kammerwasser gebildet. Von der hinteren Augenkammer gelangt es in die vordere Augenkammer und fließt über den Sammelkanal ab (rote Pfeile, Lenzen-Schulte, M., 2006).

Für die Behandlung des Augeninnendruckes stehen mehrere Strategien zur Verfügung. Alle Therapien haben das Ziel den Augendruck zu senken bzw. einen verbesserten Abfluss des Kammerwassers zu ermöglichen. Die erste Option sind Medikamente (Betablocker, Sympathomimetika, ...). Wenn die medikamentöse Therapie versagt bzw. Kontraindikationen vorliegen, ist ein invasiver Eingriff per Laser oder Operation notwendig. Bei der operativen Methode (filtrierende Operation) wird für das Kammerwasser eine Art Ventil gebildet, damit es unter die Bindehaut fließen und resorbiert werden kann. Es entsteht ein mit Flüssigkeit gefüllter Hohlraum, ein so genanntes Sickerkissen (Grehn, F., 2005). Die größte Problematik und gleichzeitig Hauptursache für das Scheitern eines operativen Eingriffs ist die Vernarbung der Bindehaut und des Tenon im Bereich des Sickerkissens (Klink, T. et al., 2006). Kommt es zur postoperativen fibrösen Narbenbildung, kann das Kammerwasser nicht abfließen. Der Augendruck steigt erneut an, die Therapie war erfolglos.

CTGF scheint ein Hauptfaktor von Fibrosen am Auge zu sein, da die *CTGF*-Konzentration mit dem Grad fibrotischer Erkrankungen am Auge korreliert (Razaque, M. S. et al., 2003; Ho, S. L. et al., 2005; Kuiper, E. J. et al., 2006). Während der Wundheilung nach PRK (photorefraktiver Keratektomie)-Laserbehandlung ist die *CTGF*-Expression in der Kornea erhöht. Desweiteren wird die Kollagensynthese in humanen Korneazellen durch *CTGF*

gesteigert (Blalock, T. D. et al., 2003). Im Hasen-Modell wird nach filtrierender Glaukom-Operation die Expression von *CTGF* und *TGF- β -2* mit einem Maximum nach fünf Tagen induziert. Die Behandlung der Sickerkissen durch exogene Zugabe von *CTGF* steigert die Rate des Versagens der Operation (Esson, D. W. et al., 2004).

1.2 Zielstellung der Arbeit

Seit der Entdeckung 1991 erhält das multimodulare Protein *CTGF* zunehmende Aufmerksamkeit als Mediator von fibrotischen Prozessen. Die biologische Bedeutung der strukturellen Heterogenität des Proteins ist noch nicht vollständig erforscht. *CTGF* induziert die Expression einiger Fibrose relevanter Gene (z.B. Kollagen Typ I). Der genaue Einfluss von *CTGF* auf die Genexpression ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Protokolle für die rekombinante Herstellung und die Reinigung von humanen *CTGF*, der N- und C-terminalen Doppeldomäne sowie der einzelnen Domänen des *CTGF* in verschiedenen Expressionssystemen entwickelt werden. Die Proteine sollten durch Bindungsstudien mittels BIAcore-Messungen, Adhäsionsassays und Analysen zur Interaktion mit *BMP-2* auf Zellbasis (ALP-Assay) biochemisch charakterisiert werden. Außerdem sollte die Funktionalität der exprimierten Proteine in verschiedenen Zell-Assays bestätigt bzw. neu bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Änderungen im Genexpressionsmuster der humanen Tenonfibroblasten nach Behandlung mit humanem rekombinantem *CTGF* zu analysieren. Die Erstellung eines komplexen Expressionsprofils am Beispiel des pathologischen Modells des Augenglaukoms mit primären Tenonfibroblasten sollte mittels Affymetrix-Mikroarray-Technologie durchgeführt werden. Für diese Studie sollten die aus Tenonfibroblasten dreier unterschiedlicher Spender gewonnene RNA nach zwei Amplifikationsschritten für die Hybridisierung der DNA-Chips verwendet werden. Die Bestätigung der beobachteten Änderungen von ausgewählten Genen sollte mittels Real-Time PCR erfolgen.

Dadurch sollte die präzise funktionelle Rolle von *CTGF*, die Regulation zellulärer Funktionen betreffend, genauer bestimmt werden. Zudem könnte das Verstehen der Fähigkeit von *CTGF* fibrotische Erkrankungen zu stimulieren Anhaltspunkte über die Pathophysiologie der Fibrose ergeben und die Entwicklung neuer Methoden für antifibrotische Interventionen fördern.

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid	FCS	fötale Kälberserum
Abb.	Abbildung	h	human
ACN	Acetonitril	HBS	Hepes gepufferte Salzlösung
ALP	alkalische Phosphatase	Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2-ethansulfonsäure
Amp	Ampicillin	HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits- Chromatographie
APS	Ammoniumpersulfat	HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase
AS	Aminosäure	HSPG	Heparansulfatproteoglykane
BAA	Bis-Acrylamid	IGF	Insulin-like growth factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein	IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
Bp	Basenpaare	Kan	Kanamycin
BPB	Bromphenolblau	LB	Luria Broth
BSA	Rinderserumalbumin	LRP	lowdensity Lipoprotein- rezeptor verwandtes Protein
β -ME	β -Mercaptoethanol	M	Marker
CTCK	C-terminaler Cystinknoten	MOI	multiplicity of infection
CTGF	Connective tissue growth factor	MW	Molekulargewicht
Cyr61	Cystein rich 61	NOV	nephroblastoma overexpressed
cDNA	kodierende DNA	n.red	nicht reduzierend
DEPC	Diethylpyrocarbonat	OD	optische Dichte
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser	PAGE	Polyacrylamid-Gel- elektrophorese
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	PBS	Phosphat gepufferte Lösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	PDGF	Platelet-derived Growth Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
E.coli	Escherichia coli		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor		
EZM	Extrazelluläre Matrix		

pfU	plaque forming unit/Plaque bildende Einheit	Tab.	Tabelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TB	Terrific Broth
P/S	Penicillin/Streptomycin	TBS	Tris gepufferte Salzlösung
red.	reduzierend	Tet	Tetracyclin
RNA	Ribonukleinsäure	TFA	Trifluoressigsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute	TGF- β	Transforming Growth Faktor β
RT	Raumtemperatur	Tris	Tris-hydroxymethylamino-ethan
RU	Resonanz Einheit „resonance unit“	Trx	Thioredoxin
S26	ribosomales Protein S26	TSP1	Thrombospondin Typ I
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin	ÜNK	Übernachtkultur
SDS	Natriumdodecylsulfat	VA	Virusamplifikation
Sf-9	Spodoptera frugiperda	VWC	van Willebrand Faktor Typ C
SPR	surface plasmon resonance	WB	Western Blot
SV	Säulenvolumen	WISP	wnt inducible secreted protein

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von folgenden Firmen in höchster Qualitätsstufe bezogen: Affymetrix, Amersham, Biochrom, Biozym, Invitrogen, Millipore, NEB, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roth, Sigma. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Greiner und Nunc bezogen.

2.2.2 Kits

DNA-Mini-Präparation	Plasmid Mini Kit (Promega)
DNA Maxi-Präparation	Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Agarose-Gelextraktion	GelExtraction Sytem (Promega)
Baculo-Gold TM Transfection Kit	Pharming
RNA-Isolations-Kit	RNeasy (Qiagen)
Sequenzier-Kit	GenomeLab DTCS- Quick Start Kit (Beckman-Coulter)
Array-Proben-Präparation	Two-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix)
	MEGAscript® High Yield Transcription Kit (Ambion)

2.2.3 Bakterienstämme

Escherichia Coli MM294 (ATCC 33625)

Genotyp: F- supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda

Escherichia Coli Origami B(DE3) (Novagen)

Genotyp: F- ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB
(Kan^R, Tet^R)

2.2.4 Eukaryotische Zelllinien und primäre Zellen

<i>Name</i>	<i>Typ</i>	<i>Quelle</i>
<i>Zelllinien</i>		
ATDC5	murine chondrogene Zellen	ATCC
Balb3T3	murine Fibroblasten	ATCC
C2C12	murine Myoblasten	ATCC
Eahy926	humane endotheliale Hybridomzellen	PD Dr. Schütze (Universität Würzburg)
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen	ATCC
HepG2	humane Leberkarzinomzellen	DSMZ
Ina-6	humane Myelomzellen	ATCC
Ishikawa	humane endometriale Adenokarzinomzellen	ATCC
Mc3T3	murine embryonale Kalottenfibroblasten	DSMZ
MPC11	murine B-Lymphozyten	ATCC
Mv1Lu	Lungenzellen des <i>mustela vison</i>	ATCC
NIH3T3	murine Fibroblasten	ATCC
NRK49F	Fibroblasten aus der Niere (<i>rattus norvegicus</i>)	DSMZ
Swiss3T3	murine Fibroblasten	Dr. Meyer-ter-Vehn (Universität Würzburg)
Sf-9	Ovarialgewebe der Larve der <i>Spodoptera frugiperda</i>	Pharmingen
<i>Primäre Zellen</i>		
Tenon- fibroblasten	Fibroblasten aus dem menschlichen Tenon	Dr. Meyer-ter-Vehn

Tab. 2: Name, Typ und Quelle der verwendeten Zelllinien und primäre Zellen

2.2.5 Vektoren

Modifizierter pET32a (Novagen)

Grundgerüst: f1 ori, T7 Promotor, lacI Sequenz, Amp^R, Trx-Tag, His₆-Tag, S-Tag.

Modifikation (Kirsch et al. 2000): Durch die Deletion der Basenpaare 223 bis 297 aus dem originalen Vektor wurde die Position der Thrombinschnittstelle unmittelbar vor das Zielgen verschoben.

Modifizierter pBAC3(Novagen)

Grundgerüst: f1 ori, polh Promotor, Amp^R, gp64 Signalpeptid, His₆-Tag, S-Tag.

Modifikation (Kraich, Michael): Durch Mutation der Basenpaare 1376-1378 wurde eine BamHI-Schnittstelle unmittelbar hinter der internen Thrombinschnittstelle eingefügt. Eine weitere Mutation (bp 1487) zerstörte eine bereits im Vektor vorhandene BamHI-Schnittstelle.

2.2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid in HPLC-Qualität bezogen.

2.2.6.1 Oligonukleotide für die reverse Transkription

OligodT22

OligodT(22)

2.2.6.2 Oligonukleotide für die Real-Time-PCR

Gen	Primer	Sequenz	Organismus
ARIA	hARIy5	TACGATGTGGTTCCCAATGA	Homo sapiens
	hARIy3	AGTCTTGCGGATGGATTTTG	
ARIs	ARIs	TGGAAGATGAGAAGCCCAAGGTCAA	Mus musculus
	ARIs	CCTTTAGTGGGCAGCTGGGCCG	
ARIB	hARIBw5	CGACTTAGTGCCCTCTGACC	Homo sapiens
	hARIBw3	TGTGGAGAGAGGGAGCAGTT	
	mARIBy5	CACGAAGATGCAATTCTGGA	Mus musculus
	mARIBy3	GCAAGGCCTCATAACTCTGC	
BRIA	BRIAz5	AGCCCTACATCATGGCTGAC	Homo s. & Mus musc.

MATERIAL UND METHODEN

	BRIAz3	AGCGTTTCACACACAACC	Mus musculus
	hBRIAz3	CACACACAACCTCACGCAT	Homo sapiens
BRIB	hBRIBy5	CATGACCTAGTGCCAGTGA	Homo sapiens
	hBRIBy3	GTCAGCCTTGATGCAGGATT	
	BRIBy5	GTGCCAGTGACCCTTCTTA	Mus musculus
	BRIBy3	TGACATTTTGGCAAGGGTTT	
TRI	hTRIy5	GGCCAAATATCCCAAACAGA	Homo sapiens
	hTRIy3	TGATGCCTTCCTGTTGACTG	
	mTRI-5	GGTCATGGGAGTGTTCTGGT	Mus musculus
	mTRI-3	TGTGCTGACAGTCCTCTGCT	
ARII	hARIIf5	GTTGCCATTTGAGGAGGAAA	Homo sapiens
	ARIIf5	AGGAAGAAATTGGCCAGCAT	Mus musculus
	ARIIf3	CCAGCTGATAACCTGGCTTC	Homo s.& Mus musc.
ARIIB	hARIIBx5	CTGACTTTGGCTTGGCTGTT	Homo sapiens
	hARIIBx3	AGGGCAGCATGTACTCATCC	
	ARIIBz5	GAAGGAGCCATCAACTTCCA	Mus musculus
	ARIIBz3	GAAGGAGCCATCAACTTCCA	
BRII	hBRIIf5	AGGGGAATCCGTACCAGAGT	Homo sapiens
	hBRIIf3	CATCCTGGTCCCAACAGTCT	
	BRIIz5	TGTATGCGCTTGGACTCATC	Mus musculus
	BRIIz3	TCTGGGAACTTGGGTCTCTG	
TRII	hTRIIf5	TGTGGATGACCTGGCTAACA	Homo sapiens
	hTRIIf3	CAACACGTTGTCCTTCATGC	
	mTRII-5	CCATGGCTCTGGTACTCTGG	Mus musculus
	mTRII-3	CGGTCAAAGTCTCACACACG	
HPRT	prhHPRT5'	GACCAGTCAACAGGGGACAT	Homo sapiens
	prhHPRT3'	ACACTTCGTGGGGTCCTTTT	

	prHPRT5'	AGTCAACGGGGGACATAAAA	Mus musculus
	prHPRT3'	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA	
S26	S26s	GCAGCAGTCAGGGACATTTCT	Homo sapiens
	S26as	TTCACATACTTGGGAAGCA	

Tab. 3 Zielgen, Name, Sequenz und Zielorganismus der Primer für die Real-Time-PCR

2.2.6.3 Oligonukleotide für die Klonierungen

Name	Sequenz
<i>Klonierung von hCTGF-VWC in pet32a-TRX</i>	
hCTGFNco-5	ATACCATGGCCAACCGCAAGATCGGCGTG
hCTGFBpu-3	ATTGCACAGCTTAGGCTCTAATCATAGTTGGGTCTG
<i>Klonierung von hCTGF-CTCK in pet32a-TRX</i>	
Ncohtgf-CK-5	ATACCATGGGCAAGGGCAAAAAGTGCATCCGTAC
BpuhtgfC-3`	ATTGCTCAGCTTATGCCATGTCTCCGTACATCTTC
<i>Klonierung von hCTGF-IGF in pBAC3</i>	
BamctgfN5`	CGGGATCCCAGAACTGCAGCGGGCC
EcohtgfIGF3`	CCGAATTCTTAACCATCTTTGGCGGTGC
<i>Klonierung von hCTGF-VWC in pBAC3</i>	
pCR3BamHI5	CGGATCCGCTCCCTGCATCTTCGGTGG
pCR3EcoRI3	GAATTCTTAGGCTCTAATCATAGTTGGGTC
<i>Klonierung von hCTGF-TSP in pBAC3</i>	
BamhtgfC-5`	CGGGATCCGCTTACCGACTGGAAGACACG
EcohtgfTsp3`	CCGAATTCTTACTTAATGTTCTCTTCCAGGTCAGC
<i>Klonierung der hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne in pBAC3</i>	
BamctgfN5`	s. hCTGF-IGF
pCR3EcoRI3	s. hCTGF-VWC in pBAC3
<i>Klonierung der hCTGF-C-terminalen Doppeldomäne in pBAC3</i>	
BamhtgfC-5`	s. hCTGF-TSP
EcohtgfC-3`	CCGAATTCTTATGCCATGTCTCCGTACATCTTCC

Klonierung von hCTGF in pBAC3

BamctgfN5` s. hCTGF-IGF

EcohtgfC-3` s. hCTGF-C-terminale Doppeldomäne

Tab. 4 Name und Sequenz der für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide**2.2.7 Antikörper**

Die verwendeten Antikörper und die dazugehörigen Bedingungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 5).

Antikörper	Verdünnung für WB	Blocklösung	Typ, Ursprung	Quelle
1. Antikörper				
Anti-HIS	1:2000 in 3% BSA in TBS	3% BSA in TBS	monoklonal, Maus	Qiagen
Anti-CTGF	1:1000 in 3% BSA in TBS-T (0,5%)	3% BSA in TBS-T (0,5%)	polyklonal, Ziege	Santa Cruz
2. Antikörper				
Goat anti- mouse-HRP	1:10000 in 3% BSA in TBS	-	Ziege	Sigma
Mouse anti- goat-HRP	1:10000 in 3% BSA in TBS	-	Maus	Santa Cruz

Tab. 5 Liste der verwendeten primären und sekundären Antikörper**2.2.8 Rekombinante Proteine**BMP 2 *E.coli*; rekombinant; human; Prof. Dr. W. Sebald (Ruppert, R. et al., 1996)EGF *E.coli*; rekombinant; human; R&DCyr61 *Sf-21*; rekombinant, human; PD Dr. Schütze (Schütze, N. et al., 2005)

2.2.9 Proteingrößenstandards

Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in der SDS-PAGE und dem Western Blot werden verschiedenen Proteingrößenstandards eingesetzt (s. Tab. 6).

Proteingrößenstandard	MW [kDa]	Konzentration [$\mu\text{g}/5\mu\text{l}$]
SDS-PAGE		
Phosphorylase b	97	0,67
Albumin	66	0,83
Ovalbumin	45	1,47
Carbo-Anhydrase	30	0,83
Trypsin-Inhibitor	20,1	0,8
a-Lactalbumin	14,4	1,16
WB: SDS7B (Sigma)		
α 2-Macroglobulin	180	
β -Galactosidase	116	
Fructose-6-Phosphate Kinase	84	
Pyruvatkinase	58	
Fumarase	48,5	
Lactic Dehydrogenase	36,5	
Triosephosphate Isomerase	26,6	
WB: Bench Mark (Invitrogen)		
Bande 1	181,8	
Bande 2	115,5	
Bande 3	82,2	
Bande 4	64,2	
Bande 5	48,8	
Bande 6	37,1	
Bande 7	25,9	
Bande 8	19,4	
Bande 9	14,8	
Bande 10	6,0	

Tab. 6 Proteingrößenstandards

2.2.10 Medien/Lösungen für die pro-/eukaryotische Zellkultur

Prokaryoten

5×ENB-Medium	40g/l Nutrient broth., 25g/l Bacto-Trypton, 7,5 g/l KH_2PO_4 , 17,5 g Na_2HPO_4 , 25 g/l NaCl.
ENB-Platten	7,5 g Agar in 400ml dH_2O wird autoklaviert. Der auf ca. 40°C abgekühlten Lösung werden 100ml 5×ENB-Medium, 1,25 ml 40% Glucose, 250µl Thiamin (10mg/ml) sowie Antibiotika zugegeben. Die Lösung wird in Petrischalen gefüllt und nach dem Erstarren bei 4°C gelagert.
LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Yeast-Extract, 10g/l NaCl, 1 NaOH-Plätzchen, pH7,5.
10×Phosphatpuffer (Pi)	0,17M KH_2PO_4 , 0,72M K_2HPO_4 .
SOC-Medium	20g/l Bacto-Trypton, 5g/l Yeast-Extract, 0,59 g/l NaCl, 0,19g/l KCl. Autoklavieren. Vor Gebrauch 10µl/ml 1M MgSO_4 , 10µl/ml 1 M MgCl_2 und 10ml 40% Glucose zugeben.
TB-Medium	13,3g/l Bacto-Trypton, 26,6 g/l Yeast-Extract, 4,4ml/l Glycerin. Vor Gebrauch werden dem sterilen TB-Medium 1:10 (v/v) Pi-Puffer zugegeben.

Eukaryoten

DMEM (Gibco)	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Präparation nach Anleitung des Herstellers, steril filtriert.
FCS (Life Technologies)	Fötale Kälber Serum wird vor Gebrauch für 30min bei 56°C inaktiviert.
HAM-F12 (Gibco)	F-12 Nutrient Mixture (Ham), flüssig.
IPL-41(HyClone)	27,2 g/l IPL-41 Pulver in Wasser lösen, 0,35g NaHCO_3 , 2,6 g/l NaCl, pH 6,2. Zugabe von 20ml/l 50×Yeastolat und 10ml/l 100×Lipid Mix.
L-Glutamin (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium

α -MEM (Gibco)	Minimum essential medium alpha, Präparation nach Anleitung des Herstellers, steril filtriert.
Penicillin (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium (Endkonzentr.: 100 U/ml)
Streptomycinsulfat (Biochrom)	Additiv zum Zellkulturmedium (Endkonzentr.: 100 μ g/ml)
Trypan Blau (Biochrom)	1:4 verdünnt mit PBS
10 \times Trypsin	0,5% Trypsin (Biochrom), 0,2% EDTA in PBS; steril filtriert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit eukaryotischen Zellen werden an einer Sterilbank durchgeführt. Vor dem Arbeiten werden Arbeitsfläche und Hände mit einer 70%igen Ethanollösung gewaschen. Verwendete Materialien und Lösungen werden durch Autoklavieren für 30 min bei 120°C und 1,2 bar (Sterico Vapoklav Dampfsterilisator) oder durch Filtration (Porendurchmesser 0,2 μ m) sterilisiert. Arbeitsmaterialien werden vor und nach dem Gebrauch abgeflammt.

2.3.1.1 Insektenzellkultur

Die Zelllinie *Sf-9* (*Spodoptera frugiperda*) wird in IPL41-Medium mit 5% FCS und 10% P/S als Monolayer oder in Suspension bei 27°C vermehrt.

Monolayer-Kultur

Die Kultivierung der Insektenzellen als Monolayer erfolgt in 175cm²-Zellkulturflaschen. Nach Erreichen der Konfluenz werden adhärente Zellen durch einige Schläge auf die Flaschenkante vom Boden abgelöst und auf neue Flaschen aufgeteilt.

Suspensions-Kultur

Für Virusamplifikationen und Expressionen werden die *Sf-9* Zellen als Suspensionszellen in Rollerflaschen kultiviert. Zellen aus konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen werden in Rollerflaschen überführt, die Zelldichte auf 1,5 \times 10⁶ Zellen/ml eingestellt und in einem Brutschrank mit Drehvorrichtung inkubiert. Bei einer Zelldichte von 2,5-3 \times 10⁶Zellen/ml werden die Zellen auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

2.3.1.2 Säugerzellen

Die Kultivierung der Zelllinien ATDC5, Balb3T3, Eahy926, HepG2, Mc3T3, Mv1Lu, NIH3T3, NRK49F, Swiss3T3 sowie der primären Tenonfibroblasten erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator. C2C12-Zellen werden bei 10% CO₂ kultiviert. Die einzelnen Wachstumsmedien sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für die Subkultivierung werden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz mit 2×Trypsin vom Flaschenboden gelöst und in neue Kulturflaschen überführt.

Zellen	Wachstumsmedium
ATDC5	DMEM + HAM F12 1:1, 5% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S
Ballb3T3/Eahy926/MPC11/ NIH3T3/Swiss3T3	DMEM, 10% FCS, 4 mM Gln, 1% P/S
C2C12/HEK293T	DMEM, 10% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S, 1 mM Natriumpyruvat
HepG2	RPML, 10 FCS, 1% P/S
Mc3T3	αMEM, 10% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S
Mv1Lu	EMEM, 10% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S, 1 mM Natriumpyruvat
NRK49F	DMEM, 5% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S
Tenonfibroblasten	DMEM, 10% FCS, 2 mM Gln, 1% P/S

Tab. 7 Zellen und die dazugehörigen Wachstumsmedien

2.3.2 Zellassays

2.3.2.1 Adhäsionsassay

96-Loch-Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4°C mit 50µl/Loch des jeweiligen Proteins beschichtet. Die Absättigung erfolgt mit je 100µl 1% BSA in PBS für 1h bei 37°C. Die für den Adhäsionsassay einzusetzenden Zellen werden mit Trypsin vom Kulturflaschenboden gelöst und in Wachstumsmedium aufgenommen. Nach Waschen der Platten mit PBS werden 5×10^5 Zellen in 100µl Medium/Loch zugegeben. Die Adhäsion erfolgt für 30-60min bei 37°C im Brutschrank. Anschließend werden die Platten mit PBS gewaschen. Adhärenente Zellen werden mit einer 10%igen Formaldehyd-Lösung (100µl/Loch) für 15min fixiert. Zur Quantifizierung werden die Zellen mit 0,1% Kristallviolett-Lösung 25 min angefärbt. Nicht gebundener

Farbstoff wird durch Waschen mit dH₂O entfernt und die Zellen mit 50µl 0,2% Triton X-100 lysiert. Die Absorption wird bei 550 nm im ELISA-Reader bestimmt.

2.3.2.2 Proliferationsassays

WST-Assay

2×10³ Eahy926-Zellen werden pro Napf einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die Platte wird für 24h bei 37°C inkubiert. Nach einem Tag Hungern in DMEM mit 0,5% FCS werden die Zellen mit den entsprechenden Proteinen im Hungermedium (DMEM, 0,5% FCS) für 24h stimuliert. Am vierten Tag wird pro Loch 10µl WST-Reagenz (Roche) zugegeben. Die Extinktion wird nach 30min, 1h und 4h bei 450nm gemessen.

³H-Thymidin-Einbau

In einer 96-Loch-Platte werden pro Napf 2×10³ Tenon-Fibroblasten ausgesät. Am nächsten Tag werden diese 24h gehungert (DMEM, 3% FCS) und mit den entsprechenden Proteinen 48h (DMEM, 3% FCS) stimuliert. Die letzten 24h der Stimulationszeit wird je 10µl ³H-Thymidin-Lösung (25µM ³H-Thymidin, 47,5µM Thymidin in PBS) zugegeben. Die Zellen werden durch Zugabe von 50µl 2×Trypsin/Loch vom Plattenboden gelöst. Die Trypsinierung wird durch Zugabe von 100µl FCS/Loch abgestoppt. Die Zellen werden am Skatron (Programm 990; Spüllsg. dH₂O; Norway) auf eine Filtermatte gesaugt. Am β-counter (RITA; radioaktiv intelligent thin layer analyzer; Ray-Test) erfolgt nach einer einstündigen Trocknung der Filtermatten bei 60°C die Messung.

2.3.2.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität

Für die Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulatoren/Inhibitoren werden 1,2×10⁴ C2C12-Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag werden die Zellen in Hungermedium (DMEM, 2% Serum) mit den entsprechenden Proteinen für 72h stimuliert. Es folgt die Zell-Lyse durch Zugabe von je 100µl ALP1 (0,1M Glycin, pH9,6, 1% NP-40, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂). Die enzymatische Reaktion wird durch Zusatz von 100µl ALP 2

(0,1M Glycin, pH 9,6, 1mM MgCl₂, 1mM ZnCl₂, 0,2mg pNPP) gestartet. Die Messung der enzymatischen Aktivität wird an einem ELISA-Reader bei 405 nm durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Klonierung der CTGF-Konstrukte

Die Sequenzen des humanen CTGF, der N- und C-terminalen Doppeldomäne sowie der einzelnen Domänen werden mit spezifischen Primern (s. 2.2.6.3), die an den Enden Schnittstellen-Sequenzen mit den für den Vektor entsprechenden Restriktionsenzymen tragen (pet32a-TRX : NcoI – Bpu1102I; pBAC3: BamHI – EcoRI), in einer PCR amplifiziert. Für die Ligation werden 200 ng Vektor und die über Agarosegel aufgereinigten PCR-Produkte im 3fach molaren Überschuss mit der T4-Ligase für 1h bei RT inkubiert. Die Transformation erfolgt durch Hitzeschock in den Bakterienstamm MM294 (s. 2.6.1). Mittels Kolonie-PCR werden 6-10 Klone auf die Anwesenheit des Inserts hin überprüft. Von drei positiven Klonen wird eine Mini-Präparation (Plasmid-Mini-Kit, Promega) und zur Verifizierung der Sequenz eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

2.4.2 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wird mit dem RNeasy Mini KitTM von Qiagen durchgeführt. Dafür werden die Zellen direkt in der Zellkulturschale oder nach Ablösen und Zentrifugation lysiert (RLT-Puffer). Die RNA-Isolation erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

2.4.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (RT) werden OligodT(22)-Primer (s. 2.2.6.1) verwendet. Ein Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen

Gesamt-RNA	1 µg
OligodT(22)-Primer	0,5 µg
DEPC-ddH ₂ O	ad 12 µl
5min	70°C

RNA-Guard	39,8 U
10mM dNTP-Mix	500nM
5×M-MLV-Puffer	1/5 Vol
M-MLV-RT(H-)	200 U
DEPC-ddH ₂ O	ad 25µl

Die RT erfolgt in einem Thermocycler. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 8 gezeigt.

	Temperatur [°C]	Dauer [min]
Reverse Transkription	40	10
	42	50
Reaktionsstop	70	15
Konservierung	4	∞

Tab. 8 Standard-Temperaturprogramm der RT

2.4.4 Real-Time-PCR

Als Detektionssystem zur Quantifizierung der DNA-Synthese wird Sybr Green I verwendet. Der freie Farbstoff hat eine nicht detektierbare Fluoreszenz. Nach Bindung an doppelsträngige Nucleinsäuren lässt sich Sybr Green mit Blaulicht (480nm) anregen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm der Real-Time-PCR werden wie folgt verwendet.

Reaktionsansatz

cDNA	1 µl
10mM dNTP-Mix	240 µM
MgCl ₂	1,5 mM
FITC	1:20000 (1:10 in DMSO; 1:200 in dH ₂ O)
Sybr Green	1:38500 (1:10 in DMSO; 1:200 in dH ₂ O)
5'Primer	0,4µM
3'Primer	0,4µM
10×Taq-Puffer	1/10 Vol
Taq-Polymerase	0,3 U
ddH ₂ O	ad 25µl

Programm	Anzahl/Wdh.	Segment-Nr.	Temp. [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	1	1	95	30
	2	1	95	30
	1	1	95	180
Amplifikation	40	1	95	15
		2	60	60
Schmelzkurve	1	1	95	60
	45	1	50	10
Konservierung	1	1	12	∞

Tab. 9 Standardtemperaturprogramm der Real-Time-PCR

Die für die Real-Time-PCR eingesetzten Primer (s. 2.6.2.2) weisen folgende Eigenschaften auf: Primerlänge: 20bp, Produktlänge: 150-200bp, GC-Gehalt: ~50%, Schmelz-Temperatur: 60°C.

Die PCR-Produkte werden auf ihre Qualität hin geprüft (Schmelzkurve, Agarosegel). Für die Datenauswertung wird die Computersoftware iCycler verwendet. Zur relativen Quantifizierung wird die Expression des Gens von Interesse auf ein Referenzgen bezogen.

Berechnung der relativen Quantifizierung:

$$x = \frac{2^{\Delta TC_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle-Behandlung})}}{2^{\Delta TC_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle-Behandlung})}}$$

TC = Threshold-cycle (= der PCR-Zyklus, bei dem ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wird)

2.5 Affymetrix-Array

Die Affymetrixarrays wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Axel Seher durchgeführt.

2.5.1 Präparation der fluoreszierenden Proben

Analog zu dem ³H-Proliferationsassays mit Tenonfibroblasten werden 1×10⁶ der primären Zellen in 15cm-Schalen ausgesät, 16h kultiviert und 24h gehungert (DMEM, 3% FCS). Die

Zellen werden mit 6µg/ml *rhCTGF* (HEK) für 48h im Hungermedium stimuliert. Die RNA-Isolation wird mit dem RNeasy Mini-Kit durchgeführt (s. 2.4.2).

Die weitere Aufbereitung der Versuchsansätze erfolgt nach Anweisungen der „Gene Chip Expression Analysis“-Vorschrift (Affymetrix) mit Hilfe des „Two-Cycle Target Labeling and Control Reagents-Kits“ (Affymetrix, Expression Analysis) und des „MEGAscript® High Yield Transfection-Kits“ (Ambion). Es wurde eine Zwei-Runden-RNA-Amplifikation (modifiziert nach (Baugh, L. R. et al., 2001)) angewendet um genügend Material für die Mikroarray-Hybridisierung zu erhalten. Nach Vermessung der Gesamt-RNA wird mittels reverser Transkriptase ein komplementärer cDNA-Strang erstellt. Der RNA-Strang wird in der darauf folgenden Zweitstrangsynthese abgebaut. Die so gewonnene cDNA wird bei der *in-vitro*-Transkription in cRNA umgeschrieben. Nach einem Aufreinigungsschritt wird diese RNA erneut in einem zweistufigen Prozess in cDNA übersetzt. Diese wird für die Synthese der mit biotinylierten Ribonukleotiden markierten cRNA eingesetzt. Die cRNA wird vor der Hybridisierung durch Metallionen induzierte Hydrolyse in Fragmente von 35-200bp zerlegt (Abouhaidar, M. G. et al., 1999; Li, Y., Breaker, R. R., 1999)Li.

2.5.2 Hybridisierung, Markierung und Messung der Signale

Die Hybridisierung des Affymetrix Gene Chips U133A 2.0, Markierung und Detektion wurde von Frau Dr. Kneitz am IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung, Würzburg) durchgeführt. Der Array umfasst eine Auswahl an 14500 humanen Genen (Oligonukleotiden). Desweiteren enthält der Chip zur Evaluierung Hybridisierungs-, Poly-A-, Normalisierungs- sowie Haushaltsgenkontrollen.

Die Mikroarrays werden bei 42°C über Nacht hybridisiert, gefolgt von einem automatisiertem Wasch- und Färbungsprogramm. Zur Markierung der biotinylierten Proben werden die Arrays für 10 Minuten bei 25°C mit Streptavidin- Phycoerythrin (SAPE, 10µg/ml) inkubiert. Nach einem Waschschrift wird zur Signalverstärkung ein α-Streptavidin biotinylierter Antikörper, der an die hybridisierten Biotin markierten cDNA-Fragmente bindet, und anschließend erneut SAPE zugegeben. Die Detektion der hybridisierten Fragmente erfolgt mittels eines konfokalen Laserscanners (ScanArray4000, Perkin Elmer). Die Messung wird mehrfach durchgeführt und die Lichtintensität aus den Messungen gemittelt.

2.5.3 Datenanalyse

Für die Analyse der Primärdaten wurden die Signale individueller Probesets (bzw. Oligonukleotide) auf die mittlere Signalintensität der zu vergleichenden Arrays normalisiert und logarithmiert (\log_{10}). Folgenden Filterkriterien wurden für die zu vergleichenden transformierten Datensätzen nach dem Normierungsschritt angewendet: (A) *CTGF*⁺/*CTGF*⁻, (B) signal \log_2 ratio. Um die Beziehungen der differentiell exprimierten Gene zu analysieren, wurde Gene Ontology verwendet. Gene Ontology ist ein Konsortium mehrerer Datenbanken, das Genprodukte in bestimmte funktionelle Gruppen einteilt und die Wechselbeziehungen analysiert werden können (Ashburner, M. et al., 2000).

2.6 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

2.6.1 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von *E.coli* MM294/Origami B(DE3) durch Hitzeschock müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden. Im 2l-Kulturkolben werden 200ml LB-Medium mit 2ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C mit 180rpm bis zu einer OD_{550} von 0,5 geschüttelt. Nach 20minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen 5min bei 3000rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wird in 10ml eiskaltem TSS-Puffer (85% LB-Medium, 10% PEG (w/v, MW: 8000), 5% DMSO, 50 mM $MgCl_2$) resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden in Aliquots von 200 μ l aufgeteilt und umgehend bei -80°C eingefroren.

Zur Transformation werden kompetente *E.coli* Bakterien mit 10-20 ng Plasmid-DNA auf Eis aufgetaut. Nach 30minütiger Inkubation wird der Hitzeschock für 90 s bei 42°C durchgeführt. Die Zellen werden für 1-2 Minuten auf Eis abgekühlt, 800 μ l SOC-Medium (s. 2.2.9) zugegeben und für 30 Minuten bei 30°C geschüttelt. Die transformierten Zellen werden auf ENB-Platten ausgestrichen.

2.6.2 Analytische Expression

Antibiotika-Stocklösungen:

Ampicillin: 50mg/ml; Kanamycin: 30mg/ml; Tetracyclin: 12,5mg/ml

Vor der Verwendung des TB-Mediums werden neben dem Phosphat-Puffer (s. 2.2.9) die entsprechenden Antibiotika im Verhältnis 1:1000 (v/v) zugegeben.

Für die analytische Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* Origami B(DE3)/pet32a wird eine Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien im Maßstab 1:35 mit TB-Medium verdünnt und diese Kultur für 1 h bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Nach Entnahme einer Probe wird IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Weitere 3 h später wird erneut eine Probe abgenommen und die Induktion anhand einer SDS-PAGE analysiert.

2.6.3 Präparative Fermentation

Für die präparative Fermentation werden 6×800ml TB (50µg/ml Amp, 30µg/ml Kan, 12,5 µg/ml Tet, 100µl 10% Antifoam) mit einer ÜNK im Verhältnis 1:25 angeimpft. Die Kulturen werden bei 30°C bis zu einer OD von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Expression mit 1mM IPTG induziert und die Bakterien bei 20°C für weitere 20h geschüttelt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 6000 rpm für 15min. Das daraus resultierende Zellpellet wird im Waschpuffer (20mM Tris/HCl; pH 7,5, 150mM NaCl) resuspendiert und gewaschen (6000rpm, 10min). Das Bakterienpellet wird in 8 g Portionen aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.4 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung

Das Bakterienpellet wird in 100ml Auftragspuffer (s. 2.8.8.1) 1h bei 4°C resuspendiert und anschließend auf 200ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wird in einer Rosettenzelle in das Ultraschallgerät (Fa. MSE Baumann) eingespannt und während der gesamten Prozedur im Eisbad gekühlt. Die Ultraschallbehandlung erfolgt 2-8mal für 30s bei einer Amplitude von 70 Mikron. Zwischen den Beschallungen wird jeweils für 1 min auf Eis pausiert. Das Abtrennen

der Zellbestandteile erfolgt durch Ultrazentrifugation (30min, 30000rpm). Die erhaltenen Rohextrakte werden direkt in der Nickel-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt.

2.7 Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen

2.7.1 Transfektion von *Sf-9* Zellen mit dem Baculo-Gold™ System

Zur Generierung rekombinanter *Autographica californica* Viren durch homologe Rekombination von viraler DNA und eines Baculo-Transfervektors (pBAC3) diente das Baculo-Gold™ Transfection Kit.

Für die Co-Transfektion werden auf einer 6-Loch-Platte $0,8 \times 10^6$ Zellen pro Loch ausgesät und für 1h bei 27°C inkubiert. Nach Absetzen der Zellen wird das Medium durch 500µl des Transfektionspuffers A ersetzt. 2,5µg der linearisierten Baculo-Gold™-DNA (AcNPV-Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) wird mit 4µg des Baculo-Transfer-Vektors (pBAC3) vermischt und für 5min bei RT inkubiert. Der DNA-Lösung werden 500µl Transfektionspuffer B zugesetzt. Der Ansatz wird anschließend tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 4h werden die Zellen zweimal mit IPL-41 Medium gewaschen und mit frischem Wachstumsmedium überschichtet. Nach fünf Tagen bei 27°C kann der Überstand, der die rekombinanten Viren enthält, geerntet werden.

2.7.2 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay dient der Isolierung einzelner Viren oder der Bestimmung des Viren-Titers von Überständen der Virusamplifikationen (s. 2.7.3). Es werden Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-6} Viren/ml Insektenzellmedium für den Plaque-Assay verwendet. Dazu werden $1,2 \times 10^6$ Zellen in 1ml Medium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, für 1h inkubiert und anschließend das Zellmedium durch die Virusverdünnungen ersetzt. Nach einer Stunde wird der Überstand abgenommen. Die Zellen werden mit einem Gemisch aus 700µl FCS, 6,6ml 1,3×SF-900 Medium und 3,3ml 2,7% Seaplaque-Agarose (0,54 g SeaPlaque®-Agarose durch Autoklavieren in 20ml ddH₂O gelöst) überschichtet und in einer feuchten Plastikbox bei 27°C inkubiert. Fünf Tage später werden die Plaques durch Anfärben der vitalen Zellen mit 1ml

MTT (1mg/ml) sichtbar gemacht. Je nach Zeitpunkt des Plaque-Assays wird folgendermaßen weiter verfahren.

Nach Cotransfektion:

Plaques werden nach Absaugen der MTT-Lösung mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 1ml IPL41-Medium resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 27°C wird die Virensuspension 5min bei 1000rpm zentrifugiert und der Überstand für die erste Virusamplifikation (s. 2.7.3) eingesetzt.

Bestimmung des Virentiters:

Die Plaques werden gezählt und der Virentiter bestimmt.

$$\frac{pfu}{ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Verdünnung}} \quad \text{pfU} = \text{Plaque bildende Einheit}$$

2.7.3 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Die Amplifikation der rekombinanten Viruspartikel erfolgt in vier Schritten um einen größeren Virusstock zu generieren. Für die erste Virusamplifikation (VA) werden je $1,5 \times 10^6$ Zellen/Loch auf einer 6-Loch-Platte ausgesät, für eine Stunde inkubiert und mit verschiedenen Klonen rekombinanter Baculo-Viren aus dem Plaque-Assay versetzt. Nach vier Tagen wird der Überstand abgenommen und für 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Die Herstellung der 2.VA wird analog zur ersten Amplifikation in einer 6-Loch-Platte mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/Loch durchgeführt. Die Überstände werden nach vier Tagen auf die Expression des gewünschten Konstrukts mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Zur Erzeugung des dritten Virusstocks wird der Klon mit der stärksten Expression gewählt und 4×10^7 Zellen in einer 175cm²-Zellkulturflasche mit den rekombinanten Viren für 4 Tage kultiviert. Der vierte Amplifikationsschritt wird in Rollerflaschen angesetzt. Hierfür werden 100ml Sf-9 Kultur ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 5 ml der 3.VA infiziert und für 4 Tage inkubiert. Die durch Zentrifugation (5 min, 1000rpm) von Zellbestandteilen gereinigte 4. VA wird nach Bestimmung des Virentiters durch einen Plaque-Assay bis zur Nutzung für die Expression des Zielgens bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.7.4 Expression in *Sf-9* Zellen

Die Expression rekombinanter Proteine in *Sf-9* Zellen wird in Rollerflaschen durchgeführt. Pro Rollerflasche werden maximal 300ml Zellsuspension ($1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit $3 \times \text{MOI}$ (3 pfU/Zelle) der 4.VA infiziert und bei 27°C inkubiert. Vier Tage später werden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 6000rpm abgetrennt. Der Überstand wird im Waschpuffer (s. 2.8.1.2) für die nachfolgende Metall-Affinitätschromatographie dialysiert.

2.8 Chromatographische Trennverfahren

2.8.1 Metall-Affinitäts-Chromatographie

Die Metall-Affinitäts-Chromatographie beruht im Allgemeinen auf der spezifischen reversiblen Bindung von Aminosäuren an Metallionen. Bei den zwei verwendeten Systemen wechselwirken die an das Säulenmaterial gebundenen Ni-Ionen mit den Histidinen des Hexa-Histidin-Tags der exprimierten Proteine.

2.8.1.1 Chromatographie an Ni-Chelat-Sepharose

Die Reinigung der in *E.coli* exprimierten Thioredoxin-His₆-Fusionsproteine erfolgt über eine Ni²⁺ beladene Chelating Sepharose® FF (Pharmacia) bei 4°C.

Auftragspuffer	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 5mM Imidazol
Waschpuffer	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 60mM Imidazol
Elutionspuffer	20mM Tris/HCl; pH 7,9; 500mM NaCl; 500mM Imidazol
EDTA-Puffer	20mM Tris, pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA
Vorsäulenmaterial	Sephacryl S-100 (Pharmacia)
Säulenmatrix	Chelating Sepharose® FF (Pharmacia)
Pumpe	Minipuls 3 (Gilson)
Detektor	2210 Recorder 2-Channel, 2238 Uvicord SII (LKB Bromma)
Fraktionssammler	Model 203 Gilson
Flussrate	2,5ml/min

Zunächst werden 10 ml Chelating Sepharose® FF in eine Säule (\varnothing 1cm, l= 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)) eingebracht und mit 10 SV dH₂O gewaschen. Die Säulenmatrix wird mittels 50 ml einer 50mM Nickelchlorid(NiCl₂)-Lösung mit Ni-Ionen beladen. Der Hauptsäule wird eine zweite Säule mit 2ml Sephacryl S-100 als Vorsäule vorgeschaltet. Die einzelnen Reinigungsschritte der Metall-Affinitätschromatographie sind in Tabelle 10 gezeigt.

Vorgang	Puffer	Volumen
Äquilibrieren	Auftragspuffer	100 ml
Probenauftrag	-	~200 ml
Waschschritt 1	Auftragspuffer	50ml
Waschschritt 2	Waschpuffer	100ml
Elution	Elutionspuffer	60ml
Regeneration	100mM EDTA, pH 8	50ml

Tab. 10 Schritte der Ni-Affinitätschromatographie

Die Elutionsfraktionen werden zu 10ml gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Proteinhaltige Fraktionen werden vereinigt und gegen 5l EDTA-Puffer dialysiert.

2.8.1.2 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren dient als erster Aufreinigungsschritt für die in *Sf-9* Zellen exprimierten Proteine. Mit Ni²⁺ beladene immobilisierte Nitrilotriessigsäure(NTA)-Agarose-Matrix wird als Säulenmaterial verwendet.

Waschpuffer 50mM NaH₂PO₄, pH 8,3; 300mM NaCl; 10mM Imidazol

Elutionspuffer 50mM NaH₂PO₄, pH 8,3; 300mM NaCl; 300mM Imidazol

Das aus der Expression in Insektenzellen gewonnene Dialysat wird für 15min bei 6000rpm zentrifugiert. Die Proteinlösung wird mit Waschpuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose (Qiagen) versetzt (2ml Ni-NTA/1l Suspension) und bei 4°C 1h gerührt. Nach der Inkubation

wird der Ansatz in eine Säulenkartusche (\varnothing 2,5cm, l = 10cm, Econo-Column® Glassäule (Bio-Rad)) überführt. Der Durchfluss wird nur durch die Schwerkraft getrieben. Nach dem Sedimentieren der Säulenmatrix, wird zweimal mit je 50 SV gewaschen. Die gebundenen Proteine werden durch den Elutionspuffer (30ml) von der Säule eluiert und zu je 5ml fraktioniert. Der Proteingehalt der Fraktionen wird mittel SDS-PAGE analysiert. Eluate mit Fusionsprotein werden gesammelt und gegen den EDTA-Puffer (s. 2.8.1.1) dialysiert.

2.8.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Trennung durch Gelfiltration erfolgt aufgrund der Größe der zu trennenden Proteine. Die Auftrennung der Proteine wird an der Größenausschlusschromatographiesäule Superdex 200® an einer HPLC-Anlage (s. 2.8.4) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Chromatographie wird die Säule mit Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Die Gelfiltrationspuffer für die verschiedenen exprimierten Proteine sind in den jeweiligen Abbildungen angezeigt. Die Proben werden in einem Volumen von 500 μ l über die Injektionsschleife aufgetragen und fraktionell eluiert. Tabelle 11 zeigt die wichtigsten Parameter der Gelfiltration.

Säulenmaterial	Säulenmaße [mm]	Elutionsgeschwin- digkeit [ml/min]	Temperatur	Fraktionsgröße [ml]
Superdex TM - 200	10 • 300	0,5	RT	0,5

Tab. 11 Parameter der SuperdexS200-Gelfiltration

2.8.3 BMP-2-Affinitätschromatographie

HBS ₇₀₀ -Puffer:	10mM HEPES; pH 7,4; 700mM NaCl
Säulenmatrix:	<i>BMP-2</i> gebunden an Cyanbromid-aktivierte Sepharose (Pharmingen)
Säulenkartusche:	Econo-Column® Glassäule (BioRad; \varnothing 1cm, l =10cm)
Pumpe, Detektor	s. 2.8.1.1
Fraktionssammler	s. 2.8.1.1

Nach Äquilibration der Säule mit HBS₇₀₀-Puffer wird die Proteinlösung in möglichst hoher Konzentration auf das Säulenbett gegeben und mittels Schwerkraft der Durchfluss angetrieben. Die Säule wird mit HBS₇₀₀-Puffer bis zum Erreichen der baseline bzw. mit 5 SV gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgt mit 4M MgCl₂ in 6 Fraktionen zu 4ml. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wird spektralphotometrisch analysiert und die entsprechenden Fraktionen zur Dialyse gegen den angegebenen HBS-Puffer vereinigt.

2.8.4 RP-HPLC

Die Umkehrphasen – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (reversed phase – high performance liquid chromatography - RP-HPLC) ist ein Chromatographieverfahren zur Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches aufgrund hydrophober Eigenschaften.

Säule	Vydac-214TP; C4; Porengröße 10µM; 4,6×250mm (MZ-Analysentechnik)
HPLC-System	L6200A-Intelligent Pump (Merck/Hitachi) L4000- UV-Detektor (Merck/Hitachi) Gilson FC 203B

Das Puffersystem besteht aus 0,1% TFA (0,1% (V/V) TFA in dH₂O) und Acetonitril. Der Probenauftrag erfolgt manuell mit einer 5ml-Spritze über ein Schaltventil in eine 5ml Probenschleife. Die Flussrate beträgt 0,8 ml/min, die Fraktionsgröße 0,8 oder 1,6 ml. Die Acetonitrilgradienten der Elution sind in den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Alle Säulenläufe werden bei RT durchgeführt. Die Peakfraktionen werden anhand des Chromatogramms ermittelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Fraktionen mit dem entsprechenden Protein werden lyophilisiert.

2.9 Proteinchemische Methoden

2.9.1 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli können Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden (Laemmli, U. K., 1970). Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgt mit dem Perfect Blue Doppelgelsystem Twin S von Peqlab.

Acrylamidlösung (AA/BAA)	30% Acrylamid, 1% N,N'-Methylenbisacrylamid, nach Filtration bei 4°C lagern
4×Lower Tris	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,4 % SDS
4×Upper Tris	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,6, 0,19 M Glycin, 0,15% SDS
PPP	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2 % SDS , 20 % Glycerin (87%), 0,1% BPB (reduzierende Bedingungen: + 5 % 2-Mercaptoethanol)

Die zur Auftrennung von Proteinen verwendeten Gele bestehen aus einem unteren 12% bzw. 15%igen Polyacrylamid-Trenngel und einem oberen 5%igen Sammelgel. Die Zusammensetzungen der Gellösungen sind in Tabelle 12 angegeben. TEMED und die Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) werden zuletzt zugesetzt. Das Trenngel wird bis auf eine Höhe von zirka einem Zentimeter unterhalb des Taschenformers gegossen. Zur Ausbildung einer planen Oberfläche wird die Gellösung sofort mit dH₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Taschenformer eingesetzt.

	Sammelgel	Trenngel 12% (15%)
AA/BAA-Lsg.	0,5 ml	4 (5)ml
4× Upper Tris	1,25 ml	-
4× Lower Tris	-	2,5 ml
dH ₂ O	3,2 ml	1,5 (0,5)ml
Glycerin	-	2ml
TEMED	12 µl	14µl
APS	12µl	14µl

Tab. 12 Herstellung der Gellösungen für die SDS-PAGE

Die Proben werden vor dem Auftrag 1:2 in Proteinprobenpuffer (PPP) aufgenommen und fünf Minuten bei 100 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 35 mA.

2.9.2 Proteinfärbung

Coomassie-Blau Färbung

Um die Proteinbanden nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, werden die Gele 25 Minuten in der Färbelösung angefärbt. Anschließend wird das Gel so lange mit der Entfärbelösung behandelt bis die gewünschte Färbung erreicht ist.

Färbelösung: 0,25% (w/v) Brillant Blue, 45% (v/v) MetOH, 10% (v/v) Eisessig

Entfärbelösung: 10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Isopropanol

Silberfärbung

Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Färbung eine sensitivere Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen.

Lösung 1: 30 ml 50% (v/v) Aceton, 750µl 50% (w/v) Trichloressigsäure (TCA), 12,5 µl 37% Formaldehyd

Lösung 2: 30 ml 50% (v/v) Aceton in H₂O

Lösung 3: 50µl 10% (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat (Na₂S₂O₃×5H₂O) in 30 ml dH₂O

Lösung 4: 400 µl 20% (w/v) Silbernitratlösung (AgNO₃), 300 µl 37% Formaldehyd, 30 ml dH₂O

Lösung 5: 0,6 g Natriumcarbonat (Na₂CO₃), 12,5 µl 37% Formaldehyd, 25 µl 10% (w/v) Na₂S₂O₃×5H₂O in 30 ml dH₂O

Nach Beendigung der SDS-PAGE wird das Gel folgendermaßen behandelt:

5min	Lösung 1
3×5s	waschen mit dH ₂ O
5min	dH ₂ O
3×5s	waschen mit dH ₂ O
5min	Lösung 2

1min	Lösung 3
8min	Lösung 4
5×5s	waschen mit dH ₂ O

Anschließend wird Lösung 5 zugegeben und das Gel so lange inkubiert bis die gewünschte Bandenintensität erreicht wird. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 1% Eisessig gestoppt.

2.9.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine empfindliche Methode für den Nachweis von spezifischen Proteinen in komplexen Mischungen.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE werden diese anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll BA85) transferiert. Der Transfer wird nach der Semi-Dry-Transfer-Methode (Kyhse-Andersen, J., 1984) in einer Apparatur der Firma Peqlab (Consort E802) durchgeführt. Es werden 2 x 3 auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Filterpapiere in Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränkt. Zusammen mit einer zurechtgeschnittenen Nitrozellulosemembran und dem PAA-Gel, beide in Transferpuffer getränkt, werden die feuchten Whatman-Papiere für den Aufbau der Blot-Apparatur (Kathode - 3x Whatman-Filterpapier - SDS-Polyacrylamidgel - Nitrozellulosemembran - 3x Whatman-Filterpapier - Anode) verwendet. Der elektrophoretische Transfer erfolgt bei Raumtemperatur für 35 min und 35mA. Als Proteinmarker dient der vorgefärbte SDS7B oder Bench Mark (s. 2.2.9).

Immundetektion von Proteinen

TBS:	10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl
TBST:	0,5 % (v/v) Tween in TBS
TBS/BSA:	3% (w/v) BSA in TBS
Luminol-Lösung:	2,5 mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid), 1 % (v/v) DMSO, 0,1M Tris/HCl, pH8,5
Enhancer-Lösung :	90 mM p-Cumarsäure, 2,5 ml DMSO
H ₂ O ₂ -Lösung:	5,4 mM H ₂ O ₂ (30 %), 0,1 M Tris/HCl, pH8,5

Nach dem Blotten wird die Nitrozellulosemembran für 1h bei RT mit dem Blockpuffer (s. 2.2.7) inkubiert. Die Membran wird 3 x 10 min mit 0,5% TBST (α -CTGF) bzw. TBS/BSA (α -HIS) gewaschen, anschließend die Primärantikörper-Lösung zugegeben und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Es folgen erneut drei Waschschrte (3 x 10 min). Im Anschluss erfolgt eine mindestens einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach viermaligem Waschen (4 x 10 min TBS (α -His) bzw. TBST (α -CTGF)) wird der Blot entwickelt. Dazu wird 5 ml Luminol-Lösung mit 22 μ l Enhancer-Lösung versetzt und zu 5ml H₂O₂-Lösung gegeben. Die Membran wird mit der Detektionslösung benetzt und 1 min inkubiert. Mit einem Röntgenfilm wird die Membran in einer Filmkassette verschlossen und in Abhängigkeit von der Signalstärke wird der Film 1 min bis 1h exponiert.

2.9.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Für die Quantifizierung von Proteinen wird eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Proteine zeigen eine spezifische Absorption bei 280 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

E =Extinktion

$$E_{280} = \epsilon_{280} * c * d \quad \epsilon = \text{molare Extinktionskoeffizient [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{]}$$

c = Konzentration [mol/l]

d = Dicke der durchstrahlten Schicht [cm]

Die molaren Massen sowie die Extinktionskoeffizienten der in der Arbeit verwendeten Proteine sind in Tabelle 13 angegeben.

Protein	Molare Masse [g/mol]	$\epsilon_{280\text{nm}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
<i>hCTGF-VWC</i>	10715,3	10595
<i>hCTGF-Nterminale Doppeldomäne</i>	16561,1	9855
<i>hCTGF (Sf-9)</i>	35614,3	25295
<i>hCTGF (HEK293T)</i>	35470,1	25295

Tab. 13 Molare Massen und Extinktionskoeffizienten der exprimierten Proteine bei 280nm

2.9.5 Thrombinspaltung

Die meisten in dieser Arbeit exprimierten Proteine verfügen über einen Hexa-Histidin-Tag auf den eine Thrombinschnittstelle folgt. Die Thrombinerkennungsstelle (LVPRGS) ermöglicht die Abspaltung des HIS₆-Tags. Dazu werden die Proteine, nachdem sie im Anschluss an die Ni-Affinitätschromatographie gegen den EDTA-Puffer dialysiert wurden, ü.N. in ein Dialysebad mit Thrombinspaltungspuffer (50mM Tris, pH 8,0, 150mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) gehängt. Die proteolytische Spaltung erfolgt bei 30°C 4-6h bei mit der jeweils angegebenen Thrombinkonzentration. Die Spaltung wird anhand einer SDS-PAGE bzw. eines Western Blots überprüft.

2.9.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein Analyseverfahren zur Bestimmung der molekularen Masse. Die Molekulargewichte der in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden von Herrn Dr. Werner Schmitz an einem ESI-FT-ICR-MS (Elektrospray-Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer, Firma Bruker) durchgeführt.

2.10 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen mit der BIAcore Technik

Basierend auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) können mit einem Biacore-Gerät die Wechselwirkungen zwischen zwei Bindungspartnern in Echtzeit analysiert werden. Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden von Herrn Prof. Sebald und Herrn Dr. Nickel am Biosensor BIAcoreTM 2000 (BIAcore) durchgeführt.

Zur Messung der Interaktionen zwischen den rekombinanten *CTGF*-Konstrukten und *BMP-2* wurde *rhBMP-2* über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an die Matrix des Sensorchips immobilisiert. Vor Beginn der Bindungsmessungen wird der Chip zwei Minuten mit der Regenerationslösung (4M MgCl₂) behandelt. Der Analyt wird in einem kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche geleitet. Bindet eine Probe, so wird die Massenzunahme an der Chipoberfläche detektiert. Die Änderung des SPR-Signals wird in Resonanz Units (=RU) angegeben. Ein RU entspricht einer Zunahme der Oberflächenkonzentration von 1pg/mm². Anschließend wird Puffer injiziert um die Dissoziation zu verfolgen. Nach der Regeneration

steht die Oberfläche der nächsten Messung zur Verfügung. Die Bindungsmessungen werden bei 25°C und einer Flussrate von 10µl/min durchgeführt. Als Puffer dient, wie in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben, HBS₃₂₅ (10mM Hepes, 325mM NaCl, pH7,4). Die Auswertung der kinetischen Bindungsdaten erfolgte mit Hilfe des Programms BIAevaluation 2.0 (Biacore AB, Freiburg).

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in die vier folgenden Teile:

1. Die rekombinante Herstellung und Aufreinigung des humanen *CTGF*, der N- und C-terminalen Doppeldomäne sowie der vier einzelnen *CTGF*-Domänen (die Insulin-like-growth Faktor-Domäne, die von Willebrand Faktor Typ C Domäne, der Thrombospondin Typ I Repeat und die C-terminale Cysin-Knoten-Domäne (Abb. 5),
2. die biochemische Charakterisierung und
3. die biologische Funktionalitätsprüfung der rekombinanten Proteine sowie
4. die Analyse des Genexpressionsprofils humaner Tenonfibroblasten nach Behandlung mit rekombinatem *hCTGF*.

A

```

1  MTAASMG PVR VAFVLLALC SRPAVGQNCS GPCRCPDEPA PRCFAGVSLV LDGCGCCRVC
61 AKQLGELCTE RDPCDPHKGL FCDFGSPANR KIGVCTAKDG APCIFGGTVY RSGESFQSSC
121 KYQCTCLDGA VGCMP LCSMD VRLPSPDCPF PRRVKLPGKC CEEWVCDEPK DQTVVGPALA
181 AYRL EDTFGP DPTMIRANCL VQTTEWSACS KTCGMGISTR VTNDNASCRL EKQSRLCMVR
241 PCEADLEENI KKGK KIRTP KISKPIKFEL SGCTSMKTYR AKFCGVCTDG RCCTPHR TTT
301 LPVEFKCPDG EVMKKNMMFI KTCACHYNCP GDNDIFESLY YRKMYGDMA
    
```

B

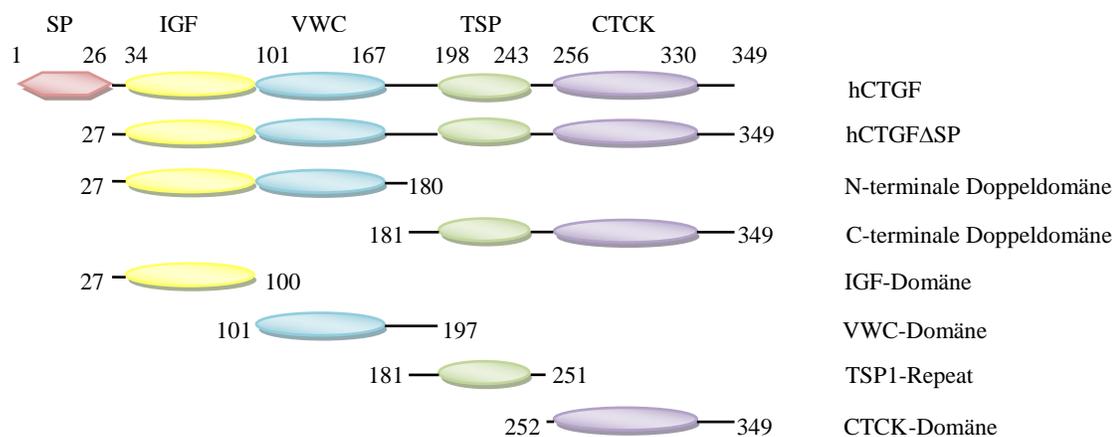


Abb. 5 AS-Sequenz des *hCTGF* und schematische Darstellung der zu exprimierenden *CTGF*-Konstrukte

(A) AS-Sequenz des humanen *CTGF*. Die vier Domänen sind in verschiedenen Farben markiert (Rot=SP, gelb=IGF-Domäne, blau=VWC-Domäne, grün = TSP1-Repeat, lila = CTCK-Domäne). (B) Die Struktur des humanen *CTGF* sowie die verschiedenen rekombinanten *CTGF*-Isoformen dieser Arbeit. SP = Signalpeptid; IGF = Insulin ähnlich Wachstumsfaktorbindende Domäne; VWC = von Willebrand Faktor Typ C Domäne, TSP1 = Thrombospondin Typ I Repeat; CTCK = C-terminale Cystinknoten-Domäne.

3. 1 Präparation und Aufreinigung der *CTGF*-Konstrukte

3.1.1 Expressionssystem *E.coli* Origami B(DE3)

Zur Herstellung der van Willebrand Faktor Typ C (VWC)- sowie der C-terminalen Cystinknoten (CTCK)-Domäne wurde *E.coli* als Expressionssystem gewählt. Vorteile dieses Systems sind die einfache und schnelle Handhabung, die geringen Kultivierungskosten, die hohe Effizienz und die Möglichkeit einer Kultivierung in relativ großem Maßstab.

Klonierung und Expression der hCTGF-VWC- und der hCTGF-CTCK-Domäne

Die Sequenzlänge für die Expression der VWC-Domäne wurde, wie bereits am *Xenopus CTGF* beschrieben, von der ersten Aminosäure der VWC-Domäne bis zur letzten AS der cysteinfreien Region (AS 101-197), die Aminosäuresequenz der zu exprimierenden CTCK-Domäne von der unmittelbar vor Domäne vier liegenden beschriebenen Plasminschnittstelle bis zum C-Terminus des *CTGF* (AS 252-349) gewählt (Abreu, J. G. et al., 2002; Grotendorst, G. R. et al., 2005).

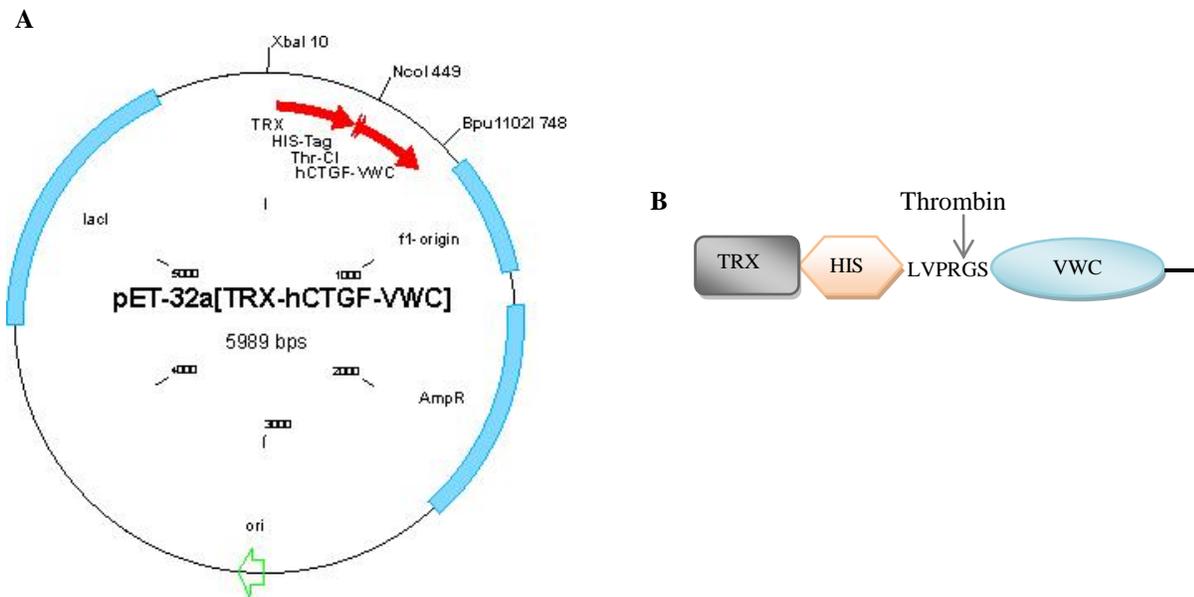


Abb. 7 Darstellung des Expressionsvektors (A) und des exprimierten *CTGF*-Konstrukts in *E.coli* (B)

(A) Genkarte des Expressionsvektors pET-32a[TRX-hctgf-vcw]. Die Sequenz der VWC-Domäne des humanen *ctgf* wurde über die Schnittstellen NcoI und Bpu1102I eingefügt. (B) schematische Darstellung des exprimierten Proteins. *hCTGF-VWC* wird als Thioredoxin(TRX)-Fusionsprotein mit einem Hexahistidin-Tag (HIS) und einer Thrombinschnittstelle (Thr-CI; LVPRGS) exprimiert.

Die Konstrukte für die hCTGF-VWC- und hCTGF-CTCK-Domäne wurden in den modifizierten pet32a-Vektor eingesetzt (Abb. 7A). Dieses Plasmid exprimiert Fusionsproteine, bestehend aus einem N-terminalen Thioredoxin, einem Hexa-Histidin-Tag, einer Thrombinschnittstelle und dem entsprechenden Protein (Abb. 7B). Die Herstellung der Proteine, *TRX-hCTGF-VWC* und *TRX-hCTGF-CTCK*, wurde in dem prokaryotischen Expressionssystem Origami B(DE3) durchgeführt. Die präparative Fermentation erfolgte im Maßstab von 4,8l (s. 2.6.3). Es wurden 3,0-3,5 g Zellen pro Liter Kulturmedium geerntet. Die Induktion der Konstrukte wurde anhand einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 8).

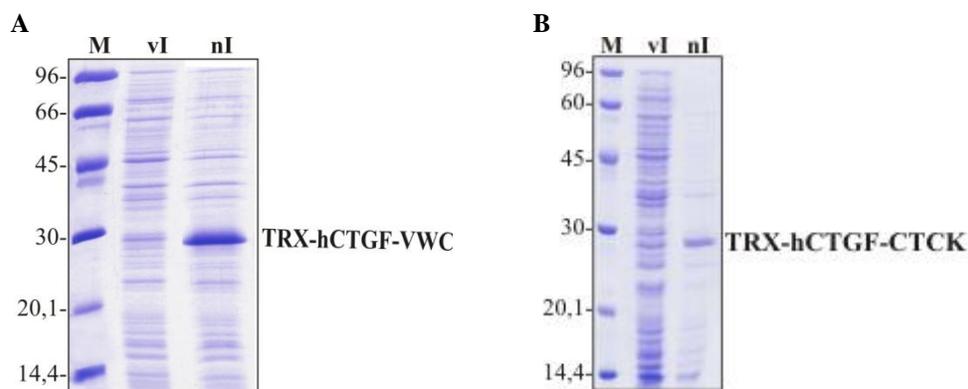


Abb. 8 Induktionskontrolle von *TRX-hCTGF-VWC* (A) und *TRX-hCTGF-CTCK* (B)

12% SDS-PAGEs (red.) der Zellaufschlüsse von *TRX-hCTGF-VWC* (A) und *TRX-hCTGF-CTCK* (B) vor (vI) bzw. 20h nach Induktion (nI).

Die Untersuchung des Proteinmusters der Zellaufschlüsse vor bzw. 20h nach Induktion mit IPTG lässt je eine spezifische Induktionsbande bei knapp 30kDa, dem theoretischen Molekulargewicht der zu exprimierenden Proteine (*TRX-hCTGF-VWC*: 25kDa; *TRX-hCTGF-CTCK*: 25,5kDa) entsprechend, erkennen (Abb. 8).

Zellaufschluss und IMAC

Das Zellpellet (8g) wurde durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und nach Ultrazentrifugation erfolgte der erste Aufreinigungsschritt durch eine Nickel-Affinitäts-Chromatographie. Die Elution der an die Säulenmatrix gebundenen Proteine erfolgte isokratisch mit 0,5M Imidazol.

hCTGF-VWC

Die SDS-PAGE der Metall-Affinitätschromatographie der VWC-Domäne unter reduzierenden Bedingungen zeigt in den Elutionsfraktionen zwei und drei eine Doppelbande bei knapp 30 kD (Abb. 9A), unter nicht reduzierenden Bedingungen ist in den Elutionsfraktionen zwei und drei eine Doppelbande bei 45kDa sowie bei ~25kDa zu erkennen (Abb. 9B).

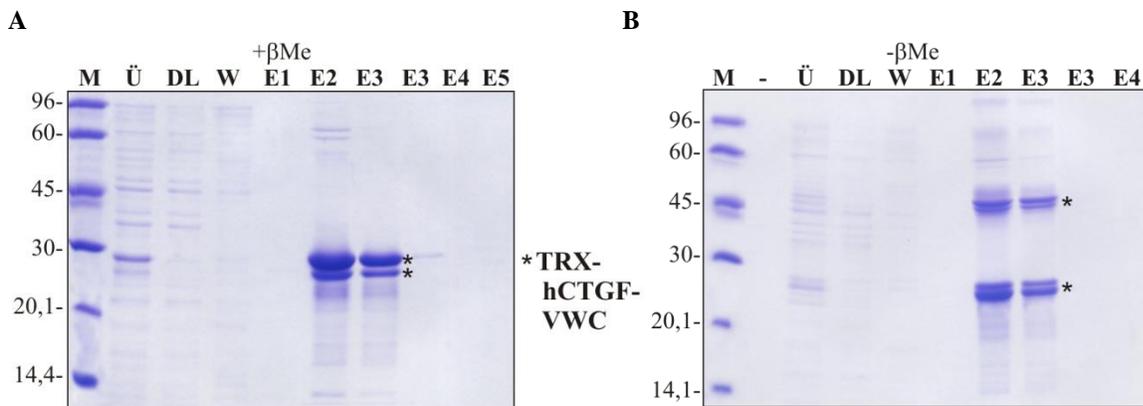


Abb. 9 Analyse der Aufreinigung von *TRX-hCTGF-VWC* mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie
12% SDS-PAGE (red. A; n. red. B) des Überstands (Ü), Durchlaufs (DL), der Waschfraktionen (W1+2) und Elutionsfraktionen (E1-5) der Ni-Affinitäts- von *TRX-hCTGF-VWC*.

Die Doppelbande bei knapp 30kD (red.) bzw. 25kD (n. red.) könnten durch Degradierung verkürzte Abbauprodukte des exprimierten Proteins darstellen. Da die Doppelbande bei 45kDa unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden ist, deutet dies an, dass die Banden bei 45kD Cystein verbrückte Dimere der VWC-Domäne sind.

hCTGF-CTCK

Bei der C-terminalen Domäne zeichnen sich in der SDS-PAGE drei Banden zwischen 22kDa und 28kDa Banden, sowie eine weitere Bande bei ca. 17kDa im reduzierten Zustand ab (Abb. 10). Nicht reduzierte Proben weisen das gleiche Bandenmuster auf (nicht gezeigt). Dieses multimere Bandenmuster ist wie bei der VWC-Domäne durch eine Spaltung des exprimierten Proteins zu erklären. Das Auftreten mehrerer Banden im Vergleich zur Induktion (Abb. 8) konnte bereits nach der Ultraschallbehandlung beobachtet werden (nicht gezeigt).

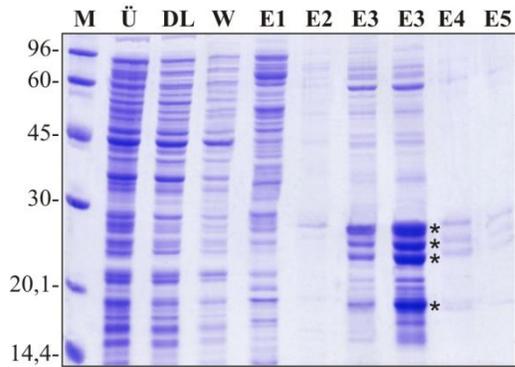


Abb. 10 Analyse der Aufreinigung von TRX- hCTGF-CTCK mittels Nickel-Affinitäts-Chromatographie

12% SDS-PAGE (red.) des Überstands (Ü), Durchlaufs (DL), der Waschfraktionen (W1+2) und Elutionsfraktionen (E1-5) der Ni-Affinitäts-Chromatographie von TRX-hCTGF-CTCK .

Thrombinspaltung, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung

hCTGF-VWC

Die N-terminal/vor der VWC-Domäne liegende Thrombinschnittstelle ermöglichte die Abspaltung des Thioredoxins inklusive des Hexahistidin-Tags. Die Spaltung erfolgte nach Dialyse bei 30°C für 5 h im Massenverhältnis 500:1. In anschließenden BMP-2-Affinitätschromatographien konnte keine Bindung der hCTGF-VWC-Domäne an die Säulenmatrix festgestellt werden. Somit scheint die VWC-Domäne nicht für die Bindung des full-length CTGF-Proteins an BMP-2 (s. 3.1.3) verantwortlich zu sein oder eine falsche Faltung aufzuweisen (Dimerisierung).

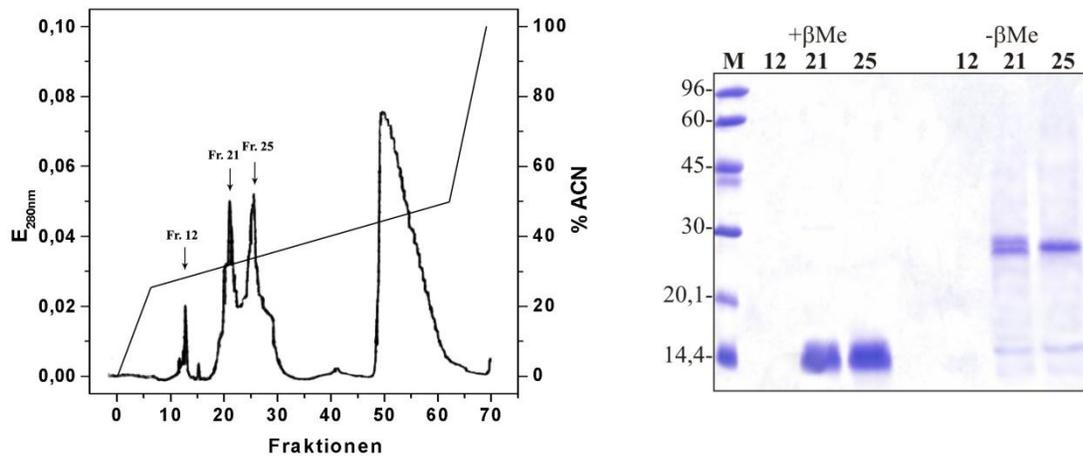
Als letzter Reinigungsschritt wurde die RP-HPLC angewandt. Hierzu wurde die Proteinlösung aus der Thrombinspaltung auf eine C4- Säule aufgetragen und in einem linearen Gradienten bei 0,1 % TFA/Acetonitril eluiert. Neben Thioredoxin, das ab Fraktion 50 eluiert wurde, konnten drei Peaks detektiert werden. Die proteinhaltigen Fraktionen dieser Peaks (12, 21, 25) wurden nach Kontrolle anhand einer SDS-PAGE lyophilisiert und in der Massenspektrometrie analysiert (Abb. 11).

In Fraktion 12 konnte mittels massenspektrometrischer Analyse eine geringe Menge eines abgespaltenen Fragmentes der exprimierten VWC-Domäne – hCTGF-VWC Δ 1–85 – identifiziert werden. Dieses Spaltprodukt war so klein, dass es auf dem SDS-Gel nicht nachweisbar war (Abb. 11A).

In den Fraktionen 21 und 25 war in der SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei ~14 kD zu erkennen. Nicht reduzierte Proben zeigten zusätzliche Banden bei ~28kD, die Vermutung Cystein verbrückter Proteine nahelegend (Abb. 11B). Die

massenspektroskopische Analyse bestätigte, dass die Fraktionen 21 und 25 dimerisierte VWC-Domänen und zwar mit ein oder zwei verkürzten Hälften (*hCTGF-VWC* Δ 86-102; Abb. 11C) enthielten. Da *CTGF* in vivo als Monomer beschrieben wird, sind die experimentell beobachteten VWC-Dimere vermutlich durch eine falsche Faltung bedingt.

A



B

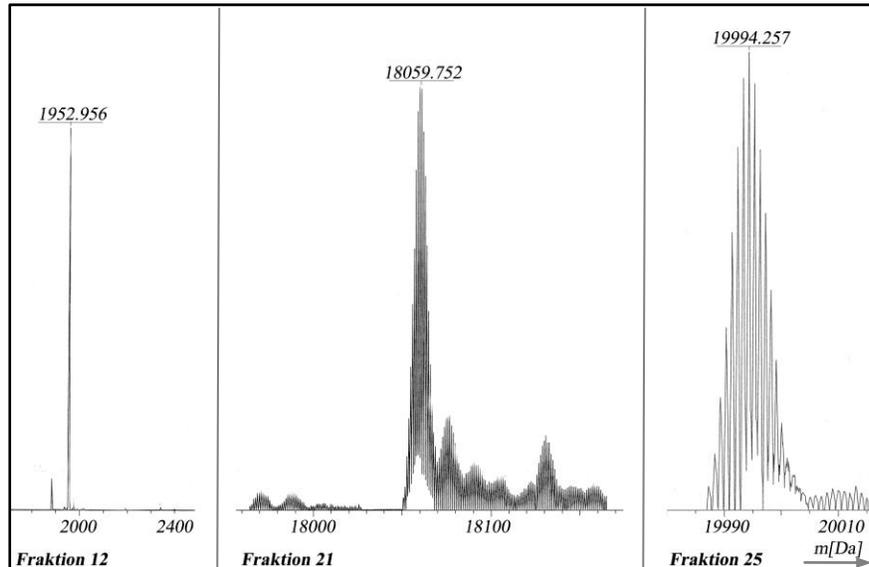


Abb. 11 RP-HPLC-Lauf des *hCTGF-VWC* und Massenspektroskopische Analyse der RP-HPLC-Fraktionen 12, 21 und 25

(A) Analyse des RP-HPLC-Laufes des *hCTGF-VWC*. Die Auftrennung erfolgte über einen 0,1% TFA/Acetonitril-Gradienten. Die Fraktionen wurden je 1,6 Minuten gesammelt. Links: Elutionsprofil der RP-HPLC. Rechts: 12% SDS-PAGE-Analyse (red.) der Fraktionen 12, 21 und 25 der RP-HPLC.

(B) Dekonvolvierte Daten der Massenspektroskopie der Proteinfractionen 12, 21 und 25 mit korrespondierendem Molekulargewicht. Links: Fraktion 12, AS 86-102 des *hCTGF-VWC*. Mitte: Fraktion 21, VWC-Dimer, bestehend aus zwei verkürzten Monomeren (*hCTGF-VWC* Δ 86-102). Rechts: Fraktion 25, VWC-Dimer, bestehend aus einem kompletten Monomer und einem verkürzten Monomer Δ 86-102.

In weiteren Experimenten wurde versucht die proteolytische Spaltung und Dimerbildung durch Variation der Bedingungen während des Zellaufschlusses und der sich anschließenden Zentrifugation zu verhindern (verkürzte Ultraschallbehandlung, kürzere Zentrifugationszeiten, niedrigerer rpm, verschiedene Protease-inhibitoren, permanentes Arbeiten bei 4°C). Dadurch konnte die Spaltung reduziert, aber nicht vollständig aufgehalten werden. Die Dimerbildung hingegen blieb unverändert.

hCTGF-CTCK

Die proteolytische Spaltung der C-terminalen Domäne sollte durch Veränderungen der experimentellen Parameter (s. VWC-Domäne) verhindert werden, konnte aber nicht reduziert werden. Deswegen wurden keine weiteren Aufreinigungsschritte unternommen.

Zumal bei der Expression der VWC- und CTCK-Domäne in *E.coli* die Problematik der auftretenden Dimerisierung und Proteolyse nicht behoben werden konnte, wurden in Prokaryoten keine weiteren *CTGF*-Konstrukte exprimiert.

3.1.2 Expression in Insekten *Sf-9* Zellen

Eine Alternative zur bakteriellen Genexpression stellt die Expression in *Sf-9*-Insektenzellen mit Hilfe rekombinanter Baculoviren dar. Vorteile dieses Expressionssystems sind die Proteinfaltung mit eukaryotischen Chaperonen und Ausbildung von Disulfidbrücken, sowie die Einführung posttranslationaler Modifikationen, wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen.

3.1.2.1 Expression des *hCTGF-IGF*

Klonierung und Expression

Die Klonierung und Kotransfektion wird nachfolgend beispielhaft für alle in *Sf-9* Zellen rekombinant hergestellten Proteine detailliert an der Insulin-like-growth-Faktor-Domäne des *hCTGF* (*hCTGF-IGF*) beschrieben. Die amplifizierte DNA-Sequenz für die *hCTGF-IGF*-

Domäne (kodierend für die AS 27-100 des *hCTGF*) wurde über die Schnittstellen BamHI und EcoRI in den modifizierten Transfektor pBAC-3 eingebracht (s. 2.2.5). Dieser Vektor kodiert neben einem Hexa-Histidin-Tag zur besseren Detektion und Reinigung des exprimierten Proteins auch für eine Signalsequenz zur Sekretion des Proteins in das Zellkulturmedium (Abb. 12A). Der rekombinante Vektor wurde anschließend mit der linearisierten Baculo-Gold-DNA, einer modifizierten *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA, in *Spodoptera frugiperda* (*Sf-9*) Zellen kotransfiziert. Das Expressionssystem ist so konzipiert, dass nach Kotransfektion ein Rekombinationsereignis stattfinden kann und rekombinante Baculoviren entstehen. Mit Hilfe eines Plaque-Assays wurden rekombinante Baculoviren isoliert. Fünf Virenisolate wurden über mehrere Schritte amplifiziert.

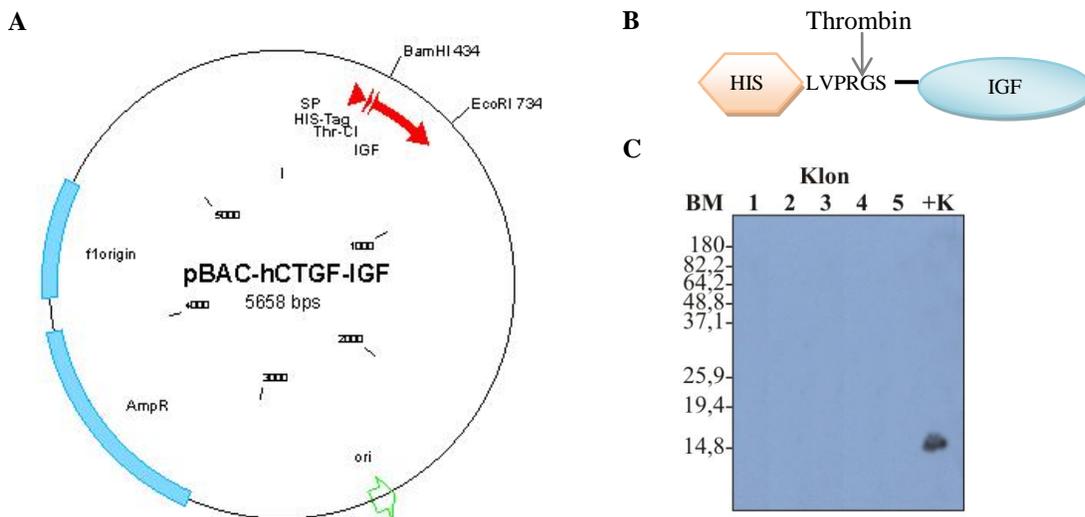


Abb. 12 (A) Genkarte des Expressionsvektors pBAC-3[hCTGF-IGF]. Die Schnittstellen BamHI und EcoRI wurden für die Einfügung der Sequenz des *hctgf-igf* in pBAC-3 verwendet. (B) Schema des exprimierten IGF-Konstrukts (HIS= Hexa-Histidin-Tag; LVPRGS= Thrombinschnittstelle). (C) Western-Blot (red.) mit α -HIS-Antikörper zur Überprüfung der *HIS₆-hCTGF-IGF*-Expression der Klone 1-5 nach der zweiten Virusamplifikation. Vier Tage nach Infektion von *Sf-9*-Zellen mit der 1.VA wurden die Virenüberstände gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. (+K = Positivkontrolle).

Die Virenüberstände dieser Klone wurden nach der zweiten Virusamplifikation anhand eines α -HIS Western-Blots auf die Expression des Proteins getestet. In den Überständen der Klone 1-5 konnte kein Signal detektiert werden (Abb. 12C). Der Virus wurde in zwei weiteren Amplifikationsschritten vermehrt und ein weiterer α -His-Western-Blot ausgeführt. Auch zu

diesem Zeitpunkt konnte keine Expression nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen für das Unterbleiben einer Expression, die z.B. ein fehlerhaftes Transferplasmid oder eine fehlerhafte wt-Baculovirus-DNA sein können, konnten durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden. Die IGF-Domäne des *hCTGF* konnte somit in Insektenzellen nicht hergestellt werden.

3.1.2.2 Präparation und Reinigung des *hCTGF*-VWC

Klonierung und Expression

Das Konstrukt für die Expression der van Willebrand Faktor Typ C (VWC)-Domäne in Insektenzellen wurde, wie bereits in *E.coli* beschrieben (s. 3.1.1), von AS 101-197 gewählt (Abreu, J. G. et al., 2002). Die Klonierung und Kotransfektion in Insektenzellen erfolgte analog zu der IGF-Domäne (s. 3.1.2.1). Nach einem Plaque-Assay wurden fünf Klone für die weitere Virusamplifikation eingesetzt. Die Expression des Konstrukts wurde nach dem zweiten Vermehrungsschritt anhand eines Immuno-Blots überprüft. Als Negativkontrolle diente der Überstand untransfizierter Zellen, die unter gleichen Bedingungen angezogen war.

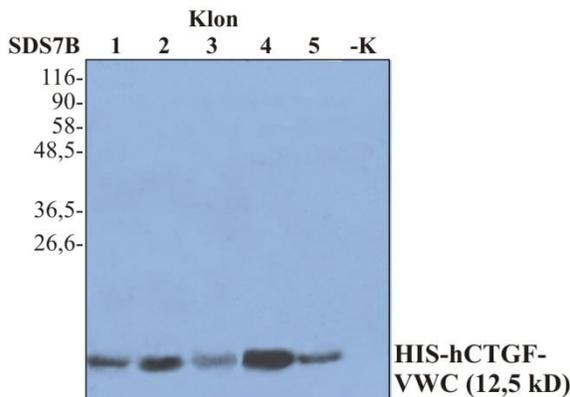


Abb. 13 Western-Blot (red.) zum Nachweis der Expression des *hCTGF*-VWC nach der 2ten Virusamplifikation

Virusüberstände, der mit Klon 1-5 infizierten *Sf-9* Zellen wurden nach der 2. VA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Transfermembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem α -HIS-AK (-K = Negativkontrolle).

Bei der Western-Blot-Analyse konnte bei allen Klonen die erwartete Bande in Höhe von ~13 kDa nachgewiesen werden (Abb. 13). Der Klon vier scheint eine stärkere Expression als die anderen Klone auszuweisen. Da eine hohe Proteinexpression gewollt ist, wurde dieser der Virusstock dieses Isolats wurde in zwei weiteren Amplifikationsschritten vermehrt. Für die Proteinexpression wurden die Insektenzellen mit $3 \times \text{MOI}$ eines Virusstocks mit $>5 \times 10^7$ pfU/ml infiziert und 4 Tage bei 27°C in Rollerflaschen inkubiert. Der 1-2 l umfassende Expressionsansatz konnte nach Dialyse für die folgende Ni-NTA-Affinitätschromatographie eingesetzt werden.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Thrombinspaltung

Das N-terminale Hexa-Histidin-Tag des exprimierten Konstrukts erlaubt nicht nur die Detektion des Zielproteins im Western-Blot, es bietet auch die Möglichkeit das Protein über Metall-Affinitätschromatographie zu reinigen. Mit dieser Reinigung ist gleichzeitig auch die Konzentrierung des Proteins verbunden. Die *VWC-Domäne* wurde aus dem Kulturüberstand über eine Nickel-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren aufgereinigt (s. 2.8.1.2). Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mit einer SDS-PAGE überprüft. Das Protein *hCTGF-VWC* war in den Elutionsfraktionen 1-4, nur eine geringe Menge an Fremdprotein im hochmolekularen Bereich wurde ebenfalls eluiert (Abb. 14A). Die gesammelten proteinhaltigen Eluate wurden zur Vorbereitung auf die Thrombinspaltung dialysiert. Zur Abtrennung der Ni-Ionen aus der Probe erfolgte zunächst ein Dialyseschritt gegen EDTA-Puffer, nachfolgend gegen Thrombinspaltungspuffer. Die Ausbeute der in *Sf-9* Zellen exprimierten *VWC-Domäne* konnte mit durchschnittlich 5mg/l bestimmt werden.

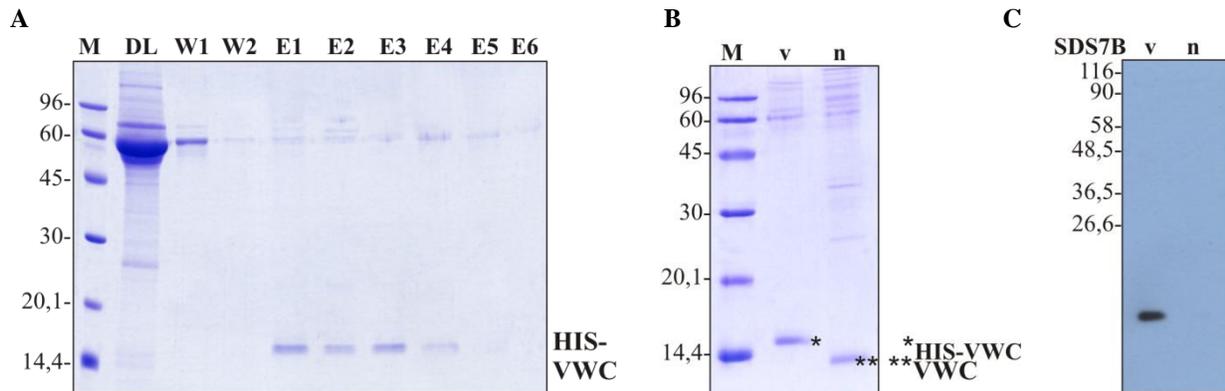


Abb. 14 Analyse der Ni-NTA-Chromatographie und der Thrombinspaltung des *hCTGF-VWC*

(A) 12% SDS-PAGE (red.) nach Ni-NTA-Chromatographie. Nach dem Durchlauf (DL) erfolgten zwei Waschschritte (W1+2). Gebundene Proteine wurden mit 300mM Imidazol isokratisch in sechs Fraktionen eluiert (E1-6). (B+C) Kontrolle der Thrombinspaltung des *hCTGF-VWC* vor (v) und nach (n) der Thrombinspaltung (A: 12% SDS-PAGE (red.); B: α -His-Western-Blot (red.)).

Das N-terminale Hexa-Histidin-Tag konnte durch die sich C-terminal anschließende Thrombin-Erkennungssequenz (LVPRGS) abgespalten werden. Dafür wurden die Eluate der Ni-Affinitätschromatographie nach Dialyse bei 30°C für 5h mit 5U Thrombin/mg Protein inkubiert. Die Abspaltung des Hexa-Histidin-Tags wurde anhand einer SDS-PAGE und eines Western-Blots analysiert. In der SDS-PAGE weist die deutliche Verschiebung der

Proteinbande des *hCTGF-VWC* nach im Vergleich zu vor der Spaltung die Verkürzung der Spezies nach (Abb. 14B). Im α -His Western Blot zeigt das Verschwinden der Bande nach fünf Stunden Verdau mit Thrombin die vollständige Abspaltung des Hexa-Histidin-Tags an (Abb. 14C). Nach der Spaltung wurde die Proteinsuspension gegen HBS₃₀₀-Puffer für den folgenden Aufreinigungsschritt dialysiert.

Größenausschlusschromatographie an der S200-Säule

Für die weitere Aufreinigung des exprimierten Proteins wurde eine Gelfiltration an der Superdex200-Säule durchgeführt. Da ein Auftragsvolumen von 500 μ l hierfür Bedingung ist, wurden 5ml Proteinlösung 10fach konzentriert. Nach dem Auftrag auf die Säule wurden die Proteine mit HBS₃₀₀-Puffer eluiert.

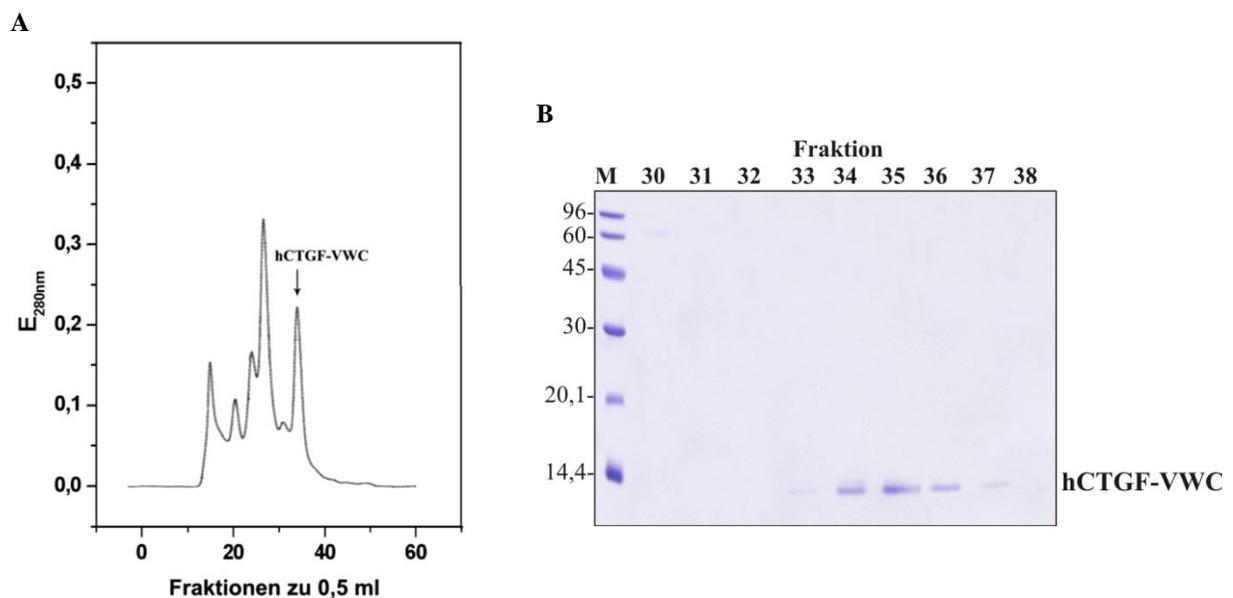


Abb. 15 Chromatogramm und SDS-PAGE der Superdex200-Gelfiltration von *hCTGF-VWC*

Als Laufpuffer für die chromatographische Analyse diente HBS₃₀₀, die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5ml/min, die Fraktionsgröße 0,5ml. (A) Chromatogramm der Superdex200-Gelfiltration. (B) 12% SDS-PAGE (red.) der Superdex200-Fraktionen 30-38.

Die Reinheit der einzelnen Peak-Fraktionen wurde durch eine SDS-PAGE überprüft. In den Fraktionen zwischen 16 und 30 Minuten konnten hochmolekulare Proteine beobachtet werden (nicht gezeigt). Die VWC-Domäne war in den Fraktionen 34-37, dem letzten Peak des

Chromatogramms entsprechend, enthalten (Abb. 15B). Die Ausbeute der gesammelten Fraktionen aus 11 *Sf-9*-Expressionsüberstand betrug im Durchschnitt 1,5mg/l.

RP-HPLC

Der letzte Aufreinigungsschritt der *VWC-Domäne* des *hCTGF* war eine RP-HPLC mit einer C4-Säule. Die Proteinlösung nach der Gelfiltration wurden 1:2 mit 0,1% TFA versetzt und chromatographisch analysiert. Das Protein wurde aufgetragen und im linearen Acetonitril-Gradienten zwischen 25% und 35% Acetonitril eluiert.

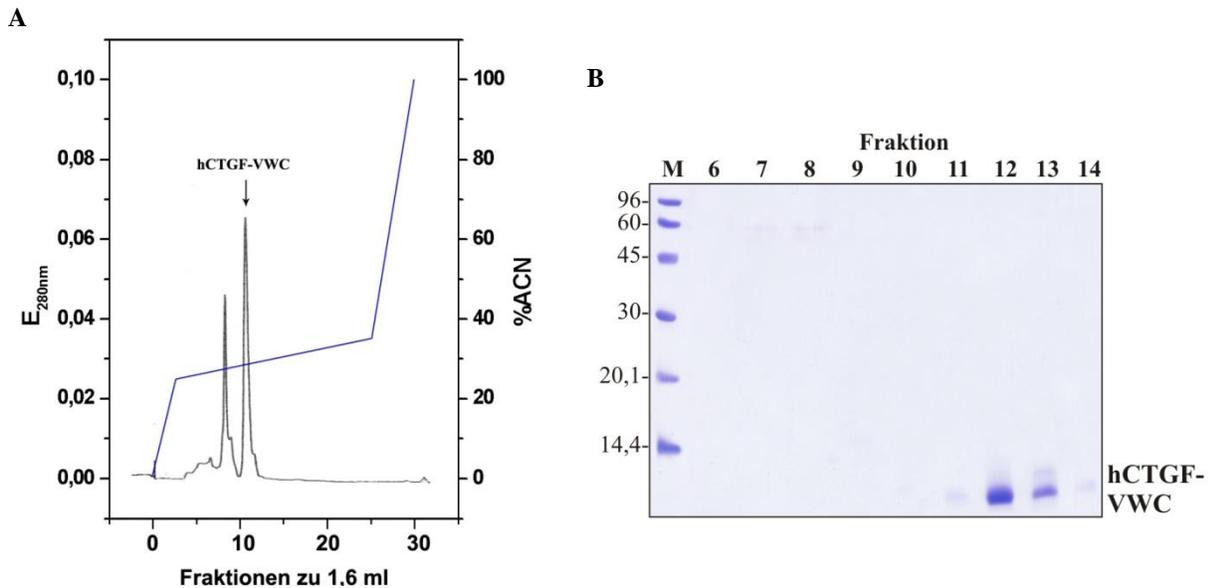


Abb. 16 RP-HPLC-Lauf des *hCTGF-VWC*

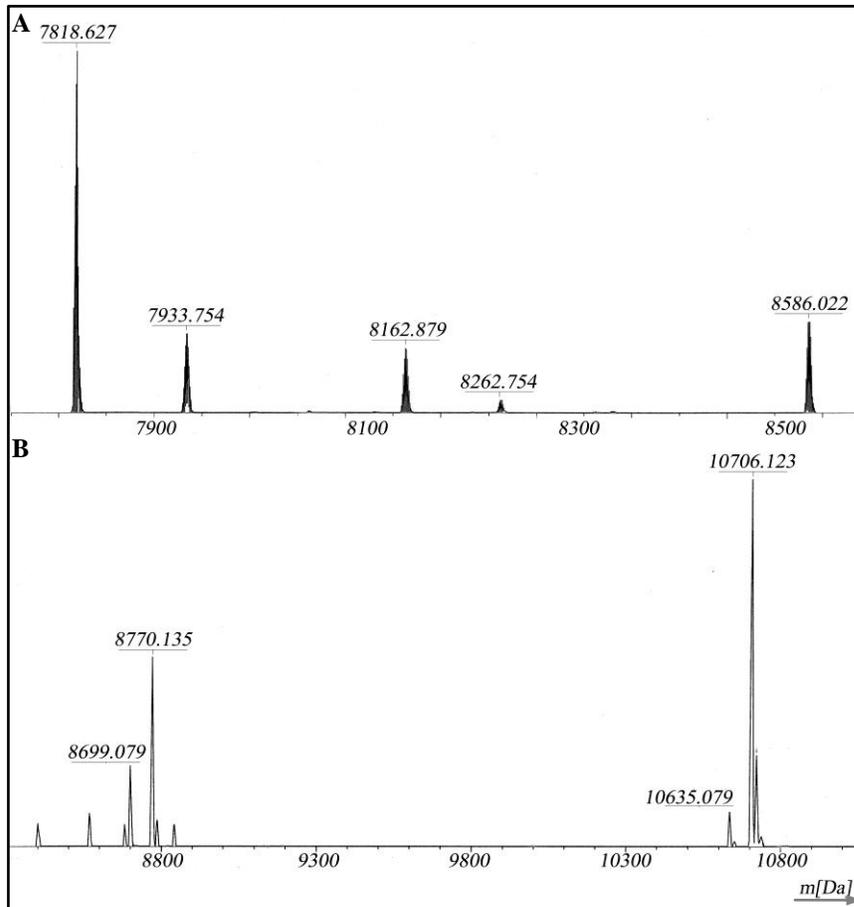
(A) Elutionsprofil der RP-HPLC des *hCTGF-VWC*. Zur Analyse wurden 300µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über einen 0,1%TFA/Acetonitril-Gradienten mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8ml/min. Die Fraktionen wurden je 2 Minuten gesammelt (schwarz: Elutionsprofil; blau: ACN-Gradient).

(B) 15%SDS-PAGE-Analyse (red.) der Fraktionen 6-14 der RP-HPLC.

Die Proteinlösung aus der S200-Chromatographie konnten durch RP-HPLC in zwei Peaks aufgetrennt werden. Das Chromatogramm zeigt zwei Signale (Abb. 16A). Die *VWC-Domäne* wurde bei 28% Acetonitril in den Fraktionen 12 und 13 eluiert (Peak bei 21 Minuten; Abb. 16A/B). Es konnte eine Ausbeute von 600µg aus 11 Kulturüberstand erreicht werden.

Massenspektrometrie

Um die Identität des Proteins zu verifizieren, wurden die Fraktionen 12 und 13 der RP-HPLC nach Lyophilisation massenspektrometrisch vermessen.



Masse [Da]	AS-Länge
10705, 885	1-99
8770,089	1-82
8586,022	1-80
8162,879	1-75
7933,754	1-73
7818,627	1-72

Tab. 14: Gemessene Massen der Hauptsignale der Fraktionen 12 und 13 sowie die entsprechende AS-Länge des exprimierten CTGF-Konstruktes.

Abb. 17 Daten der massenspektrometrischen Analyse der RP-HPLC-Fraktionen 12 und 13

Dekonvolvierte Daten der Proteinfractionen mit korrespondierendem Molekulargewichten. (A) Fraktion 12; (B) Fraktion 13 des *hCTGF-VWC* nach RP-HPLC.

Die Vermessung im Spektrometer ergab in Abhängigkeit von der Fraktion und unterschiedlichen Ansätzen 1-2 Hauptsignale sowie mehrere kleinere Signale. Diese Signale konnten durch Vergleich mit der theoretisch berechneten Isotopenverteilung eindeutig der *hCTGF-VWC-Domäne* (10705,8 Da, $C_{462}H_{721}N_{125}O_{142}S_{13}$ (+1), 5 Disulfidbrücken) sowie Konstrukten mit einem trunkierten C-Terminus zugeordnet werden. Die Massen der stärksten Signale sind mit der entsprechenden AS-Länge des exprimierten Proteins in Tabelle 14 aufgeführt. Da die verbleibenden Aminosäuren aller verkürzten Varianten noch die komplette VWC-Domäne (AS 3-69) umspannten und die C-terminale Abspaltungen Aminosäuren der mitexprimierten cysteinfreien Region betrafen, wurde das Protein für die spätere biochemische Charakterisierung eingesetzt.

3.1.2.3 Präparation und Reinigung des *hCTGF-TSP1*

Die Klonierung des Thrombospondin-TypI-Repeats (AS 181-251) des *hCTGF* in den Transfervektor pBAC-3 sowie die Kotransfektion erfolgte wie beschrieben (3.1.2.1). Isolierte rekombinante Baculoviren wurden vermehrt.

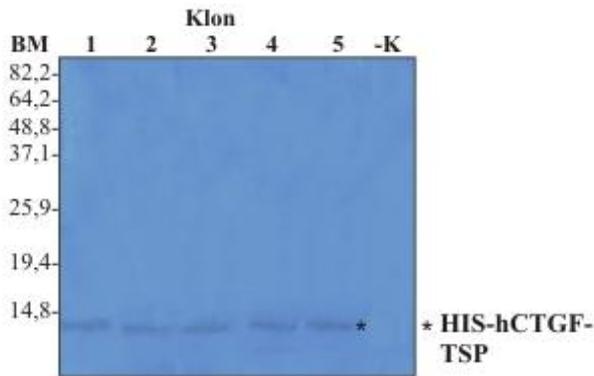


Abb. 18 α -His-Western-Blot (red.) zum Nachweis der Expression des *hCTGF-TSP* nach der 2ten Virusamplifikation

Die Virusüberstände, der mit Klon 1-5 infizierten *Sf-9* Zellen wurden nach der 2. VA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Transferrmembran übertragen. Die Detektion HIS-getaggtter-Proteinen erfolgte mit einem α -HIS-AK (-K = Negativkontrolle).

Nach der zweiten Virusamplifikation wurde in allen Klonen eine schwache Bande von etwa 12 kDa, dem theoretischen Molekulargewicht von *HIS₆-hCTGF-TSP* (10kDa) ungefähr entsprechend, nachgewiesen. Obwohl nur eine sehr schwache Expression detektiert werden konnte, wurde eine Expression des Konstrukts versucht. Für die folgenden Virusamplifikationen und die Expression mit 3×MOI wurde Klon 3 verwendet.

Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Der Expressionsüberstand der infizierten *Sf-9*-Zellen wurde nach Dialyse im Waschpuffer für die Nickel-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt um die TSP-Domäne von Fremdproteinen zu reinigen und gleichzeitig zu konzentrieren.

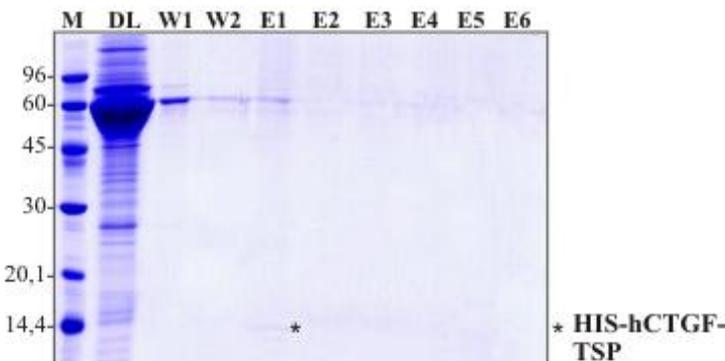


Abb. 19 Analyse der Ni-NTA-Chromatographie des *HIS-hCTGF-TSP*

15% SDS-PAGE (red.) nach Ni-NTA-Chromatographie. Nach dem Durchlauf (DL) erfolgten zwei Waschschritte (W1+2). Gebundene Proteine wurden mit 300mM Imidazol isokratisch in sechs Fraktionen eluiert (E1-6).

In der SDS-PAGE kann man in der ersten Elutionsfraktion eine geringe Menge des *hCTGF-TSP* erkennen (~200µg/l). In folgenden Experimenten wurde versucht die Expressionsausbeute zu verbessern. Die Veränderung verschiedener Expressionsparameter (MOI, Expressionszeit, anderer Klon), um die exprimierte Proteinmenge zu steigern, erzielte keinen Erfolg. Die Expression des *hCTGF-TSP* war auf so niedrigem Level, dass nicht genügend große Mengen für die biologische Charakterisierung gewonnen werden konnte.

3.1.2.4 Präparation und Reinigung der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne*

Die Sequenz für die Expression der N-terminalen Doppeldomäne wurde, wie in der Literatur beschrieben von AS 27-180 gewählt (Grotendorst, G. R. et al., 2005). Klonierung, Kotransfektion und Virusamplifikation wurden nach dem Standardprotokoll ausgeführt.

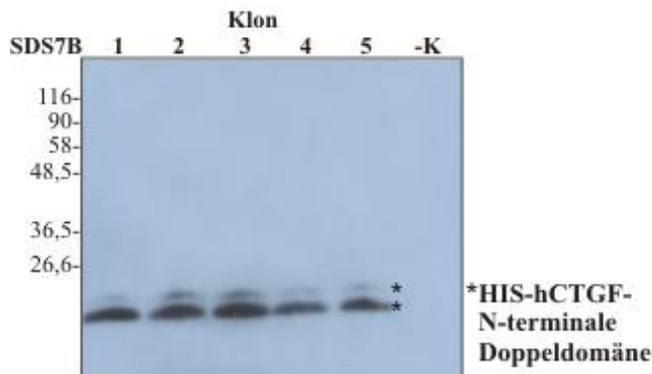


Abb 20 α-HIS-Western-Blot (red.) zum Nachweis der Expression der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne* nach der 2ten Virusamplifikation

Die Virusüberstände, der mit Klon 1-5 infizierten *Sf-9* Zellen wurden nach der 2. VA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Transfermembran übertragen. Die Detektion HIS-getagget-Proteine erfolgte mit einem α-HIS-AK (-K = Negativkontrolle).

Wie in dem Western-Blot in Abbildung 19 zu erkennen ist, war in den Virenüberständen aller fünf gepickter Plaques (Klon 1-5) die Expression der His₆-getaggeten *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne* als Doppelbande in Höhe des kalkulierten Molekulargewichts von 19kDa nachweisbar. Der rekombinante Baculovirenstock mit der stärksten Bandenintensität (Klon 3) wurde für die weiteren Amplifikationsschritte eingesetzt. Die Expression erfolgte in einem Maßstab von 1-2 l 1,5×10⁶ *Sf-9* Zellen pro ml, infiziert mit 3×MOI der rekombinanten Baculoviren.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Thrombinspaltung

Der dialysierte Zellüberstand der Expression wurde mit Ni-NTA-Agarose vermischt und für die Nickel-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren verwendet.

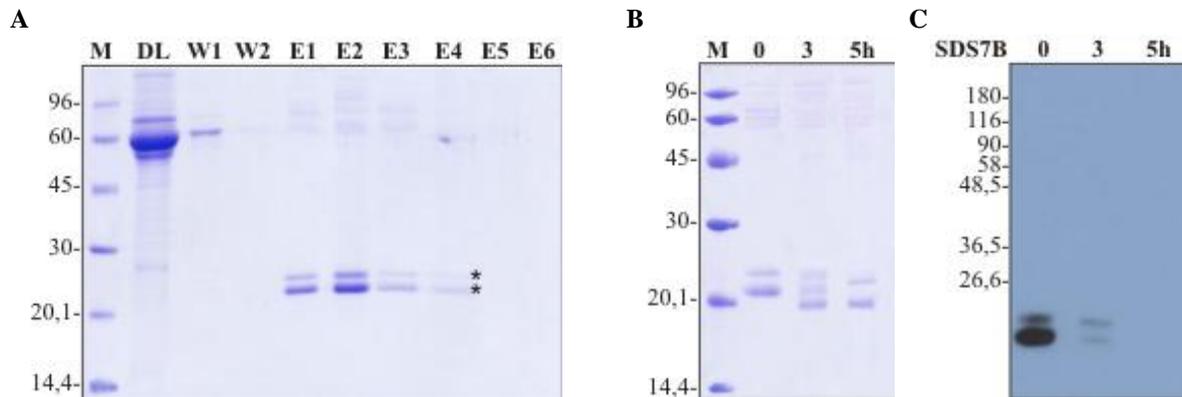


Abb. 21 Analyse der Ni-NTA-Chromatographie und Thrombinspaltung der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne*

(A) 12% SDS-PAGE (red.) nach Ni-NTA-Chromatographie. Nach dem Durchlauf (DL) erfolgten zwei Waschschritte (W1+2). Gebundene Proteine wurden mit 300mM Imidazol isokratisch in sechs Fraktionen eluiert (E1-6). (B+C) Kontrolle der Thrombinspaltung vor (0), nach 3 und 5 Stunden anhand einer 12%SDS-PAGE (B; red.) und eines α -His-Western-Blots (C; red.).

Wie man der Abbildung 21A entnehmen kann, konnte das Protein durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose erfolgreich gereinigt und konzentriert werden. Es wurden durchschnittlich 6 mg Protein/l Expression geerntet. Die anschließende Thrombinspaltung mit 3U Thrombin/mg Protein führte zur Abspaltung des HIS₆-Tags nach 5h, erkennbar durch die Veränderung in der Laufhöhe der zwei Banden der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne* in der SDS-PAGE und dem Verschwinden des α -HIS-Signals im Western Blot.

Größenausschlusschromatographie an der S200-Säule

Der zweite Aufreinigungsschritt der N-terminalen Doppeldomäne erfolgte an der SuperdexS200. Die von 5ml auf 500 μ l eingengte Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen und mit HBS₇₀₀-Puffer die Proteine der Größe nach eluiert.

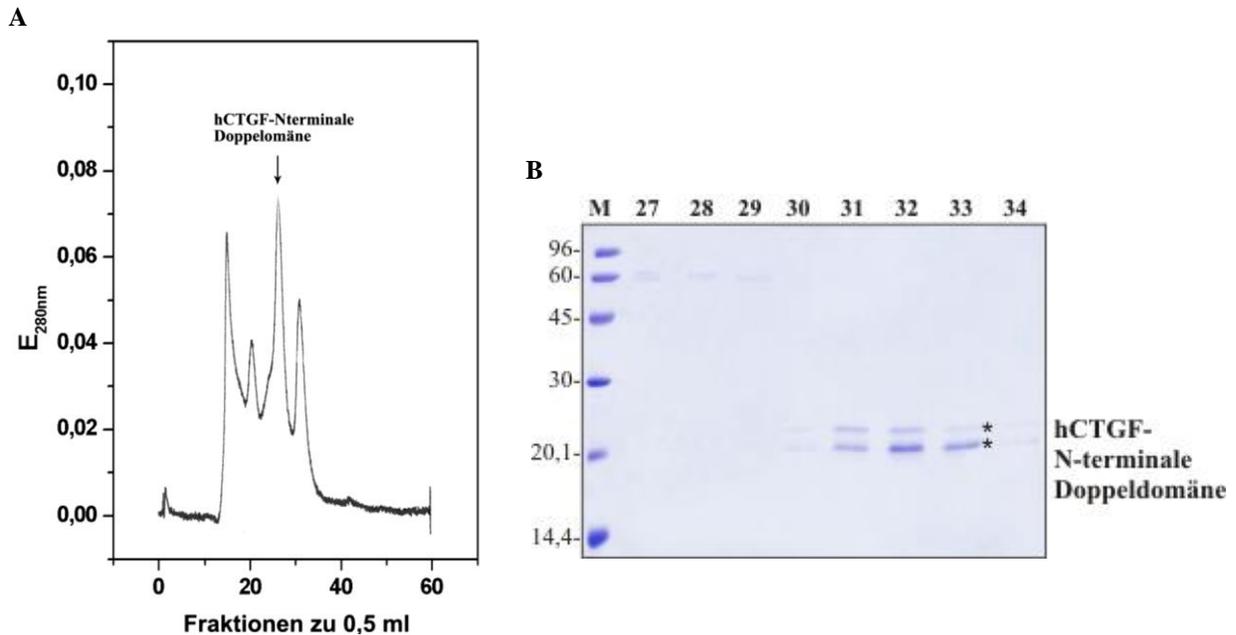


Abb. 22 Chromatogramm und SDS-PAGE der Superdex200-Gelfiltration der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne*

Als Laufpuffer für die chromatographische Analyse diente HBS₇₀₀, die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5ml/min, die Fraktionsgröße 0,5ml. (A) Elutionsdiagramm der Chromatographie. (B) 12% SDS-PAGE (red.) der Fraktionen 27-34.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration zeigte vier Signale (Abb. 22A). Die entsprechenden Fraktionen wurden gelelektrophoretisch untersucht. In den Fraktionen 31-33 wurde die N-terminale Doppeldomäne detektiert (Abb. 22B). Nach der Gelfiltration ergaben die gesammelten Proben eine Ausbeute von 700µg/1l.

RP-HPLC und Massenspektrometrie

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proteine nach Gelfiltration als RP-HPLC-Fractionen isoliert und anhand einer SDS-PAGE analysiert. Eine Darstellung der RP-HPLC-Auftrennung zeigt zwei Signale (Abb. 23A). Die N-terminale Doppeldomäne wurde bei 36% ACN in den Fraktionen 7-9 eluiert (Abb. 23B).

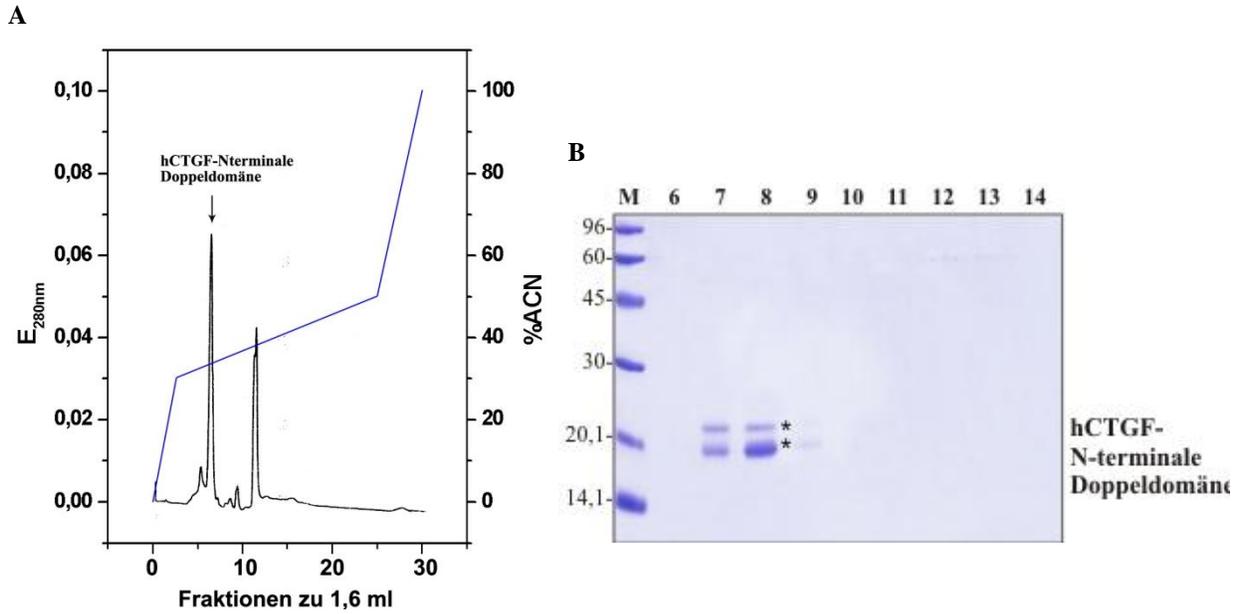


Abb. 23 RP-HPLC der hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne nach Gelfiltration

Die Auftrennung der aufgetragenen Proteinlösung erfolgte über einen linearen 0,1%TFA/Acetonitril-Gradienten mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8ml/min. Die Fraktionen wurden je 2 Minuten gesammelt. (A) Chromatogramm der RP-HPLC (schwarz: Elutionsprofil; Blau: ACN-Gradient). (B) 12% SDS-PAGE-Analyse (red.) der Fraktionen 6-14.

Die Ausbeute wurde mit 180µg/l bestimmt. Nach Lyophilisation wurde die Masse der gereinigten Proteine mit Hilfe der Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie analysiert.

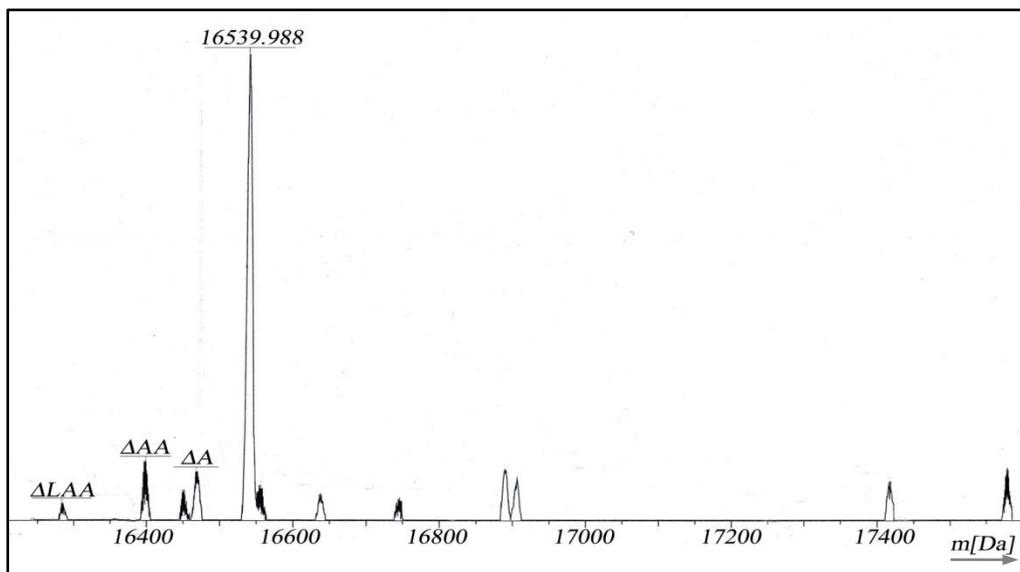


Abb. 24 Daten der massenspektrometrischen Analyse nach Dekonvolution

RP-HPLC-Fraktion 8 der hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne wurde massenspektrometrisch analysiert.

Das Hauptsignal der Massenspektrometrie entspricht der aus der molekularen Zusammensetzung berechneten theoretischen Isotopenverteilung der N-terminalen Doppeldomäne (16539,9 Da, C₆₈₆H₁₁₀₆N₂₀₂O₂₁₈S₂₄ (+1); 11 Disulfidbrücken). Die Signale <16,5 kDa konnten um 1-3 AS (ΔA , ΔAA , ΔLAA) C-terminal verkürzten Formen der Doppeldomäne zugeordnet werden. Die Doppeldomäne wurde zudem oxidiert in dem Peak bei 16555,9 Da und mit einem Phosphat-Addukt in dem Peak bei 16638,0 Da detektiert. Dahingegen konnten die fünf weiteren detektierten Signale nicht zugeordnet werden.

3.1.2.5 Präparation und Reinigung der *hCTGF-C-terminalen Doppeldomäne*

Für die Expression der C-terminalen Domäne des *hCTGF* wurden die AS 181-349 in den Baculotransfervektor kloniert (Grotendorst, G. R. et al., 2005). Nach der Herstellung rekombinanter Baculoviren und zweifacher Virusamplifikation wurde ein Immuno-Blot zur Überprüfung der Proteinexpression durchgeführt.

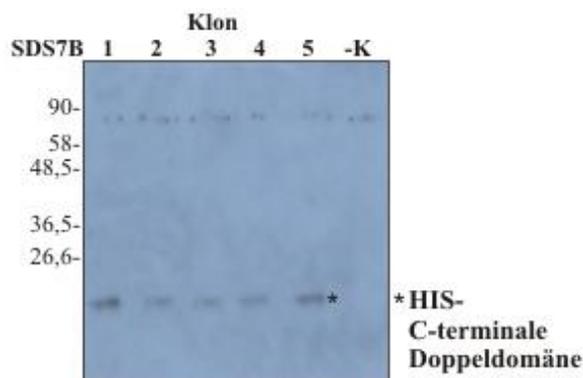


Abb. 25 α -HIS-Western-Blot (red.) zum Nachweis der Expression der *hCTGF-C-terminalen Doppeldomäne*

Die Virusüberstände der mit Klon 1-5 infizierten *Sf-9* Zellen wurden nach der 2. VA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Transfermembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem α -HIS-AK (-K = Negativkontrolle).

Der His-spezifische Antikörper detektierte in allen Klonen die Expression der *HIS₆-hCTGF-C-terminalen Doppeldomäne* auf niedrigem Niveau (Abb. 25).

Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Thrombinspaltung

Die hohe Affinität der N-terminalen *HIS₆*-Sequenz zu Ni^{2+} -Ionen wurde, wie bereits mehrfach beschrieben, zur Aufreinigung des Proteins genutzt.

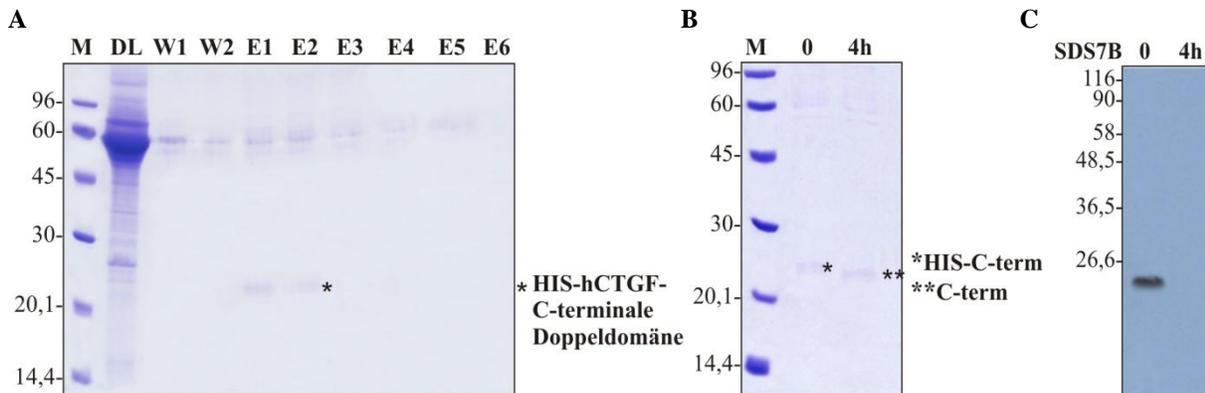


Abb. 26 Ni-NTA-Chromatographie und Thrombinspaltung der *hCTGF*-C-terminalen Doppeldomäne

(A) 12% SDS-PAGE (red.) nach Ni-NTA-Chromatographie. Nach dem Durchlauf (DL) erfolgten zwei Waschschritte (W1+2). Gebundene Proteine wurden mit 300mM Imidazol isokratisch in sechs Fraktionen eluiert (E1-6). (B+C) Kontrolle der Thrombinspaltung vor (0) und nach 4 Stunden anhand einer 12%SDS-PAGE (B; red.) und eines α -His-Western-Blots (C; red.).

Die Analyse der Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE zeigt eine geringe Menge der *C-terminalen Doppeldomäne* in den Elutionsfraktionen eins und zwei (Abb. 26A). Eine Steigerung der exprimierten Proteinmenge durch Variation der Synthesebedingungen konnte nicht erreicht werden. Die Ausbeute betrug 600 μ g/l Expressionsüberstand. Die Proteinlösung der Ni-Affinitätschromatographie wurde mit Thrombin verdaut, um die HIS₆-Sequenz abzuspalten. Eine vollständige Spaltung konnte nach 4h und einer Konzentration von 5U Thrombin/mg Protein erreicht werden (Abb. 26B+C).

Weitere Konzentrierungs- und Aufreinigungsschritte der schon geringen Menge an *C-terminaler Doppeldomäne* führten zu hohem Proteinverlust. Es konnte kein Protein für biochemische Analysen gewonnen werden.

3.1.2.6 Präparation und Reinigung des *hCTGF*

Die DNA-Sequenz, kodierend für das humane *CTGF* ohne Signalpeptid (AS 27-349), wurde, wie alle anderen beschriebenen Konstrukte, in den Baculo-Transfervektor kloniert und anschließend in *Sf-9* Zellen kotransfiziert.

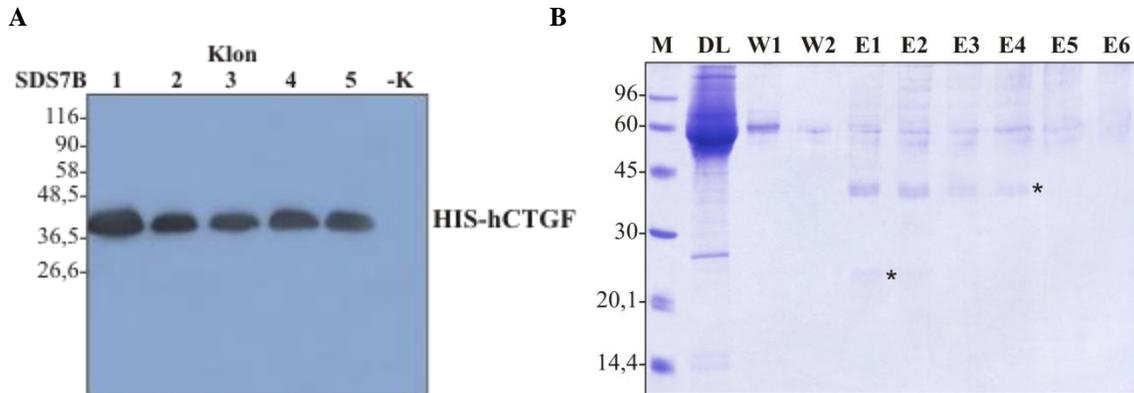


Abb. 27 Analyse der Synthese (A) und Ni-NTA-Chromatographie (B) des *HIS₆-hCTGF*

(A) Die Virenüberstände der Klone 1-5 wurden nach der 2. VA anhand eines α -HIS-Western-Blots (red), auf die Expression des *HIS₆-hCTGF* hin geprüft (-K = Negativkontrolle).

(B) 12%-SDS-PAGE (red.) der Fraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie des *HIS₆-hCTGF*.

Nach der zweiten VA wies Klon 1 die größte Proteinmenge auf. Dieser wurde für die folgenden Virusamplifikationen eingesetzt. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgte nach dem Standardprotokoll (s. 2.7.4). Um das *hCTGF* von Fremdproteinen zu trennen wurde zunächst eine Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt, dass zwei Banden im Bereich von 40kDa, dem Molekulargewicht des *hCTGF* entsprechend, in den Elutionsfraktionen 1-4 auftraten. Die Doppelbande ist durch eine Glykosylierung des Proteins an einer der zwei potentiellen Glykosylierungsstellen zu erklären. Aus einem Liter Kulturüberstand konnten durchschnittlich 2,5mg *hCTGF* geerntet werden. Neben *hCTGF* und hockmolekularen Proteinen wurde zusätzlich ein kleineres Protein (~22kDa) von der Säule eluiert. Die Identität dieser 22kDa-Bande konnte durch einen α -*CTGF* Western-Blot als *CTGF*-Fragment bestätigt werden (nicht gezeigt). Nach Dialyse wurden das *HIS₆*-Tag durch Thrombinspaltung bei 30°C für 5h mit 5U Thrombin/mg Protein vom *CTGF* abgetrennt.

Die SDS-PAGE- und Immuno-Blot-Analyse weisen die Abspaltung des Hexa-Histidin-Tags nach 5 h nach (Abb. 28). Das Signal von ~20kDa im Westernblot vor der Thrombinspaltung, das nach 3h Verdau aber bereits verschwunden war, zeigt dass ein Degradationsprodukt dem N-terminalen Teil des *hCTGF* zuzuordnen ist.

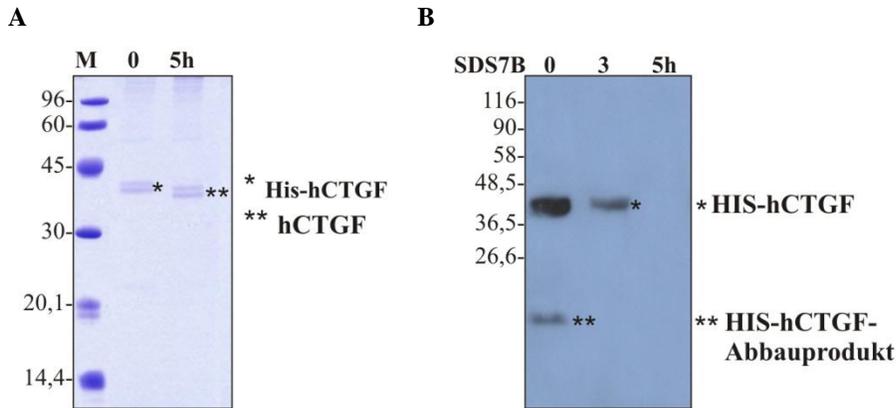


Abb. 28 Analyse der Thrombinspaltung des *hCTGF*

Kontrolle des Spaltansatzes vor (0h) und nach 3- bzw. 5-stündiger Inkubation anhand einer 12%-SDS-PAGE (A; red) und eines α -HIS Western-Blots (B; red).

Größenausschlusschromatographie an der S200-Säule

Die Konzentrierung des Proteins für die Gelfiltration erwies sich als problematisch. Wurde das Protein zu stark eingengt, so zeigte sich in der SDS-PAGE, dass im Vergleich zu der Ausgangskonzentration das *hCTGF* nicht entsprechend konzentriert war oder sogar verloren ging (nicht gezeigt). Infolgedessen wurde das Protein für die Superdex200-Säule maximal 5fach konzentriert eingesetzt, um den Verlust an *hCTGF* gering zu halten.

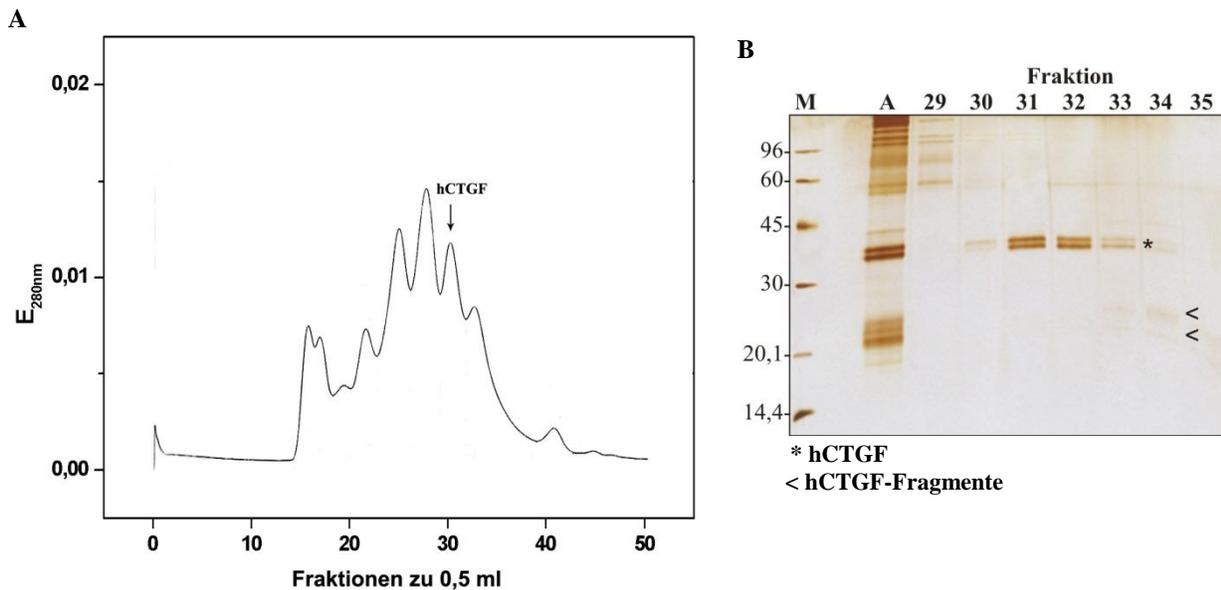


Abb. 29 Chromatogramm und SDS-PAGE der Superdex200-Gelfiltration von *hCTGF*

300 μ g *CTGF* wurden auf eine Superdex200-Säule geladen und mit HBS₇₀₀-Puffer (Flussrate: 0,5 ml/min; Fraktionsgröße: 0,5 ml) eluiert. (A) Elutionsprofil der Superdex200-Gelfiltration des *hCTGF*. (B) 12% SDS-PAGE (n. red.) nach Silberfärbung des Auftrags (A) und der Superdex200-Fraktionen 29-35.

Die chromatographische Analyse der Proteinlösung nach Thrombinspaltung durch eine S200-Säule ergab eine Auftrennung in 8 Peaks (Abb. 29A). *hCTGF* entspricht dem mit dem Pfeil markierten Signal und ist in Fraktion 31-33 enthalten (Abb. 29A/B). Der sich anschließende Peak bei 32,38 ist *CTGF*-Fragmenten mit einem Molekulargewicht von 20-25kDa zuzuordnen, wie auch in der SDS-PAGE schwach zu erkennen ist. Es konnte eine Ausbeute von 120µg/l *hCTGF* mit niedriger Proteinkonzentration (~15ng/µl) erzielt werden. Die Konzentrierungsschritte und die Aufreinigung mittels Gelfiltration hatten im Vergleich zur Ausgangskonzentration einen hohen Proteinverlust und Verdünnung der Konzentration zur Folge. Weitere Konzentrierungsversuche des Proteins resultierten in einem weiteren Proteinverlust. *CTGF* konnte nicht in ausreichend hohen Konzentrationen und Mengen, um es für die biochemische Charakterisierung und Zell-Assays einzusetzen, gewonnen werden.

3.1.3 Expression in HEK-Zellen

Die Proteinexpression in stabil transfizierten HEK-Zellen bietet den Vorteil, dass eine kontinuierliche Synthese und Isolierung des zu untersuchenden Proteins stattfinden kann und im Gegensatz zum Baculovirensystem keine Neuinfektionen notwendig sind.

Die Herstellung der stabil transfizierten HEK-Zellen, die Expression des *hCTGF* sowie ein erster Reinigungsschritt über eine Heparinsäule wurde von Dr. Welser durchgeführt (EMP Genetech, Ingolstadt).

BMP-2-Affinitäts-Säule

CTGF interagiert mit Proteinen der *TGF-β*-Superfamilie über die VWC-Domäne (Abreu, J. G. et al., 2002). Aufgrund dieser Affinität wurde zur weiteren Aufreinigung eine *BMP-2*-Affinitätssäule eingesetzt. Die Proteinlösung wurde konzentriert und in HBS₇₀₀-Puffer umgepuffert. Es wurde ein Puffer mit hoher Salzkonzentration gewählt, da in anfänglichen Versuchen bei niedrigen Salzkonzentrationen die Bildung von Aggregaten beobachtet wurde. Nach Äquilibrierung der *BMP-2*-Säule mit HBS₇₀₀-Puffer wurde die Proteinlösung aufgetragen und mit HBS₇₀₀-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 4M MgCl₂ eluiert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde spektralphotometrisch bestimmt,

proteinhaltiges Eluat gesammelt und gegen HBS₇₀₀ dialysiert. Durchlauf und Eluat wurden gelelektrophoretisch analysiert.

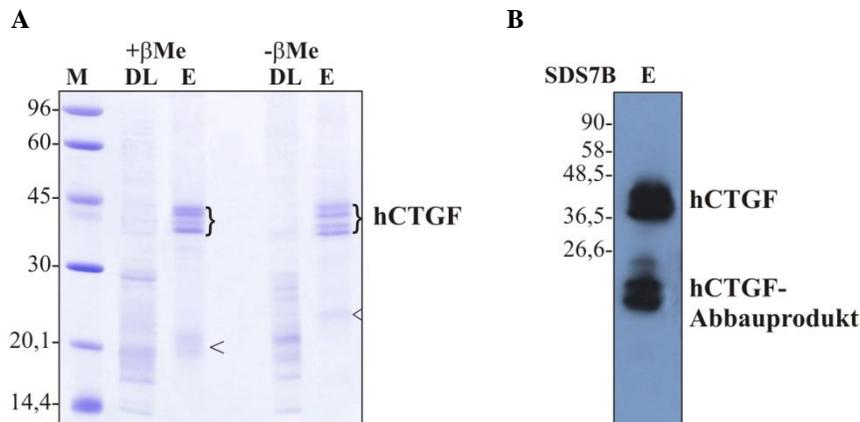


Abb. 30 Analyse des *hCTGF* nach BMP-2-Affinitätschromatographie durch SDS-PAGE und Western Blot (A) 12% SDS-PAGE des Durchlaufs (DL) und Eluats (E). (B) α -CTGF spezifischer Antikörper erkennt CTGF-Proteine mit einem Molekulargewicht von \sim 40kD und \sim 20kD im Eluat (red.).

Die Elutionsfraktionen enthielten das *hCTGF* sowie Proteine von ca. 20kDa. Anhand eines α -*CTGF*-spezifischen Antikörpers, der gegen eine interne Sequenz des *CTGF* gerichtet ist, konnten im Western Blot die Banden um knapp 40kDa als *CTGF* und die Banden von etwa 20kDa als Fragmente des Proteins bestätigt werden (Abb. 30B). Die Identität der Proteinbanden von \sim 40kDa wurde zusätzlich durch einen In-Gel-Trypsinverdau mit anschließender Massenspektrometrie analysiert. Die erhaltenen Signale deckten 63-68% der AS-Sequenz des *hCTGF* von AS 9-295 ab.

Größenausschlusschromatographie an der S200-Säule

Als zweiter Aufreinigungsschritt wurde die Gelfiltration an der S200-Säule durchgeführt. Das Protein wurde konzentriert und 500 μ l Probe in HBS₇₀₀-Puffer aufgetragen.

Die Abbildung 31A zeigt das Elutionsprofil der Gelfiltration des humanen *CTGF* an der S200-Säule. Nach 29 Minuten wurde das *hCTGF* eluiert. Wie anhand der SDS-PAGE zu erkennen ist, konnte das humane *CTGF* von den kleineren *CTGF*-Fragmenten abgetrennt werden (Abb. 31B). Der Reinheitsgrad des humanen *CTGF* wurde mittels eines Western Blots mit einem spezifischen Antikörper gegen *CTGF* bestätigt. (Abb. 31C).

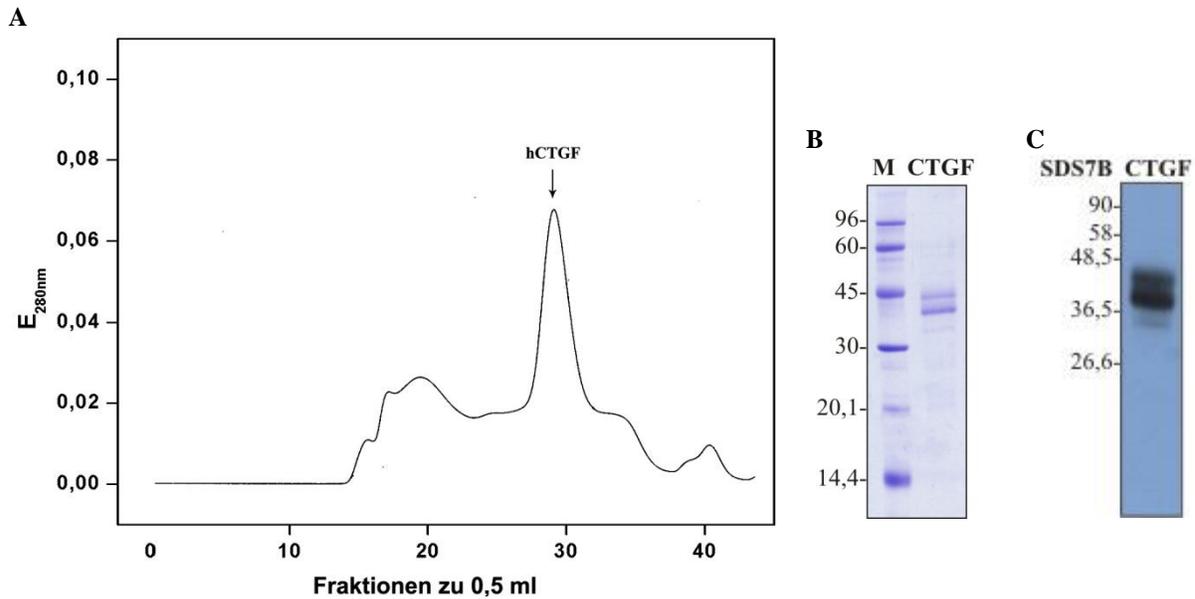


Abb. 31 Analyse der Superdex200-Gelfiltration des *hCTGF*

Nach Auftrag des *hCTGF* auf eine Superdex-S200-Säule wurden mit HBS₇₀₀-Puffer (Flussrate:0,5 ml/min; Fraktionsgröße: 0,5 ml) die Proteine eluiert. (A) Elutionsprofil der Superdex200-Gelfiltration des *hCTGF*. (B+C) 12% SDS-PAGE (B; red.) und α -*CTGF*-Western-Blot (C; red.) des im Peak29 eluierten *hCTGF*.

3.2 Biochemische Charakterisierung

Für die biochemische Charakterisierung wurden das humane *CTGF* aus HEK-Zellen, die N-terminale Doppel- und die VWC-Domäne aus *Sf-9* Zellen eingesetzt.

3.2.1 Oberflächenplasmonresonanzanalyse

Ein entscheidendes Merkmal für die biochemische Charakterisierung der rekombinanten *CTGF*-Varianten ist die Interaktion mit anderen Molekülen, z.B. Proteinen der *TGF- β* -Superfamilie. In Oberflächenplasmonresonanzstudien zeigte rekombinantes *Xenopus CTGF* eine Bindung an *BMP-4* mit einer K_D von 5nM. Zudem war ein cross-linking von *CTGF* bzw. der VWC-Domäne mit *BMP-4* nachgewiesen worden (Abreu, J. G. et al., 2002). Zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen *BMP-2* und *rhCTGF*, der N-terminalen Doppeldomäne sowie der VWC-Domäne wurden zunächst Oberflächenplasmonresonanz-Experimente (BIAcore) durchgeführt. Dabei wurden die exprimierten *CTGF*-Proteine an immobilisiertem *BMP-2* vermessen.

hCTGF (HEK)

Die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen *hCTGF* (HEK) und *hBMP-2* wurden mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie in HBS₃₂₅-Puffer analysiert.

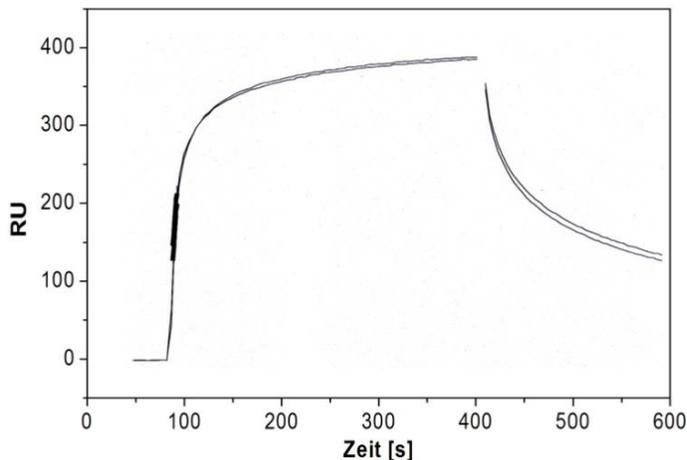


Abb. 33 BIAcore-Interaktionsanalyse der *CTGF*(HEK):*BMP-2* Interaktion

Sensogramm der *hCTGF* (HEK) in Interaktion mit immobilisiertem *BMP-2* bei einer Konzentration von 1,1 μM . Als Puffer wurde HBS₃₂₅ verwendet.

Das Sensogramm zeigt die Bindung von 1,1 μM *CTGF* an immobilisiertes *BMP-2*. Eine schnelle Bindungskinetik war zu beobachten. Die Dissoziationskonstante K_D betrug $4 \pm 1 \times 10^{-7} \text{M}$ ($k_{\text{on}} = 1,8 \pm 0,5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 7 \pm 1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$). Durch diese Untersuchungen konnte der Beweis erbracht werden, dass *hCTGF* mit *BMP-2* *in vitro* interagiert.

hCTGF-VWC und hCTGF-N-terminale Doppeldomäne

Die Interaktionsanalyse mit der VWC-Domäne und der N-terminalen Doppeldomäne wurde nach RP-HPLC-Reinigung ebenso in HBS₃₂₅-Puffer durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Typ-I-Rezeptor *BRIA*, der Haupt-Typ-I-Rezeptor für *BMP-2*, verwendet.

In Abbildung 32A ist das Sensogramm der *BMP-2*: *hCTGF-VWC* Interaktion dargestellt. Demgegenüber zeigt die Abbildung 32B das Sensogramm der Wechselwirkung der N-terminalen Doppeldomäne an immobilisiertes *BMP-2*. Es wurden Konzentrationen bis zu 1 μM eingesetzt. Eine spezifische Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der VWC-Domäne des *hCTGF* und *rhBMP-2* konnte nicht bestätigt werden. Bis zu der eingesetzten Konzentration von 1 μM konnte ebenso keine Bindung der N-terminalen Doppeldomäne an *BMP-2* beobachtet werden.

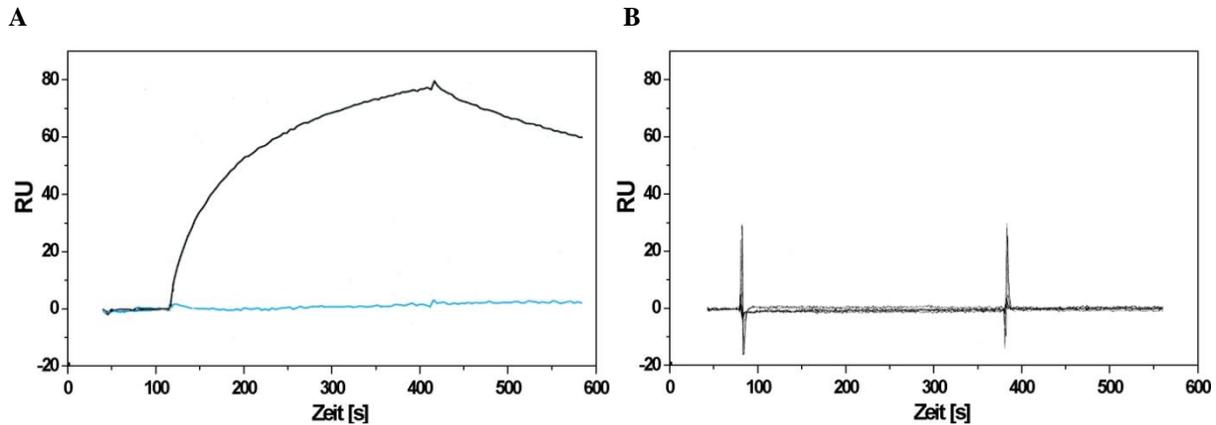


Abb. 32 BIAcore-Interaktionsanalysen der *hCTGF-VWC-Domäne* und der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne* an immobilisiertem *BMP-2*

(A) Sensogramm des *hCTGF-VWC* in Interaktion mit immobilisiertem *BMP-2* bei einer Konzentration von 1µM (hellblau). Als Positivkontrolle diente 270nM *BRIA* (schwarz).

(B) Sensogramm der Interaktion der *N-terminalen Doppeldomäne* (100, 200, 300, 400, 500, 600, 800nM) an immobilisiertem *BMP-2*. Als Puffer wurde HBS₃₂₅ verwendet.

Die Bindung des fulllength *CTGF* an *BMP-2* scheint somit nicht durch die *VWC*- bzw. die *N-terminal* Doppeldomäne vermittelt zu werden. Ebenso möglich wäre es, dass durch falsche Proteinfaltung der exprimierten Domänen die Bindungsregion für das *BMP-2* nicht zugänglich oder nicht korrekt ausgebildet ist.

3.2.2 Effekt auf die *BMP-2* induzierte ALP-Aktivität

Zur Untersuchung der Interaktion der verschiedenen *CTGF*-Konstrukte mit *BMP-2* auf Zellbasis, wurde ein Alkalische Phosphatase (ALP)-Assay durchgeführt. ALP ist ein „late response“ Zielgen von Mitgliedern der *TGF-β*-Superfamilie, wie *BMP-2* oder *BMP-4*, und ein Markergen für die Osteoblastendifferenzierung (Takuwa, Y. et al., 1991). Der ALP-Assay misst die Induktion des ALP-Gens durch den Einsatz von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat nach 72 Stunden Stimulation mit *BMP-2*. Dieser Assay wurde als ein Wettbewerbsassay durchgeführt, um die Interaktion von *BMP-2* und den *CTGF*-Istoformen indirekt unter physiologischen Bedingungen zu belegen.

hCTGF (HEK)

Für die Analyse des rekombinanten humanen *CTGF* aus HEK-Zellen wurde der Effekt auf die *BMP-2* induzierte ALP in C2C12-Zellen analysiert. Der EC-50-Wert der ALP-Induktion für *BMP-2* in C2C12-Zellen liegt bei 20 ± 10 nM (Kirsch, T. et al., 2000). Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.3.2.3 beschrieben, mit den Proteinen behandelt.

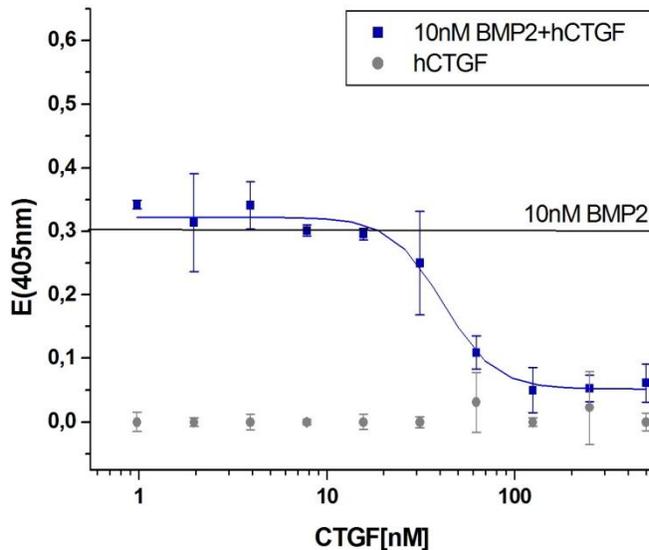


Abb. 34 Effekt von *hCTGF* (HEK) auf die *BMP-2* induzierte ALP-Aktivität in C2C12-Zellen

Die C2C12-Zellen wurden, wie beschrieben (s. 2.3.2.3), mit 10nM *BMP-2* und den angezeigten Konzentrationen des rekombinanten *hCTGF* aus HEK-Zellen für 72h stimuliert. Nach Zell-Lyse wurde die ALP-Aktivität mit pNPP als Substrat bestimmt.

In der Anwesenheit von ≥ 250 nM *hCTGF* der mit 10nM *BMP-2* stimulierten C2C12-Zellen wurde die ALP-Induktion auf annähernd das Basalniveau reduziert (Abb. 34). Der IC-50-Wert für *hCTGF* lag zwischen 50-100 nM. *hCTGF* allein zeigte keinen Effekt auf die ALP-Induktion.

hCTGF-VWC und hCTGF-N-terminale Doppeldomäne

Die Interaktion zwischen *BMP-2* und der exprimierten *VWC-Domäne* bzw. der *N-terminalen Doppeldomäne* wurde, wie beim rekombinanten *CTGF* gezeigt, anhand der *BMP-2*-induzierten ALP-Aktivität von C2C12-Zellen analysiert.

Abbildung 35A zeigt, dass die *VWC-Domäne* des *hCTGF* die durch *BMP-2* induzierte ALP-Aktivität ebenfalls nicht kompetitiert. In Abbildung 35B ist zu sehen, dass die *N-terminale*

Doppeldomäne des *hCTGF* ebenso keinen inhibitorischen Einfluss auf die *BMP-2*-induzierte ALP-Aktivität in C2C12-Zellen hat. Die *Doppeldomäne* und die *VWC-Domäne* alleine haben keinen Effekt auf den Basallevel der ALP.

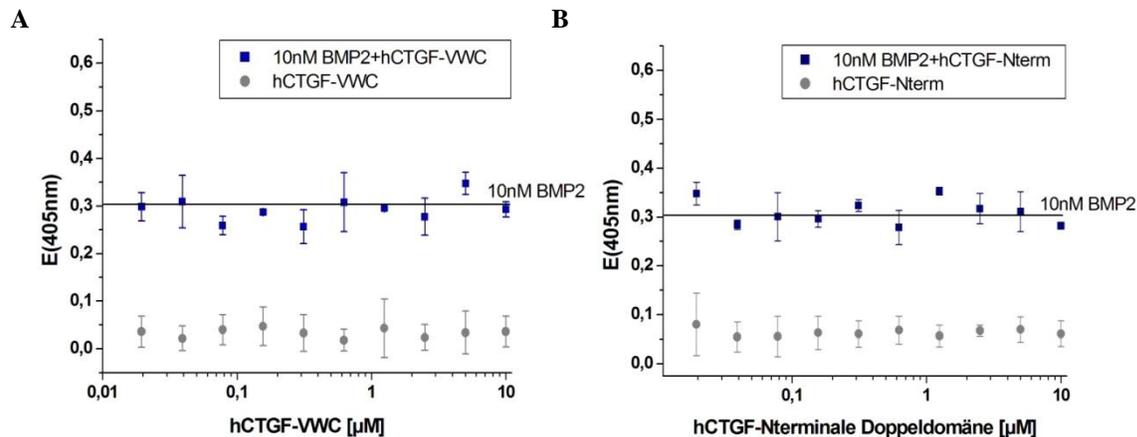


Abb. 35 Effekt von *hCTGF-VWC* (A) und der *hCTGF-N-terminalen Doppeldomäne* (B) auf die *BMP-2*-induzierte ALP-Aktivität

C2C12-Zellen wurden, wie beschrieben (s. 2.3.2.3) mit 10nM *BMP-2* und den angezeigten Konzentrationen des rekombinanten *hCTGF* aus HEK-Zellen für 72h stimuliert. Nach Zell-Lyse wurde die ALP-Aktivität mit pNPP als Substrat photometrisch bei 405nm bestimmt. (A) N-terminale Doppeldomäne, (B) *hCTGF-VWC* (schwarze Linie: 10nM *BMP-2*, blaue Punkte: 10nM *BMP-2* und *VWC/N-t-terminale Doppeldomäne*; graue Punkte: *VWC/N-terminale Doppeldomäne*).

3.2.3 Adhäsionsassay

Die Wechselwirkungen von verschiedenen Zelltypen mit *CTGF* wurden mehrfach beschrieben (Babic, A. M. et al., 1999; Jedsadayanmata, A. et al., 1999; Schober, J. M. et al., 2002; Chen, G. et al., 2003; Leu, S. J. et al., 2003; Gao, R. et al., 2005; Gao, R. et al., 2006). Die Adhäsion beruht hauptsächlich auf den bereits beschriebenen Wechselwirkungen von *CTGF* mit diversen Integrinen und der EZM (HSPGs; s. 1.3.4).

Für den Adhäsionsassay wurden 96-well-Platten mit den rekombinanten *CTGF*-Varianten beschichtet. Nach einer anschließenden einstündigen Inkubation mit Blocklösung wurden je 5×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Die Adhäsion der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Nicht adhärenente Zellen wurden nach einer Stunde durch Waschen entfernt. Die photometrische Messung der Adhäsion erfolgte nach Fixieren und Anfärben der adhärenenten Zellen mit Kristallviolett (s. 2.3.2.1). Um eine geeignete Zelllinie für diesen Assay auszuwählen, wurden mehrere Fibroblasten-Zelllinien in Vorversuchen getestet (Balb3T3, Swiss3T3, NIH3T3,

Mc3T3). Für die Analyse der rekombinant exprimierten Proteine wurden die Balb3T3-Zellen verwendet, da sie die stärkste Interaktion mit *CTGF* aufwiesen.

Als Positivkontrolle wurde in den Adhäsionsassays Fibronektin eingesetzt. Die maximale Adhäsion in den mit Fibronektin beschichteten Kontrolllöchern wurde gleich 100% gesetzt.

hCTGF (HEK)

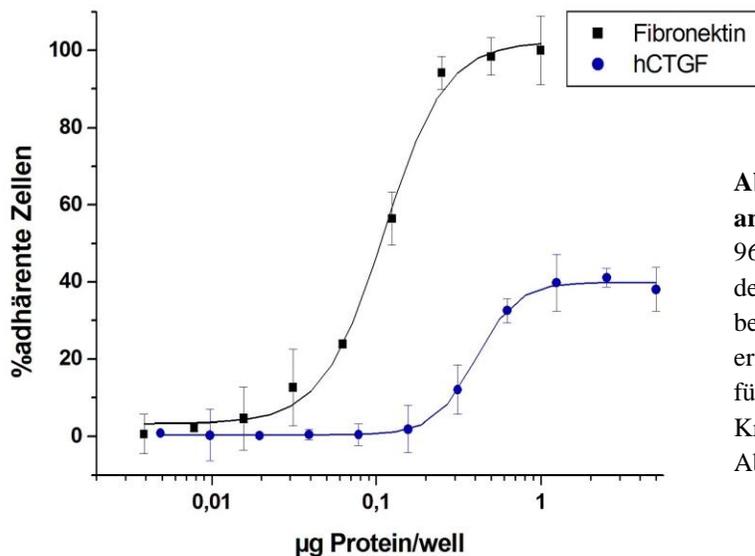


Abb. 36 Adhäsion von Balb3t3-Zellen an rekombinantes *hCTGF* (HEK)

96-Loch-Platten wurden über Nacht mit den angegebenen Proteinmengen/Loch beschichtet. Nach Blocken mit 3% BSA erfolgte die Adhäsion der BALB3t3-Zellen für 1h. Adhärenz Zellen wurden mit Kristall-Violett angefärbt und die Absorption bei 550nm gemessen

Der Graph zeigt die dosisabhängige Adhäsion von Balb3T3-Zellen an *hCTGF* (Abb. 36). Im Vergleich zur Kontrolle, Fibronektin, adhären 40% der Zellen. Pro Loch wurden $\geq 1\mu\text{g}$ *hCTGF* benötigt um die maximale Adhäsion zu erreichen. Die EC_{50} betrug zwischen 0,5 und 0,7 μg rekombinatem *hCTGF*/Loch.

hCTGF-VWC und hCTGF-N-terminale Doppeldomäne

Innerhalb der VWC-Domäne von *Cyr61* (AS 116-135) liegt eine Bindungsstelle für Integrin $\alpha_v\beta_3$, die die Adhäsion an Endothelzellen vermittelt (Chen, N. et al., 2004). Zur Analyse, ob die am *hCTGF* beobachteten adhäsiven Eigenschaften in Wechselwirkung mit Balb3T3-Zellen durch die N-terminale Doppeldomäne bzw. die VWC-Domäne des Proteins vermittelt werden, wurden diese rekombinanten Proteine im Adhäsionsassay eingesetzt.

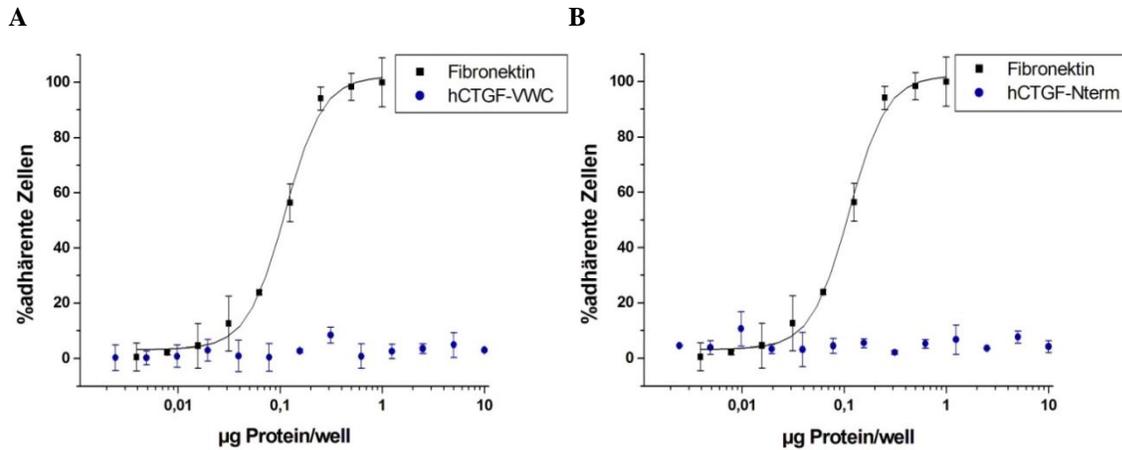


Abb. 37 Analyse der Adhäsion von Balb3T3-Zellen an *hCTGF-VWC* (A) bzw. *hCTGF-N-terminale Doppeldomäne* (B).

96-Loch-Platten wurden über Nacht mit den angegebenen Proteinmengen/Loch beschichtet. Nach Blocken mit 3%BSA erfolgte die Adhäsion der Balb3T3-Zellen für 1h. Adhärenente Zellen wurden mit Kristall-Violett angefärbt und die Absorption bei 550nm gemessen.

Den Abbildungen 36A und B kann man entnehmen, dass keine dosisabhängige Adhäsion von Balb3T3-Zellen an die *VWC*- oder die *N-terminale Doppel-Domäne* des *hCTGF* stattfindet. Auch bei hohen Proteinmengen von 10µg/Loch, eine um den Faktor 10 größere Menge als für die Adhäsion mittels *hCTGF* benötigt, konnte keine Zelladhäsion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend betrachtet, konnte in den verschiedenen Ansätzen zur biochemischen Charakterisierung der *CTGF*-Isoformen die *BMP-2* Interaktion in der Oberflächenplasmonresonanzmessung sowie im ALP-Assay und die Adhäsion der Balb3T3-Zellen nur für das komplette *CTGF* (HEK) beobachtet werden. Für die *VWC*- und *N-terminale Doppeldomäne* des *CTGF* hingegen war in allen Tests kein Effekt nachweisbar (Tab. 15).

	BIAcore	ALP-Assay	Adhäsionsassay
<i>hCTGF</i> (HEK)	+	+	+
<i>hCTGF-Nterminale Doppeldomäne</i>	-	-	-
<i>hCTGF-VWC</i>	-	-	-

Tab. 15 Übersicht über die biochemische Charakterisierung der exprimierten *CTGF*-Konstrukte

3.3 Biologische Aktivität

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität von *CTGF* gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Zellassays. Der am häufigsten publizierte Effekt von *CTGF* ist die Induktion der Proliferation von Zellen. Dazu wurden sowohl Zelllinien, z.B. Balb3T3, NRK-49F, NIH3T3 (Kireeva, M. L. et al., 1997; Ball, D. K. et al., 2003; Grotendorst, G. R. et al., 2004), als auch primäre Zellen, z.B. primäre Fibroblasten, Osteoblasten und Sternzellen der Leber (Safadi, F. F. et al., 2003; Wang, J. F. et al., 2003; Gao, R. et al., 2004), verwendet. Um die biologische Aktivität des rekombinanten *CTGF* zu analysieren, wurden verschiedene Zelllinien (NRK-49F, Balb3T3, NIH3T3, MPC11, Mv1Lu, Eahy 926) und primäre humane Fibroblasten getestet. Für die Proliferationsassays wurden schließlich die Endothelzelllinie Eahy926 und die primären humanen Tenonfibroblasten eingesetzt, da diese die stärkste Induktion der Proliferation durch *CTGF* zeigten.

3.3.1 Proliferation der Zelllinie Eahy926

Die humane Endothelzell-ähnliche Zelllinie Eahy926 entstand durch Fusion von HUVECs mit der Zelllinie A5498-8 (humanes Lungenkarzinom) (Edgell, C. J. et al., 1983). Für den Proliferationsassay zur Überprüfung der biologischen Aktivität des *hCTGF* (HEK) wurden die Zellen nach einer eintägigen Hungerperiode für 48 Stunden mit den Proteinen behandelt (s. 3.3.1). Es wurde die metabolische Aktivität vitaler Zellen anhand der Quantifizierung der Reduktionsäquivalente gemessen. Als Kontrollprotein diente humanes *EGF*.

CTGF (200ng/ml; 5,5nM) steigert die Proliferation der Eahy926-Zellen um das 2,5fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 38A). Die Positivkontrolle, eine Stimulation mit 10ng/ml (1,7nM) *EGF*, zeigt eine 2fache Stimulation der Proliferation. Höhere Konzentrationen bis zu 5µg/ml an *hCTGF* resultieren in keiner weiteren Proliferationssteigerung der Endothelzellen (Abb. 38B). In Abbildung 36B ist der Effekt von *hCyr61*, einem *CTGF*-Homolog mit ähnlichen Funktionen, auf die Endothelzellen gezeigt. Das rekombinante *Cyr61* Protein war mit einem IgG-Fc-Tag exprimiert worden und wurde als Fusionsprotein in den Proliferationsassays eingesetzt (Schutze, N. et al., 2005). *hCyr61* bewirkt bei einer Konzentration von 0,5µg/ml (7,4nM) eine 2,3fache Proliferationsstimulation der Endothelzellen. Der gleiche Effekt war bereits mit 100ng/ml (2,8nM) *hCTGF*, einer

2,6fach geringeren als der eingesetzten *Cyr61*-Konzentration, zu beobachten. Dies bestätigte die biologische Aktivität des exprimierten *CTGF*-Proteins.

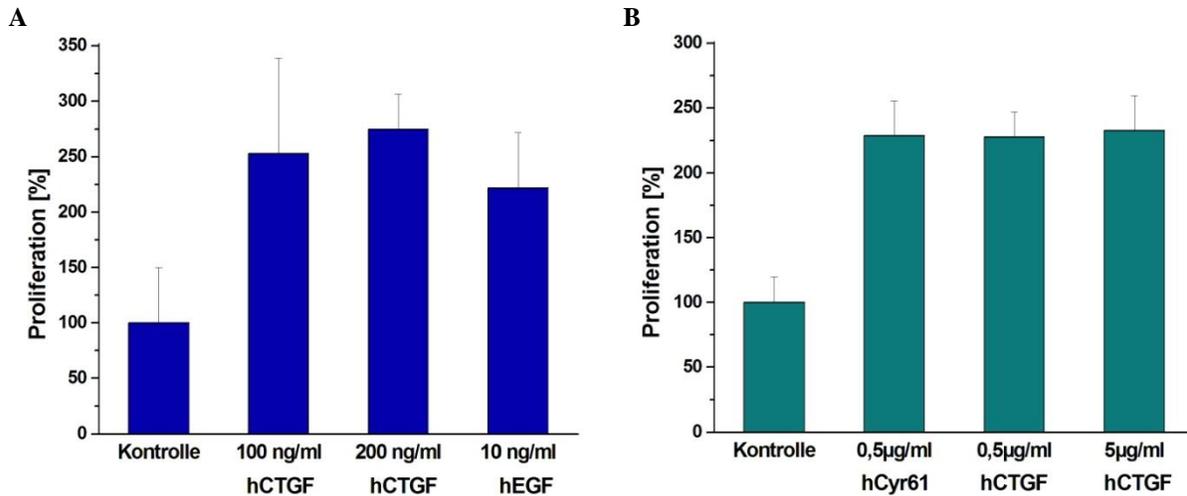


Abb. 38 Effekt von *hCTGF* auf die Proliferation von *Eahy926*-Zellen

Eahy-926-Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät, für 24h kultiviert und für weitere 24h mit 0,5% FCS gehungert. Die Stimulation mit *hCTGF*, *hEGF* und *hCyr61* erfolgte für 48h im Hungermedium. Die Messung der Proliferation wurde nach Zugabe von WST-1 photometrisch bei 405nm gemessen. (A) Stimulation der Proliferation von *Eahy-926*-Zellen durch *CTGF*. (B) Wirkung von *rhCTGF* und *rhCyr61* auf die Endothelzellproliferation.

3.3.2 Proliferation der humanen Tenon-Fibroblasten

Die Tenonkapsel (*fascia bulbi*) ist eine Bindegewebshülle, die den hinteren Teil des Augapfels vom Sehnerv bis zum Ziliarkörper umgibt (Abb. 39). Humane Fibroblasten wurden aus dem Tenon verschiedener Patienten isoliert (Universitäts-Augenklinik Würzburg, Dr. T. Meyer-ter-Vehn).

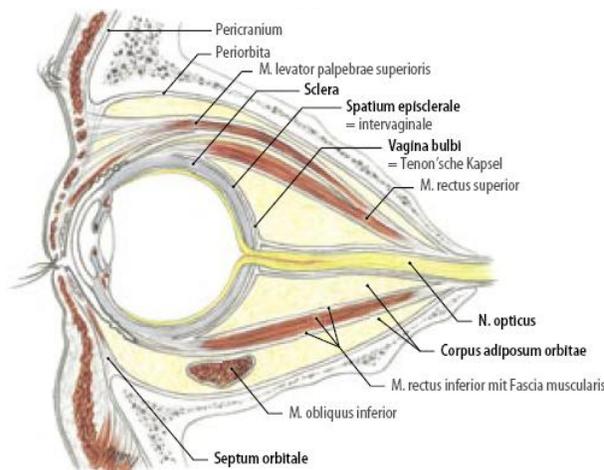


Abb. 39 Sagittalschnitt durch den mittleren Bereich der rechten Orbita. Ansicht der lateralen Schnittfläche (Tilmann, B., 2005)

Die Wirkung von *hCTGF* auf die Proliferation humaner Tenonkapsel-Fibroblasten wurde untersucht. Die Analyse erfolgte durch Messung der DNA-Synthese mittels ^3H -Thymidin-Einbau in neu synthetisierte DNA. Für die Versuche wurden Fibroblasten der Passage vier bis acht verwendet.

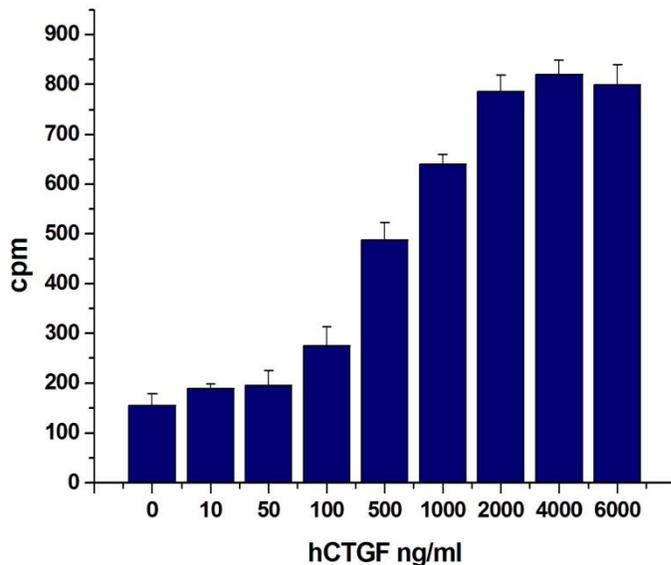


Abb. 40 ^3H -Thymidin-Einbau in primäre humane Fibroblasten des Tenon nach *CTGF*-Stimulation. Tenonfibroblasten wurden in 96-Loch-Platten 24h kultiviert, 24h gehungert und 48h stimuliert. Die letzten 24h wurde radioaktiv markiertes Thymin zugegeben. Die Zellen wurden auf eine Filtermatte gesaugt und im β -Counter gemessen.

Das Experiment zeigt die dosisabhängige Stimulation der Proliferation von Tenonfibroblasten durch *rhCTGF* in Abbildung 40. Es wurden die Zellen von sechs verschiedenen Spendern getestet. *hCTGF* stimuliert die Proliferation von Tenonfibroblasten in Abhängigkeit vom Spender 2-8fach (\varnothing 4fach). Der EC_{50} -Wert liegt zwischen 0,5 und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (14-56nM).

Im Gegensatz zu den Endothelzellen, bei denen bereits bei einer Konzentration von 0,1-0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *CTGF* die maximale Antwort erreicht wird, ist in den primären Zellen die halbmaximale Antwort erst bei 0,5-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht. Dies könnte ein Zellabhängiger Effekt sein, Endothelzellen gegenüber Fibroblasten, oder auch darauf zurückzuführen, dass die Fibroblasten primäre Zellen und die Eahy-926-Zellen eine Zelllinie sind

3.4 RNA-Expressionanalyse von *CTGF* stimulierten primären humanen Tenonfibroblasten

Um einen besseren Einblick in die genregulatorischen Eigenschaften des *CTGF* zu erhalten, wurde die Methode der RNA-Expressionsanalyse gewählt. Die Genexpressionsprofile wurden mit Hilfe der Affymetrix-Oligonucleotid-Arrays „Human Genome U133A2.0“ generiert. Der HG-U133A 2.0 Array umfasst 22000 Sondensätze mit 500000 verschiedenen Oligonukleotiden und ermöglicht die Expressionsanalyse von 18400 Transkripten, einschließlich 14500 bekannter humaner Gene. Redundante und mismatch-Proben ermöglichen eine zuverlässige Analyse.

Für die Genexpressionsanalyse wurden Tenonfibroblasten drei verschiedener Spender verwendet und separat analysiert. Die Zellen wurden nach einem Tag hungern für 48h mit *rhCTGF* (HEK) stimuliert. Als Referenz dienten unstimulierte Zellen, die abgesehen von der *CTGF*-Stimulation identisch behandelt worden waren. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA präpariert, die cDNA in einem Zwei-Runden Amplifikationsprotokoll synthetisiert und anschließend die biotinylierte cRNA hergestellt. Nach Fragmentierung erfolgte die Hybridisierung der *CTGF*⁺- bzw. *CTGF*⁻-cRNA physikalisch getrennt auf zwei separaten HG-U133A 2.0 Mikrochips. Die Mikroarrays wurden mit dem Streptavidin markierten Fluoreszenzfarbstoff (SAPE) versetzt und die Emission der Fluorochrome mittels eines Lasers gemessen.

Bei der Auftragung der gemessenen Signalintensitäten im Verteilungsdiagramm befinden sich die Mehrheit der Punkte der zwei zu vergleichenden Proben auf einer Diagonalen (Abb. 41). Dies zeigt, dass die meisten Gene beider Datensätze die gleich Signalintensität haben und somit nicht reguliert sind. Da angenommen werden kann, dass bei Expressionsanalysen ein signifikanter Anteil der zu untersuchenden Gene auf demselben Niveau exprimiert wird und somit gleiche Fluoreszenzintensitäten aufweist, ist die geringe Streuung ein qualitativer Maßstab für die erfolgreiche Hybridisierung der Arrays. Das Verteilungsdiagramm zeigt zudem, dass die Mehrzahl der Gene der statistischen Erwartung entsprechend schwach bis mittelstark exprimiert wurde (Abb. 41).

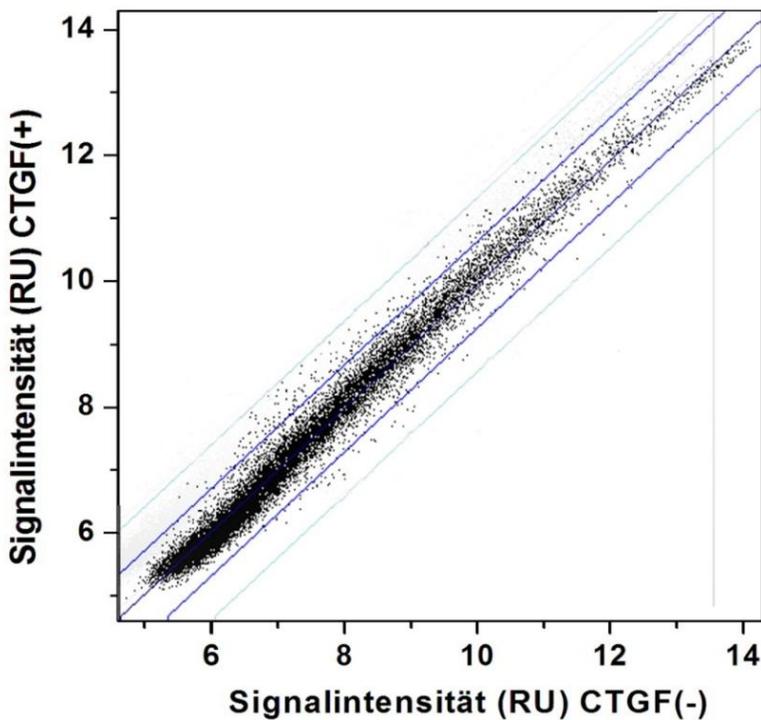


Abb. 41 Verteilungsdiagramm der Signalintensitäten

Aufgetragen sind die mit Laser gemessenen Signalintensitäten (RU) nach Standardisierung der *CTGF* behandelten Proben gegen die Signalintensitäten unbehandelter Proben aus den Mikroarrayanalysen.

Die generelle Reproduzierbarkeit der Methode konnte durch die gute Übereinstimmung der Datensätze, die als Triplikate vorliegen, bestätigt werden.

Aus dem Rohdatensatz wurde durch Rangmittel-Normalisierung und Logarithmierung der für die weiteren Untersuchungen dienende Datensatz der Mikroarrays generiert. Bei einem p-Wert kleiner als 0,01 wurden Gene als signifikant differentiell exprimiert bewertet. Eine signifikant differentielle Expression um mindestens den Faktor 2 zeigten 109 Gene. Eine Übersicht über die Anzahl der regulierten Gene befindet sich in Tabelle 16.

x-fache Stimulierung	Stärker exprimiert in <i>CTGF</i> stimulierten Zellen	Schwächer exprimiert in <i>CTGF</i> stimulierten Zellen
≥2	81	18
≥4	8	-
≥8	2	-

Tab. 16 Anzahl der Gene, die in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen ≥2 reguliert sind

In *CTGF* stimulierten Zellen sind 83% der regulierten Gene stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. Die zehn Gene, die in *CTGF* stimulierten Zellen am stärksten bzw. am schwächsten im Vergleich zu Kontroll-Tenonfibroblasten exprimiert wurden, sind in Tabelle 17 gezeigt. Ein Überblick über alle 109 differentiell regulierten Gene ist im Anhang präsentiert.

Gen Name	Gene Symbol	X-fache Expressionsänderung
Top 10 der in <i>CTGF</i> stimulierten Zellen stärker exprimierten Gene		
Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 6	CXCL6	14.2791918
Chemokin (C-X-C Motiv)-Ligand 1	CXCL1	9.39219746
Interleukin 8	IL8	5.58722225
Tumor Nekrose Faktor, alpha-induziertes Protein 6	TNFAIP6	5.02725399
Interleukin 6	IL6	4.88181179
Serpin Peptidase Inhibitor	SERPINE1	4.68117484
Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2	CCL2	4.31062408
Kinesin family member 20A	KIF20A	4.10328766
Interferon, alpha-induzierbares Protein	G1P3	3.94854828
Ribonukleotid Reduktase M2 Polypeptid	RRM2	3.86710236
Top 10 der in <i>CTGF</i> stimulierten Zellen schwächer exprimierten Gene		
platelet derived growth factor D	PDGFD	-3.1107
Osteoglycin	OGN	-2.9699
Osteomodulin	OMD	-2.9638
Chemokin (C-C motiv) Rezeptor-like 1	CCRL1	-2.6963
SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	-2.5342
Matrix Gla Protein	MGP	-2.4181
Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	RASSF2	-2.2324
Selenoprotein P, Plasma, 1	SEPP1	-2.2107
Alkohol Dehydrogenase IB	ADH1B	-2.1839
v-maf musculoaponeurotic Fibrosarkom Onkogen Homolog B	MAFB	-2.1554

Tab. 17 Top 10-Gene, die in *CTGF*-stimulierten Zellen stärker bzw. schwächer exprimiert werden als in Kontrollzellen

3.4.1 Biologische Interpretation durch Kategorieanalyse mittels Gene Ontology

Für die funktionelle Einordnung der differentiell exprimierten Gene wurden das Programm Gene Ontology (GO) verwendet und zusätzlich Literaturrecherchen durchgeführt. „Gene Ontology“ ist ein Konsortium mehrerer Datenbanken mit der Aufgabe Gene bzw. Genprodukte kontrolliert zu annotieren (Ashburner, M. et al., 2000). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in hierarchisch organisierten Bäumen (Dendrogramme), die die Verwandtschaft oder Ähnlichkeit von Gruppen anschaulich machen. Das Organisationsprinzip beruht auf der Beschreibung 1. des **biologischen Prozesses** (biological process), der durch eine oder mehrere molekulare Funktionen gesteuert wird, 2. der **molekularen Funktion** (molecular function) eines Genprodukts, sowie 3. einer Zuordnung der **zelluläre Lokalisation** (cellular component). Diese 3 Hauptkategorien werden hierarchisch in weitere Subgruppierungen untergliedert. Bei einem p-Wert kleiner als 0,01 wurde eine GO-Kategorie der untersuchten Genliste als statistisch signifikant überrepräsentiert angesehen.

In die GO-Analyse ging eine Genliste von 109 differentiell exprimierten Genen ein, die Referenz umfasste 14500 Gene. Zahlreiche Gene konnten mehr als einer Gruppe zugeordnet werden. Die regulierten Transkripte bzw. die sich daraus ableitenden Proteine konnten in 94 überrepräsentative funktionelle Gruppen kategorisiert werden. Einen Überblick über die 94 GO-Kategorien, die am GO-Baum überrepräsentiert waren, ist in Abbildung 42 schematisch dargestellt. Um einen besseren Einblick zu erhalten, werden die drei Hauptkategorien „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ und „zelluläre Lokalisation“ im folgenden separat vorgestellt.

In der GO-Hauptkategorie „biological process“ wurden 60 Unterkategorien, überwiegend in der Regulation biologischer Prozesse, in zellulären physiologischen Prozessen und Reiz-Reaktionen präsent, als signifikant moduliert bestätigt (Abb. 43).

Desweiteren wurden die Expression von Proteinen reguliert, die die molekulare Funktion der Zelle modulieren (Abb. 44). Hier waren 17 Kategorien signifikant. Die meisten modulierten Gene der GO-Kategorie „Molekulare Funktion“ sind an der Interaktion mit Proteinen, z. B. IGF, und Glykosaminoglykanen, z.B. Heparin, beteiligt.

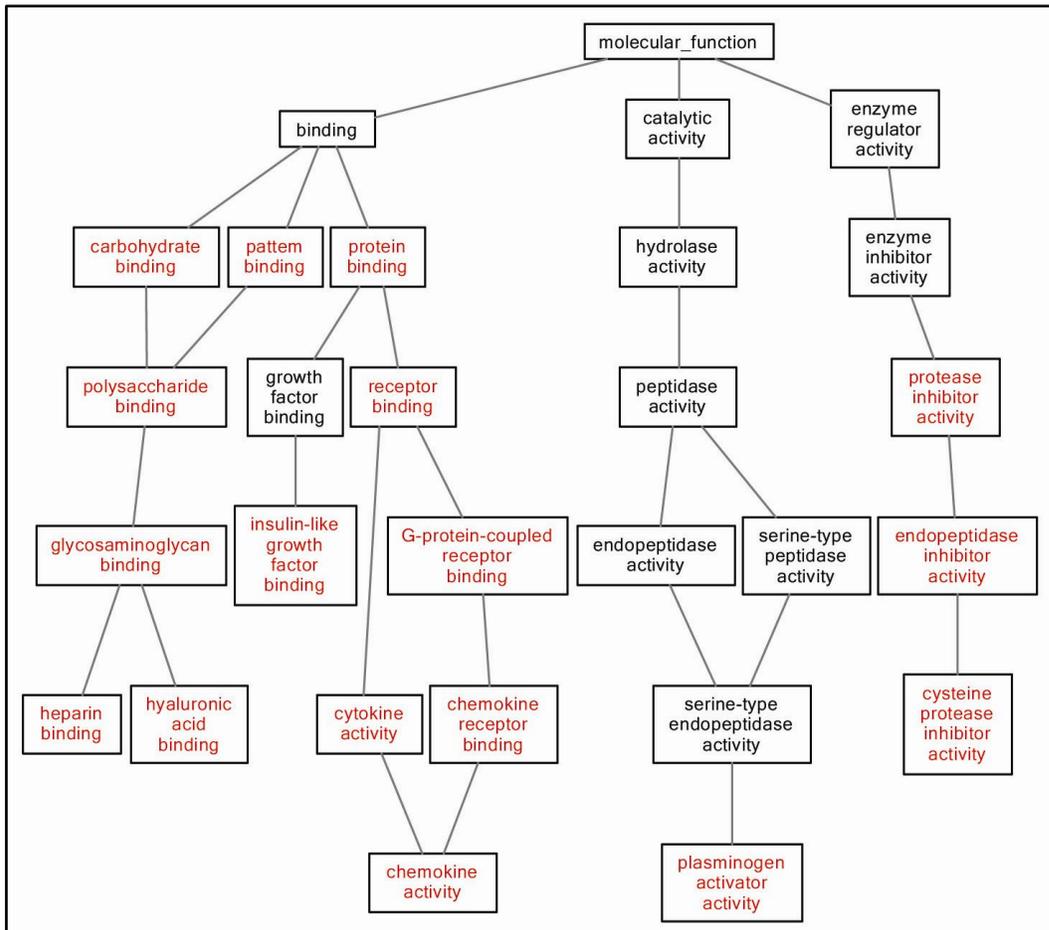


Abb. 44 Dendrogramm der GO-Kategorie „Molekulare Funktion

Durch GO-Analyse wurden in der Kategorie „Molekulare Funktion“ 17 Kategorien als signifikant (rot) bestätigt.

In der dritten Hauptkategorie „Zellkomponenten“ wurde die Lokalisation die Mehrheit der differentiellen Transkripte der extrazellulären Region, der EZM und intrazellulären nicht Membran gebundenen Organellen zugeordnet (Abb. 45).

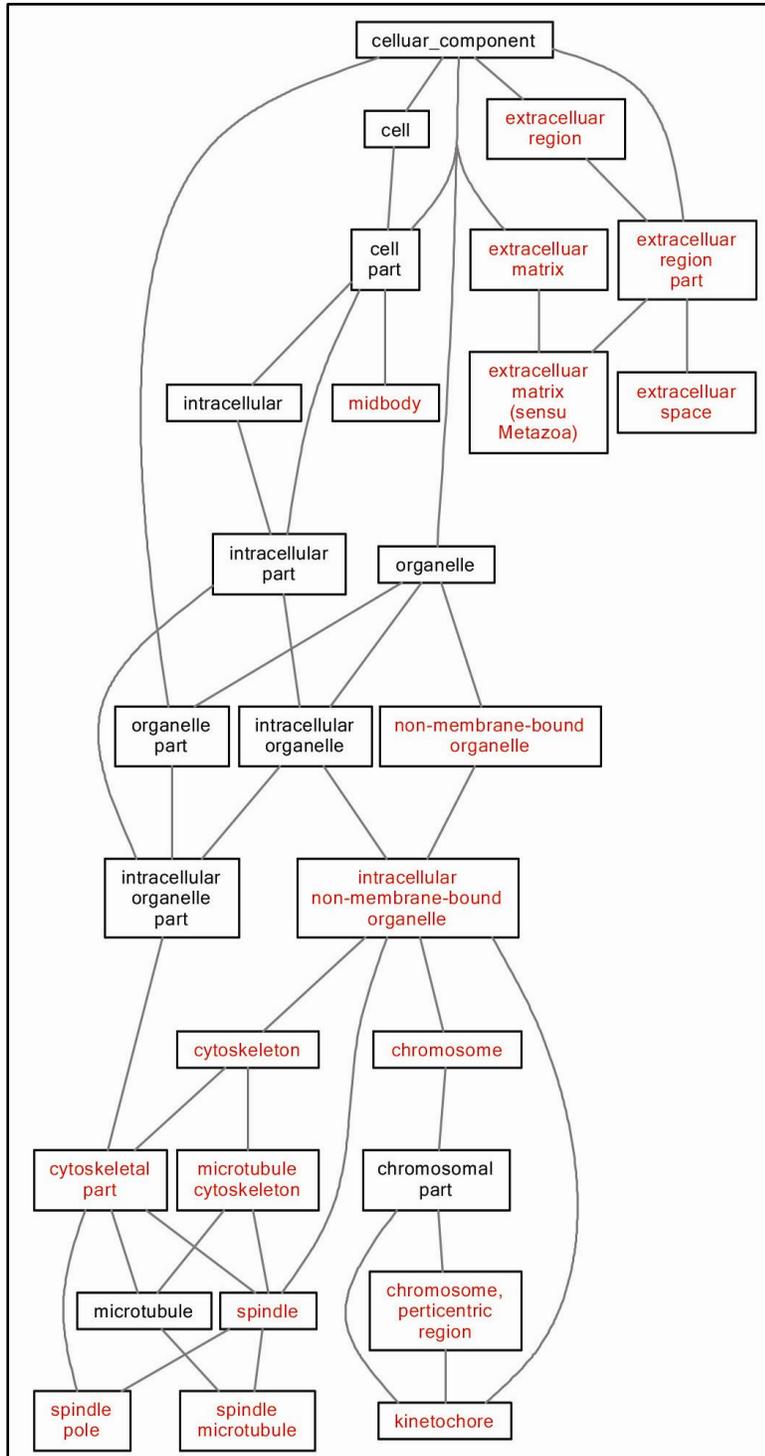


Abb. 45 Dendrogramm der GO-Kategorie „Zelluläre Komponente“

Durch GO-Analyse wurden in der Kategorie „Zelluläre Komponente“ 17 Kategorien (rot) als signifikant bestätigt.

Die Genexpressionsanalyse an Tenonfibroblasten identifizierte diverse Antworten auf *CTGF*. Zu den stärksten und interessantesten detektierten Antworten auf *CTGF* in Tenonfibroblasten zählen 1. die Prozesse der Zellproliferation durch Regulation des Zellzyklus sowie proliferationsfördernder Transkripte, 2. die Inflammation und Wundheilung sowie 3. differentiell regulierte Transkripte, die Teil der EZM sind oder mit extrazellulären Matrixkomponenten interagieren. Im Folgenden werden repräsentative Gene dieser drei ausgewählten biologischen Prozesse und Kategorien stellvertretend analysiert

3.4.1.1 Differentiell exprimierte Gene in der Zellproliferation

Eine der bedeutensten biologischen Antworten auf die *CTGF*-Stimulation war die Regulation und Förderung der Zellproliferation. Das Auftreten der überrepräsentierten GO-Kategorien „Zellproliferation“ (12 Gene), „Zellteilung“ (14 Gene), „Chromosomenaggregation“ (3 Gene) und „Zellzyklus“ (23 Gene) zeigte, dass unter den differentiell exprimierten Genen überdurchschnittlich viele Gene physiologische Zellprozesse beeinflussen. In der GO-Kategorie „Zellproliferation“ wurden in Tenonfibroblasten 11 Gene signifikant stärker und ein Gen signifikant schwächer nach *CTGF*-Stimulation exprimiert (Abb.46).

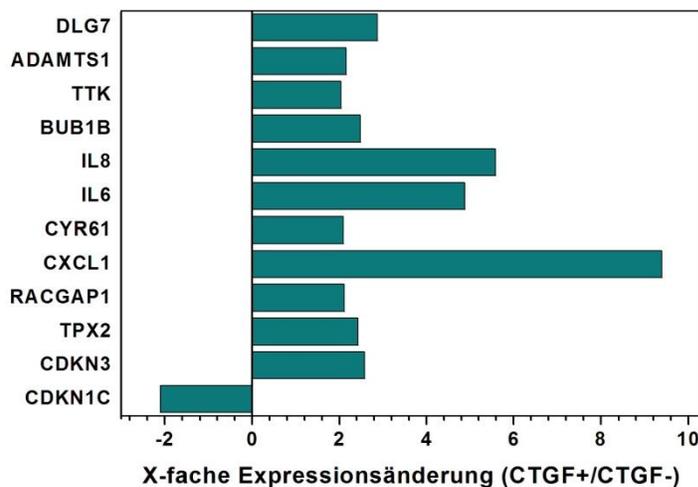


Abb. 46 Signifikant differentiell exprimierte Gene der GO-Kategorie „Zellproliferation“ in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten

Dargestellt sind die Expressionsänderungen von 12 differentiell exprimierten Genen in der GO-Kategorie „Zellproliferation“.

Fünf der signifikant modulierten Transkripte induzieren selbst die Proliferation verschiedener Zellen bzw. sind für das normale Wachstum notwendig (*ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif*; s. 3.4.1.3), *IL8*, *IL6*, *Cyr61*, *CXCL1*) (Kishimoto, T., 1989; Singh, R. K. et al., 1994; Kireeva, M. L. et al., 1996; Shindo, T. et al., 2000; Bechara, C. et al., 2007). Dahingegen konnte ein stimulatorischer Effekt des *IL-6* auf die Proliferation humaner Fibroblasten der Tenonkapsel nicht beobachtet werden (Cunliffe, I. A. et al., 1995).

Zu den regulierten Genen der GO-Kategorie „Zellproliferation“ zählen zudem Proteine, die die Progression des Zellzyklus beeinflussen (z.B. *CDKN1C*, *CDKN3* oder *BUB1B*). *CDKN1C* und *CDKN3* sind Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren, die mit CDKs (cyclin dependent kinases) und Cyclinen interagieren und deren Aktivierung durch Dephosphorylierung verhindern (Hannon, G. J. et al., 1994; Matsuoka, S. et al., 1995). *BUB1B* (budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta) kodiert eine Kinase, die durch Inhibition des „Anaphase-Promoting Komplexes“ (APC) in die Regulation des „Spindelkontrollpunkts“ involviert ist (Fang, G., 2002). Die *Proteinkinase TTK* ist an der Verdoppelung des Spindelpolkörperchens und an der Kontrolle des mitotischen Spindelkontrollpunktes beteiligt (Winey, M. et al., 1991; Weiss, E. et al., 1996). Die Mikrotubuli-organisierende Aktivität von *DLG7 (discs large homolog 7)* ist für die Spindelfunktion essenziell (Davis, T. N. et al., 2007). *TPX2* spielt eine Rolle in der Spindelpolformation und dem Chromatin induzierten Mikrotubuli-Assembly (Gruss, O. J. et al., 2004). Das *Rac GTPase activating protein 1 (RACGAP1)* bindet Mikrotubuli und ist für die Zytokinese notwendig (Hirose, K. et al., 2001).

3.4.1.2 Differentiell exprimierte Gene in der Wundheilung und Inflammation

Der GO-Kategorie „Wundheilung“ wurden 13 signifikant regulierte Transkripte zugeordnet. Alle diese Gene sind in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten stärker exprimiert (Abb. 47A). Neun dieser Gene sind gleichzeitig in der GO-Kategorie „Inflammation“ zu finden (Abb. 47B).

Die signifikant regulierten Transkripte *Serpine 1* und *PLAT (Gewebe-Plasminogen Aktivator)* sind Gegenspieler in der Fibrinolyse (s. 3.4.1.3) (Benarroch, E. E., 2007).

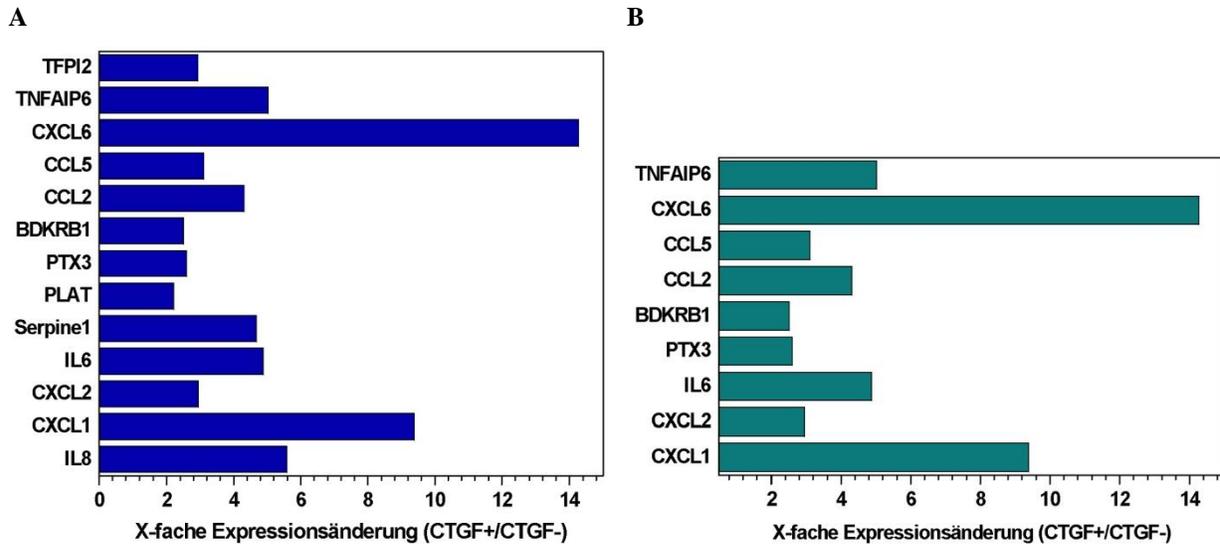


Abb. 47 Signifikant differentiell exprimierte Gene der Wundheilung und Inflammation in CTGF stimulierten Tenonfibroblasten

Dargestellt sind die Expressionsänderungen von 13 differentiell exprimierten Genen in der Kategorie Wundheilung (A) und neun regulierten Transkripten der Kategorie Inflammation (B).

Dreifach stärker exprimiert in den *CTGF* behandelten Fibroblasten ist der *Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2)*, der durch Hemmung von Matrixmetalloproteasen (MMP) sowie einiger Serinproteasen (Plasmin, FaktorXIIa, Trypsin,...) die Struktur der EZM und die Hämostase modulieren kann (Petersen, L. C. et al., 1996; Herman, M. P. et al., 2001).

Die elf anderen in der Kategorie Wundheilung durch *CTGF* regulierten Proteine sind an der Inflammation beteiligt.

Dazu zählt der *Bradykinin Rezeptor B1 (BDKRB1)* des Kallikrein-Kinin-Systems, der nach Verletzungen hochreguliert wird und wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese von chronischen inflammatorischen Krankheiten spielt (Marceau, F. et al., 1998).

PTX3 (Pentraxin 3; TSG - Tumor Nekrose Faktor-stimulated Gen 14) und *TNFAIP6 (Tumor Nekrose Faktor alpha induziertes Protein 6; TSG-6)* sind Mediatoren von akuten Inflammationsprozessen, wobei *TNFAIP6* anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist (Souza, D. G. et al., 2002).

Interleukin 6 ist ein multifunktionelles Zytokin. Als Mediator der akuten Inflammation fördert *IL-6* die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten, steigert die Immunoglobulinproduktion, aktiviert T-Zellen, stimuliert die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, beeinflusst die Proliferation von nicht-lymphoiden Zellen

und aktiviert die Akute-Phase-Reaktion (Kishimoto, T., 1989). Zudem induziert *IL-6 in vitro* einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Kollagen- und Glykosaminoglykanproduktion in humanen Hautfibroblasten (Duncan, M. R. et al., 1991).

Die übrigen sechs in die Wundheilung involvierten differentiell exprimierten Gene, darunter auch die drei am stärksten regulierten Transkripte, kodieren für chemotaktische Zytokine. Diese sogenannten Chemokine sind niedermolekulare Proteine, die in Abhängigkeit der relativen Position der Cysteine am N-terminalen Ende, in vier Untergruppen, C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokine, eingeteilt werden. Die CC-Chemokine haben nahe dem N-terminus zwei benachbarte Cysteine. In CXC-Chemokinen sind die zwei N-terminal gelegenen Cysteine durch eine AS getrennt. Chemokine agieren durch Bindung und Aktivierung der Chemokin-Rezeptoren (Luster, A. D., 1998). Im Allgemeinen induzieren sie Zellmigration von Leukozyten während der Entwicklung und Wundheilung (Nagasawa, T. et al., 1996; Gillitzer, R. et al., 2001).

CCL-2 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1), mehr als 4fach stärker in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten exprimiert, ist ein Lockstoff, der Monozyten veranlasst vom Blut in das umliegende Gewebe zu infiltrieren und zu Makrophagen zu differenzieren (Valente, A. J. et al., 1988). Neben Monozyten kann *CCL-2* auch T-Zellen anlocken (Carr, M. W. et al., 1994). Abgesehen von den inflammatorischen Eigenschaften ist *CCL-2* an der Remodeling-Phase, der Phase der strukturellen Veränderungen der EZM, durch Modifizierung der Synthese und Degradierung der EZM beteiligt (Gharaee-Kermani, M. et al., 1996; Yamamoto, T. et al., 2000).

CCL5 (RANTES, Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), ein potenter Lockstoff für inflammatorische und immunokompetente Zellen, wie Eosinophile, Basophile, T-Gedächtniszellen und Monozyten, gilt als Schlüsselmediator in verschiedenen immunologischen und allergischen Erkrankungen (Alam, R., 1997).

CXCL1 (GRO- α , Growth related oncogen-alpha) ist chemotaktisch für diverse Leukozyten (Neutrophile, T-Lymphozyten, Monozyten) und Endothelzellen und induziert die Zellproliferation von Krebszelllinien (Bechara, C. et al., 2007).

CXCL2 (MIP-2, macrophage inflammatory protein) ist ein Chemokin, das *in vitro* ein starker Lockstoff für Neutrophile sowie mitogen aktiv für Epithelzellen ist (Driscoll, K. E. et al., 1995).

CXCL-6 ist das am stärksten regulierte Gen nach Stimulation mit *CTGF* in Tenonfibroblasten (>14fach). Wie es der alte Name des Proteins, *granulocyte chemoattractant protein 2 (GCP-2)*, suggeriert, ist *CXCL-6* hauptsächlich für die Anlockung und Steuerung neutrophiler Granulozyten verantwortlich (Proost, P. et al., 1993). Ergänzend wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass *CXCL6* die Homöostase von zirkulierenden Leukozyten beeinflusst (Starckx, S. et al., 2002).

Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) wurde erstmals 1987 nach Aufreinigung aus dem Überstand LPS-stimulierter humaner Monozyten als chemotaktischer Faktor für Neutrophile beschrieben (Yoshimura, T. et al., 1987). Die Zielzellen sind neben neutrophilen Granulozyten auch T-Lymphozyten, Monozyten und nicht leukozytäre Zellen (Larsen, C. G. et al., 1989; Gerszten, R. E. et al., 1999). Zusätzlich zur Chemotaxis induziert *IL-8* die Degranulation von Neutrophilen und die Freisetzung von Histamin aus Basophilen (Mukaida, N., 2003). Mehrere *in vivo*-Studien haben *CXCL8* als Marker und Schlüsselmediator in der Neutrophil-vermittelten akuten Entzündungsreaktion bestätigt (Harada, A. et al., 1996).

Alle beschriebenen CXC-Chemokine weisen überdies angiogene Eigenschaften auf (Slettenaar, V. I. et al., 2006).

Plasminogen Aktivator Aktivität

Eine weitere die Wundheilung betreffende signifikante Kategorie ist die „Plasminogen Aktivator Aktivität“. Die Aktivierung von Plasminogen wird in den Tenonfibroblasten nach *CTGF*-Behandlung durch drei signifikant regulierte Gene beeinflusst (Abb. 48).

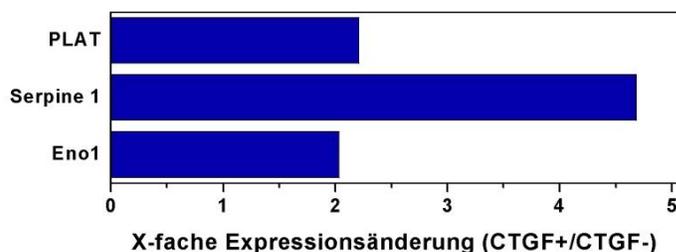


Abb. 48 Signifikant differentiell exprimierte Gene der Kategorie „Plasminogen Aktivator Aktivität“ in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten

Dargestellt sind die Expressionsänderungen von drei differentiell exprimierten Genen in der GO-Kategorie „Plasminogen Aktivator Aktivität“.

Serpine 1, auch bekannt als *PAI-1* (*plasminogen aktivator inhibitor 1*), ist der Hauptinhibitor der Plasminogenaktivatoren „tissue -“ und „urokinase plasminogen activator“ und reguliert als Akute-Phase-Protein das Fibrinolyse-System. Die Expression von *PAI-1* wurde in inflammatorischen Bereichen nach Gewebeerletzungen nachgewiesen (Juhan-Vague, I. et al., 1984). *PLAT* (*tissue plasminogen activator; tpa*) aktiviert die Spaltung von Plasminogen in Plasmin (Benarroch, E. E., 2007). *Enolase 1 alpha* (*ENO 1*) agiert als ein „Plasminogen-Rezeptor“ und fördert die Aktivierung des Plasminogens (Lopez-Aleman, R. et al., 2005).

3.4.1.2 Differentiell exprimierte Gene der EZM

Sechs differentiell exprimierte Gene in der GO-Kategorie „Extrazelluläre Matrix“ zeigen den Einfluss von *CTGF* auf die EZM. Bei den in dieser Kategorie differentiell exprimierten Transkripten ist auffällig, dass 2/3 dieser Gene in *CTGF* stimulierten Zellen schwächer exprimiert werden (Abb. 49).

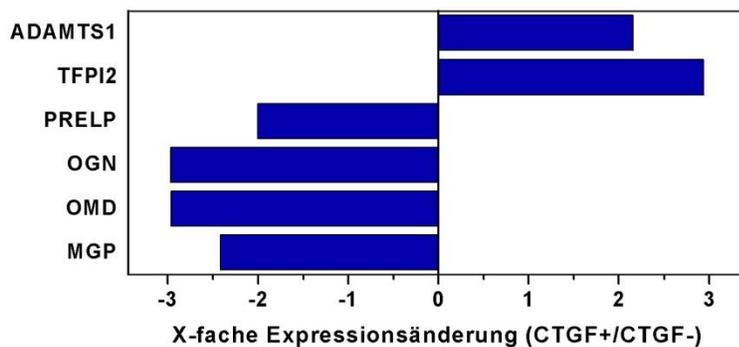


Abb. 49 Signifikant differentiell exprimierte Gene der Kategorie „Extrazelluläre Matrix“ in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten

Dargestellt sind die Expressionsänderungen von sechs differentiell exprimierten Genen in der Kategorie „Extrazelluläre Matrix“.

Differentiell exprimierte Gene der GO-Kategorie „EZM“, die in *CTGF* stimulierten Zellen verstärkt exprimiert werden sind *ADAMTS1* (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif) sowie *TFPI2* (*Tissue factor pathway inhibitor 2*). *ADAMTS1*, eine in der EZM verankerte Matrixmetalloprotease, deren Substrate die Proteoglykane Aggrecan und Versikan sind, und *TFPI2*, ein Inhibitor von Serinproteinasen wie Plasmin, regulieren Matrix-Umstrukturierungen (Chand, H. S. et al., 2005; Porter, S. et al., 2005).

Vier weitere Gene der Kategorie „EZM“, die Proteoglykane Osteomodulin, Osteoglycin und PRELP sowie das Matrix Gla Protein, sind signifikant schwächer exprimiert. *PRELP* interagiert mit Kollagenen und Perlecan und agiert als ein Basalmembranankermolekül (Bengtsson, E. et al., 2002). Die anderen schwächer exprimierten Gene dieser Kategorie spielen eine Rolle in der Osteogenese. *Osteomodulin (Osteoadherin)* interagiert mittels Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit Osteoblasten (Wendel, M. et al., 1998). Die Expression ist in murinen primären Osteoblasten und der Osteosarkom-Zelllinie MC3T3 durch *BMP-2* induzierbar, durch *TGF- β* inhibierbar (Rehn, A. P. et al., 2006). *Osteoglycin*, ursprünglich als osteoinduktiver Faktor bezeichnet, hat eine Rolle in der Kollagenbiosynthese (Tasheva, E. S. et al., 2002). Das *matrix Gla Protein (MGP)* ist ein Inhibitor der Kalzifizierung von Blutgefäßsystemen und Knorpel. In Abhängigkeit von der Konzentration hat *MGP* einen positiven bzw. negativen Effekte auf die *BMP-2* induzierte Osteoblastendifferenzierung (Zebboudj, A. F. et al., 2002).

Heparin Bindung

Die differentielle Expression von drei Heparin interagierenden Proteinen, die desgleichen mit HPSGs, einer Komponente der EZM, Wechselwirkungen eingehen können, verdeutlichen den Effekt von *CTGF* auf die EZM.

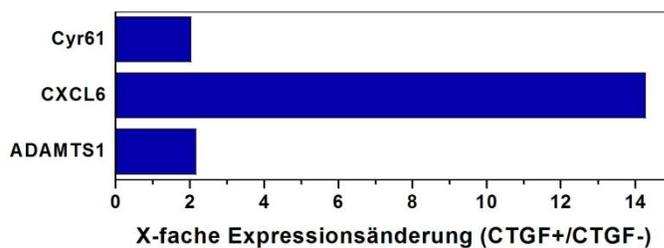


Abb. 50 Signifikant differentiell exprimierte Gene der Kategorie „Heparin Bindung“ in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten

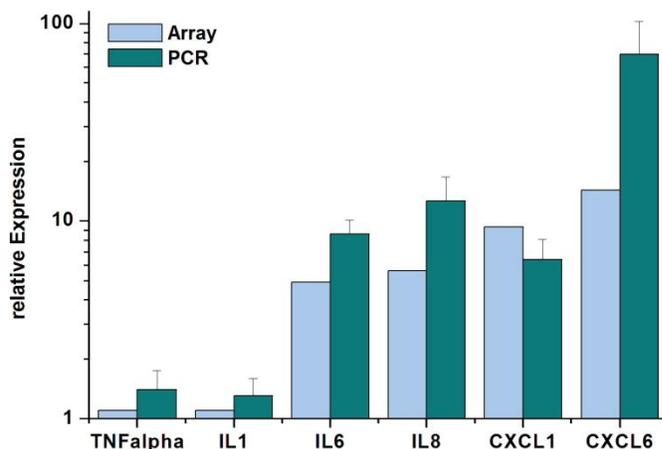
Dargestellt sind die Expressionsänderungen von drei differentiell exprimierten Genen in der GO-Kategorie „Heparin Bindung“.

ADAMTS1 (a disintegrin and metalloproteinase mit Thrombospondin Motiv) kann neben den bereits beschriebenen proteolytischen Eigenschaften mit Heparin über das TSP-Motiv und TSP-Sub-Motiv (Kuno, K. et al., 1998) interagieren. *Cyr61*, Mitglied der *CCN*-Proteinfamilie, interagiert wie *CTGF* über den C-terminalen Abschnitts des Proteins mit Heparin (Yang, G. P.

et al., 1991). Desgleichen weist *CXCL-6* (s.o.) eine Affinität zu Heparin auf (Proost, P. et al., 1993).

3.4.2 Validierung der Affymetrix-Analysen mittels semiquantitativer Real-Time-RT-PCR

Zur Kontrolle der Array-Ergebnisse wurden Real-Time-PCRs mit der Gesamt-RNA aus den entsprechenden Proben durchgeführt (Abb. 51). Die Real-Time-PCR stellt eine unabhängige Methode zur Expressionsanalyse dar, da sie im Gegensatz zu Mikroarray Analyse nicht auf der Hybridisierung von RNA an Zielsequenzen sondern dem Verfahren der Nukleinsäureamplifikation beruht. Dabei ist die durchschnittliche mRNA-Menge in den stimulierten Fibroblasten, standardisiert auf die Transkripte des Haushaltsgens *HPRT* in der gleichen Probe, im Verhältnis zu den unstimulierten Zellen dargestellt.



Gen	X-fache Expressionsänderung	
	RT-PCR	Array
TNF α	1,4	1,1
IL1	1,3	1,1
IL6	8,6	4,9
IL8	12,6	5,6
CXCL1	6,4	9,3
CXCL6	69,8	14,3

Abb. 51/Tab. 18 Expressionsprofil für die TNFAIP-, IL1-, IL6-, IL8-, CXCL1- und CXCL-6 Expression in Tenonfibroblasten nach CTGF-Behandlung

Abb. 51 Die aus Tenonfibroblasten isolierte RNA wurde reverse transkribiert und die erhaltene cDNA für die Real-Time-PCR eingesetzt. Erhaltene Daten der Threshold-Zyklen für TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, CXCL-1 und CXCL-6 wurden gegen das Referenzgen *HPRT* normalisiert. Die Real-Time- (grün) und Array-Daten (hellblau) sind im relativen Vergleich dargestellt.

Tab. 18 Die durch Array und Real-Time-PCR ermittelten Expressionsänderungen der Gene TNF α , IL1, IL6, IL8, CXCL1 und CXCL6 in HTFs nach CTGF-Stimulation im direkten Vergleich.

Analysiert wurde die Expression von sechs Genen (TNF α , IL1, IL6, IL8, CXCL1, CXCL6). Vier Gene, deren Transkription durch CTGF signifikant verändert war, und zwei Transkripte, deren Expression kaum beeinflusst war. Entsprechend den Ergebnissen aus den Mikroarrays

wurde mittels Real-Time-PCR in den *CTGF* stimulierten Zellen eine starke Zunahme der inflammatorischen Transkripte IL-6, IL-8, CXCL1 und CXCL6 nachgewiesen. Die Expression von TNF α und IL1 blieb nach *CTGF*-Stimulation nahezu unverändert.

3.5 Expression der Rezeptoren der *TGF- β* -Familie in verschiedenen Zelllinien

Die *TGF- β* -Superfamilie umfasst eine Gruppe funktionell und strukturell verwandter Proteine. Diese Wachstumsfaktoren regulieren Zellwachstum, -adhäsion, -differenzierung, die Morphogenese von Geweben und den Zelltod in verschiedenen Zelltypen und Organismen. Die meisten Liganden der *TGF- β* -Superfamilie liegen als Homodimer vor und vermitteln ihr Signal über eine Familie von Transmembran-Serin/Threonin-Kinasen, die in zwei Unterfamilien, die Typ I und Typ II Rezeptoren, eingeteilt werden können. (Massague, J., 1998). Zur Auslösung der Signalkaskade muss ein Ligand an beide Rezeptortypen binden. Da es mehr als 30 Liganden, aber lediglich sieben Typ-I- und fünf Typ-II-Rezeptoren gibt, muss ein Rezeptor-Subtyp mit verschiedenen Liganden interagieren, in unterschiedlichen Signalkaskaden resultierend (Shi, Y. et al., 2003).

Zur Entwicklung von Zell-Assays zum Test von *BMPs*, *BMP*-Mutanten, *CTGF* und anderen *BMP*-Modulatoren sollten Zelllinien und deren Rezeptorbesatz für Mitglieder der *TGF- β* -Familie mittels Real Time RT-PCR analysiert werden.

3.5.1 *TGF- β* -Rezeptorbesatz verschiedener Zelllinien

Für die Analyse der Expression von Rezeptoren der *TGF- β* -Superfamilie wurden folgende Zelllinien untersucht:

Murine Myoblasten (C2C12), murine Knorpelvorläuferzellen (ATDC5), humane Endometriumkarzinom-Zellen (Ishikawa), humane embryonale Nieren-Zellen (HEK293T), humane Leberzellen (HepG2) und Maus-Myelomzellen (MPC11).

Diese Zelllinien wurden gewählt, da entweder die *BMP/TGF- β* Responsivität wohl bekannt ist oder diese, wie im Falle der HEK-Zellen, sehr effizient transfizierbar sind und sich daher besonders zur Charakterisierung von *BMPs* und deren Modulatoren eignen (Dubridge, R. B. et

al., 1987; Croxtall, J. D. et al., 1992; Chalaux, E. et al., 1998; Shukunami, C. et al., 1998; Phillips, D. J. et al., 1999; Chen, W. et al., 2000; Kotzsch, A. et al., 2008).

Typ-I-Rezeptoren

Zellen wurden auf die Expression der gut charakterisierten *BMP/TGF-β*-responsiven Typ-I-Rezeptoren: ARIA/ALK2, ARIB/ALK4, BRIA/ALK3, BRIB/ALK6 und TRI/ALK5 getestet. Die Rezeptoren ALK1 und ALK7 wurden nicht überprüft, da über deren Liganden wenig bekannt ist. Es wurde aus den Zelllinien Gesamt-RNA isoliert, in cDNA übersetzt und in der Real-Time-PCR analysiert.

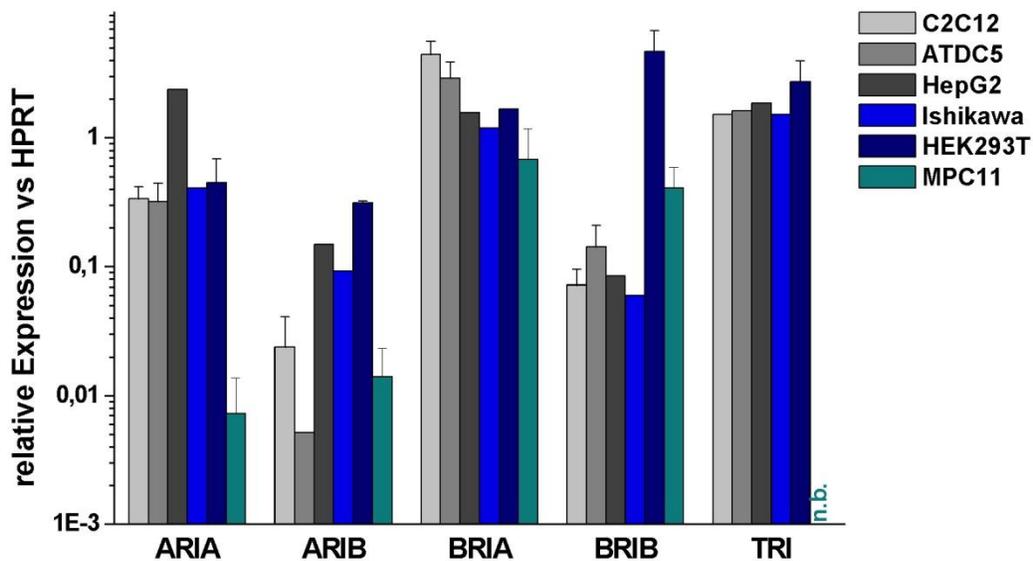


Abb. 52 Relative Expression von TGF-β-TypI-Rezeptoren in 7 Zelllinien

Aus C2C12-, ATDC-5-, HepG2-, Ishikawa-, HEK293T- und MPC-11-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, 1µg reverse transkribiert und die erhaltene cDNA für die Real-Time-PCR eingesetzt. Erhaltene Daten der Threshold-Zyklen für die Typ-I-Rezeptoren wurden gegen das Referenzgen HPRT normalisiert. n.b.= nicht bestimmt.

In Abbildung 52 sind die Expressionsunterschiede der Typ-I-Rezeptoren in den oben beschriebenen Zelllinien dargestellt. ARIA ist am stärksten in HepG2-Zellen, in MPC-11-Zellen 10-100mal schwächer als in allen anderen Zelllinien exprimiert. Die wenigsten Transkripte des ARIB weist die Zelllinie ATDC-5 auf. Der BRIA ist in allen Zelllinien in ähnlichen Mengen vorhanden. Die Expression des BRIB ist in HEK-Zellen am stärksten, in

den anderen Zelllinien wurden 10-80mal weniger mRNA nachgewiesen. Der TRII ist in allen Zellen vergleichbar stark exprimiert.

Typ-II-Rezeptoren

Die mRNA-Level der TGF- β -Typ-II-Rezeptoren ARII, ARIIB, BRII und TRII der Zelllinien wurde ebenso analysiert.

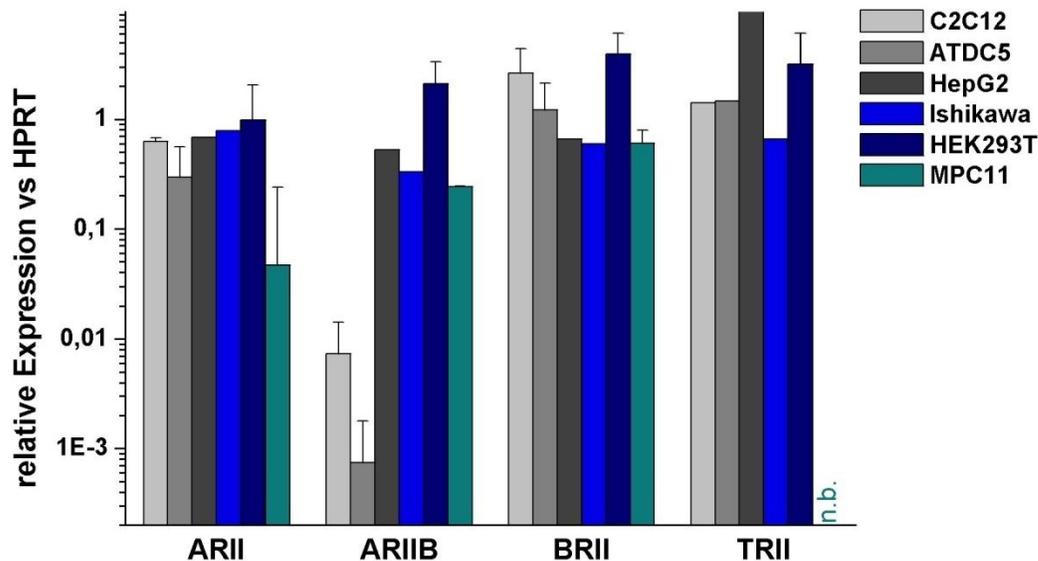


Abb. 53 Relative Expression der TGF- β -TypII-Rezeptoren in sieben Zelllinien

Aus C2C12-, ATDC-5-, HepG2-, Ishikawa-, HEK293T- und MPC-11-Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, 1 μ g reverse transkribiert und die erhaltene cDNA für die Real-Time-PCR eingesetzt. Erhaltene Daten der Threshold-Zyklen für die Typ-II-Rezeptoren wurden gegen das Referenzgen HPRT normalisiert. n.b.= nicht bestimmt.

Transkripte der Typ-II-Rezeptoren zeigen wenige signifikante Unterschiede. Der stärkste Unterschied ist bei der ARIIB-Expression zu sehen. In ATDC-5-Zellen ist dieser Rezeptor im Vergleich zu C2C12-Zellen 10fach, hinsichtlich MPC-11-, HepG2- und Ishikawa-Zellen 500fach und im Vergleich zu HEK-Zellen über 3000fach schwächer exprimiert. Der mRNA-Level des ARII-Rezeptors ist in MPC11-Zellen am niedrigsten, der des TRII-Rezeptors ist in HepG2-Zellen am höchsten (nicht getestet in MPC-11-Zellen).

3.5.2 Expression der TGF- β -Rezeptoren in humanen Myeloma-Zelllinien

BMPs spielen eine Rolle in der Hämatopoese durch die Bildung, Proliferation und Differenzierung von pluripotenten hämatopetischen Stammzellen (HSC). Sie induzieren u. a. die hämatopoetische Aktivität in Embryoid-Körpern muriner embryonaler Stammzellen und regulieren die Differenzierung und Proliferation von primitiven HSCs in Kultur (Johansson, B. M. et al., 1995; Bhatia, M. et al., 1999). Um mehr Informationen über die Rolle von *BMPs* in Myelomen zu erhalten, wurden sieben Myelomzelllinien auf den Rezeptorbesatz für Mitglieder der *TGF- β* -Familie hin untersucht. Die von Dr. Stühmer (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Würzburg) bereitgestellten cDNAs aus den humanen Myelom-Zelllinien Ina-6, Ano-1, KMS-12-BM, MM.1S, MOLP, OPM-2, RPMI-8226 sowie U266 wurden für die Real-Time-Versuche eingesetzt. Die RNA war hierfür aus $2 \cdot 10^5$ Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben worden. Für die Normalisierung der Expressionen wurde als Haushaltsgen das stärker exprimierte ribosomale Protein S26 verwendet, da HPRT in einigen Proben nicht detektiert werden konnte.

Typ-I-Rezeptoren

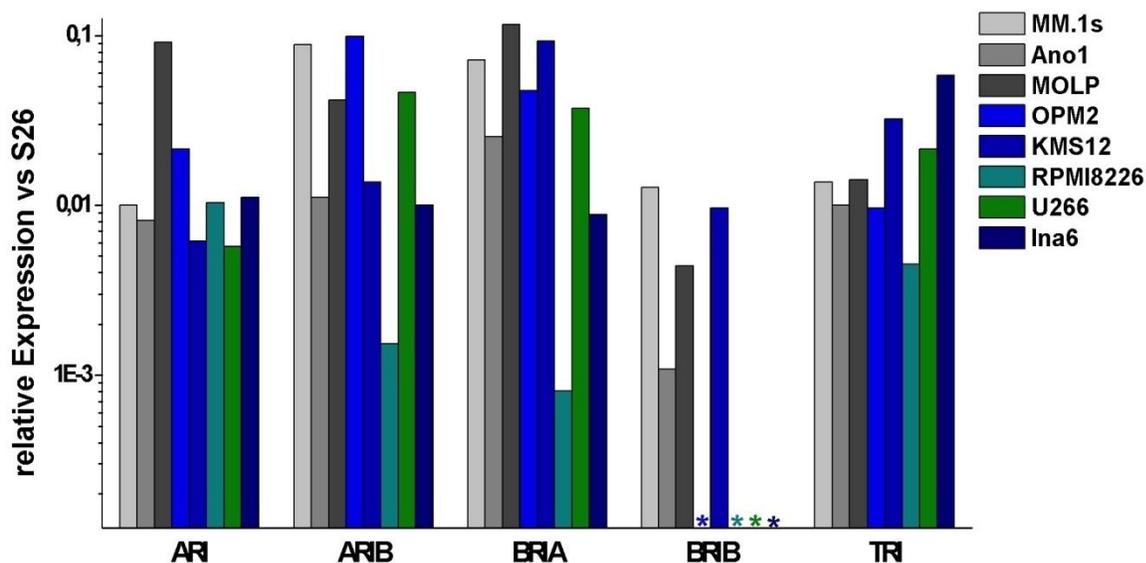


Abb. 54 Relative Expression der TGF- β -TypI-Rezeptoren in Myelomazelllinien

Der TGF- β -Typ-I-Rezeptorbesatz der Zelllinien MM-1S, Ano-1, MOLP, OPM-2, KMS12-BM, RPMI-8226, U266 und Ina-6 wurde auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR untersucht. Erhaltene Daten der Threshold-Zyklen für die Typ-I-Rezeptoren wurden gegen das Referenzgen S26 normalisiert. * keine Expression nachweisbar.

Der Graph zeigt die Expression der TypI-Rezeptoren. ARIA ist in MOLP-Zellen ~10fach stärker exprimiert. RPMI-Zellen weisen einen 10-100fach niedrigeren m-RNA-Level des ARIB und BRIA als die anderen Myelomzellen auf. Der BRIB ist im Verhältnis zu den anderen Typ-I-Rezeptoren in allen Zelllinien am schwächsten oder maximal gleich stark exprimiert. In den Zelllinien OPM-2, RPMI-8226, U266 und Ina-6 konnten keine BRIB-Transkripte nachgewiesen werden. Der mRNA-Level des TRI-Rezeptors ist in Ina-6-Zellen am stärksten, in RPMI-Zellen am schwächsten vorhanden.

TypII-Rezeptoren

In weiteren Real-Time-Experimenten wurde der TGF-β-TypII-Rezeptorbesatz der Myelomzelllinien analysiert.

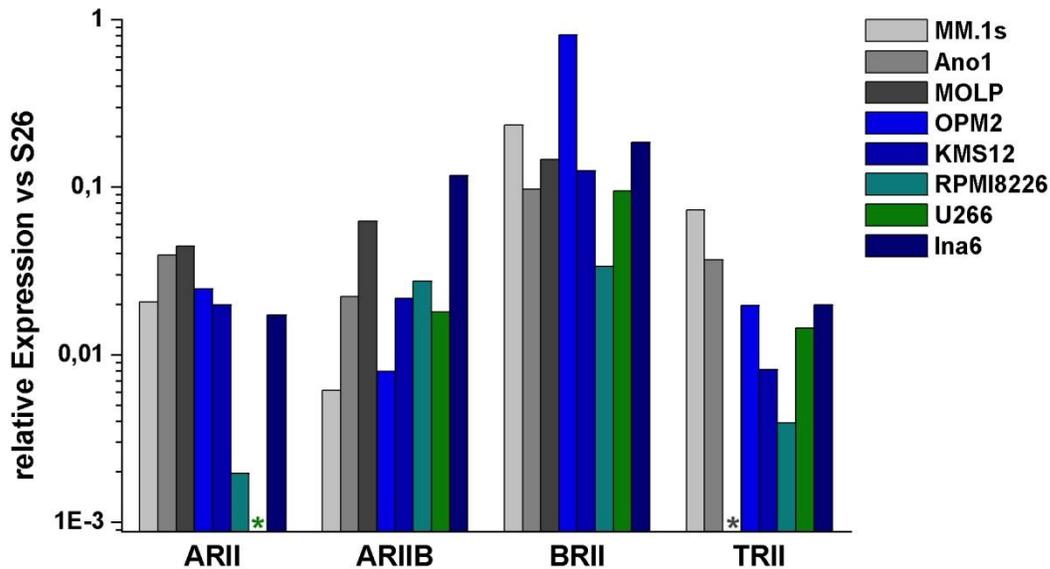


Abb. 55 relative Expression der TGF-β-TypII-Rezeptoren in Myelomzelllinien

Der TGF-β-Typ-II-Rezeptorbesatz der Zelllinien MM-1S, Ano-1, MOLP, OPM-2, KMS12-BM, RPMI-8226, U266 und Ina-6 wurde auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR untersucht. Erhaltene Daten der Threshold-Zyklen für die Typ-I-Rezeptoren wurden gegen das Referenzgen S26 normalisiert. * keine Expression nachweisbar.

Die Real-Time-Ergebnisse zur Detektion der Typ-II-Rezeptoren zeigen, dass in RPMI-8226-Zellen eine deutlich schwächere, in U266-Zellen keine ARII-Expression nachgewiesen werden konnte. Die Expression des ARIIB ist in den Zelllinien MM.1S und OPM-2 am niedrigsten, in Ina-6-Zellen am höchsten. In OPM-2-Zellen ist der BRII 4-9fach höher, in RPMI-8226 3-7fach geringer vorhanden als in den anderen untersuchten Myelomzellen. Der

TRII-Besatz variiert zwischen den verschiedenen Zelllinien bis um den Faktor 20. In MOLP-Zellen konnte kein Signal für den TRII nachgewiesen werden.

4. Diskussion

CTGF ist ein multimodulares Protein, aufgebaut aus vier verschiedenen Domänen. Die funktionelle Bedeutung der vier Module des *CTGF*-Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die verschiedenen Domänen der *CCN*-Proteine in verschiedenen Zelltypen unabhängig voneinander funktionieren (Bork, P., 1993; Brigstock, D. R., 1999). Neben den bereits beschriebenen *CTGF*-Isoformen, die unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen, gibt es verkürzte Varianten anderer *CCN*-Proteine. In Fibroblasten wurde eine *Cyr61* mRNA mit einer Deletion von 99 Nukleotiden in Exon 4 (entspricht Domäne 3) detektiert (Leng, E. et al., 2002). Desweiteren wurden mehrere N-terminal trunke Isoformen mit fehlendem Modul 1 bzw. Modulen 1 und 2 von *NOV* beschrieben (Joliot, V. et al., 1992; Perbal, B., 1999). Die Nov-Variante ohne *IGF*-Domäne weist onkogene Eigenschaften auf (Joliot, V. et al., 1992). Eine kurze Isoform von *WISP1*, der Modul 2 fehlt, ist in die pathologische Progression von malignen Erkrankungen involviert (Tanaka, S. et al., 2001; Tanaka, S. et al., 2003). *WISP2* fehlt grundsätzlich Domäne vier (Pennica, D. et al., 1998).

Obwohl die Entdeckung des *CTGF* mehr als 15 Jahre zurückliegt, wurden nur wenige detaillierte strukturelle und funktionelle Studien durchgeführt. Schwierigkeiten bei der Isolation dieses Proteins haben Studien erschwert. Obgleich *CTGF* in vielen Zelltypen in Kultur exprimiert wird, gibt es keine geeigneten Quellen, die für die „large-scale“ Produktion geeignet sind (Moussad, E. E. et al., 2000). Die komplexe Proteinstruktur, *CTGF* umfasst 38 Cysteine (>10% der Masse), die vermutlich intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, ist ein kritischer Faktor bei der Herstellung in rekombinanten Expressionssystemen (Bork, P., 1993).

4.1 Expression und Charakterisierung der *CTGF*-Proteine

Für die funktionelle Charakterisierung des humanen *CTGF*, der *N*- und *C-terminalen Doppeldomäne* sowie den vier einzelnen Domänen, sollten diese Proteine zunächst in verschiedenen Expressionssystemen hergestellt werden.

Die Herstellung der *VWC*- und *CTCK*-Domäne wurde zunächst im *E.coli* Expressionssystem versucht. Eine Problematik nach Zellaufschluss war die vorhandene Degradierung der *VWC*- bzw. *CTCK*-Domäne. In *E.coli* K12 wurden bisher mehr als 70 Proteasen identifiziert, von denen mehr als 50% im Cytoplasma lokalisiert sind (*E.coli* protease database). Verschiedene Strategien, um die Spaltung durch Proteasen zu verhindern, stoppten die Proteolyse der *VWC*-Domäne fast vollständig. Die Degradierung der *CTCK*-Domäne wurde nur minimal reduziert. Das zweite Problem der Expression in *E.coli* war die nicht korrekte Faltung der *VWC*-Domäne. Die zehn Cysteine der *VWC*-Domäne bildeten mindestens eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei *VWC*-Monomeren aus. Dadurch konnten nur *VWC*-Dimere aufgereinigt werden (Abb. 11).

Aufgrund der Problematik bei der Expression dieser *CTGF*-Domänen in *E.coli* und da bekannt war, dass bei der Expression des kompletten *hCTGF* in *E.coli* bisher nur ein immunoreaktives, aber biologisch nicht aktives rekombinantes Protein hergestellt werden konnte, wurde für die Herstellung weiterer *CTGF*-Konstrukte eukaryotische Expressionssysteme gewählt (Bradham, D. M. et al., 1991).

Eine erfolgreiche eukaryotische Alternative bietet die Produktion des *CTGF* mit dem Baculovirus-Expressionssystem in Insektenzellen (Frazier, K. et al., 1996; Kireeva, M. L. et al., 1997; Chen, C. C. et al., 2001; Shimo, T. et al., 2002; Mercurio, S. et al., 2004). Die meisten eukaryotischen Proteine bedürfen posttranslationaler Modifikationen, um hinsichtlich ihrer Struktur (Disulfidbrücken), ihrer Sekretion (Glykosylierungen) und ihrer Bioaktivität, korrekt exprimiert und gefaltet zu werden. In den folgenden Abschnitten wird auf wichtige Ergebnisse und Schwierigkeiten bei der Expression und Aufreinigung der verschiedenen *CTGF*-Isoformen im Baculovirus-Expressionssystem eingegangen.

Die Expression der *IGF*-Domäne konnte in *Sf-9* Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 12). Mögliche Ursachen – ein fehlerhaftes Transferplasmid, eine fehlerhafte wt-DNA, fehlerhafte Kotransfektions-Reagentien, veränderte *Sf-9* Zellen – wurden durch Kontrollexperimente

ausgeschlossen. Aufgrund der geringen Expressionsraten in *Sf-9*-Zellen konnten ebenso das *TSP1-Repeat* und die *C-terminale Doppeldomäne* nicht in ausreichenden Mengen für die biochemische Charakterisierung gewonnen werden. Eine Expressionsteigerung durch Veränderung der Expressionszeit, der MOI, dem Einsatz neuer Zellen und eines anderen Klons wurde nicht erreicht

Die *VWC-Domäne* und die *N-terminale Doppeldomäne* wurden mit einer guten Expressionsrate in *Sf-9* Zellen exprimiert, konnten durch Ni-NTA-Chromatographie gereinigt und konzentriert werden. Durch sich anschließende chromatographische Schritte (Superdex200-Gelfiltration und HPLC) konnten reine Proteine mit einer Ausbeute von 600 µg/l (*VWC-Domäne*) bzw. 180µg/l (*N-terminale Doppeldomäne*) erhalten werden, die für die funktionellen Analysen eingesetzt wurden.

Die biochemische Charakterisierung zeigte, dass die aufgereinigten Proteine, die *VWC-Domäne* und die *N-terminale Doppeldomäne*, die *BMP-2* induzierte ALP nicht blockierten und in BIAcore-Analysen keine Bindung an *BMP-2* nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber war die Interaktion der *VWC-Domäne* des *Xenopus CTGF* mit *BMP-4* bzw. *TGF-β1* durch Crosslinking-Experimente gezeigt worden (Abreu, J. G. et al., 2002). Eine Bindung der rekombinanten *VWC-* und *N-terminalen Doppeldomäne* in Balb3T3-Adhäsionsassays konnte außerdem nicht festgestellt werden. Eine mögliche Ursache für die fehlende Funktionalität könnte eine falsche Faltung der Proteine sein. Da die Interaktion des rekombinanten *hCTGF* mit *BMP-2* und ebenso die Adhäsion des *hCTGF* an Balb3T3-Zellen in dieser Arbeit gezeigt wurden, wäre es auch möglich, dass weitere Bereiche des Proteins für die Interaktionen notwendig sind (Abb. 34 und 36) (Ball, D. K. et al., 2003).

Die Aufreinigung des *hCTGF* aus *Sf-9* Zellen wurde mit guter Reinheit durch Ni-NTA-Chromatographie und S200-Gelfiltration erreicht (3.1.2.6). Die Ausbeuten und Konzentration an gereinigtem Protein waren jedoch zu gering, um die für die *in vitro*-Anwendungen nötigen Mengen an einsetzbarem Protein zu erzielen. Besondere Schwierigkeiten ergaben sich mit jedem hinzukommenden Konzentrierungsschritt, wodurch hohe Mengen an *hCTGF* verloren gingen. Es ist bekannt, dass *CTGF* für Proteolyse sehr empfänglich ist, in Isoformen von 10-20 kDa resultierend (Brigstock, D. R. et al., 1997; Yang, D. H. et al., 1998). Desgleichen wurden in dieser Arbeit bei der Aufreinigung aus dem *Sf-9* Kulturüberstand verkürzte *CTGF*-Formen von 20~kDa beobachtet (Abb. 27 und 28). Die proteolytische Aktivität im Überstand

der *Sf9*-Zellen könnte möglicherweise eine weitere Degradierung des Proteins verursachen und zum beobachteten Proteinverlust führen (Cruz, P. E. et al., 1999; Gotoh, T. et al., 2001).

Ein weiterer Ansatz für die *CTGF*-Expression in Eukaryoten war die Nutzung eines CMV-getriebenen Säuger-Expressionsplasmid, das stabil in Säugerzellen, z.B. HeLa- oder 293T-Zellen, überexprimiert wird (Nishida, T. et al., 1998; Inoki, I. et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das HEK-Zell-Expressionssystem ein geeignetes System für die Produktion im präparativen Maßstab und Isolation des *hCTGF* darstellt. Nach den chromatographischen Schritten konnte reines *CTGF* gewonnen werden. Während der Aufreinigung konnten, wie beim *CTGF* aus *Sf-9* Zellen, Degradierungsprodukte beobachtet werden, die durch die Gelfiltration vom kompletten *CTGF* abgetrennt werden konnten (3.1.3).

Die *in vitro*-Charakterisierung des humanen *CTGF* aus HEK Zellen ergab, dass ein funktionell bioaktives Protein generiert worden war, das in der Lage war, die *BMP-2* induzierte ALP-Aktivität signifikant mit einer IC_{50} von 50-100 nM zu blockieren (Abb. 34). Verglichen mit der in der Literatur beschriebenen Inhibition der mit *BMP-4* induzierten ALP in 10T1/2 Zellen durch *Xenopus CTGF* liegt die IC_{50} in dieser Arbeit um den Faktor 5-8fach höher (50-100nM vs. 12nM, Abreu, J. G. et al., 2002). Im Hinblick auf die in den Assays eingesetzten BMP-Konzentration von 10nM *BMP-2* bzw. 2,5nM *BMP-4* ist in beiden Fällen das ≥ 5 fache der eingesetzten *BMP*-Konzentration an *CTGF* nötig um die halbmaximale Inhibition zu erreichen. In Oberflächenplasmonresonanzstudien konnte die direkte und spezifische Interaktion zwischen *hCTGF* und *BMP-2* bestätigt werden (3.2.1).

Die adhäsiven Eigenschaften des rekombinanten *hCTGF* wurden nach Vorversuchen mit verschiedenen Fibroblasten mit Balb3T3-Zellen im Adhäsionsassay ermittelt. Es konnte eine dosisabhängige Adhäsion der Balb3T3-Zellen an *CTGF* beobachtet werden, die 40% der maximalen Adhäsion der Kontrolle, Fibronectin, erreichte. Bei $\geq 1\mu\text{g CTGF/Loch}$ adhärierte das Maximum an Zellen (Abb. 36). Im Gegensatz dazu wird in der Literatur für die Adhäsion von Balb3T3-Fibroblasten an *CTGF* eine um den Faktor zehn niedrigere Menge benötigt (100ng) (Ball, D. K. et al., 2003).

Experimente zur biologischen Aktivitätsprüfung des humanen *CTGF* bestätigten proliferative Eigenschaften in Eahy926-Zellen sowie in primären Tenonfibroblasten. In Endothelzellen induziert das rekombinante *hCTGF* die gleiche Proliferationssteigerung wie das rekombinante Fusionsprotein *hCyr61* bei einer 2,5fach höheren Konzentration. Der Einsatz von *CTGF* in

Proliferationsassays mit primären humanen Tenonfibroblasten führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der DNA-Synthese. In Abhängigkeit vom Spender der Zellen variierte die EC50 zwischen 14 und 56nM. Diese Ergebnisse bestätigten die Expression eines funktionell bioaktiven Proteins.

Es bleibt jedoch weiterhin ungeklärt, ob *CTGF* als komplettes Protein diese Aktivitäten aufweist oder als eine Art Proprotein agiert, das zunächst gespalten werden muss, um biologisch aktiv zu sein oder zumindest für einige Funktionen zunächst eine Spaltung stattfinden muss.

4.2 Genexpressionsanalyse an humanen Fibroblasten

CTGF scheint eine bedeutende Funktion bei der Entstehung und Progression fibrotischer Defekte am Auge zu haben, da der *CTGF*-Level mit zunehmendem Fortschreiten dieser Erkrankungen ansteigt (Kuiper, E. J. et al., 2006). Nähere Informationen über die Aufgaben des *CTGF* bei Fibrosen am Auge, die z.B. nach Behandlung eines Glaukoms entstehen, wurden bisher nicht publiziert. Desgleichen ist über Tenonfibroblasten, Zellen der die Augen umgebende Bindegebeweshülle, und ihre biologische Relevanz bei fibrotischen Vorgängen am Auge wenig bekannt.

Um die präzise Rolle und den molekularen Mechanismus des *CTGF* in diesem Bereich besser zu verstehen, wurde eine umfangreiche Expressionsstudie durchgeführt, bei der die Veränderungen der Genexpression in humanen Tenonfibroblasten nach Behandlung mit *hCTGF* (HEK) im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht wurde. Der HG-U133A-2.0 Array machte es möglich die Expression von 14500 humanen Genen parallel zu untersuchen. Der untersuchte Effekt von *CTGF* auf die humanen Primärzellen des Tenon erlaubte einen experimentellen Zugang zu sehr unterschiedlichen Fragestellungen: zum einen eher grundlegenden Fragen, beispielsweise ob *CTGF* basale zelluläre Funktionen in Fibroblasten reguliert, zum anderen aber auch, um neue molekulare Zusammenhänge, die eine Rolle bei der Fibrose spielen, aufzudecken, sowie eventuell neue Targets am Auge anhand der Expressionsveränderungen zu identifizieren. Es konnte an Zellen von drei unabhängigen Spendern gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber *CTGF* eine Veränderung im Expressionsprofil hervorruft. 109 der untersuchten Gene wurden signifikant beeinflusst.

CTGF ist ein proliferatives Protein, das die Expression eines genetischen Programms für die Wundheilung in Fibroblasten reguliert. Diese Aussage gründet auf der Beobachtung, dass *CTGF* einerseits während der Wundheilung exprimiert wird und andererseits die Expression von Genen reguliert, die überwiegend in 1. die Zellproliferation, 2. die Inflammation und Wundheilung involviert sowie 3. Bestandteile, Interaktionspartner oder Modulatoren der EZM sind.

Der Effekt von *CTGF* auf die Proliferation verschiedener Fibroblasten wurde bisher mehrfach untersucht, und *CTGF* ist bekannt die Zellproliferation in Fibroblasten zu induzieren (Kireeva, M. L. et al., 1997; Ball, D. K. et al., 2003; Grotendorst, G. R. et al., 2004). Mittels des Affymetrix-Arrays konnte die signifikant differentielle Expression von zwölf Genen, die vor allem in die Regulation des Zellzyklus involviert sind oder proliferative Proteine kodieren, diese funktionelle Eigenschaft des Proteins bestätigen (3.4.1.1).

Es ist außerdem bekannt, dass *CTGF* eine entscheidende Rolle in der Wundheilung spielt (Leask, A. et al., 2002). Diese Effekte waren bisher vor allem im Bereich der Umstrukturierung der EZM in der reparativen Phase des Wundheilungsprogramms zu beobachten. Dagegen konnte in dieser Mikroarray-Analyse zusätzlich ein starker proinflammatorischer Effekt des *CTGF* beobachtet werden. Neun der regulierten Gene, die in *CTGF* stimulierten Zellen stärker exprimiert werden, spielen eine Rolle in der Inflammation. Die CC-Chemokine *CCL2* und *CCL5* sind Lockstoffe für diverse Leukozyten (Alam, R., 1997). Die gesteigerte mRNA-Produktion von *CCL2* und *CCL5* nach *CTGF*-Stimulation wurde bereits in Mesangialzellen der Ratte beobachtet (Wu, S. H. et al., 2006). Im Gegensatz zu dieser und der in dieser Arbeit beobachteten *CTGF* induzierten Hochregulierung von *CCL-2* und *IL-8* beschreibt Qi, dass *CTGF* keinen Effekt auf die *CCL-2* und *IL-8*-Expression in humanen Nieren (HK-2)-Zellen hat (Qi, W. et al., 2006). Dieser kontroverse Effekt könnte einerseits dadurch zu erklären sein, dass die HK-2-Zellen nicht responsiv für *CTGF* sind, die eingesetzte Konzentration (400ng/ml) zu gering war, um die Expressionssteigerung zu induzieren oder diese Zellen ein anderes Expressionsprofil zeigen.

Weiterhin wurden bisher noch nicht beschriebene durch *CTGF* regulierte Gene in der Kategorie Inflammation identifiziert. Zu diesen zählt *Interleukin 6*, das ein wichtiger Mediator der Akute-Phase-Reaktion ist. Das *CTGF* Homolog *Cyr61* induziert in Fibroblasten die Expression von *IL-1 β* , welches bekannt ist die Expression und Freisetzung von *IL-6* zu steuern

(Kohase, M. et al., 1987; Chen, C. C. et al., 2001). Zudem wurde in Lungenfibroblasten eine *TGF- β* induzierte Expressionssteigerung von *IL6* und *IL8* beschrieben (Eickelberg, O. et al., 1999). Diese Beobachtungen legten nahe, dass auch *CTGF* eine Rolle in der Regulation der *IL-6*-Expression spielen könnte. In dieser Arbeit konnte dies durch eine verstärkte Expression von *Interleukin 6* nach *CTGF*-Stimulation in Tenonfibroblasten nachgewiesen werden.

Weitere proinflammatorische Proteine, deren Regulation durch *CTGF* bisher unbekannt war, sind die CXC-Chemokine 1, 2, 6 und 8. Alle diese Proteine werden nach *CTGF*-Stimulation verstärkt exprimiert. Die Transkription von *CXCL-1* ist >9fach nach *CTGF*-Stimulation hochreguliert. *CXCL-1* wird mit der Angiogenese und Inflammation assoziiert (Bechara, C. et al., 2007). *CXCL-2* wirkt chemotaktisch auf Neutrophile (Driscoll, K. E. et al., 1995). Das am stärksten durch *CTGF* regulierte Gen kodiert für *CXCL-6*, ein weiteres inflammatorisches Chemokin. Die Expression von *CXCL-6* wird abhängig vom Gewebe und Inducer-Substanzen differentiell reguliert. Fibroblasten produzieren *CXCL6* in Antwort auf pro-inflammatorische Stimuli (LSP, IL-1 β) (Wuyts, A. et al., 2003).

Ein weiteres in Tenonfibroblasten durch *CTGF* reguliertes Gen ist *Interleukin 8/CXC-Chemokin 8*. In HK-2-Zellen hingegen wurde keine Veränderung der *IL-8*-Expression nach *CTGF*-Behandlung festgestellt (s. o.) (Qi, W. et al., 2006). In Modellen der akuten Inflammation wurde *IL-8* als ein Schlüsselmediator in der Neutrophil-vermittelten akuten Inflammation eingeführt. *IL-8* übt verschieden Aktivitäten auf diverse Zelltypen, einschließlich Neutrophile, Monocyten, Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten aus (Mukaida, N., 2003).

Alle CXC-Chemokine spielen zudem eine Rolle bei der Regulation der Angiogenese. Obwohl der präzise molekulare Mechanismus der Chemokin-Aktivitäten in Bezug auf die Neovaskularisation während der Inflammation oder des Tumorwachstum nicht vollständig verstanden sind, könnten die mehrfach beschriebenen angiogenen Eigenschaften von *CTGF* möglicherweise durch die *CXC-Chemokine 1, 2, 6* und/oder *8* vermittelt werden (Brigstock, D. R., 2002; Ivkovic, S. et al., 2003; Strieter, R. M. et al., 2005)

Neben den überwiegend neu beschriebenen inflammatorischen Genen induzierte *CTGF* auch Gene, deren Proteinprodukte in der reparativen Phase der Wundheilung entscheidend sind. Der Aufbau der EZM kann durch das nach *CTGF*-Stimulation verstärkt exprimierte *TFPI2*

verändert werden (Petersen, L. C. et al., 1996; Herman, M. P. et al., 2001). Das durch *CTGF* hochregulierte Zytokin *IL-6* und das Chemokin *CCL-2* weisen neben den vielfältigen inflammatorischen Eigenschaften zusätzlich EZM-modulierende Funktionen auf. *IL6* stimuliert die Kollagensynthese in Zellen (Duncan, M. R. et al., 1991). *CCL-2* reguliert die Expression von Typ I Kollagen mRNA in Fibroblasten hoch (Gharaee-Kermani, M. et al., 1996; Yamamoto, T. et al., 2003). Zudem wird die Expression von *MMP-1*, *MMP-2* und *TIMP-1* durch *CCL-2* gesteigert (Yamamoto, T. et al., 2000). Diese die EZM betreffenden Funktionen von *IL-6* und *CCL-2* sind analog zu den beschriebenen *CTGF* vermittelten Umstrukturierungen der EZM (Hochregulierung von Kollagen, MMP2, TIMP-1) (Frazier, K. et al., 1996; McLennan, S. V. et al., 2004). Möglicherweise werden diese publizierten stimulierenden *CTGF*-Effekte durch die gesteigerte Expression von *IL6* und/oder *CCL-2* verstärkt bzw. vermittelt.

Verschiedene Bereiche der Wundheilung können außerdem durch die differentielle Expression von Plasminogen Aktivator modulierenden Genen reguliert werden. Plasmin, primär eine fibrinolytisches Enzym, ist durch seine proteolytische Aktivität zudem in zahlreiche nicht-fibrinolytische Prozesse wie die Umstrukturierung der EZM involviert (Festuccia, C. et al., 1998). Zudem verstärkt Plasmin die Inflammation durch Induktion der Aggregation von Neutrophilen, der Degranulation von Thrombozyten (Ryan, T. J. et al., 1992; Shigeta, O. et al., 1997). In der Literatur wird beschrieben, dass *CTGF* allein keinen Effekt auf die Gentranskription des *Plasminogen Aktivator Inhibitors (PAI)* in mesangialen Zellen zeigt. Demgegenüber bewirken *CTGF* und *TGF- β* synergistisch eine stärkere Induktion von *PAI* als *TGF- β* allein (Wahab, N. A. et al., 2005). Die *TGF- β* induzierte *PAI*-Expression in HKC-Zellen (human proximal tubular epithelial cell) wird über einen *CTGF*-abhängigen Weg reguliert (Zhang, C. et al., 2004). *In vitro* Modelle von mechanischem Stress an Fibroblasten, die kontraktile Kräfte während der Wundheilung simulieren, zeigten die gesteigerte Expression von *CTGF* sowie *PAI-1*. Die spezifische Hochregulierung von *CTGF* infolge von mechanischem Stress könnte die Expression von Proteinen der EZM oder EZM-modulierenden Proteinen, wie *PAI-1*, induzieren (Kessler, D. et al., 2001; Schild, C. et al., 2002). In Tenonfibroblasten wurde in dieser Arbeit die gesteigerte Expression von *PAI-1* nach *CTGF*-Stimulation nachgewiesen. Gleichzeitig wurde die Expression von zwei Aktivatoren

(*Enolase 1* und *PLAT*) hochreguliert. Die gestiegenen Level des Plasminogen Inhibitors und der Plasminogen Aktivatoren könnte das subtile Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und –degradierung stören und zur Akkumulation von EZM am Auge führen. Desgleichen könnte auch die Fibrinolyse und Inflammation durch Modulation der Plasminogenaktivierung reguliert werden.

Die letzte interessante durch *CTGF* signifikant beeinflusste Kategorie ist die EZM. Proteasen, die die Umstrukturierung der EZM regulieren (*ADAMTS1*, *TFPI2*) sind in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten stärker exprimiert. Die Hochregulierung verschiedener Matrixmetalloproteinasen (*MMP3*, *MMP13*, *ADAMTS4* und *5*) durch eine *CTGF*-Überexpression war bereits gezeigt worden (Blaney Davidson, E. N. et al., 2006). Diese *CTGF* induzierte Modulation der Protease-anti-Protease-Balance durch die Regulation verschiedener Proteasen und Proteaseinhibitoren könnten zur Reparatur von Gewebedefekten bzw. zur Entwicklung fibrotischer Defekte beitragen.

Im Gegensatz zu diesen EZM modulierenden Proteinen sind mehrere Proteoglykane (PRELP, Osteoglycin, Osteomodulin) schwächer in den *CTGF* stimulierten Zellen vorhanden. In Endothelzellen unterdrückt *CTGF* die Expression des Proteoglykans Biglycan, induziert aber die Synthese von Decorin (Kaji, T. et al., 2004). Da *IGFs* die Proteoglykansynthese stimulieren und ihre Aktivität durch *IGF*-interagierende Proteine moduliert wird, ist es möglich, dass *CTGF* die Synthese der Proteoglykane nicht direkt beeinflusst, sondern die Effekte von *IGF* auf die Proteoglykansynthese moduliert (Takigawa, M. et al., 1997).

CTGF ist weiterhin ein Heparin bindendes Protein für dessen Adhäsion an Lebersternzellen die Interaktion mit Zelloberflächen-HSPGs notwendig sind (Ball, D. K. et al., 2003; Gao, R. et al., 2004). Heparin ist ein Polysaccharid, das gerinnungshemmende Eigenschaften besitzt. Heparansulfatproteoglykane, strukturell mit dem Heparin verwandt, sind an der Zelloberfläche oder in der EZM lokalisiert und sind an der Zellproliferation, Differenzierung, Embryonalentwicklung, der Zellmigration, der Inflammation und Chemotaxis beteiligt (Bishop, J. R. et al., 2007). HSPGs sind zudem wichtig für die Wundheilung (Echtermeyer, F. et al., 2001). Durch die *CTGF* induzierte differentielle Expression von Heparin interagierenden Proteinen können verschieden Heparinabhängige Prozesse moduliert werden. Neben den in der GO-Kategorie „Heparin Bindung“ beschriebenen Genen (*ADAMTS-1*,

Cyr61, *CXCL6*) zählen zu den differentiell exprimierten Heparin interagierenden Transkripten auch die *CXC-Chemokine 1, 2* und *8 (IL8)* (Strieter, R. M. et al., 2005). Diese *CTGF* induzierte Expressionsänderung kann eine Modulation der EZM-Struktur wie auch der Hämostase, zwei entscheidenden Bereichen der Wundheilung, bedingen.

Diese beobachteten *CTGF* induzierten genregulatorischen Effekte in Tenonfibroblasten werden durch die 1,8fache Expression von *CTGF* autokrin/parakrin verstärkt (Tabelle, Anhang).

Die mehrfach beschriebene durch *CTGF* gesteigerte Kollagensynthese und die Transdifferenzierung von Fibroblasten konnte in dieser Expressionsanalyse nicht beobachtet werden. *CTGF* soll die Hochregulierung von *Typ I Kollagen* und *α -smooth muscle-Actin (α -SMA)* durch *TGF- β* vermitteln bzw. selbst die *Kollagen/ α -SMA*-Expression in Fibroblasten induzieren (Frazier, K. et al., 1996; Duncan, M. R. et al., 1999; Grotendorst, G. R. et al., 2004). Eine Regulation der Expression des *Kollagen I ($\alpha 1$)* und *α -SMA* durch *CTGF* konnte in den primären Tenonfibroblasten nicht detektiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass dieser Effekt in primären Tenonfibroblasten nicht stattfindet. *TGF- $\beta 1$* hingegen induziert in den primären humanen Fibroblasten des Tenon die Transkription von *Kollagen I $\alpha 1$* und *α -smooth muscle-Actin* (Meyer-Ter-Vehn, T. et al., 2006). Möglicherweise ist für die Induktion durch *CTGF* in den Tenonfibroblasten die Präsenz eines Cofaktors notwendig um diese Expressionsänderungen zu beobachten. Ein weiterer Grund könnte sein, dass eine gesteigerte Expression von *Kollagen* bzw. *α -SMA* in HTF zu einem anderen als dem gewählten Zeitpunkt von 48h nach Stimulation nachweisbar ist. Nicht auszuschließen ist, dass dieser Effekt auf die Variabilität und den genetischen Hintergrund der Spender zurückzuführen ist. Die Expressionssteigerung von *Kollagen I ($\alpha 1$)* durch den zu *CTGF* homologen Faktor *Cyr61* konnte in einer Expressionsanalyse an primären humanen Hautfibroblasten ebenso wie bei *CTGF* nicht nachgewiesen werden. Dahingegen wurde bei hohen *Cyr61*-Konzentrationen (>5 μ g/ml) eine verminderte Expression des humanen Typ I Kollagens beobachtet (Chen, C. C. et al., 2001).

Vergleicht man die weiteren Ergebnisse der *Cyr61* Mikroarray-Studie mit der Expressionsanalyse in dieser Arbeit, ist offensichtlich, dass die meisten beeinflussten Bereiche, identisch sind, die regulierten Gene hingegen unterscheiden sich. In der *Cyr61*

Mikroarray-Studie kodierten die identifizierten regulierten Gene Proteine, die die Angiogenese die Inflammation, die Umstrukturierung der EZM und die Zell-EZM-Interaktionen kontrollieren.

Cyr61 induziert wie *CTGF* ein Wundheilungsprogramm. Im Bereich der Inflammation steigern beide Proteine die Expression proinflammatorischer Transkripte. *Cyr61* induziert die Synthese des proinflammatorischen Proteins *IL-1 β* (Chen, C. C. et al., 2001). Dieses Protein ist ein zentraler Botenstoff von Entzündungsreaktionen, der die Produktion von *IL-6*, das in Tenonfibroblasten neben weiteren inflammatorischen Proteinen nach *CTGF*-Behandlung verstärkt exprimiert wird, auslöst. *Cyr61* und *CTGF* sind proangiogen *in vitro* und induzieren die Angiogenese *in vivo* (Kireeva, M. L. et al., 1996; Babic, A. M. et al., 1998; Shimo, T. et al., 1999). Dementsprechend zeigte die *Cyr61* Arrayanalyse eine Regulation der Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) A und C (Chen, C. C. et al., 2001). Die Regulation dieser Faktoren durch *CTGF* konnte zwar nicht identifiziert werden, jedoch wurden andere angiogene Proteine verstärkt exprimiert (CXC-Chemokine). Überdies wird die Expression von EZM-modulierenden Proteinen, wie *MMP1*, *MMP3* und *TIMP1* durch *Cyr61* bzw. *TFPI2* oder *ADAMTS1* durch *CTGF* reguliert. Identische Beobachtungen in den *Cyr61/CTGF*-Arrays wurden bei der Hochregulierung von *PAI-1* gemacht.

Folglich scheint *CTGF* wie *Cyr61* nach einer Verletzung induziert zu werden und diverse Funktionen in der Wundheilung am Auge zu besitzen. Die inflammatorische Phase könnte durch Modifikation der Hämostase und der gesteigerten Expression proinflammatorischer Proteine moduliert werden. Proliferative und angiogene Eigenschaften des *CTGF* nehmen möglicherweise Einfluss auf die Granulationsphase (Proliferationsphase). Die bekannten bestätigten EZM-modulierenden Aufgaben des *CTGF* sind in der zweiten und vor allem dritten Phase der Wundheilung von Bedeutung.

5. Zusammenfassung

Der *Connective tissue growth factor*, *CTGF*, ist ein mit der EZM assoziiertes Protein, das diverse zelluläre Aktivitäten, einschließlich Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Migration, besitzt. Die umfassenden biologischen Eigenschaften des *CTGF* in verschiedenen Zelltypen spiegelt seine Fähigkeit, eine Vielfalt an Zelloberflächenmolekülen (HSPGs, Integrine, ...) als auch andere bioaktive Moleküle (*BMP-4*, *TGF- β 1*, ...) zu binden, wieder. Eine veränderte *CTGF*-Expression ist mit mehreren fibrotischen Erkrankungen assoziiert und *CTGF* selbst stimuliert die Entstehung und Progression fibrotischer Defekte. Genauere Informationen über den Einfluss des *CTGF* auf die Genexpression von Zellen waren bisher unbekannt.

In dieser Arbeit wurde zunächst humanes *CTGF* in HEK-Zellen exprimiert und anschließend in mehreren chromatographischen Schritten aufgereinigt. Die biologische Charakterisierung zeigte, dass das rekombinante Protein mit *BMP-2* in Oberflächenplasmonresonanzstudien und auf Zellbasis interagiert. Desweiteren konnte auch eine Interaktion mit Balb3T3-Zellen festgestellt werden. Die biologische Aktivität des Proteins wurde durch Proliferationsassays mit einer Endothelzelllinie und primären Fibroblasten des menschlichen Tenon bestätigt.

Das reine rekombinante Protein wurde für Genexpressionsanalysen an humanen primären Fibroblasten des Tenon eingesetzt. Ergebnisse dieser Studie der Genexpression von HTF von drei unabhängigen Spendern zeigten, dass *CTGF* verschiedene biologische und physiologische Prozesse beeinflusst. Bekannte proliferatorische Eigenschaften und der Einfluss auf die EZM konnten bestätigt werden. Neben den bisher bekannten Funktionen der durch *CTGF* verursachten Effekte bei der Wundheilung, die überwiegend in der zweiten und dritten Phase der Wundheilung im Bereich der Umstrukturierung der EZM zu finden sind, konnten mehrere regulierte Gene nachgewiesen werden, die eine Rolle in der ersten Phase der Wundheilung, der Inflammation, spielen. Die interessantesten bisher im Zusammenhang mit *CTGF* noch nicht beschriebenen proinflammatorischen Proteine sind die *CXC-Chemokine 1, 2, 6* und *8* sowie *IL-6*, die in den *CTGF* behandelten Fibroblasten stärker exprimiert waren.

CTGF scheint somit eine mannigfaltige koordinierte Rolle in der Wundheilung am Auge, einschließlich Inflammation und EZM-Remodeling sowie möglicherweise auch in der

Angiogenese und Hämostase, zu spielen und damit seine Rolle als multimodularer Faktor zu bestätigen.

Summary

Connective tissue growth factor, *CTGF*, is an ECM associated protein that has diverse cellular activities including adhesion, proliferation, differentiation and migration. The widespread biological properties of *CTGF* reflect its ability to bind many cell surface molecules (HSPGs, *Integrins*, *LDL*, ...) and other bioactive molecules (*BMP-4*, *TGF- β* , ...). Expression of *CTGF* is associated with many fibrotic diseases and *CTGF* itself stimulates development and progression of fibrotic defects. Detailed information about the effect of *CTGF* on cellular gene expression is relatively unknown so far.

In this study human *CTGF* was expressed in HEK-cells and subsequently purified in several chromatographic steps. Biological characterization shows an interaction of the protein with *BMP-2* in surface plasmon resonance studies and also in cell based assays. Furthermore there was detected an interaction with Balb3T3 cells. Biological activity of the protein was confirmed by proliferation assays with an endothelial cell line and primary fibroblasts of the human tenon.

Pure recombinant protein was used for gene expression analysis of human primary fibroblast of the tenon. Results of this gene expression study from three independent donors showed influence of *CTGF* on different biological and physiological processes. Known proliferative properties and influence on the ECM could be confirmed. Beside up to now known function of *CTGF* induced effects in wound healing, predominantly found in second and third phase of wound healing in range of ECM remodeling and myofibroblast differentiation, several regulated genes, important in first phase of wound healing, the inflammation, could be detected. As yet unknown *CTGF* regulated interesting genes are the upregulated chemokines 1, 2, 6 and 8 as well as Interleukin 6, all with proinflammatory properties.

Significant influence of *CTGF* on the gene expression of tenon fibroblasts indicates the meaningful part of this protein in ocular woundhealing, including inflammation and ECM remodeling, potentially also angiogenesis and haemostasis, and confirms its multimodular function.

6. Literaturverzeichnis

E.coli protease database: <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/ehrmann/index.html>

- Abouhaidar, M. G. and Ivanov, I. G. (1999). "Non-enzymatic RNA hydrolysis promoted by the combined catalytic activity of buffers and magnesium ions." *Z Naturforsch [C]* 54(7-8): 542-8.
- Abreu, J. G., Coffinier, C., Larraín, J., Oelgeschläger, M. and De Robertis, E. M. (2002). "Chordin-like CR domains and the regulation of evolutionary conserved extracellular signaling systems." *Gene* 287: 39-47.
- Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B. and De Robertis, E. M. (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." *Nat Cell Biol* 4(8): 599-604.
- Alam, R. (1997). "Chemokines in allergic inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 99(3): 273-7.
- Allen, J. T., Knight, R. A., Bloor, C. A. and Spiteri, M. A. (1999). "Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(6): 693-700.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M. and Sherlock, G. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet* 25(1): 25-9.
- Babic, A. M., Kireeva, M. L., Kolesnikova, T. V. and Lau, L. F. (1998). "CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6355-60.
- Babic, A. M., Chen, C. C. and Lau, L. F. (1999). "Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo." *Mol Cell Biol* 19(4): 2958-66.
- Ball, D. K., Moussad, E. E., Rageh, M. A., Kemper, S. A. and Brigstock, D. R. (2003). "Establishment of a recombinant expression system for connective tissue growth factor (CTGF) that models CTGF processing in utero." *Reproduction* 125(2): 271-84.
- Ball, D. K., Rachfal, A. W., Kemper, S. A. and Brigstock, D. R. (2003). "The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion." *J Endocrinol* 176(2): R1-7.
- Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L. and Hunter, C. P. (2001). "Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription." *Nucleic Acids Res* 29(5): E29.
- Bechara, C., Chai, H., Lin, P. H., Yao, Q. and Chen, C. (2007). "Growth related oncogene-alpha (GRO-alpha): roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions." *Med Sci Monit* 13(6): RA87-90.

- Benarroch, E. E. (2007). "Tissue plasminogen activator: beyond thrombolysis." *Neurology* 69(8): 799-802.
- Bengtsson, E., Morgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegard, D. and Aspberg, A. (2002). "The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor." *J Biol Chem* 277(17): 15061-8.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L. and Dick, J. E. (1999). "Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells." *J Exp Med* 189(7): 1139-48.
- Bishop, J. R., Schuksz, M. and Esko, J. D. (2007). "Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology." *Nature* 446(7139): 1030-7.
- Blalock, T. D., Duncan, M. R., Varela, J. C., Goldstein, M. H., Tuli, S. S., Grotendorst, G. R. and Schultz, G. S. (2003). "Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5): 1879-87.
- Blaney Davidson, E. N., Vitters, E. L., Mooren, F. M., Oliver, N., Berg, W. B. and Van Der Kraan, P. M. (2006). "Connective tissue growth factor/CCN2 overexpression in mouse synovial lining results in transient fibrosis and cartilage damage." *Arthritis Rheum* 54(5): 1653-61.
- Boes, M., Dake, B. L., Booth, B. A., Erondy, N. E., Oh, Y., Hwa, V., Rosenfeld, R. and Bar, R. S. (1999). "Connective tissue growth factor (IGFBP-rP2) expression and regulation in cultured bovine endothelial cells." *Endocrinology* 140(4): 1575-80.
- Bork, P. (1993). "The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor." *FEBS Lett* 327(2): 125-30.
- Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. and Grotendorst, G. R. (1991). "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10." *J Cell Biol* 114(6): 1285-94.
- Brigstock, D. R., Steffen, C. L., Kim, G. Y., Vegunta, R. K., Diehl, J. R. and Harding, P. A. (1997). "Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor." *J Biol Chem* 272(32): 20275-82.
- Brigstock, D. R. (1999). "The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family." *Endocr Rev* 20(2): 189-206.
- Brigstock, D. R. (2002). "Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)." *Angiogenesis* 5(3): 153-65.
- Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S. and Springer, T. A. (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3652-6.
- Chaloux, E., Lopez-Rovira, T., Rosa, J. L., Bartrons, R. and Ventura, F. (1998). "JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2." *J Biol Chem* 273(1): 537-43.
- Chand, H. S., Foster, D. C. and Kisiel, W. (2005). "Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2." *Thromb Haemost* 94(6): 1122-30.

- Chen, C. C., Chen, N. and Lau, L. F. (2001). "The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts." *J Biol Chem* 276(13): 10443-52.
- Chen, C. C., Mo, F. E. and Lau, L. F. (2001). "The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts." *J Biol Chem* 276(50): 47329-37.
- Chen, G., Grotendorst, G., Eichholtz, T. and Khalil, N. (2003). "GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(3): L548-56.
- Chen, N., Leu, S. J., Todorovic, V., Lam, S. C. and Lau, L. F. (2004). "Identification of a novel integrin alphavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* 279(42): 44166-76.
- Chen, P. P., Li, W. J., Wang, Y., Zhao, S., Li, D. Y., Feng, L. Y., Shi, X. L., Koeffler, H. P., Tong, X. J. and Xie, D. (2007). "Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer." *PLoS ONE* 2: e534.
- Chen, W., Woodruff, T. K. and Mayo, K. E. (2000). "Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins." *Endocrinology* 141(3): 1263-72.
- Chen, Y., Abraham, D. J., Shi-Wen, X., Pearson, J. D., Black, C. M., Lyons, K. M. and Leask, A. (2004). "CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin." *Mol Biol Cell* 15(12): 5635-46.
- Croxtall, J. D., Jamil, A., Ayub, M., Colletta, A. A. and White, J. O. (1992). "TGF-beta stimulation of endometrial and breast-cancer cell growth." *Int J Cancer* 50(5): 822-7.
- Cruz, P. E., Martins, P. C., Alves, P. M., Peixoto, C. C., Santos, H., Moreira, J. L. and Carrondo, M. J. (1999). "Proteolytic activity in infected and noninfected insect cells: degradation of HIV-1 Pr55gag particles." *Biotechnol Bioeng* 65(2): 133-43.
- Cunliffe, I. A., Richardson, P. S., Rees, R. C. and Rennie, I. G. (1995). "Effect of TNF, IL-1, and IL-6 on the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in tissue culture." *Br J Ophthalmol* 79(6): 590-5.
- Davis, T. N. and Wordeman, L. (2007). "Rings, bracelets, sleeves, and chevrons: new structures of kinetochore proteins." *Trends Cell Biol* 17(8): 377-82.
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I. and Gabbiani, G. (1995). "Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar." *Am J Pathol* 146(1): 56-66.
- Desmouliere, A., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. (2005). "Tissue repair, contraction, and the myofibroblast." *Wound Repair Regen* 13(1): 7-12.
- Diegelmann, R. F. and Evans, M. C. (2004). "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing." *Front Biosci* 9: 283-9.
- Driscoll, K. E., Hassenbein, D. G., Howard, B. W., Isfort, R. J., Cody, D., Tindal, M. H., Suchanek, M. and Carter, J. M. (1995). "Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen." *J Leukoc Biol* 58(3): 359-64.
- Dubridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. and Calos, M. P. (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol Cell Biol* 7(1): 379-87.

- Duncan, M. R. and Berman, B. (1991). "Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6." *J Invest Dermatol* 97(4): 686-92.
- Duncan, M. R., Frazier, K. S., Abramson, S., Williams, S., Klapper, H., Huang, X. and Grotendorst, G. R. (1999). "Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP." *Faseb J* 13(13): 1774-86.
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M. and Goetinck, P. (2001). "Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4." *J Clin Invest* 107(2): R9-R14.
- Edgell, C. J., McDonald, C. C. and Graham, J. B. (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(12): 3734-7.
- Eickelberg, O., Pansky, A., Mussmann, R., Bihl, M., Tamm, M., Hildebrand, P., Perruchoud, A. P. and Roth, M. (1999). "Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts." *J Biol Chem* 274(18): 12933-8.
- Esson, D. W., Neelakantan, A., Iyer, S. A., Blalock, T. D., Balasubramanian, L., Grotendorst, G. R., Schultz, G. S. and Sherwood, M. B. (2004). "Expression of connective tissue growth factor after glaucoma filtration surgery in a rabbit model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(2): 485-91.
- Fang, G. (2002). "Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex." *Mol Biol Cell* 13(3): 755-66.
- Festuccia, C., Dolo, V., Guerra, F., Violini, S., Muzi, P., Pavan, A. and Bologna, M. (1998). "Plasminogen activator system modulates invasive capacity and proliferation in prostatic tumor cells." *Clin Exp Metastasis* 16(6): 513-28.
- Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H. and Grotendorst, G. R. (1996). "Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor." *J Invest Dermatol* 107(3): 404-11.
- Frazier, K. S. and Grotendorst, G. R. (1997). "Expression of connective tissue growth factor mRNA in the fibrous stroma of mammary tumors." *Int J Biochem Cell Biol* 29(1): 153-61.
- Friedrichsen, S., Heuer, H., Christ, S., Winckler, M., Brauer, D., Bauer, K. and Raivich, G. (2003). "CTGF expression during mouse embryonic development." *Cell Tissue Res* 312(2): 175-88.
- Gao, R. and Brigstock, D. R. (2003). "Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells." *Hepatol Res* 27(3): 214-220.
- Gao, R. and Brigstock, D. R. (2004). "Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan." *J Biol Chem* 279(10): 8848-55.
- Gao, R. and Brigstock, D. R. (2005). "Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor." *Gastroenterology* 129(3): 1019-30.

- Gao, R. and Brigstock, D. R. (2006). "A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells." *Gut* 55(6): 856-62.
- Garrett, Q., Khaw, P. T., Blalock, T. D., Schultz, G. S., Grotendorst, G. R. and Daniels, J. T. (2004). "Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(4): 1109-16.
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., Luscinskas, F. W. and Rosenzweig, A. (1999). "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions." *Nature* 398(6729): 718-23.
- Gharaee-Kermani, M., Denholm, E. M. and Phan, S. H. (1996). "Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors." *J Biol Chem* 271(30): 17779-84.
- Gillitzer, R. and Goebeler, M. (2001). "Chemokines in cutaneous wound healing." *J Leukoc Biol* 69(4): 513-21.
- Gotoh, T., Miyazaki, Y., Kikuchi, K. and Bentley, W. E. (2001). "Investigation of sequential behavior of carboxyl protease and cysteine protease activities in virus-infected Sf-9 insect cell culture by inhibition assay." *Appl Microbiol Biotechnol* 56(5-6): 742-9.
- Grehn, F. (2005). "Augenheilkunde." *Springer-Verlag* 29: 552.
- Grotendorst, G. R., Okochi, H. and Hayashi, N. (1996). "A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene." *Cell Growth Differ* 7(4): 469-80.
- Grotendorst, G. R. (1997). "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 171-9.
- Grotendorst, G. R., Rahmanie, H. and Duncan, M. R. (2004). "Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation." *Faseb J* 18(3): 469-79.
- Grotendorst, G. R. and Duncan, M. R. (2005). "Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation." *Faseb J* 19(7): 729-38.
- Gruss, O. J. and Vernos, I. (2004). "The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2." *J Cell Biol* 166(7): 949-55.
- Hannon, G. J., Casso, D. and Beach, D. (1994). "KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1731-5.
- Harada, A., Mukaida, N. and Matsushima, K. (1996). "Interleukin 8 as a novel target for intervention therapy in acute inflammatory diseases." *Mol Med Today* 2(11): 482-9.
- Heng, E. C., Huang, Y., Black, S. A., Jr. and Trackman, P. C. (2006). "CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins." *J Cell Biochem* 98(2): 409-20.
- Herman, M. P., Sukhova, G. K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M. R., Libby, P. and Schonbeck, U. (2001). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis." *J Clin Invest* 107(9): 1117-26.
- Hinton, D. R., Spee, C., He, S., Weitz, S., Usinger, W., Labree, L., Oliver, N. and Lim, J. I. (2004). "Accumulation of NH2-terminal fragment of connective tissue growth factor in

- the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy." *Diabetes Care* 27(3): 758-64.
- Hinz, B. and Gabbiani, G. (2003). "Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts." *Curr Opin Biotechnol* 14(5): 538-46.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T. and Kitamura, T. (2001). "MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody." *J Biol Chem* 276(8): 5821-8.
- Hishikawa, K., Oemar, B. S., Tanner, F. C., Nakaki, T., Fujii, T. and Luscher, T. F. (1999). "Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells." *Circulation* 100(20): 2108-12.
- Hishikawa, K., Oemar, B. S., Tanner, F. C., Nakaki, T., Luscher, T. F. and Fujii, T. (1999). "Connective tissue growth factor induces apoptosis in human breast cancer cell line MCF-7." *J Biol Chem* 274(52): 37461-6.
- Hishikawa, K., Nakaki, T. and Fujii, T. (2000). "Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured human aortic smooth muscle cells." *Eur J Pharmacol* 392(1-2): 19-22.
- Ho, S. L., Dogar, G. F., Wang, J., Crean, J., Wu, Q. D., Oliver, N., Weitz, S., Murray, A., Cleary, P. E. and O'brien, C. (2005). "Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome." *Br J Ophthalmol* 89(2): 169-73.
- Hoshijima, M., Hattori, T., Inoue, M., Araki, D., Hanagata, H., Miyauchi, A. and Takigawa, M. (2006). "CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1." *FEBS Lett* 580(5): 1376-82.
- Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M. and Grotendorst, G. R. (1993). "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair." *Mol Biol Cell* 4(6): 637-45.
- Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Grotendorst, G. R. and Takehara, K. (1995). "Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis." *J Invest Dermatol* 105(2): 280-4.
- Igarashi, A., Hayashi, N., Nashiro, K. and Takehara, K. (1998). "Differential expression of connective tissue growth factor gene in cutaneous fibrohistiocytic and vascular tumors." *J Cutan Pathol* 25(3): 143-8.
- Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K. and Okada, Y. (2002). "Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis." *Faseb J* 16(2): 219-21.
- Ivkovic, S., Yoon, B. S., Popoff, S. N., Safadi, F. F., Libuda, D. E., Stephenson, R. C., Daluiski, A. and Lyons, K. M. (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." *Development* 130(12): 2779-91.
- Jedsadayanmata, A., Chen, C. C., Kireeva, M. L., Lau, L. F. and Lam, S. C. (1999). "Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3)." *J Biol Chem* 274(34): 24321-7.

- Johansson, B. M. and Wiles, M. V. (1995). "Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development." *Mol Cell Biol* 15(1): 141-51.
- Joliot, V., Martinerie, C., Dambrine, G., Plassiart, G., Brisac, M., Crochet, J. and Perbal, B. (1992). "Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas." *Mol Cell Biol* 12(1): 10-21.
- Juhan-Vague, I., Moerman, B., De Cock, F., Aillaud, M. F. and Collen, D. (1984). "Plasma levels of a specific inhibitor of tissue-type plasminogen activator (and urokinase) in normal and pathological conditions." *Thromb Res* 33(5): 523-30.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Oh-I, M., Nishida, T. and Takigawa, M. (2004). "Differential regulation of biglycan and decorin synthesis by connective tissue growth factor in cultured vascular endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 322(1): 22-8.
- Kessler, D., Dethlefsen, S., Haase, I., Plomann, M., Hirche, F., Krieg, T. and Eckes, B. (2001). "Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype." *J Biol Chem* 276(39): 36575-85.
- Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T., Jr. and Rosenfeld, R. G. (1997). "Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12981-6.
- Kireeva, M. L., Mo, F. E., Yang, G. P. and Lau, L. F. (1996). "Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion." *Mol Cell Biol* 16(4): 1326-34.
- Kireeva, M. L., Latinkic, B. V., Kolesnikova, T. V., Chen, C. C., Yang, G. P., Abler, A. S. and Lau, L. F. (1997). "Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development." *Exp Cell Res* 233(1): 63-77.
- Kirsch, T., Nickel, J. and Sebald, W. (2000). "BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II." *Embo J* 19(13): 3314-24.
- Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." *Blood* 74(1): 1-10.
- Klink, T., Guthoff, R., Grehn, F. and Schlunck, G. (2006). "[Postoperative care after glaucoma filtration surgery]." *Ophthalmologe* 103(9): 815-23; quiz 824-5.
- Kohase, M., May, L. T., Tamm, I., Vilcek, J. and Sehgal, P. B. (1987). "A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1." *Mol Cell Biol* 7(1): 273-80.
- Kothapalli, D., Frazier, K. S., Welply, A., Segarini, P. R. and Grotendorst, G. R. (1997). "Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway." *Cell Growth Differ* 8(1): 61-8.
- Kotzsch, A., Nickel, J., Seher, A., Heinecke, K., Van Geersdaele, L., Herrmann, T., Sebald, W. and Mueller, T. D. (2008). "Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome." *J Biol Chem* 283(9): 5876-87.
- Kubota, S., Eguchi, T., Shimo, T., Nishida, T., Hattori, T., Kondo, S., Nakanishi, T. and Takigawa, M. (2001). "Novel mode of processing and secretion of connective tissue

- growth factor/ecogenin (CTGF/Hcs24) in chondrocytic HCS-2/8 cells." *Bone* 29(2): 155-61.
- Kuiper, E. J., De Smet, M. D., Van Meurs, J. C., Tan, H. S., Tanck, M. W., Oliver, N., Van Nieuwenhoven, F. A., Goldschmeding, R. and Schlingemann, R. O. (2006). "Association of connective tissue growth factor with fibrosis in vitreoretinal disorders in the human eye." *Arch Ophthalmol* 124(10): 1457-62.
- Kuno, K. and Matsushima, K. (1998). "ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region." *J Biol Chem* 273(22): 13912-7.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Methods* 10(3-4): 203-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K. (1989). "The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes." *Science* 243(4897): 1464-6.
- Lau, L. F. and Lam, S. C. (1999). "The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection." *Exp Cell Res* 248(1): 44-57.
- Leask, A., Holmes, A. and Abraham, D. J. (2002). "Connective tissue growth factor: a new and important player in the pathogenesis of fibrosis." *Curr Rheumatol Rep* 4(2): 136-42.
- Leng, E., Malcolm, T., Tai, G., Estable, M. and Sadowski, I. (2002). "Organization and expression of the Cyr61 gene in normal human fibroblasts." *J Biomed Sci* 9(1): 59-67.
- Lenzen-Schulte, M. (2006). "Glaukom - Wenn hoher Druck den Sehnerv schädigt." *DOG-Patienteninformation* August 2006.
- Leu, S. J., Liu, Y., Chen, N., Chen, C. C., Lam, S. C. and Lau, L. F. (2003). "Identification of a novel integrin alpha 6 beta 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61)." *J Biol Chem* 278(36): 33801-8.
- Li, G., Xie, Q., Shi, Y., Li, D., Zhang, M., Jiang, S., Zhou, H., Lu, H. and Jin, Y. (2006). "Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats." *J Gene Med* 8(7): 889-900.
- Li, J., Chen, J. and Kirsner, R. (2007). "Pathophysiology of acute wound healing." *Clin Dermatol* 25(1): 9-18.
- Li, Y., Breaker, R. R. (1999). "Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group." *J. Am. Chem. Soc.* 121: 5364-5372.
- Lopez-Aleman, R., Suelves, M., Diaz-Ramos, A., Vidal, B. and Munoz-Canoves, P. (2005). "Alpha-enolase plasminogen receptor in myogenesis." *Front Biosci* 10: 30-6.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med* 338(7): 436-45.
- Mancuso, D. J., Tuley, E. A., Westfield, L. A., Worrall, N. K., Shelton-Inloes, B. B., Sorace, J. M., Alevy, Y. G. and Sadler, J. E. (1989). "Structure of the gene for human von Willebrand factor." *J Biol Chem* 264(33): 19514-27.
- Marceau, F., Hess, J. F. and Bachvarov, D. R. (1998). "The B1 receptors for kinins." *Pharmacol Rev* 50(3): 357-86.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." *Annu Rev Biochem* 67: 753-91.

- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1995). "p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene." *Genes Dev* 9(6): 650-62.
- McLennan, S. V., Wang, X. Y., Moreno, V., Yue, D. K. and Twigg, S. M. (2004). "Connective tissue growth factor mediates high glucose effects on matrix degradation through tissue inhibitor of matrix metalloproteinase type 1: implications for diabetic nephropathy." *Endocrinology* 145(12): 5646-55.
- Mercurio, S., Latinkic, B., Itasaki, N., Krumlauf, R. and Smith, J. C. (2004). "Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex." *Development* 131(9): 2137-47.
- Meyer-Ter-Vehn, T., Gebhardt, S., Sebald, W., Buttmann, M., Grehn, F., Schlunck, G. and Knaus, P. (2006). "p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4): 1500-9.
- Mori, T., Kawara, S., Shinozaki, M., Hayashi, N., Kakinuma, T., Igarashi, A., Takigawa, M., Nakanishi, T. and Takehara, K. (1999). "Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model." *J Cell Physiol* 181(1): 153-9.
- Moussad, E. E. and Brigstock, D. R. (2000). "Connective tissue growth factor: what's in a name?" *Mol Genet Metab* 71(1-2): 276-92.
- Mukaida, N. (2003). "Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(4): L566-77.
- Mutsaers, S. E., Bishop, J. E., Mcgrouter, G. and Laurent, G. J. (1997). "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis." *Int J Biochem Cell Biol* 29(1): 5-17.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. and Kishimoto, T. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* 382(6592): 635-8.
- Nakanishi, T., Nishida, T., Shimo, T., Kobayashi, K., Kubo, T., Tamatani, T., Tezuka, K. and Takigawa, M. (2000). "Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture." *Endocrinology* 141(1): 264-73.
- Nishida, T., Nakanishi, T., Shimo, T., Asano, M., Hattori, T., Tamatani, T., Tezuka, K. and Takigawa, M. (1998). "Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8)." *Biochem Biophys Res Commun* 247(3): 905-9.
- Nishida, T., Nakanishi, T., Asano, M., Shimo, T. and Takigawa, M. (2000). "Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro." *J Cell Physiol* 184(2): 197-206.
- Nishida, T., Kubota, S., Fukunaga, T., Kondo, S., Yosimichi, G., Nakanishi, T., Takano-Yamamoto, T. and Takigawa, M. (2003). "CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes." *J Cell Physiol* 196(2): 265-75.
- Oemar, B. S. and Luscher, T. F. (1997). "Connective tissue growth factor. Friend or foe?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(8): 1483-9.

- Pennica, D., Swanson, T. A., Welsh, J. W., Roy, M. A., Lawrence, D. A., Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L. A., Deuel, B., Lew, M., Watanabe, C., Cohen, R. L., Melhem, M. F., Finley, G. G., Quirke, P., Goddard, A. D., Hillan, K. J., Gurney, A. L., Botstein, D. and Levine, A. J. (1998). "WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14717-22.
- Perbal, B. (1999). "Nuclear localisation of NOVH protein: a potential role for NOV in the regulation of gene expression." *Mol Pathol* 52(2): 84-91.
- Perbal, B. (2001). "NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues." *Mol Pathol* 54(2): 57-79.
- Perbal, B. (2004). "CCN proteins: multifunctional signalling regulators." *Lancet* 363(9402): 62-4.
- Petersen, L. C., Sprecher, C. A., Foster, D. C., Blumberg, H., Hamamoto, T. and Kisiel, W. (1996). "Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor." *Biochemistry* 35(1): 266-72.
- Phillips, D. J., Brauman, J. N., Mason, A. J., De Kretser, D. M. and Hedger, M. P. (1999). "A sensitive and specific in vitro bioassay for activin using a mouse plasmacytoma cell line, MPC-11." *J Endocrinol* 162(1): 111-6.
- Pi, L., Ding, X., Jorgensen, M., Pan, J. J., Oh, S. H., Pintilie, D., Brown, A., Song, W. Y. and Petersen, B. E. (2007). "Connective tissue growth factor with a novel fibronectin binding site promotes cell adhesion and migration during rat oval cell activation." *Hepatology*.
- Planque, N. and Perbal, B. (2003). "A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis." *Cancer Cell Int* 3(1): 15.
- Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. and Edwards, D. R. (2005). "The ADAMTS metalloproteinases." *Biochem J* 386(Pt 1): 15-27.
- Proost, P., De Wolf-Peeters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A. and Van Damme, J. (1993). "Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8." *J Immunol* 150(3): 1000-10.
- Qi, W., Chen, X., Polhill, T. S., Sumual, S., Twigg, S., Gilbert, R. E. and Pollock, C. A. (2006). "TGF-beta1 induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway." *Am J Physiol Renal Physiol* 290(3): F703-9.
- Razzaque, M. S., Foster, C. S. and Ahmed, A. R. (2003). "Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of conjunctival scarring in ocular cicatricial pemphigoid." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(5): 1998-2003.
- Rehn, A. P., Chalk, A. M. and Wendel, M. (2006). "Differential regulation of osteoadherin (OSAD) by TGF-beta1 and BMP-2." *Biochem Biophys Res Commun* 349(3): 1057-64.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. and Sebald, W. (1996). "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity." *Eur J Biochem* 237(1): 295-302.
- Ryan, T. J., Lai, L. and Malik, A. B. (1992). "Plasmin generation induces neutrophil aggregation: dependence on the catalytic and lysine binding sites." *J Cell Physiol* 151(2): 255-61.
- Ryseck, R. P., Macdonald-Bravo, H., Mattei, M. G. and Bravo, R. (1991). "Structure, mapping, and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cysteine-rich protein." *Cell Growth Differ* 2(5): 225-33.

- Safadi, F. F., Xu, J., Smock, S. L., Kanaan, R. A., Selim, A. H., Odgren, P. R., Marks, S. C., Jr., Owen, T. A. and Popoff, S. N. (2003). "Expression of connective tissue growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo." *J Cell Physiol* 196(1): 51-62.
- Schild, C. and Trueb, B. (2002). "Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor." *Exp Cell Res* 274(1): 83-91.
- Schober, J. M., Chen, N., Grzeszkiewicz, T. M., Jovanovic, I., Emeson, E. E., Ugarova, T. P., Ye, R. D., Lau, L. F. and Lam, S. C. (2002). "Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions." *Blood* 99(12): 4457-65.
- Schober, J. M., Lau, L. F., Ugarova, T. P. and Lam, S. C. (2003). "Identification of a novel integrin alphaMbeta2 binding site in CCN1 (CYR61), a matricellular protein expressed in healing wounds and atherosclerotic lesions." *J Biol Chem* 278(28): 25808-15.
- Schutze, N., Kunzi-Rapp, K., Wagemanns, R., Noth, U., Jatzke, S. and Jakob, F. (2005). "Expression, purification, and functional testing of recombinant CYR61/CCN1." *Protein Expr Purif* 42(1): 219-25.
- Segarini, P. R., Nesbitt, J. E., Li, D., Hays, L. G., Yates, J. R., 3rd and Carmichael, D. F. (2001). "The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor." *J Biol Chem* 276(44): 40659-67.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* 113(6): 685-700.
- Shigeta, O., Kojima, H., Jikuya, T., Terada, Y., Atsumi, N., Sakakibara, Y., Nagasawa, T. and Mitsui, T. (1997). "Aprotinin inhibits plasmin-induced platelet activation during cardiopulmonary bypass." *Circulation* 96(2): 569-74.
- Shimo, T., Nakanishi, T., Kimura, Y., Nishida, T., Ishizeki, K., Matsumura, T. and Takigawa, M. (1998). "Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells." *J Biochem* 124(1): 130-40.
- Shimo, T., Nakanishi, T., Nishida, T., Asano, M., Kanyama, M., Kuboki, T., Tamatani, T., Tezuka, K., Takemura, M., Matsumura, T. and Takigawa, M. (1999). "Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo." *J Biochem (Tokyo)* 126(1): 137-45.
- Shimo, T., Wu, C., Billings, P. C., Piddington, R., Rosenbloom, J., Pacifici, M. and Koyama, E. (2002). "Expression, gene regulation, and roles of Fisp12/CTGF in developing tooth germs." *Dev Dyn* 224(3): 267-78.
- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wasa, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-Hashi, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y. and Matsushima, K. (2000). "ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function." *J Clin Invest* 105: 1345-1352.
- Shukunami, C., Ohta, Y., Sakuda, M. and Hiraki, Y. (1998). "Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5." *Exp Cell Res* 241(1): 1-11.

- Singh, R. K., Gutman, M., Radinsky, R., Bucana, C. D. and Fidler, I. J. (1994). "Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice." *Cancer Res* 54(12): 3242-7.
- Slettenaar, V. I. and Wilson, J. L. (2006). "The chemokine network: a target in cancer biology?" *Adv Drug Deliv Rev* 58(8): 962-74.
- Souza, D. G., Soares, A. C., Pinho, V., Torloni, H., Reis, L. F., Teixeira, M. M. and Dias, A. A. (2002). "Increased mortality and inflammation in tumor necrosis factor-stimulated gene-14 transgenic mice after ischemia and reperfusion injury." *Am J Pathol* 160(5): 1755-65.
- Starckx, S., Wuyts, A., Opsomer, I., Van Coillie, E., Proost, P., Arnold, B., Van Damme, J. and Opdenakker, G. (2002). "Recombinant mouse granulocyte chemotactic protein-2: production in bacteria, characterization, and systemic effects on leukocytes." *J Interferon Cytokine Res* 22(9): 965-74.
- Strieter, R. M., Burdick, M. D., Gomperts, B. N., Belperio, J. A. and Keane, M. P. (2005). "CXC chemokines in angiogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* 16(6): 593-609.
- Takigawa, M., Okawa, T., Pan, H., Aoki, C., Takahashi, K., Zue, J., Suzuki, F. and Kinoshita, A. (1997). "Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulating proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors on a clonal human chondrosarcoma-derived chondrocyte cell line, HCS-2/8." *Endocrinology* 138(10): 4390-400.
- Takuwa, Y., Ohse, C., Wang, E. A., Wozney, J. M. and Yamashita, K. (1991). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1." *Biochem Biophys Res Commun* 174(1): 96-101.
- Tanaka, S., Sugimachi, K., Saeki, H., Kinoshita, J., Ohga, T., Shimada, M., Maehara, Y. and Sugimachi, K. (2001). "A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma." *Oncogene* 20(39): 5525-32.
- Tanaka, S., Sugimachi, K., Kameyama, T., Maehara, S., Shirabe, K., Shimada, M., Wands, J. R. and Maehara, Y. (2003). "Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma." *Hepatology* 37(5): 1122-9.
- Tasheva, E. S., Koester, A., Paulsen, A. Q., Garrett, A. S., Boyle, D. L., Davidson, H. J., Song, M., Fox, N. and Conrad, G. W. (2002). "Mimcan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities." *Mol Vis* 8: 407-15.
- Tilman, B. (2005). *Atlas der Anatomie des Menschen mit Muskeltrainer*. Berlin, [Springer](#).
- Tong, Z. Y. and Brigstock, D. R. (2006). "Intrinsic biological activity of the thrombospondin structural homology repeat in connective tissue growth factor." *J Endocrinol* 188(3): R1-8.
- Tucker, R. P. (2004). "The thrombospondin type 1 repeat superfamily." *Int J Biochem Cell Biol* 36(6): 969-74.
- Valente, A. J., Graves, D. T., Vialle-Valentin, C. E., Delgado, R. and Schwartz, C. J. (1988). "Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture." *Biochemistry* 27(11): 4162-8.
- Wahab, N. A., Brinkman, H. and Mason, R. M. (2001). "Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action." *Biochem J* 359(Pt 1): 89-97.

- Wahab, N. A., Weston, B. S. and Mason, R. M. (2005). "Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2." *Exp Cell Res* 307(2): 305-14.
- Wahab, N. A., Weston, B. S. and Mason, R. M. (2005). "Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA." *J Am Soc Nephrol* 16(2): 340-51.
- Wang, J. F., Olson, M. E., Ball, D. K., Brigstock, D. R. and Hart, D. A. (2003). "Recombinant connective tissue growth factor modulates porcine skin fibroblast gene expression." *Wound Repair Regen* 11(3): 220-9.
- Weiss, E. and Winey, M. (1996). "The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint." *J Cell Biol* 132(1-2): 111-23.
- Wendel, M., Sommarin, Y. and Heinegard, D. (1998). "Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteoaderin) from bovine bone." *J Cell Biol* 141(3): 839-47.
- Wenger, C., Ellenrieder, V., Alber, B., Lacher, U., Menke, A., Hameister, H., Wilda, M., Iwamura, T., Beger, H. G., Adler, G. and Gress, T. M. (1999). "Expression and differential regulation of connective tissue growth factor in pancreatic cancer cells." *Oncogene* 18(4): 1073-80.
- Williams, E. J., Gaca, M. D., Brigstock, D. R., Arthur, M. J. and Benyon, R. C. (2000). "Increased expression of connective tissue growth factor in fibrotic human liver and in activated hepatic stellate cells." *J Hepatol* 32(5): 754-61.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P. and Byers, B. (1991). "MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication." *J Cell Biol* 114(4): 745-54.
- Wu, S. H., Wu, X. H., Lu, C., Dong, L., Zhou, G. P. and Chen, Z. Q. (2006). "Lipoxin A4 inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells." *Kidney Int* 69(2): 248-56.
- Wuyts, A., Struyf, S., Gijsbers, K., Schutyser, E., Put, W., Conings, R., Lenaerts, J. P., Geboes, K., Opdenakker, G., Menten, P., Proost, P. and Van Damme, J. (2003). "The CXC chemokine GCP-2/CXCL6 is predominantly induced in mesenchymal cells by interleukin-1beta and is down-regulated by interferon-gamma: comparison with interleukin-8/CXCL8." *Lab Invest* 83(1): 23-34.
- Yamamoto, T., Eckes, B., Mauch, C., Hartmann, K. and Krieg, T. (2000). "Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop." *J Immunol* 164(12): 6174-9.
- Yamamoto, T. and Nishioka, K. (2003). "Role of monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor, CCR-2, in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma." *J Invest Dermatol* 121(3): 510-6.
- Yang, D. H., Kim, H. S., Wilson, E. M., Rosenfeld, R. G. and Oh, Y. (1998). "Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 83(7): 2593-6.
- Yang, G. P. and Lau, L. F. (1991). "Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface." *Cell Growth Differ* 2(7): 351-7.

- Yang, M., Huang, H., Li, J., Huang, W. and Wang, H. (2007). "Connective tissue growth factor increases matrix metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production by cultured renal interstitial fibroblasts." *Wound Repair Regen* 15(6): 817-24.
- Yoshimura, T., Matsushima, K., Oppenheim, J. J. and Leonard, E. J. (1987). "Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)." *J Immunol* 139(3): 788-93.
- Zebboudj, A. F., Imura, M. and Bostrom, K. (2002). "Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2." *J Biol Chem* 277(6): 4388-94.
- Zhang, C., Meng, X. F., Zhu, Z. H., Yang, X. and Deng, A. G. (2004). "Role of connective growth factor in plasminogen activator inhibitor-1 and fibronectin expression induced by transforming growth factor beta1 in renal tubular cells." *Chin Med J (Engl)* 117(7): 990-6.
- Zhang, J. L., Huang, Y., Qiu, L. Y., Nickel, J. and Sebald, W. (2007). "von Willebrand factor type C domain-containing proteins regulate bone morphogenetic protein signaling through different recognition mechanisms." *J Biol Chem* 282(27): 20002-14.

Anhang

Tabellarische Übersicht der >2 differentiell exprimierten Gene

Gene, die in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten ≥ 2 fach stärker exprimiert werden.

Affy ID	Gene Symbol	Gen Name	X-fache Expressionsänderung
206336_at	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	14.2791918
204470_at	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	9.39219746
202859_x_at	IL8	Interleukin 8	5.58722225
206025_s_at	TNFAIP6	Tumor necrose factor, alpha-induced protein 6	5.02725399
206026_s_at	TNFAIP6	Tumor necrose factor, alpha-induced protein 6	4.95272819
205207_at	IL6	Interleukin 6	4.88181179
202628_s_at	SERPINE1	Plasminogen-Activator-Inhibitor 1	4.68117484
216598_s_at	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 1	4.31062408
202627_s_at	SERPINE1	Plasminogen-Activator-Inhibitor 1	4.22689009
218755_at	KIF20A	Kinesin family member 20A	4.10328766
204415_at	G1P3	Interferon, alpha-inducible protein	3.94854828
209773_s_at	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	3.86710236
211506_s_at	IL8	Interleukin 8	3.57080371
205483_s_at	G1P2	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	3.48427292
201890_at	RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	3.31985111
219148_at	PBK	PDZ binding kinase	3.31940107
218009_s_at	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	3.23219194
204655_at	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	3.1138307
214710_s_at	CCNB1	Cyclin B1	3.03879982
218039_at	NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1	3.01641234
1405_i_at	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2.99582673
209774_x_at	CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2.94954676

203554_x_at	PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1	2.93894297
209278_s_at	TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	2.93824377
208937_s_at	ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	2.93266142
203764_at	DLG7	Discs, large homolog 7 (Drosophila)	2.87565795
201291_s_at	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	2.8429863
215223_s_at	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	2.78909909
202357_s_at	BF	B-factor, properdin	2.74363726
206969_at	KRTHA4	Keratin, hair, acidic, 4	2.70535135
204337_at	RGS4	Regulator of G-protein signalling 4	2.67839638
204439_at	IFI44L	Interferon-induced protein 44-like	2.63824743
202644_s_at	TNFAIP3	Tumor necrose factor, alpha-induced protein 3	2.60960821
206157_at	PTX3	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	2.60139133
221059_s_at	COTL1	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)	2.59974743
209714_s_at	CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	2.58154914
202503_s_at	KIAA0101	KIAA0101	2.5224151
207510_at	BDKRB1	Bradykinin receptor B1	2.51210777
216841_s_at	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	2.50464464
203755_at	BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	2.48689872
202870_s_at	CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	2.46836788
210052_s_at	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	2.43280916
203560_at	GGH	Gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, foylpolysaccharide hydrolase)	2.4174935
204338_s_at	RGS4	Regulator of G-protein signalling 4	2.40955952
202095_s_at	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	2.39777293
204240_s_at	SMC2L1	SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1 (yeast)	2.37325018
208079_s_at	STK6	Serine/threonine kinase 6	2.35982242

202998_s_at	LOXL2	Lysyl oxidase-like 2	2.35878634
202705_at	CCNB2	Cyclin B2	2.34639326
210559_s_at	CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	2.33508823
202643_s_at	TNFAIP3	Tumor necrose factor, alpha-induced protein 3	2.32496321
203213_at	CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	2.32445655
218542_at	C10orf3	Chromosome 10 open reading frame 3	2.32224388
202589_at	TYMS	Thymidylate synthetase	2.30147086
206632_s_at	APOBEC3B	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	2.29804636
207165_at	HMMR	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	2.29402306
202338_at	TK1	Thymidine kinase 1, soluble	2.26331278
201292_at	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	2.25880312
201859_at	PRG1	Proteoglycan 1, secretory granule	2.2509484
202620_s_at	PLOD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	2.23620906
200598_s_at	TRA1	Tumor rejection antigen (gp96) 1	2.22960411
201860_s_at	PLAT	Plasminogen activator, tissue	2.20850664
219918_s_at	ASPM	Asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.19641062
219493_at	SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	2.19027452
203362_s_at	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	2.1858636
219869_s_at	SLC39A8	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	2.18579047
218883_s_at	MLF1IP	MLF1 interacting protein	2.18547321
204026_s_at	ZWINT	ZW10 interactor	2.18220604
212110_at	SLC39A14	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	2.17061182
222162_s_at	ADAMTS1	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	2.16203451
202954_at	UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	2.15074281
203418_at	CCNA2	Cyclin A2	2.14507924
206116_s_at	TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)	2.13632415
204224_s_at	GCH1	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	2.12447157

209267_s_at	SLC39A8	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	2.12124312
222077_s_at	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	2.1146611
AFFX- HUMISGF3A/M979 35_MB_at	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.10775851
210764_s_at	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2.09476598
204933_s_at	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	2.07923897
216449_x_at	TRA1	Tumor rejection antigen (gp96) 1	2.07062198
210987_x_at	TPM1	Tropomyosin 1 (alpha)	2.07029349
204092_s_at	STK6	Serine/threonine kinase 6	2.04277707
200599_s_at	TRA1	Tumor rejection antigen (gp96) 1	2.03636087
204822_at	TTK	TTK protein kinase	2.03591142
202619_s_at	PLOD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	2.03555779
217294_s_at	ENO1	Enolase 1, (alpha)	2.03018877
219978_s_at	NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1	2.02355075
201289_at	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	2.02032724
AFFX- HUMISGF3A/M979 35_MA_at	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.01857842
202779_s_at	UBE2S	Ubiquitin-conjugating enzyme E2S	2.01531549
209969_s_at	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	2.01297388

Gene, die in *CTGF* stimulierten Tenonfibroblasten ≥ 2 fach schwächer exprimiert werden.

Affy ID	Gene Symbol	Gen Name	Relative Expressionsänderung
219304_s_at	PDGFD	Platelet derived growth factor D	-3.1107
218730_s_at	OGN	Osteoglycin (osteoinductive factor, mimecan)	-2.9699
205907_s_at	OMD	Osteomodulin	-2.9638
205908_s_at	OMD	Osteomodulin	-2.9172
220351_at	CCRL1	Chemokine (C-C motif) receptor-like 1	-2.6963
201417_at	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	-2.5342
202291_s_at	MGP	Matrix Gla protein	-2.4181
203185_at	RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	-2.2324
201427_s_at	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1	-2.2107
209613_s_at	ADH1B	Alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide	-2.1839
218559_s_at	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	-2.1554
206165_s_at	CLCA2	Chloride channel, calcium activated, family member 2	-2.1465
213348_at	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	-2.0990
213241_at	PLXNC1	Plexin C1	-2.0958
208699_x_at	TKT	Transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	-2.0781
205200_at	CLEC3B	C-type lectin domain family 3, member B	-2.0580
213568_at	OSR2	Odd-skipped related 2 (Drosophila)	-2.0204
204223_at	PRELP	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	-2.0035

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Sebald, der mir diese Arbeit ermöglichte. Seine stete Diskussionsbereitschaft und die zu jeder Zeit gewährte großzügige Unterstützung waren eine große Hilfe bei der Erstellung. Sein großes Interesse und persönliches Engagement waren für mich Motivation und Hilfe gleichermaßen. Danke für diese Erfahrungen!

Prof. Dr. Thomas. Müller danke ich sehr herzlich für die Betreuung der Arbeit als Gutachter der Fakultät für Biologie.

Axel Seher danke ich für die Hilfsbereitschaft, viele nützliche Ratschläge und die Zeit, die er meiner Arbeit gewidmet hat!

Ein großes Dankeschön an Dr. T. Meyer-ter-Vehn und Dr. G. Schlunck für die Bereitstellung der primären Fibroblasten, hilfreiche Tipps und Diskussionen.

Herrn Dr. Joachim Nickel danke ich für seine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude.

Bei Herrn Dr. W. Schmitz möchte ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen bedanken.

Ein ganz spezieller Dank geht an die wechselnde Crew im Denkraum. Ihre tatkräftige Hilfe und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre haben dazu beigetragen, dass mir der Spaß am Laboralltag niemals verloren ging.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen „extralaboralen“ Freunden, die für den notwendigen Ausgleich zur manchmal frustrierenden Laborarbeit gesorgt haben.

Schließlich mochte ich mich bei allen weiteren Kollegen des Lehrstuhls für Physiologische Chemie II für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Zum Abschluss der größte Dank an die wichtigsten Personen in meinem Leben, meine Eltern, meine Brüder und mein Freund. Keine Worte könnten je ausdrücken, wie dankbar ich bin Euch zu haben. DANKE!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Susanne Gebhardt
geb. 09.06.1980 in Ochsenfurt
Familienstand: ledig

Ausbildung

- 02/05 – heute Promotion bei Prof. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg
Titel: Expression, biochemische Charakterisierung und biologische Analyse des Connective tissue growth factor
- 02/04-11/04 Diplomarbeit bei Prof. W. Sebald am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg
Titel: Die Rolle von CTGF (connective tissue growth factor) bei der postoperativen Wundheilungs- und Vernarbungsreaktion am Auge
- 12/03-01/04 Diplomprüfungen: Hauptfach: Biochemie, Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie, Mikrobiologie
- 11/99 – 11/04 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians Universität, Würzburg
Abschluss: Diplom
- 09/90 - 07/99 Christian-von-Bomhard-Schule, Uffenheim
Abschluss: Allgemeins Hochschulreife
- 09/86-07/90 Grundschule Lipprichhausen

Berufstätigkeit

- 02/05-12/07 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Physiologische Chemie II an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

Schriftenverzeichnis

Meyer-Ter-Vehn, T., Gebhardt, S., Sebald, W., Buttmann, M., Grehn, F., Schlunck, G. and Knaus, P. (2006). "p38 inhibitors prevent TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(4): 1500-9.

Meyer-Ter-Vehn, T., Sieprath, S., Katzenberger, B., Gebhardt, S., Grehn, F. and Schlunck, G. (2006). "Contractility as a prerequisite for TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(11): 4895-904.

Seher, A., Gebhardt, S. Kneitz, S., Nickel, J. Müller, T. D., Meyer-ter-Vehn, T., Schlunck, G. and Sebald, W. (2008). „The connective tissue growth factor (CTGF) initiates an inflammatory and wound healing response in primary human tenon fibroblasts” (Manuskript in Vorbereitung).

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, Mai 2008

Susanne Gebhardt