

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert

Aufklärung der Funktion von CYR61/ CCN1 in Osteoblasten und Osteoklasten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Benedikt Markus Schröter
aus Köln

Würzburg, März 2009

Referent: Prof. Dr. rer. nat. N. Schütze

Koreferent: Prof. Dr. med. R. Meffert

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.10.2009

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Zellen des Knochenstoffwechsels	2
1.2 hCYR61 und die CCN Familie	4
1.3 Funktionen des Proteins hCYR61	5
1.4 Bedeutung der CCN –Familie im Knochenstoffwechsel	7
1.5 Aufbau und Funktionsdomänen des hCYR61	8
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	10
2 Methoden	12
2.1 Zellkultur	12
2.1.1 Humane fetale Osteoblasten hFOB	12
2.1.2 Raw264.7 Makrophagen	12
2.1.3 MCSF-abhängige Knochenmarksmakrophagen	12
2.2 RNA-Isolierung	13
2.3 c-DNA-Synthese	13
2.4 PCR	14
2.5 Gel-Elektrophorese und Gel-Auswertung	14
2.6 Western Blot	15
2.6.1 Elektrophoresebedingungen	15
2.6.2 Blotting	15
2.6.3 Stripping:	18
2.7 Immunohistochemie	18
2.8 Histochemie	19
2.8.1 Tartrat Resistente Saure Phosphatase (TRAP) Färbung:	19
3 Ergebnisse.....	20
3.1 Auswahl von hCYR61 beeinflussten Genprodukten	20

3.2	<i>Überprüfung der Kandidaten und Konzentrationsreihe</i>	20
3.3	<i>Funktion nach Einfrieren und Auftauen</i>	23
3.4	<i>Identifikation der Funktionsdomänen</i>	23
3.4.1	Gli 2	24
3.4.2	Gli 3	26
3.4.3	Patched	28
3.4.4	MAL	30
3.4.5	BMPRI1A	32
3.4.6	HES 2	34
3.5	<i>Effekt von hCYR61 auf murine RAW264.7 Makrophagen mittels Western Blot.</i>	36
3.6	<i>Vorbehandlung mit hCYR61 von 24 Stunden</i>	37
3.6.1	Westernblot der phosphorylierten und totalen Kinase P38 in RAW264.7 Zellen.	38
3.6.2	ERK 1/2 (MAPK 1/2)	39
3.6.3	JNK	40
3.6.4	IκB	41
3.6.5	S6-Kinase	42
3.7	<i>Gleichzeitige Stimulation mit hCYR61</i>	43
3.7.1	p38	44
3.7.2	p38	45
3.8	<i>Effekt von hCYR61 auf die Proliferation von murinen Knochenmarksmakrophagen mittels Immunhistochemie</i>	46
3.8.1	Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Calcitoninrezeptors in MCSF abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus.	48
3.9	<i>Effekt von hCYR61 auf die Fusion von murinen RAW264.7 Makrophagen</i>	48
4	Diskussion	50
4.1	<i>Methodische Problematik</i>	50
4.1.1	Zellkultur	50
4.1.1.1	Humane fetale Osteoblasten (hFOB)	50

4.1.1.2	RAW 264.7 Zellen	51
4.1.1.3	MCSF-abhängige Knochenmarksmakrophagen	51
4.1.2	PCR	52
4.1.3	Western Blot	52
4.2	<i>Eigenschaften des Proteins hCYR61</i>	53
4.3	<i>Wertung der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur</i>	54
4.3.1	Wirkung des Proteins hCYR61 auf die hFOB Zellen	54
4.3.1.1	Der Bone Morphogenic Protein Signalweg (BMPRI1A)	54
4.3.1.2	Der Indian Hedgehog Signalweg. (Gli 2,3, Patch)	56
4.3.1.3	Der Notch Signalweg (HES 2)	57
4.3.1.4	Insuline like growth Faktor (IGF 2)	58
4.3.1.5	Kollagen XIV	58
4.3.1.6	Serum Response Faktor Singalweg (MAL)	59
4.3.2	Effekt von hCYR61 auf Osteoklastenvorläuferzellen	59
4.3.2.1	Der RANK Signalweg (p38, ERK 1/2, JNK,IκB, S6K)	60
4.3.2.2	Integrin $\alpha_v\beta_3$	62
4.3.2.3	Der Calcitoninrezeptor	63
4.3.2.4	Effekt von hCYR61 auf die Fusion von RAW264.7 Zellen	64
4.4	<i>Weitere mögliche Untersuchungen</i>	64
5	Zusammenfassung	66
	Literatur	i
	Abbildungsverzeichnis	ix
	Danksagung.....	
	Curriculum Vitae.....	

1 Einleitung

In der alternden Bevölkerung Deutschlands und anderer Industrienationen wird die Relevanz von Störungen des Knochen- und Mineralstoffwechsels in der alltäglichen Praxis zunehmen⁹⁶. Am Übergang des 19. zum 20. Jahrhundert hatte sich die Rachitis zu einer Volkskrankheit in den Industrienationen Europas entwickelt. So zeigten etwa 80% der Kinder in den Städten Europas und der USA Symptome dieser Erkrankung. Die Rachitis wurde durch die Entdeckung des antirachitischen Faktors durch McCollum⁷¹ und die Behandlung mit UV-Licht therapierbar. Zu der bedeutsamsten Krankheit des Knochenstoffwechsels ist heute die Osteoporose geworden⁸⁸. Sie zählt mit 3-5 Millionen betroffenen Personen zu einer der wichtigsten Volkskrankheiten in Deutschland³². Insbesondere Frauen sind betroffen. Sie erkranken 4 -5 Mal häufiger als Männer. Eine Studie in Dänemark beziffert die Prävalenz der Osteoporose bei Personen im Alter von 50 Jahren und mehr mit 40,8% bei Frauen und 17,7% bei Männern¹⁰². Statistisch ist jede 3. Frau nach der Menopause von einer osteoporosebedingten Fraktur betroffen, wobei die Inzidenz mit dem Alter exponentiell zunimmt¹⁸. Während die Osteoporose lange mit einem Knochenabbau im Alter gleichgesetzt wurde⁹² definiert die WHO die Osteoporose als eine „systemische Skeletterkrankung, bei der es über eine kritische Verminderung der Knochenmasse und der Störung der Knochenarchitektur zu einer verminderten Bruchfestigkeit des Knochens kommt“¹⁰⁴. Die osteoporotischen Frakturen führen zu irreversiblen Einbußen an Lebensqualität, Folgeb morbidität, Pflegebedürftigkeit und erhöhter Mortalität²². Neben den medizinischen und psychosozialen Folgen kommt es auch zu erheblichen Belastungen der Gesundheitssysteme. Konservative Schätzungen gehen von 2 - 2,5 Milliarden Euro allein für die Behandlung von hüftgelenksnahen Frakturen in Deutschland aus⁸⁹. Die Zahl der osteoporotischen Frakturen wurde im Jahr 2000 auf 3,9 Millionen in Europa geschätzt, davon allein 179000 Hüftfrakturen bei den Männern und 711000 bei den Frauen⁷³.

Es entstanden direkte Kosten von 31,7 Milliarden Euro. Entsprechend der erwarteten demographischen Entwicklung wird erwartet, dass sie auf 76,7 Milliarden Euro im Jahr 2050 steigen werden⁴⁴.

So hat die Weltgesundheitsorganisation die Osteoporose auf Grund der zunehmenden Brisanz der Fragilitätsfrakturen im Zuge der demographischen Entwicklung in den kommenden Jahrzehnten in die Liste der 10 wichtigsten Erkrankungen aufgenommen⁸⁷.

Die Erkenntnis, dass es sich bei der Osteoporose um ein gesellschaftliches und ökonomisches Gesundheitsproblem hoher Priorität handelt, hat zu einer intensiven Forschung im Bereich des Knochenstoffwechsels im Allgemeinen und der Osteoporose im Speziellen geführt.

1.1 Zellen des Knochenstoffwechsels

Der Knochen ist ein metabolisch aktives Gewebe, welches einem fortlaufendem Umbau unterliegt. Die Balance zwischen Resorption von altem Knochen und Formation von neuem Knochen ist in etwa ausgewogen. Der Knochenstoffwechsel findet an den so genannten Bone Metabolism Units (BMU) an den Knochenoberflächen statt¹⁷.

Die Knochenformation wird durch die Aktivität der Osteoblasten gefördert, der Unterhalt durch die Osteozyten - beide Zellen mesenchymaler Abstammung - und Resorption durch Osteoklasten myeloischer Herkunft. Die Osteoblasten ersetzen die Oberflächen mit einer Knochenmatrix – dem Osteoid. Unter normalen Bedingungen dauert die Resorptionsphase (Osteoklastenphase) 10 Tage. Es folgt eine Formationsphase (Osteoblastenphase) von bis zu 3 Monaten⁶⁶.

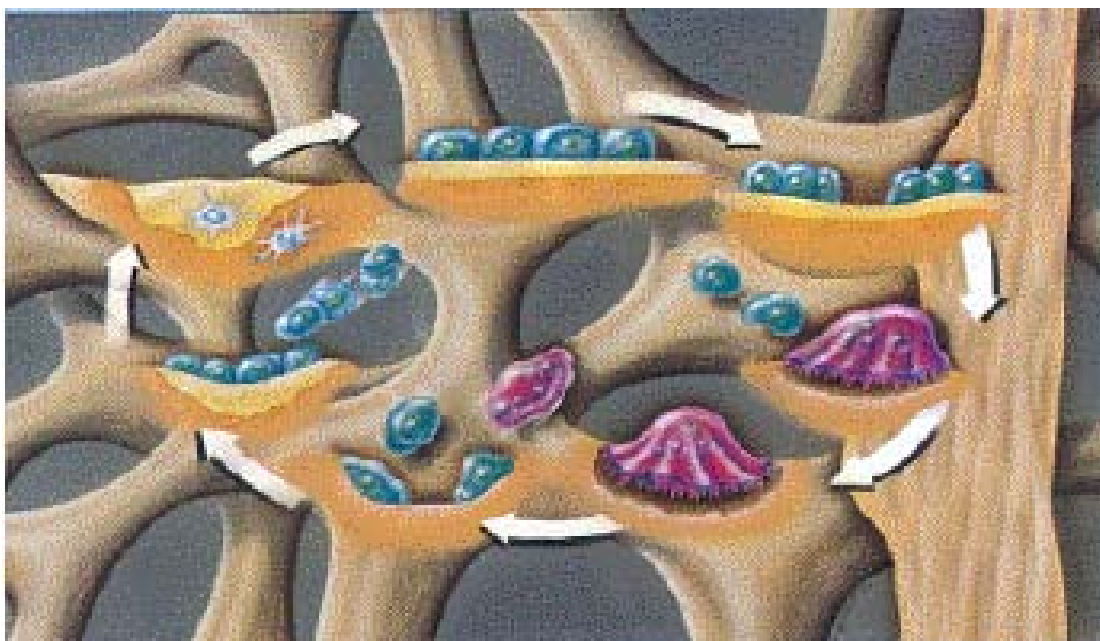


Abb. 1.1.1: Bone Remodelling, Basic Biology of Bone and Cartilage, Metra Biosystems

Im gesunden Knochen herrscht ein kompliziertes Gleichgewicht zwischen den beiden Zellarten, welches durch Hormone (Vitamin D, Parathormon, Sexualhormone) und durch

ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktor- abhängiger Genexpression aufrecht gehalten wird.

Wichtige Bestandteile des Mikroumfeldes des Knochens (extrazelluläre Matrix), aber auch Signalmoleküle wie Osteokalzin, Osteopontin, Alkalische Phosphatase und Proteine der so genannten CCN-Familie, werden durch die Osteoblasten sezerniert. Durch die Wirkung der Signalmoleküle auf Osteoklasten, Osteoblasten und Endothelzellen wird der Knochenumbau gesteuert⁴¹.

Die Balance zwischen Knochenauf- und abbau wird durch verschiedene Signalwege aufrechterhalten, wobei dem OPGL/RANK Zytokinsystem und Osteoprotegerin eine besondere Bedeutung zukommen. OPGL (Osteoprotegerinligand) - auch bekannt als RANKL (Rezeptor Aktivator von NFκB Ligand) - wird von Osteoblasten, Fibroblasten und aktivierten T-Lymphozyten sezerniert. RANKL aktiviert über den RANK (Rezeptor Aktivator von NFκB) die Differenzierung der Osteoklasten. Neben dem zellgebundenen RANK existiert das Osteoprotegerin, ein sezernierter decoy Rezeptor, der den Knochenabbau hemmt³⁷. Die Bedeutung dieses Signalweges wird im Tiermodell deutlich. Bei transgenen oder Knock-out Mäusen mit exzessiver oder defekter Produktion von RANKL, RANK und Osteoprotegerin zeigen sich die Extrema der skelettalen Phänotypen in Form von Osteopetrose (targeted deletion of RANKL)⁴⁷ und Osteoporose (RANKL Substitution)⁵⁵.

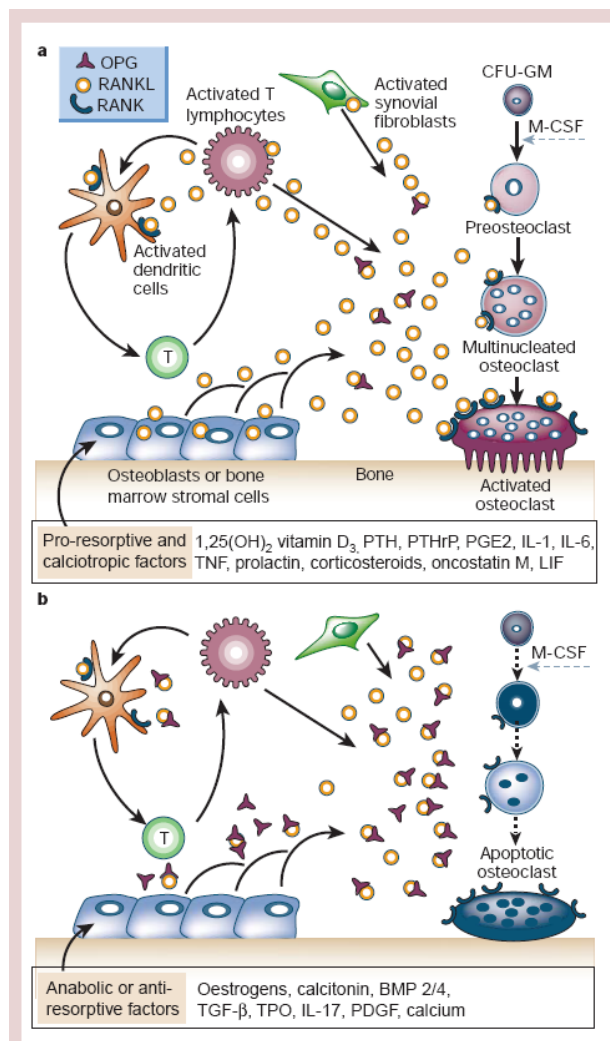


Abb. 1.1.2: Hormonelle Kontrolle der Knochenresorption. Schematische Darstellung des Mechanismus pro-resorptiver Faktoren(a) und anaboler Faktoren (b)
Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423: 337–42

1.2 hCYR61 und die CCN Familie

Das Protein hCYR61 (human cystein rich protein 61) gehört zu der Familie der CCN-Proteine. Hierbei handelt es sich um multifunktionale, extrazelluläre-Matrix-assoziierte Signalproteine, die Prozesse der Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung regulieren. Benannt wurde diese Familie nach den ersten drei Mitgliedern (Cyr61, CTGF und NOV)⁸. Weitere Mitglieder sind das WISP1, WISP2 und WISP3¹¹. Die Zuordnung zu dieser Familie erfolgte durch die Homologien im Aufbau der Proteine. Es handelt sich also um eine Strukturfamilie. Charakteristisch ist ein Aufbau mit 38 Cysteinresten (mit Ausnahme von WISP2, siehe Abb 1.2). Die Proteine enthalten neben einer Sezernierungs-

Signalsequenz vier konservierte Domänen, die je durch ein Exon kodiert werden^{6 8 9}. Der modulare Aufbau weist folgende Homologien auf:

Insuline like Growth Factor binding Protein (IGFBP)

Von Willebrand Faktor Typ C

Thrombospondin Typ 1

C-terminaler Cysteinrest

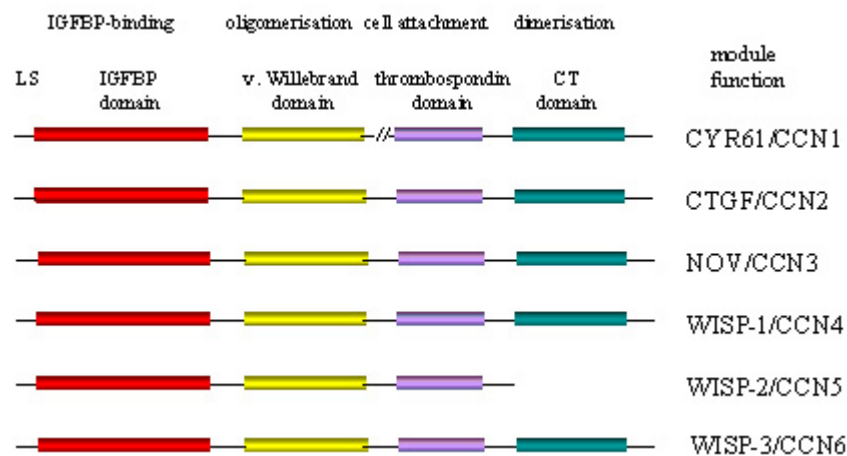


Abb. 1.2: Die Proteine der CCN-Familie

Seit der Entdeckung der CCN Proteine hat man viel über die Biochemie und die Expression während der Entwicklung, im gesunden und erkrankten Gewebe gelernt. Nachdem man ursprünglich glaubte, dass es sich um klassische Wachstumsfaktoren handelte, haben *in vitro* Studien und besonders Versuche mit transgenen und Knock-out Mäusen zu neuen Einsichten in die Aktivitäten der CCN Proteine geführt¹⁰⁷.

1.3 Funktionen des Proteins hCYR61

Das Protein CYR61 wurde als erstes Mitglied der CCN- Familie als immediate early Gen bei der Stimulation von Fibroblasten der Maus mit Wachstumsfaktoren identifiziert⁵⁶. Die humane Variante hCYR61 wurde erstmalig 1997 / 1998 unter anderem von der Forschungsgruppe Schütze/Jakob beschrieben⁹⁵. CYR61 wird in verschiedenen Zelltypen

exprimiert. Es findet sich in gesunden Zellen der Blutgefäße, des Muskels, des Knochens und des Nervensystems, muss aber auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wie dem Mammakarzinom, dem Glioblastom und auch dem kleinzelligem Lungenkarzinom gesehen werden⁴². Die Effekte von CYR61 sind abhängig vom Zelltyp und werden unter anderem durch Integrine und Proteoglykane vermittelt. So hat CYR61 als Signalmolekül der extrazellulären Matrix Einfluss auf die Proliferation, Zelladhäsion¹⁵, Migration⁵ und die Genexpression der extrazellulären Matrix von menschlichen Endothelzellen. Es bindet sowohl Integrine ($\alpha_{2b}\beta_3$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$)^{31 43 46} als auch Proteoglykane¹⁶. CYR61 hat eine starke proangiogenetische Wirkung, welche über Integrine vermittelt wird^{14 63}.

Diese zeigte sich auch in einem Ischämiemodell des Kaninchens²¹. Bei Mäusen wurde zuvor schon eine Induktion der Angiogenese und Zunahme des Tumorwachstums durch CYR61 *in vivo* nachgewiesen⁵. Neben dem indirekten Effekt auf das Tumorwachstum durch die Angiogenese zeigen sich auch direkte Wirkungen. So korreliert die Proliferation des Mammakarzinoms und die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung mit der Expression von CYR61^{68 100}. Auch in malignen Gliomzellen ist CYR61 hochreguliert¹⁰⁶. Einen gegenteiligen Effekt findet man beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Hier wirkt CYR61 wachstumshemmend⁹⁹. Somit muss von einer zell- und gewebsspezifischen Wirkung des Proteins ausgegangen werden. Effekte auf die Chondrogenese zeigen sich im Genprodukt der Maus *in vitro*¹⁰³. So ist CYR61 direkt in der Lage, mesenchymale Hüftzellen der Maus zu Knorpelzellen zu differenzieren⁸³. Im Frakturkallus der Ratte ist die Expression von CYR61 temporär erhöht³³. Sowohl der beschriebene Einfluss auf die Chondrogenese, als auch die verstärkte Expression beim Knochenaufbau der Ratte deuten auf eine wichtige Rolle des Proteins hCYR61 im Knochenstoffwechsel hin. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass hCYR61 ein immediate early Genprodukt in humanen Osteoblasten ist, welches durch 1-25(OH)Vitamin D3, Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert wird⁹⁵. Die Fähigkeit der Bindung an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* vermittelt die Signaltransduktion im Knochenstoffwechsel, da der Vitronektinrezeptor auf Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert wird. Ein Anti-Integrin-Antiserum verhindert die hCYR61 abhängige Adhäsion und Migration von Endothelzellen⁴⁶.

Ergebnisse der Forschungsgruppe Schütze/ Jakob zeigen eine verstärkte Expression bei der Frakturheilung in einem Tibiamodell des Schafes⁶⁷.

In Kooperation mit der Forschungsgruppe in Aberdeen (Bone Group, Prof. Mike Rogers, Institute of Medical Sciences, Aberdeen) konnte die Arbeitsgruppe in Würzburg eine Hemmung der Formation von Osteoklastenvorläuferzellen durch einen bisher noch unbekanntem Mechanismus nachweisen. Die Einflüsse sowohl auf das Wachstum von Osteoblasten, als auch auf die Hemmung der Osteoklastenformation lassen darauf schließen, dass es sich bei CYR61 um einen wichtigen Regulator des Knochenremodelings handelt¹⁹.

1.4 Bedeutung der CCN –Familie im Knochenstoffwechsel

Neben den oben genannten Effekten des Proteins hCYR61, zeigen auch andere Mitglieder der CCN-Familie Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel. Insbesondere CTGF/CCN2 ist hierbei von Bedeutung. Es wird sowohl im Knochen wie auch im Knorpel exprimiert. CTGF/CCN2 spielt eine Rolle in der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation⁸⁰. So wird das CTGF/CCN2 deutlich nachweisbar von proliferierenden Osteo- und Chondroblasten bei der Frakturheilung exprimiert⁷⁸.

CTGF(CCN2) wird durch BMP-2 und TGF- β hochreguliert. Die Rolle in der Homöostase des Knochens und der Knorpelentwicklung zeigt sich auch in einem Mausmodell mit der funktionellen Deaktivierung des CTGF. So haben CTGF(CCN2)- defiziente Mäuse multiple skelettale Defekte⁴⁰.

Im CCN2-null Mutanten findet sich im Vergleich zu dem Wildtyp eine drastische Reduktion des Osteoblastenphänotyps. Die exogene Zugabe von CCN2 kann die attenuierten Eigenschaften der CCN2-null Osteoblasten wiederherstellen. So spielt CCN2 nicht nur bei der Regulation des Knorpels, sondern auch bei der normalen intermembranösen Knochenentwicklung eine wichtige Rolle⁵².

Bei der pseudorheumatischen Dysplasie kann der Effekt von WISP3 (CCN6) nachgewiesen werden³⁹. Auch WISP2 (CCN5) wurde als ein Regulator der Funktion von Osteoblasten und Chondrozyten erkannt⁴⁹.

Deutliche Expression von NOV (CCN3) wird an den Orten der Chondrogenese gefunden, an denen es in den späten Stadien der Chondrozytendifferenzierung und Osteogenese von Bedeutung sein könnte⁸⁵.

So wird deutlich, dass die CCN –Proteine eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Knochens spielen und sowohl am Knochen- und Knorpelwachstum als auch am Knochenstoffwechsel und der Frakturheilung beteiligt sind. Die zell- und gewebspezifischen Unterschiede in der Expression und Funktion der verschiedenen CCN Proteine deuten jedoch darauf hin, dass sie nicht per se redundant wirken³⁹.

1.5 Aufbau und Funktionsdomänen des hCYR61

Die Proteine enthalten neben einer Sezernierungssignalsequenz vier Domänen. Bisher sind die Effekte der einzelnen Domänen zum Teil noch spekulativ.

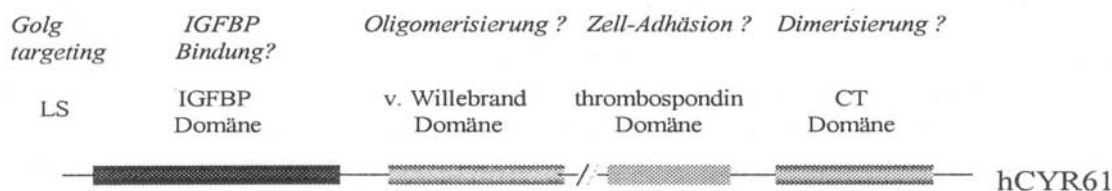


Abb. 1.4.1 Struktureller Aufbau des Proteins hCYR61 mit den charakteristischen Proteindomänen und ihrer z.T. noch spekulativen Effekte.

Die N-terminale Signalsequenz

Bei den N-terminalen Aminosäuren zeigte die Forschungsgruppe Schütze/Jakob, dass diese wichtig für die Sekretion des Proteins CYR61 ist⁶⁰.

- Domäne I: Die IGFBP Domäne

Obwohl die CCN Proteine ein insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) ähnliches Motiv haben, wurde keine Funktion auf den IGF- Signalweg gefunden²⁹.

Die von Willebrand Typ C Domäne (vWC), die Thrombospondin Typ I Domäne und die C-terminale Domäne werden für die Protein-Protein Wechselwirkungen, wie der Oligomerisation oder der Interaktion mit Molekülen und Rezeptoren der extrazellulären Matrix verantwortlich gemacht. Wie bereits beschrieben, gehören zu den Interaktionspartnern der CCN Proteine Integrinrezeptoren^{30 63 93} und Proteoglykane²⁴, aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine².

- Domäne II: Die von Willebrand Typ C Domäne (vWC)

Der Wachstumsfaktor TGF- β bindet an der n-terminalen von Willebrand Faktor Domäne von CCN2². Die spezifische Interaktion von CYR61 und Integrin $\alpha_v\beta_3$ konnte auf der Domäne II nachgewiesen werden¹⁴.

Zwischen den Domänen II und III befindet sich die "Hinge-Region", an der die Spaltung durch Proteinasen beobachtet wurde. So lassen sich Fragmente von CCN2 in biologischen Flüssigkeiten finden. Zu diesen Fragmenten zählen neben den c- und n-terminalen Hälften auch die Domäne IV^{10,59}.

- Domäne III: Die Thrombospondin Domäne

Eine Bindungsstelle von Integrin $\alpha_6\beta_1$ wurde auf Domäne III von hCYR61 entdeckt⁶⁴.

An der Domäne III von CCN2 bindet das LRP1 (Low-density-lipoprotein receptor related protein 1)²³.

- Domäne IV: Die c-terminale Domäne

Zwei benachbarte Bindungsstellen für Integrin $\alpha_6\beta_1$ und Heparan Sulfate Proteoglykan wurden auf der Domäne IV entdeckt⁶⁵. Fibronectin bindet an die c-terminale Domäne von CCN2 und verstärkt die Chondrozytenadhäsion durch Integrin $\alpha_5\beta_1$ ³⁸. An die c-terminale Domäne von CCN3 bindet Notch1 mit seinen epidermal growth factor ähnlichen Repeats⁹¹. Bei CCN2 zeigte sich eine proliferative Aktivität. Diese wurde durch die Wirkung der c-terminalen Domäne auf den Ras/MEK/ERK Signalweg vermittelt²⁵.

Die c-terminale Domäne von CCN4 (WISP 1) bindet an Fibulin 1C⁸⁶. Die Stimulation der Migration von menschlichen Fibroblasten über Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde durch Cyr61 ohne c-terminale Domäne erreicht³¹.

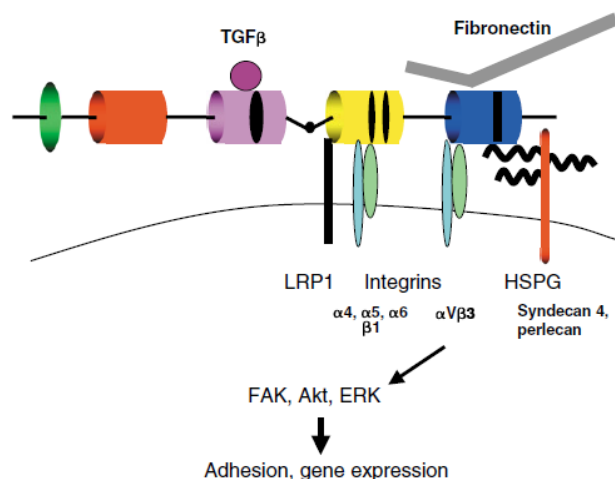


Abb. 1.4.2: Darstellung der Signalübertragung bei Mitgliedern der CCN Familie an den entsprechenden Domänen
Leask A, Abraham DJ (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Science* 119:4803–4810

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass verschiedene, unterschiedliche biologische Aktivitäten durch die Interaktionen von diskreten funktionellen Domänen der Proteine der CCN-Familie vermittelt werden⁵⁹. Vielfach ist der Mechanismus der Wirkungen noch ungeklärt. Es ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich noch weitere unbekannte Bindungspartner existieren.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zielsetzung der Arbeit ist die Identifizierung von Funktionsdomänen von hCYR61 durch Stimulation von humanen fetalen Osteoblasten (hFOB). In einem zweiten Teil sollen die Effekte des Gesamtproteins auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen gezeigt werden.

Zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Funktionen des Proteins hCYR61 wurden verschiedene Teilbereiche des Proteins exprimiert. Entsprechend den bereits vorher untersuchten Effekten auf ausgewählte mRNA-Spezies werden die verschiedenen Konstrukte auf ihre Funktion überprüft.

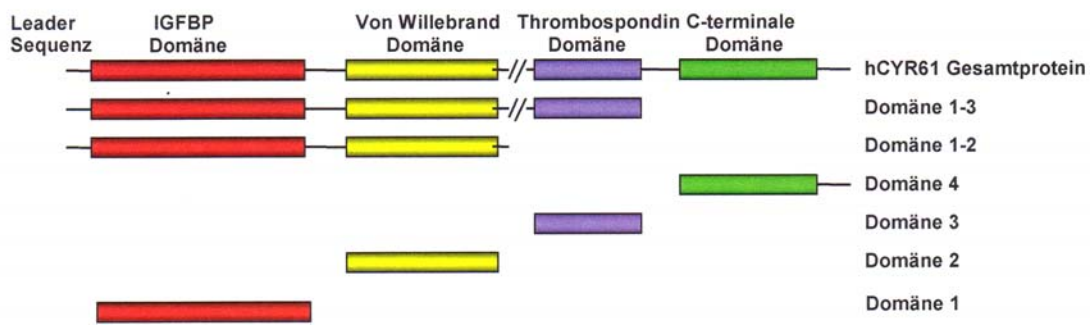


Abb. 1.6 Das Gesamtprotein hCYR61 und die verschiedenen Konstrukte.

Bei der Untersuchung der Effekte von hCYR61 auf Osteoklasten, sowie deren Vorläuferzellen, steht die Rolle von hCYR61 bei der RANKL abhängigen Osteoklastenformation im Mittelpunkt. Des Weiteren wird der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Calcitoninrezeptors und Integrin $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors untersucht.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Humane fetale Osteoblasten hFOB

Humane fetale Osteoblasten (eine durch eine temperatursensitive Mutante (tsA58) des großen T-Antigens des SV40-Virus immortalisierte Zelllinie) wurden verwendet, die von Dr. T.C Spelsberg (Mayo Clinic, Rochester) zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden aus einer Primärkultur humaner fetaler Osteoblasten gewonnen (Harris et al. 1995). Sie wurden bei 34°C und 5% CO₂ in 6-Loch-Platten kultiviert. Als Medium dienten 4 ml DMEM/F12 (Gibco) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 150mg/l G418, 10000U/l Penicillin, 10mg/l Streptomycin und 25µg/l Amphotericin B pro Loch. 24 Stunden vor der Stimulation mit hCYR61 wurde das Medium gegen Medium ohne fetales Kälberserum getauscht. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.1.2 Raw264.7 Makrophagen

Die Raw264.7 Zellen der Maus (ein Klon erhalten von Dr Ian James, SKB) wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Sie wurden in einer Dichte von $3,6 \times 10^5$ Zellen pro 6-Loch-Platte ausgesät. Das verwendete Medium bestand aus DMEM, FCS, Glutamin und Penicillin/Streptomycin. Die Passagen 10 – 27 wurden benutzt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.1.3 MCSF-abhängige Knochenmarksmakrophagen

Die Extremitäten von 3 Monate alten Mäusen wurden entnommen. Nach dem Entfernen der Weichteile und des Gelenkknorpels wurden die Knochen in PBS überführt. Die nach dem Ausspülen des Knochenmarks erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellen wurden im Medium resuspendiert (Alpha MEM + Penicillin/Streptomycin + Guanin + 10% FCS) und mit 100ng/ml M-CSF auf Petrischalen gebracht. Nach zwei Nächten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und auf einer 24-Loch-Platte ausgesät ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Loch). Das

Zytokin M-CSF wurde in einer Konzentration von 25ng/ml zugegeben und RANK-L in 100ng/ml. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.2 RNA-Isolierung

Verwendet wurde das RNeasy- Kit der Firma Quiagen. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und mit PBS gespült. Danach wurden 10µl β-Mercaptoethanol pro 1ml RLT-Puffer gemischt und 350µl in jedes Loch der 6-Loch-Platte gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Schaber vom Untergrund gelöst. Das Lysat wurde in Eppendorf Caps überführt und gemischt. Zu dem Lysat wurden 350µl 70% Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. 700µl der Probe wurden in eine RNeasy mini Säule gebracht und diese in einem 2ml Sammelgefäß bei 10.000 rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit 700µl RW1 Puffer in der RNeasy mini Säule bei 10.000 rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert und dadurch gereinigt. Der Durchfluss und das Sammelgefäß wurden verworfen. Dann wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und mit 500µl RPE Puffer bei 10.000 rpm 15 Sekunden lang zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die RNA-Silica-Gel Membran der RNeasy mini Säule wurde durch Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 2 Minuten mit 500µl RPE-Puffer getrocknet. Zum Eluieren wurde die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorf Cap gesteckt und 50µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran gebracht und bei 10.000rpm für 1 Minute zentrifugiert.

2.3 c-DNA-Synthese

Verwendet wurde das Random Hexamere / M-MLV Reverse Transkriptase der Firma Promega.

Zunächst wurden die RNA-Proben auf Eis aufgetaut und das Volumen der RNA-Suspension ausgerechnet. Gemeinsam mit autoklaviertem HPLC-H₂O wurde die Suspension in ein Eppendorf Cap pipettiert, um ein Endvolumen von 13 µl zu erreichen. Nach der Zugabe von 1µl Random Hexamere OligoDT-Primer wurde die Probe bei 70°C im Heizblock 10 Minuten erhitzt und auf Eis 5 Minuten abgekühlt.

Dann wurde der Master Mix hergestellt. Dazu wurden der Probe 4 µl 5x M-MLV Puffer, 1 µl 10 mM dNTPs und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Der Master Mix wurde dann 10 Minuten bei 25°C gelagert, dann für 50 Minuten auf 42°C und für 15 Minuten auf 70°C. Nach kurzem Zentrifugieren wurde dann 30µl HPLC-H₂O dazugegeben, so dass ein Endvolumen von 50µl erreicht wurde.

2.4 PCR

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die synthetisierte c-DNA vervielfältigt. Knochenspezifische Signalwege wurden mit ausgewählten Primern untersucht. Der Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ-Research wurde verwendet. In ein PCR-Gefäß wurde 1µl c-DNA gegeben. Hinzugegeben wurden 1µl Primer Sense und Antisense. Außerdem wurden noch 3µl 10xPuffer (10 mM Tris(pH8,4), 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 1µl dNTP-Mix (2,5 mM je Base von TaKaRa), 0,5µl Taq-Polymerase (Clone – TAQ-DNS-Polymerase 5 un/µl von Amersham) und 22,5µl HPLC-H₂O hinzugefügt. In Abhängigkeit vom Protokoll des jeweiligen Primers wurde die Gesamtmenge von 30µl in den PCR-Cycler gegeben und bearbeitet.

2.5 Gel-Elektrophorese und Gel-Auswertung

Die Agarose GTQ der Firma Roth wurde in einer Konzentration von 2% benutzt. Es wurden 2g Agarose in 100ml 0.5 TBE-Puffer (10,8g/l Tris, 5,8g/l Borsäure, 10mM EDTA) in einem Erlenmeyerkolben erhitzt. Der in dem TBE-Puffer gelösten Agarose wurde Ethidiumbromid (5 µl auf 100ml) zugegeben. Sie wurde dann in den Gel-Träger gegossen und ein Kamm eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden mit einem Ladepuffer (TBE, 60% Glycerol, 0,4% Xylen Cyanol) im Verhältnis 10 µl PCR Produkt auf 1µl Ladepuffer gemischt. Nach Erkalten des Gels wurde der Träger in eine Elektrophoresekammer gelegt, der Kamm aus dem Träger entnommen und die Kammern mit 0.5 x TBE gefüllt. Die PCR Produkte, die durch den Ladepuffer beschwert und gefärbt wurden, wurden dann in die Vertiefungen des Gels gefüllt. Die Laufzeiten und die angesetzte Spannung wurden entsprechend der Größe der Kammer gewählt. Die Gelelektrophorese lief 25 Minuten bei 120 Volt in einer kleinen Kammer, in einer großen Kammer 45 Minuten bei 140 Volt.

Die Gelauswertung erfolgte durch das System BioCapt MW der Firma LTF Labortechnik. Die Banden der Gele wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Durch eine in der Kammer installierte Optik wurde das Bild dann auf den Computer übertragen.

Nach Justieren der Optik und der Einstellungen wurde das Bild dann gespeichert und ausgedruckt. Durch das Programm Bio Profil 1D (LTF Labortechnik, Wasserburg) wurden die Banden quantifiziert. Diese Daten wurden in das Programm Microsoft Excel überführt und zur Tabellenkalkulation verwendet.

2.6 Western Blot

Für den Western Blot wurden 18 Loch Criterion Gele (Biorad) und MOPS Running Puffer (20x Puffer, Biorad) verwendet.

Als molekulare Masse Marker wurden Kaleidoscope gefärbte Standards (Biorad) eingesetzt. Der Marker bestand aus sieben angefärbten Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 200 to 6,5 kDa gebunden an verschiedene Farbstoffe. Es wurden 8 µl eingesetzt.

Der MagicMarker Protein Standard (Invitrogen) bestand aus acht rekombinanten Proteinen mit einer Bandbreite von 20 –200 kDa. Es wurden 2,5 µl verwendet.

2.6.1 Elektrophoresebedingungen

Alle Elektrophoresen wurden bei 200V durchgeführt. Die Laufzeit der Criterion Gele betrug etwa eine Stunde.

2.6.2 Blotting

Die PVDF Membran (Amersham Biosciences Hypobond) wurde mit 100% Methanol behandelt, um die hydrophobische Membran zu durchdringen. Die Membran wurde in Transfer Puffer (48mM Tris, 39mM Glycine, 0.04% SDS, 20% Methanol) 5 Minuten lang eingelegt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel in den Transfer Puffer zur Äquilibrierung überführt. Ein Blotting Sandwich wurde auf dem Semi-Dry Blotting

System (Biometra) aufgebaut. Alle Komponenten wurden mit Transfer Puffer feucht gehalten.

Reihenfolge der Komponenten des Blotting Sandwich:

3 x Whatman Filter Papier, 1 x PVDF Membran, 1 x Gel, 3 x Whatman Filter Papier. Der Transfer wurde bei einer konstanten Spannung von 120mA pro Criterion Gel 2 Stunden lang durchgeführt.

Vor der Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper wurden unbesetzte Stellen mit einem Protein geblockt, welches nicht an den primären Antikörper bindet.

Verwendet wurde 5% Magermilchpulver in TBST (50mM Tris, 150mM NaCl und 0,1% Tween 20) 1 Stunde bei 20°C oder ca. 12 Stunden bei 4°C.

Die Membranen wurden 4x10 Minuten auf dem Rütteltisch in TBST gewaschen. Danach folgte die einstündige Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper in 5% Magermilchpulver in TBST.

Masse	Primärer Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
70/85	Phospho P70 S6Kinase (9206) (Maus) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Maus IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
42/44	Phospho p44/42 MAPK (9101) (Kaninchen) Cell Signaling Tec.	1:1000 (H2O + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
70/85	P70 S6Kinase (9202) (Kaninchen) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kaninchen IgG-HRP (goat) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
42/44	P42/P44 MAP kinase (9102) (Kaninchen) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)

43	Phospho-p38 (Kaninchen) (9211) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
46/54	Phospho SAPK/JNK (Kaninchen) (9251) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kainchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
43	P38 (C-20): sc-535 (Kaninchen) Santa Cruz Biotec.	1:1000 (TBST) (25µl in 25ml)	1h	Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)
46/54	SAPK/JNK (Kaninchen) (9252) Cell Signaling Tec.	1:1000 (TBST + BSA) (25µl in 25ml)	Über Nacht	Anti-Kaninchen IgG-HRP (Ziege) Calbiochem	1:5000 (TBST + Milchpulver) (4µl in 20ml)

Abb. 2.5.2: Primäre und sekundäre Antikörper beim Western Blotting

Die verschiedenen primären und sekundären Antikörper inklusive ihrer Verdünnung, Inkubationszeit und Masse der detektierten Kinase sind in der Abb. 2.5.2 aufgeführt

Die Membranen wurden 4x10 Minuten auf dem Rütteltisch in TBST gewaschen. Vor der HRP Detektion wurde die Membran ein letztes Mal 10 Minuten lang in TBST gewaschen. Das Signal wurde mittels SuperSignal Extended Dura chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) detektiert. Gleiche Anteile Luminol/Enhancer Lösung und feste Peroxid Lösung wurden unmittelbar vor der Verwendung gemischt. Ausreichend Arbeitslösung wurde hergestellt, um den Blot vollständig zu bedecken - mindestens aber 0,125ml/cm². Die Membran wurde mit der Super Signal Substrat Arbeitslösung 5 Minuten lang inkubiert. Das Signal wurde mit dem Fluor-S Multi Imager (Bio-Rad Laboratories Ltd. Herts, UK) detektiert.

2.6.3 Stripping:

15 ml Stripping Puffer +15 µl von 1M DTT (Stock Solution) wurde für eine Dauer von 15 Minuten verwendet.

2.7 Immunhistochemie

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd 10 Minuten lang fixiert. Dann wurden sie in 0,5% Triton etwa 20 Minuten lang permeabilisiert und mit 10% FCS geblockt. Daran schloss sich die Inkubation mit dem primären Antikörper/10% FCS für eine Dauer von 90 Minuten unter leichter Bewegung an.

Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden sie mit dem sekundären Antikörper/10% FCS 30 Minuten lang in Folie verpackt inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in der Abb. 2.6 wiedergegeben. Im Anschluss daran wurde erneut mit PBS gewaschen.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte während des ersten Waschvorgangs mit 0,5µg/ml DAPI.

Tab. 2.6: *Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfärbung*

Anti β3 (Hamster) 1/100 in 10% FCS/PBS	Für die β3 Färbung 1/100 Alexafluor 488 (grün) anti-Hamster IgG
Anti Calcitonin Rezeptor (Ziege) 1/200 in 10%FCS/PBS	Für die CTR Färbung 1/100 Alexafluor 594 anti-Ziege IgG

Histochemie

2.7.1 Tartrat-resistente alkalische Phosphatase (TRAP) Färbung:

Die Zellen wurden 2 Mal vor und 3 Mal nach der Fixation in 4% Formaldehyd je 5 bis 10 Minuten gewaschen.

Folgende Lösungen wurden in Glasgefäßen gemischt:

Lösung 1

150ul Naphtol-AS-BI-Phosphate stock	150µl
750ul Veronal Puffer	750µl
900ul Azetat Puffer	450µl
900ul Azetat Puffer mit 100mM Tartrat	1.35ml

Lösung 2

120ul Pararosanilin
120ul NaNO₂ (4%)

Anschließend wurden die Lösungen 1 und 2 gemischt und zu den fixierten Zellen gegeben. Eine Inkubation von 45-60 Minuten bei 37°C folgte. Die Zellen wurden dann mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 70% Ethanol gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl von hCYR61 beeinflussten Genprodukten

Dieser Untersuchung vorausgegangen war eine Array- Analyse der Wirkung von hCYR61 auf einem knochenspezifischen Chip mit 1000 Genen, durchgeführt von der Arbeitsgruppe Prof. Adamski (GSF München). Eine geringe Anzahl regulierter Gene von hCYR61 konnte reproduzierbar beobachtet werden und wurde mittels RT-PCR von dieser Arbeitsgruppe bestätigt. Einige dieser Kandidaten wurden dann für die Untersuchung der Wirkungen der verschiedenen Domänen auf hFOB- Zellen (humane fetale Osteoblasten) ausgewählt.

3.2 Überprüfung der Kandidaten und Konzentrationsreihe

Zunächst wurde der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) als Standard überprüft. Bei diesem handelt es sich um ein gängiges Housekeeping Gene in Zellkulturen, da dieses Protein in vielen zellulären Prozessen beteiligt ist und eine geringe Variabilität der Expression aufweist. Hierzu wurden hFOB-Zellen mit Konzentrationen von 50 und 1000 ng/ml hCYR61 stimuliert und dann das Genprodukt von EF1 α gemessen. Dann wurden die in Frage kommenden Kandidaten getestet. Hierbei wurden hFOB-Zellen ohne, mit einer Konzentration von 50ng/ml und 1000ng/ml stimuliert

Auf der folgenden Abbildung sieht man die Gelelektrophorese einer RT-PCR. Es wird die Stimulation der Expression verschiedener Signalproteine durch zwei Konzentrationen von hCYR61 (50 und 1000ng/ml) in hFOB- Zellen dargestellt. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

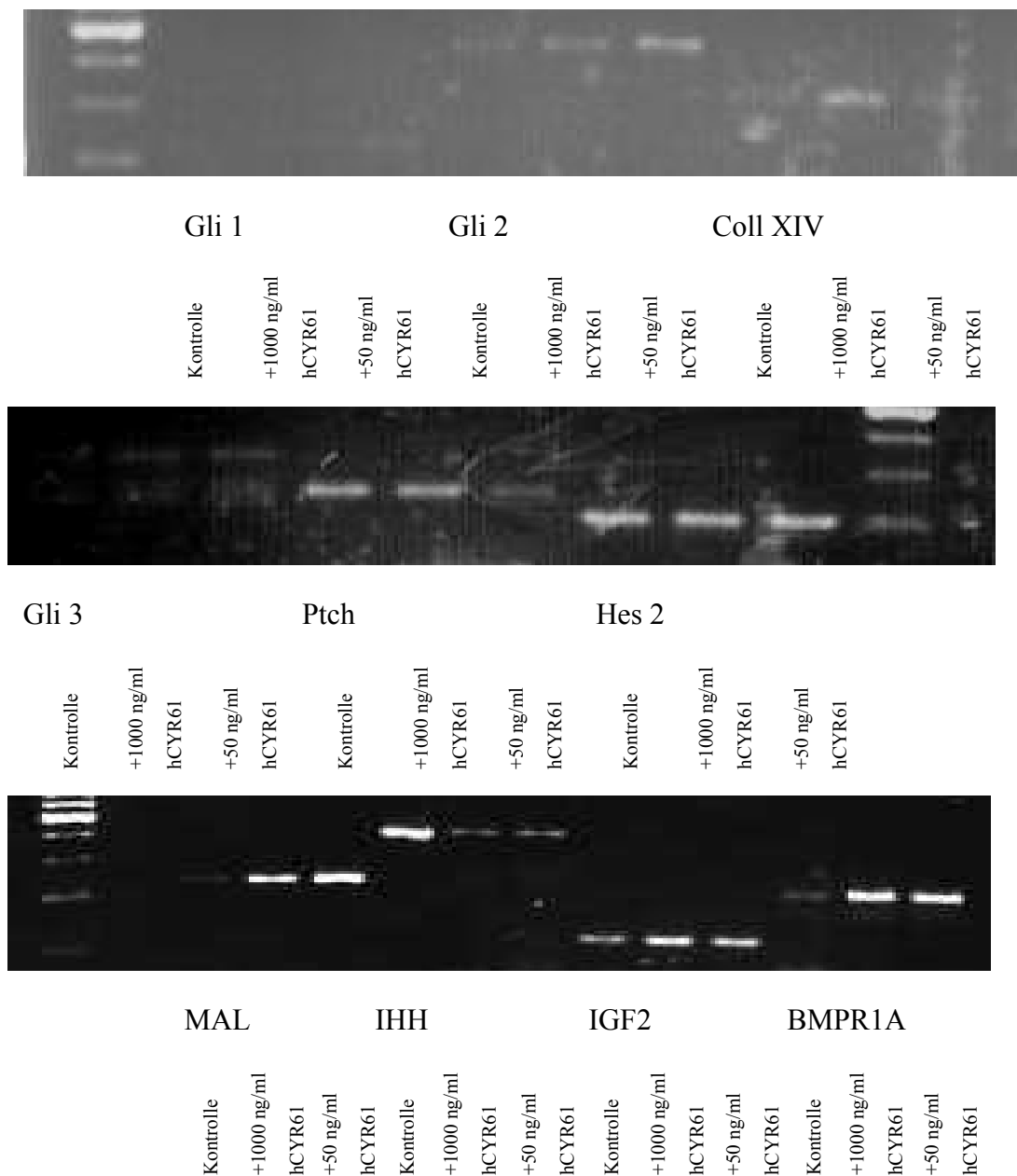


Abb.3.2.1: Stimulation der Expression verschiedener Signalproteine durch zwei Konzentrationen von hCYR61 (von 50 und 1000 ng/ml) in hFOB Zellen für eine Stunde.

Die Ergebnisse dieses ersten Versuches zeigten einen Effekt von hCYR61 auf die Expression der verschiedenen mRNA Spezies. So deuteten die Banden bei Gli2, Gli3, Mal, IGF2 und BMPR1A auf eine deutliche und bei Collagen XIV auf eine geringe Steigerung der Expression. Bei Ihh und möglicherweise bei Ptch zeigte sich eine Verringerung der Expression. Gli1 und HES2 erschienen nicht reguliert. Im folgenden Hauptversuch sollte dann untersucht werden, welche Domänen für die Effekte verantwortlich gemacht werden können und ob diese Ergebnisse überhaupt reproduzierbar wären.

Zunächst wurde eine Konzentration mit einer deutlichen Wirkung für die Versuchsreihe gesucht. Dazu wurden die hFOB-Zellen mit Dosierungen von 50 – 1000 ng/ml hCYR61 stimuliert. Als Standard wurde der Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) gewählt. Dieser Versuch ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

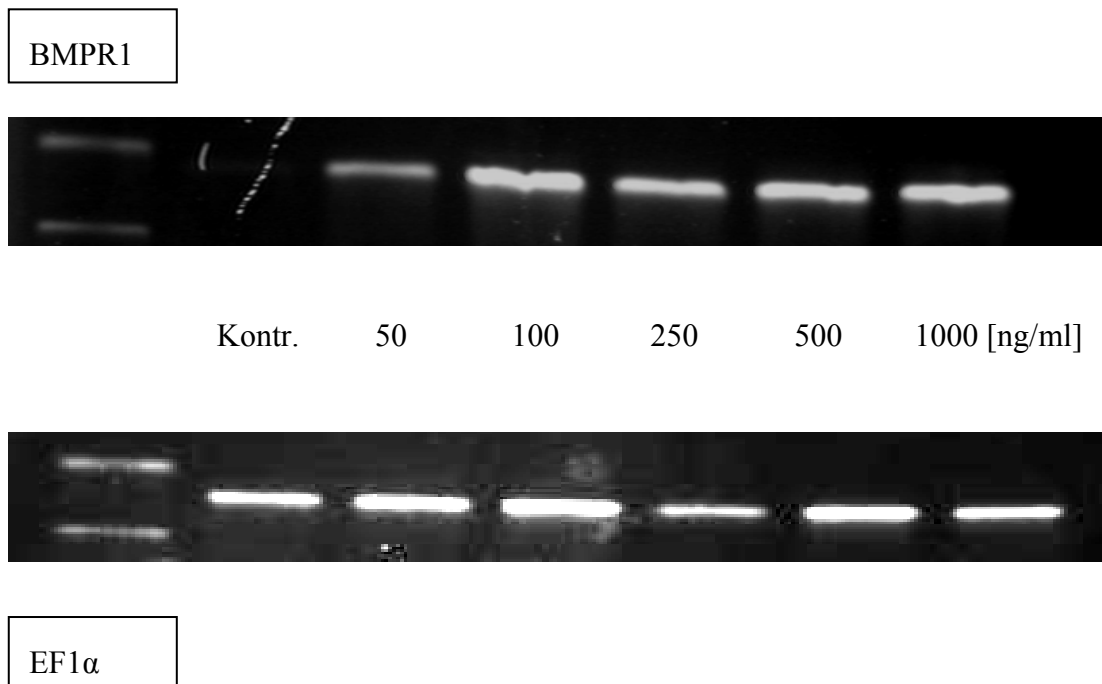


Abb.3.2.2: Stimulation der Expression von BMPR1A in hFOB Zellen durch Konzentrationen von hCYR61 zwischen 50 und 1000 ng/ml. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in den anderen untersuchten Primern (nicht abgebildet). So konnte die Hochregulation von Gli2, Gli3, Mal, Collagen XIV und BMPR1A bestätigt werden. Im Gegensatz zum ersten Versuch zeigte sich bei Patched diesmal eine deutliche Steigerung, bei HES2 eine geringe Steigerung ab 500 ng/ml hCYR61. Das Housekeeping Gene β -Aktin wurde als zusätzlicher Standard mit in die Versuchsreihe aufgenommen.

3.3 Funktion nach Einfrieren und Auftauen

Im nächsten Versuch wurde der Einfluss der Temperatur auf die Wirkung von hCYR61 untersucht. Hierbei stand die Fragestellung im Mittelpunkt, ob es möglich ist das Protein zu lagern. So wurde hCYR61 24 Stunden bei +4°C und bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurden hFOB-Zellen damit stimuliert. Als Kontrolle diente wieder EF1 α .

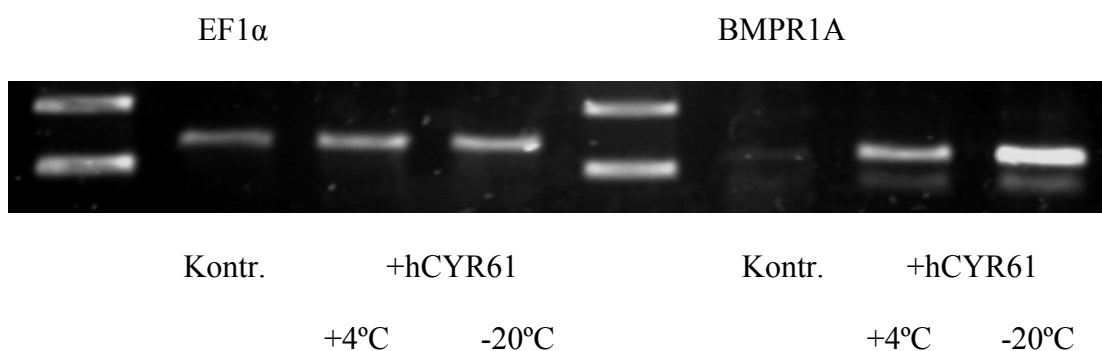


Abb.3.3: Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB Zellen durch hCYR61 (100ng/ml) welches zuvor 24h bei +4°C oder -20°C gelagert wurde. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

In der Abb. 3.3 sieht man die Gelelektrophorese einer PCR mit den Primern BMPR1A und EF1 α . Im Vergleich zu EF1 α ist ein deutlicher Effekt durch BMPR1A auch nach der Lagerung bei +4°C und -20°C sichtbar.

3.4 Identifikation der Funktionsdomänen

Nach der Auswahl der Primer und der Konzentration von hCYR61 in den vorangegangenen Versuchen wurden die Effekte des Gesamtproteins und der unterschiedlichen Konstrukte der verschiedenen Domänen untersucht. Dazu wurden Gli 2 und 3, Patched, MAL, BMPR1A und die Housekeeping Gene EF1 α und β -Aktin ausgewählt. Dieser Versuch wurde insgesamt sechs Mal (vier Mal für HES2) durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. (Die Stimulation mit der Domäne I+Start, sowie Domäne IV erfolgte nur in 2 Versuchen) Im weiteren Verlauf wird je ein typisches Gel einer mRNA Spezies mit dem dazugehörigen Standard abgebildet. In den Diagrammen

wird der Mittelwert der Intensität der einzelnen Banden dargestellt. Diese wurde mit denen des Standards EF1 α abgeglichen und die Kontrolle gleich 1 gesetzt. Des Weiteren findet sich die Standardabweichung der verschiedenen Mittelwerte.

3.4.1 Gli 2

Bei Gli 2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor im Indian Hedgehog Signalweg. Die folgende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese einer RT-PCR der Stimulation von Gli2 durch hCYR61, einzelne Domänen und deren Kombinationen.

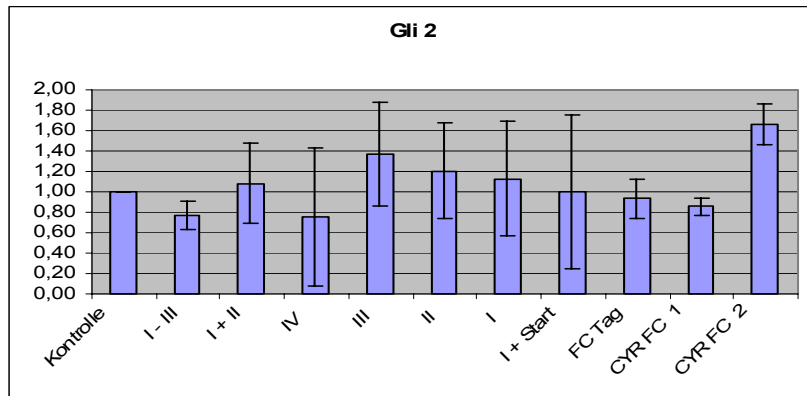
Gli 2



EF1 α

Abb. 3.4.1: Stimulation der Expression von Gli2 und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Während sich im Vorversuch noch eine deutliche Heraufregulation unter Stimulation mit hCYR61 gezeigt hatte, ließ sich diese in der Folge nicht mehr eindeutig nachweisen. In zwei Versuchen kamen zwei verschiedene Chargen von hCYR61 zum Einsatz, wobei sich einmal eine deutliche Steigerung zeigte. Die andere aber und die vier folgenden Versuche mit wechselnden Chargen von hCYR61 – konnten diesen Effekt im Vergleich zur Kontrolle nicht bestätigen. Insgesamt war die Schwankung der verschiedenen Ergebnisse sehr groß und zeigte kein eindeutiges Muster.

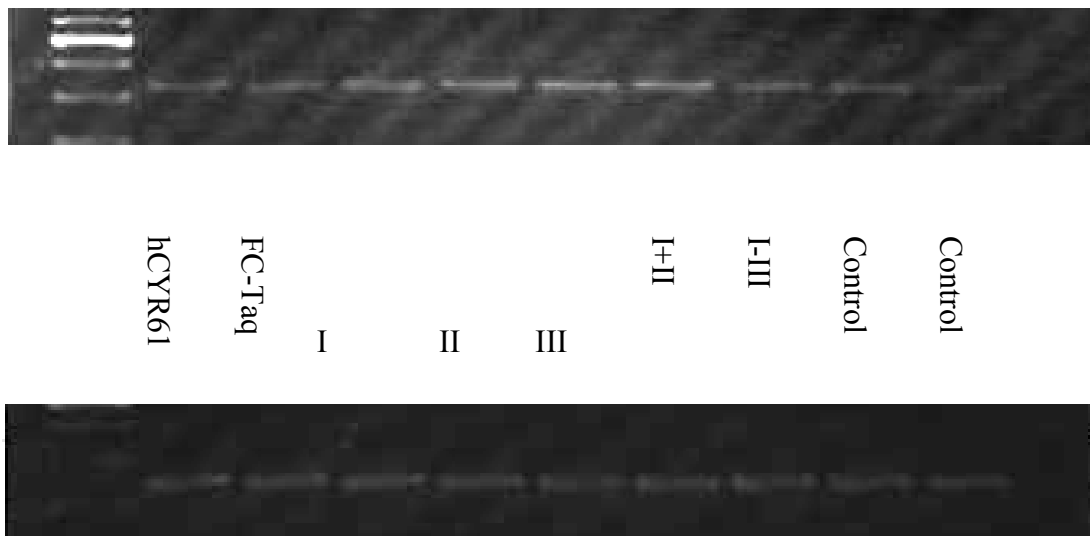


3.4.2 Abb. 3.4.1: Stimulation der Expression von Gli2 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)

3.4.2 Gli 3

Auch bei Gli 3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor im Indian Hedgehog Signalweg. In der folgenden Abbildung wird die Gelelektrophorese einer RT-PCR der Stimulation von Gli3 durch hCYR61, einzelne Domänen und deren Kombinationen gezeigt..

Gli3



EF1 α

Abb. 3.4.2: Stimulation der Expression von Gli3 und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Auch hier konnte die im Vorversuch gesehene Stimulation nicht gezeigt werden. Im Gegensatz zum Vorversuch führten auch die Kontrollen sowie der FC-Taq als interner Vergleich zu einem starken Signal. Eine verstärkte Stimulation durch eine einzelne Domäne ließ sich nicht ausmachen. Insgesamt erfolgte die Stimulation durch alle Konstrukte in etwa gleicher Höhe wie durch das Gesamtprotein.

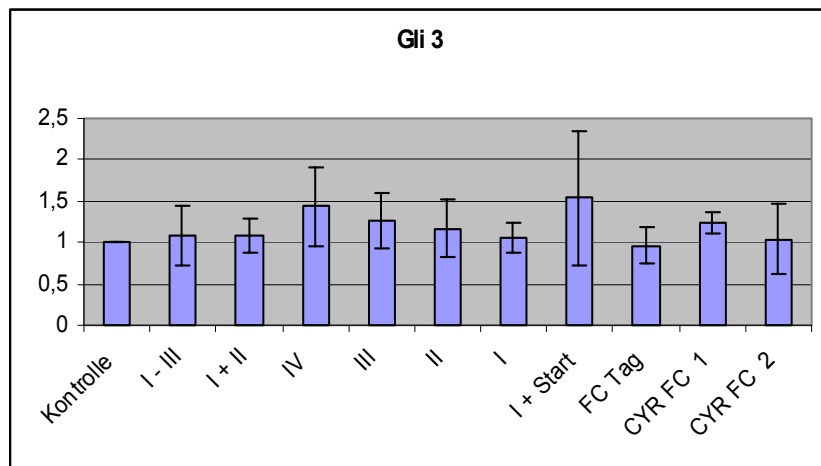
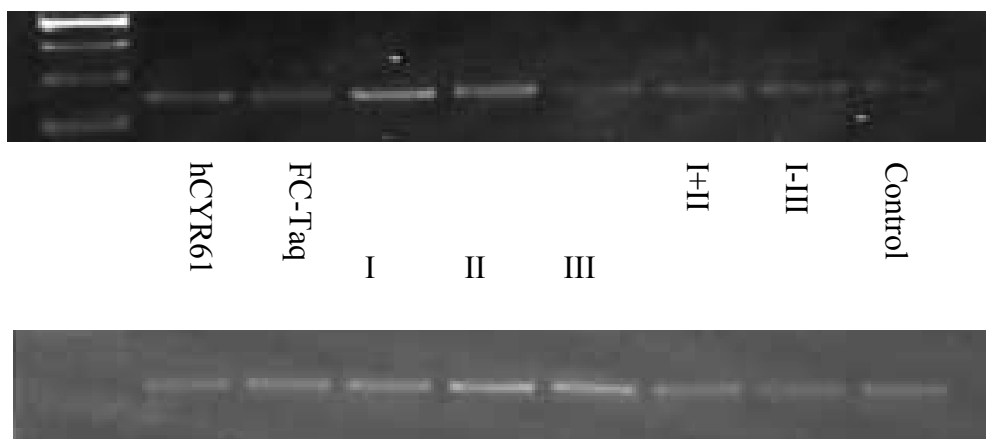


Abb. 3.4.2: Stimulation der Expression von Gli3 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)

3.4.3 Patched

Bei Patched handelt es sich auch um ein Signalmolekül im Indian Hedgehog Signalweg. In der folgenden Abbildung wird die Gelelektrophorese einer RT-PCR der Stimulation von Patched durch hCYR61, verschiedene Domänen und deren Kombinationen gezeigt.

Patched



EF1 α

Abb. 3.4.3: Stimulation der Expression von Patched und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Patched zeigte schon in den Vorversuchen keine eindeutigen Ergebnisse. Zum Teil ließ sich aber eine deutliche Stimulation erkennen, die zusammen mit den anderen Effekten auf diesem Signalweg zur Aufnahme in den Hauptversuch geführt hat. Auch hier zeigen die Ergebnisse eine große Varianz, wie aus dem Diagramm 3.4.3 ersichtlich wird.

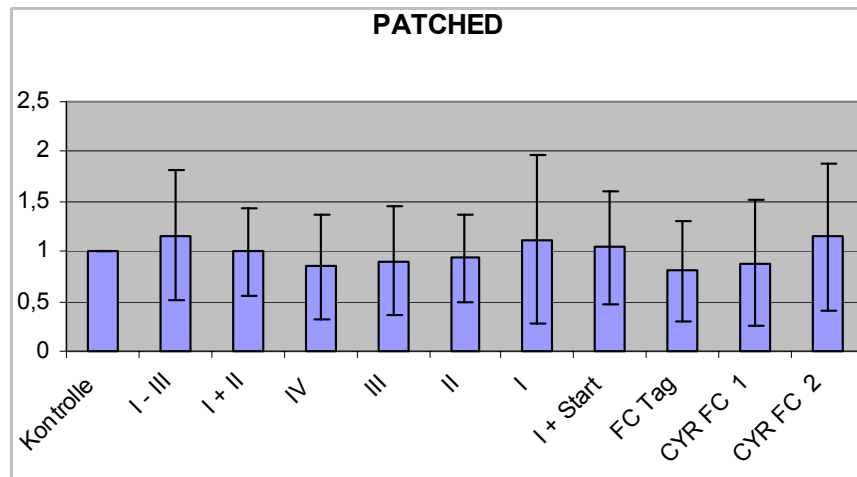


Abb. 3.4.3: Stimulation der Expression von Patched in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)

3.4.4 MAL

Bei Mal handelt es sich um einen Ko-Aktivator im Signalweg des SRF (Serum Response Faktor), der Einfluss auf das Zellwachstum, die Proliferation, Differenzierung und die Regulation des Zytoskeletts hat. Die folgende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese einer RT-PCR der Stimulation von MAL durch hCYR61, einzelne Domänen und deren Kombinationen.

MAL



EF1 α

Abb. 3.4.4: Stimulation der Expression von Mal und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Obwohl sich in den Vorversuchen auch hier eine eindeutige Steigerung der Expression gezeigt hatte, konnte diese im Hauptversuch nicht bestätigt werden. Die Banden des Gesamtproteins zeigten häufig die gleichen Intensitäten wie die internen Standards. Einen Effekt durch eine einzelne Domäne, wie in dem Gel oben abgebildet, ließ sich nicht reproduzieren.

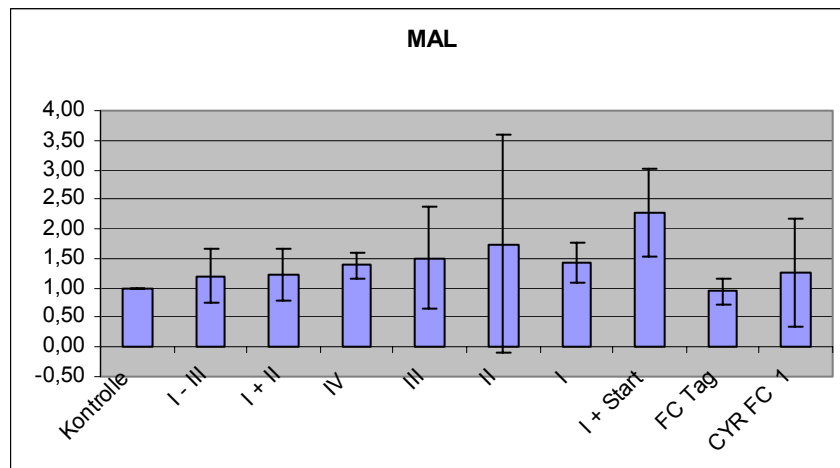
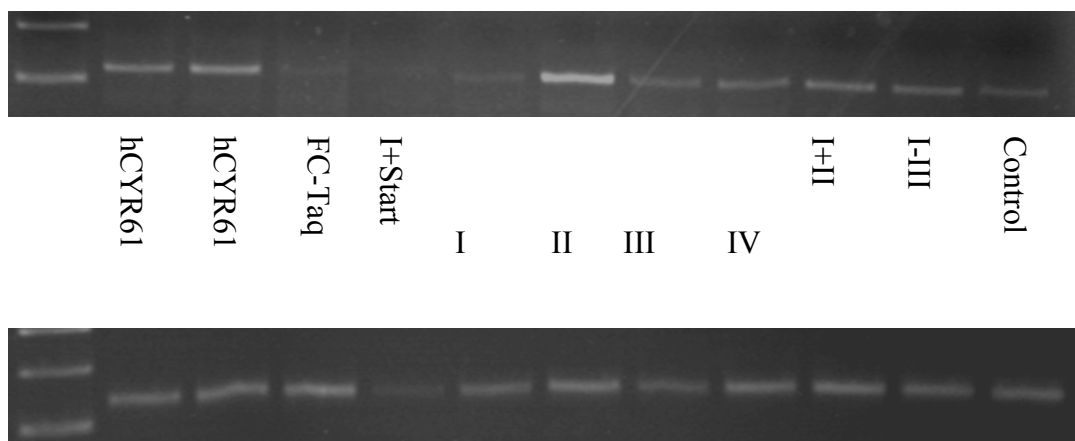


Abb. 3.4.4: Stimulation der Expression von MAL in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)

3.4.5 BMPR1A

Der Bone Morphogenic Protein Signalweg hat eine große Bedeutung für das Aufrechterhalten der Homöostase des Knochens und wird für die Frakturheilung benötigt. Diese Wirkung wird unter anderem durch den Rezeptor BMPR1A vermittelt. Die folgende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese einer RT-PCR. Dargestellt ist die Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen.

BMPR1A



EF1 α

Abb. 3.4.5: Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen von hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Die Abb. 3.4.5 zeigt eine Elektrophorese einer PCR mit den Primern BMPR1A und EF1 α . Hier wurden hFOB-Zellen mit hCYR61 und verschiedenen Konstrukten der unterschiedlichen Domänen stimuliert. Man erkennt hier eine Stimulation durch das Gesamtprotein und auch durch die Domäne II. Diese Ergebnisse konnten leider nicht im Verlauf der Experimente bestätigt werden. Auch hier fanden wir eine große Varianz und somit keine signifikanten Ergebnisse vor.

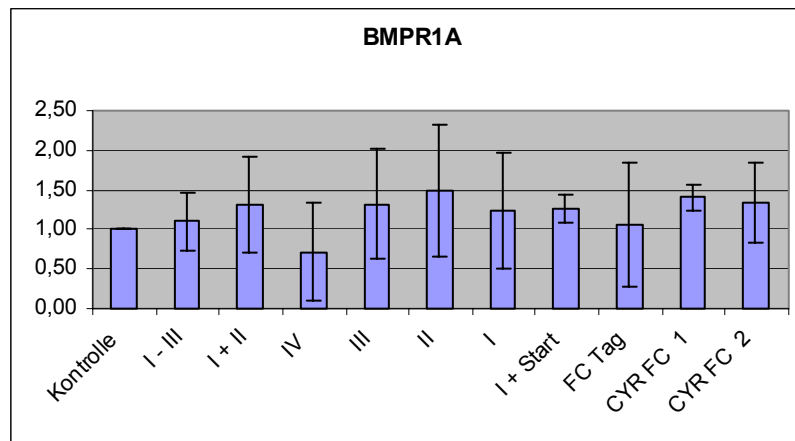
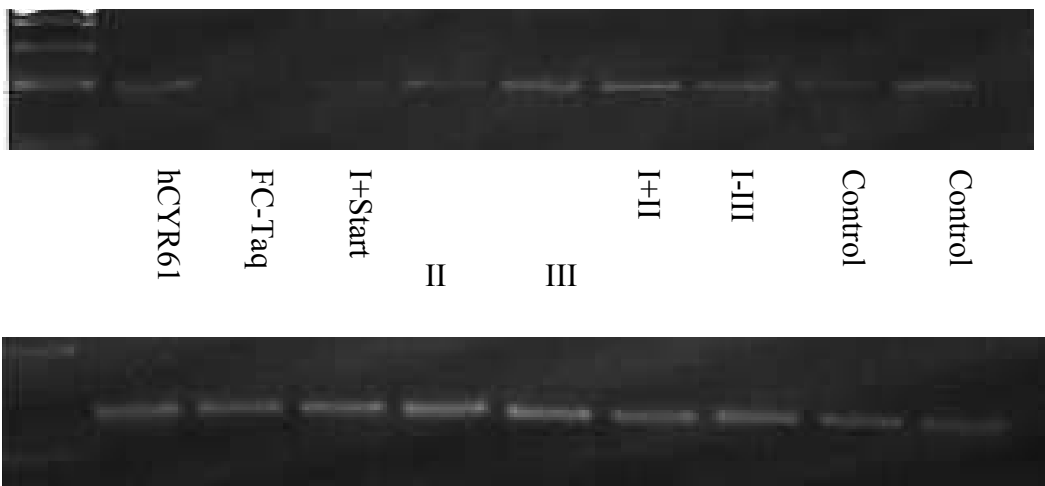


Abb. 3.4.5: Stimulation der Expression von BMPR1A in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)

3.4.6 HES 2

HES 2 ist ein Mitglied des Notch Signalweges. Dieser hat eine inhibitorische Wirkung auf die Entwicklung und Differenzierung von Osteoblasten, Osteoklasten und im postnatalen Knochen. Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition der Osteoblastendifferenzierung über die HES und HEY Familie vermittelt wird. Die folgende Abbildung zeigt die Gelelektrophorese einer RT-PCR. Dargestellt ist die Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen.

HES2



Efl α

Abb. 3.4.6: Stimulation der Expression von HES2 und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten nur eine sehr schwache Intensität der Banden. Auch konnte keine stimulatorische Wirkung des Gesamtproteins im Vergleich zu der Kontrolle nachgewiesen werden. Dazu kam noch eine große Varianz der anderen untersuchten Domänen.

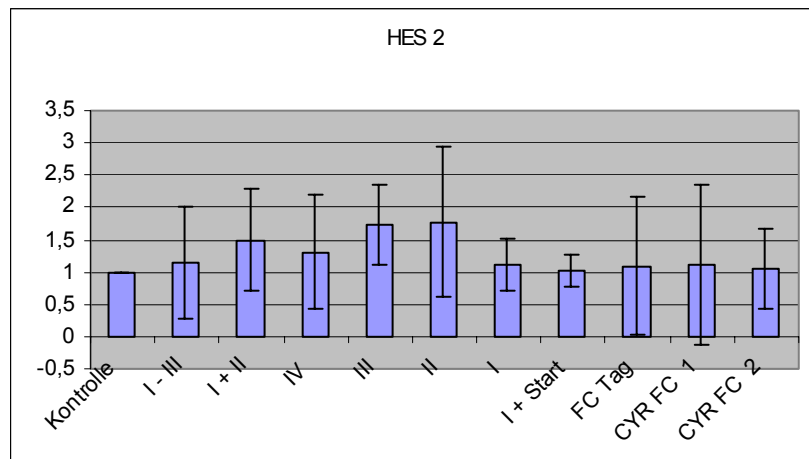


Abb. 3.4.6: Stimulation der Expression von HES2 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=4, hCYR FC2 n=2)

3.5 Effekt von hCYR61 auf murine RAW264.7 Makrophagen mittels Western Blot.

Osteoklasten Vorläuferzellen (RAW264 Makrophagen) wurden mit oder ohne rekombinantes hCYR61 gleichzeitig oder vor der Stimulation mit RANKL und TNF α behandelt. Die Zellextrakte wurden vorbereitet und mittels Western Blot die großen Signaltransduktionswege der RANKL abhängigen Osteoklastendifferenzierung (I κ B, JNK, ERK1/2, p38) und des -überlebens (S6Kinase, AKT) untersucht. (Abb. 3.5.1). Die Untersuchung des Gesamtproteins und der phosphorylierten (aktiven) Kinasen folgte.

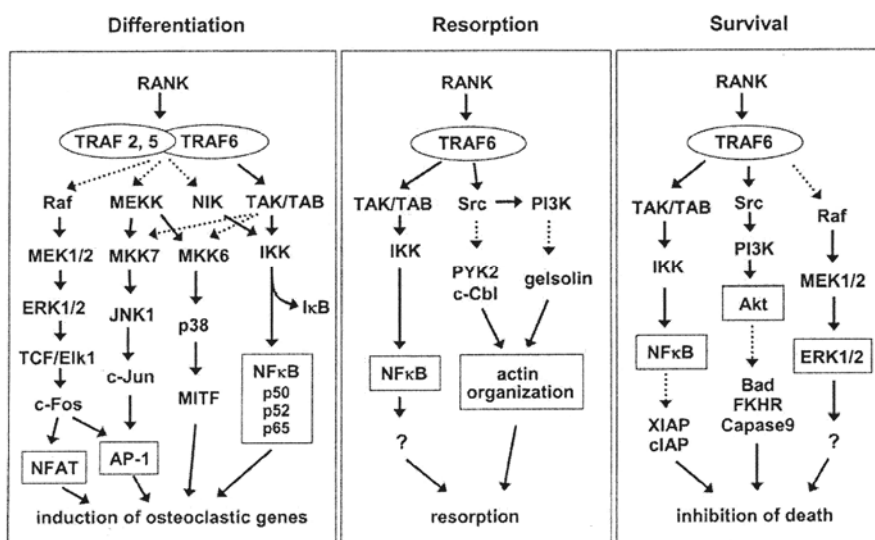


Abb. 3.5.1: Die Hauptsignalwege von RANK in der Differenzierung, Resorption und dem Überleben des Osteoklasten.
 Z.H.Lee, H.-H.Kim /Biochemical and Biophysical Research Communications 305 (2003) 211-214

Zum Teil wurde auch auf das Housekeeping Gen Tubulin als Standard zurückgegriffen, da die Aussagekraft der totalen Kinasen auf denselben Blots nach Stripping eingeschränkt war. Die RAW264.7 Zellen wurden nach der Konfluenz mittels eines Schabers vom Boden einer 75cm²-Zellkulturflasche gelöst. 4 x 10⁵ Zellen wurden pro 12-Loch-Platte ausgesät und mit 1ml Medium versorgt. Am zweiten Tag wurden die Zellen mit hCYR61 (1000ng/ml) 24 Stunden lang vorbereitet - inklusive einer serumfreien Periode von 3 Stunden. Die Zellen wurden mit RANKL oder TNF α 5, 10 und 20 Minuten inkubiert. RANKL wurde in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF in einer Konzentration von 1/1000 verwendet. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen lysiert und zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des Bradford Protein Assays ermittelt und es wurde ein entsprechendes Volumen für 50 μ g Protein eingesetzt.

Zunächst wurde ein Versuchsaufbau mit einer Vorbehandlung durch hCYR61 von 24 Stunden gewählt. Nachdem hierbei keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde der Versuchsaufbau zu Gunsten der gleichzeitigen Stimulation von hCYR61 und TNF α oder RANKL geändert.

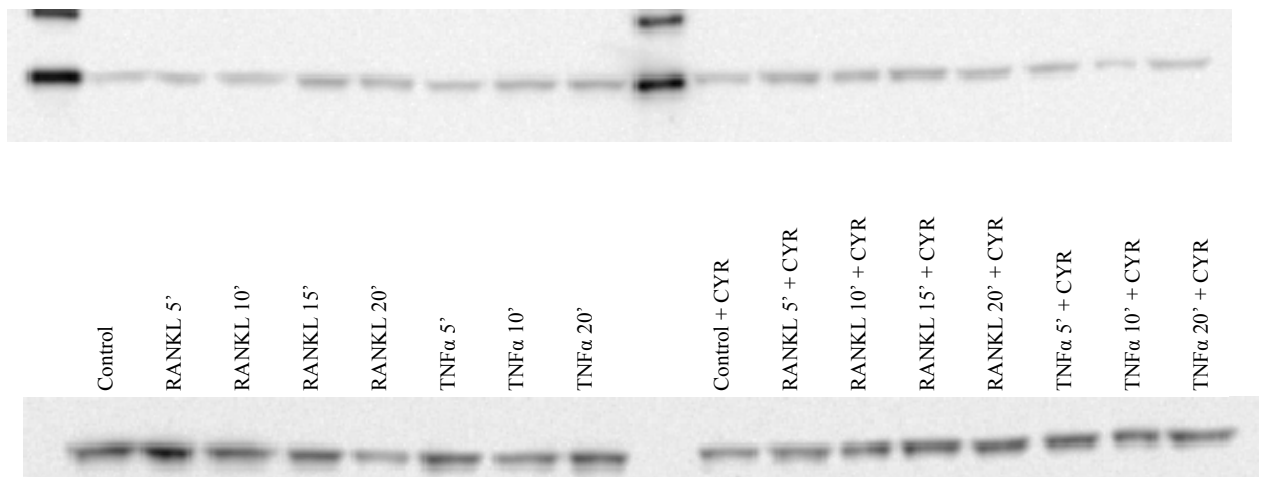
3.6 Vorbehandlung mit hCYR61 von 24 Stunden

Die RAW264.7 Makrophagen wurden mit RANKL und TNF α stimuliert, nachdem sie 24 Stunden mit oder ohne hCYR61 kultiviert worden waren. Die Intensität der einzelnen Banden wurde mittels Densitometrie gemessen. Die phosphorylierten (aktiven) Kinasen wurden mit den totalen Kinasen verglichen. In vier Wiederholungen zeigten sich keine reproduzierbaren Ergebnisse. Ein Beispiel für jeden untersuchten Signalweg wird in den Abbildungen 3.6.1 bis 3.6.5 gezeigt.

3.6.1 P38

Die Abb. 3.6.1 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die Banden der phosphorylierten Kinase P38 und der totalen Kinase P38 bei 43kDA. Die Zellen der rechten acht Banden wurden 24 Stunden lang mit 1000ng/ml hCYR61 stimuliert. Die Zellen wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF α in einer Konzentration von 1/1000 5, 10 und 20 Minuten inkubiert.

Phospho- P38



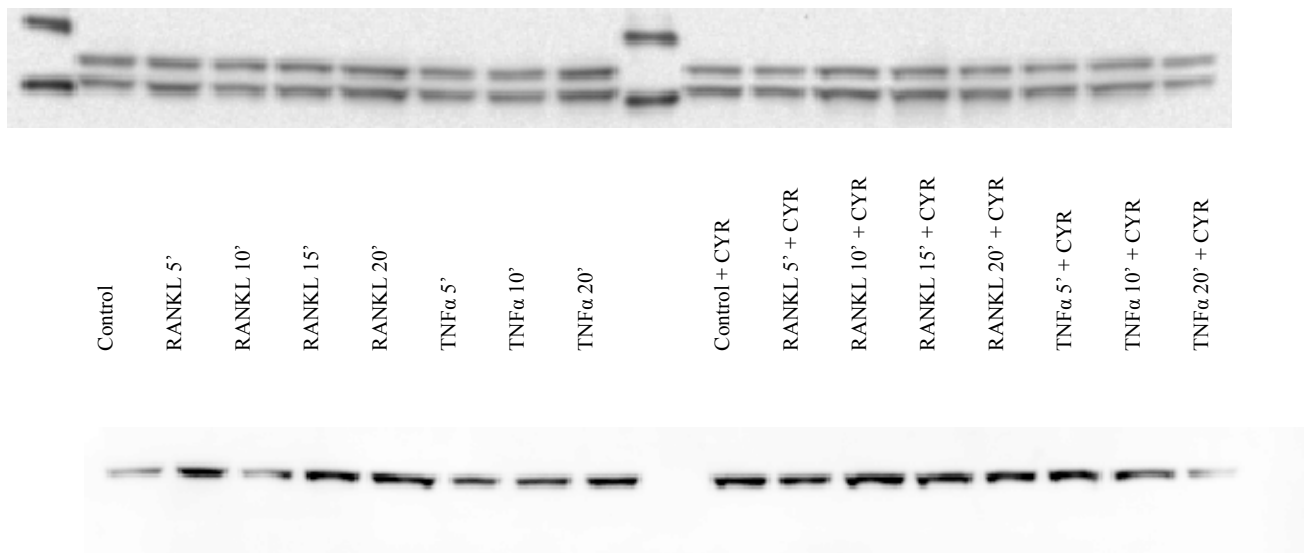
Total p38

Abb. 3.6.1: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase P38 mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.

3.6.2 ERK 1/2 (MAPK 1/2)

Die Abb. 3.6.2 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die typischen Doppelbanden der phosphorylierten Kinase ERK1/2 (p42/44) bei 42/44kDA. Als Standard wurde Tubulin verwendet. Die Zellen der rechten acht Banden wurden 24 Stunden lang mit 1000ng/ml hCYR61 stimuliert. Die Zellen wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF α in einer Konzentration von 1/1000 5, 10 und 20 Minuten inkubiert.

Phospho-ERK1/2



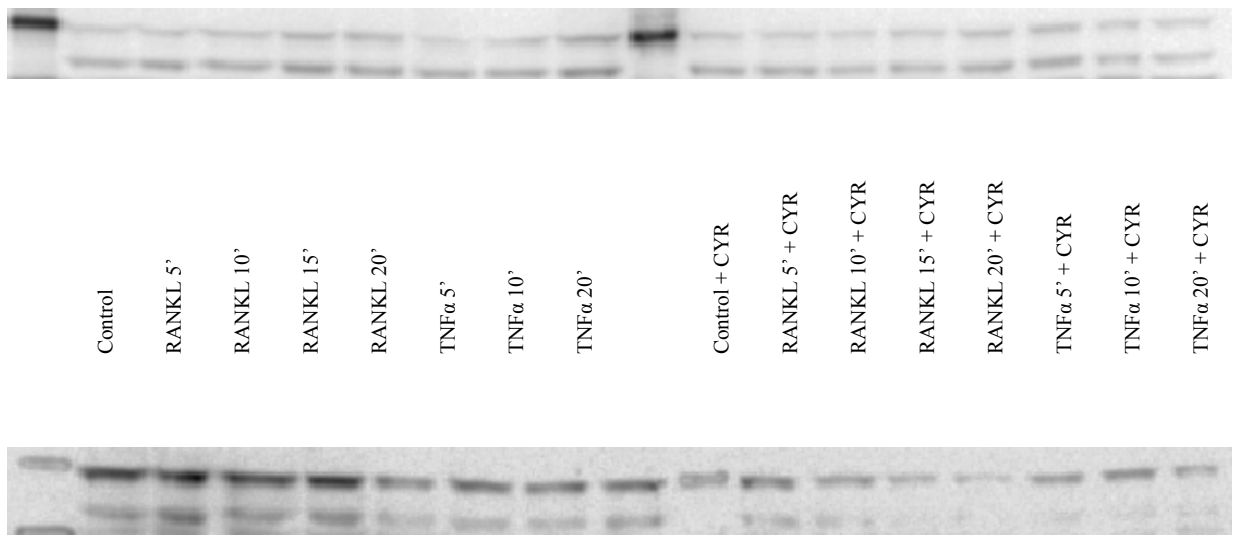
Tubulin

Abb. 3.6.2: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte Kinase ERK 1/2 und das House Keeping Gen Tubulin mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.

3.6.3 JNK

Die Abb. 3.6.3 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die typischen Doppelbanden der phosphorylierten und der totalen Kinase JNK bei 46/54kDA. Die Zellen der rechten acht Banden wurden 24 Stunden lang mit 1000ng/ml hCYR61 stimuliert. Die Zellen wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF α in einer Konzentration von 1/1000 5, 10 und 20 Minuten inkubiert.

Phospho-JNK



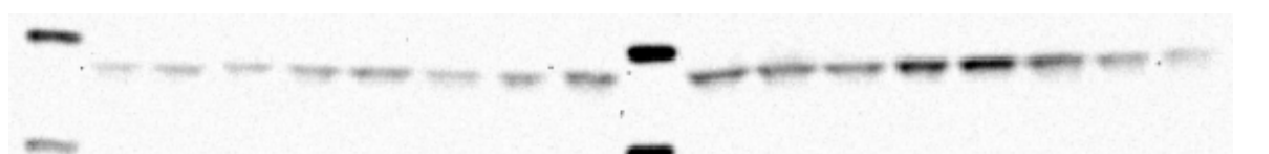
TotalJNK

Abb. 3.6.3 Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase JNK mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.

3.6.4 I κ B

Die Abb. 3.6.4 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die typischen Banden der phosphorylierten und der totalen Kinase I κ B bei 72kDA. Die Zellen der rechten acht Banden wurden 24 Stunden lang mit 1000ng/ml hCYR61 stimuliert. Die Zellen wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF α in einer Konzentration von 1/1000 5, 10 und 20 Minuten inkubiert.

PhosphoI κ B



Control
RANKL 5'
RANKL 10'
RANKL 15'
RANKL 20'
TNF α 5'
TNF α 10'
TNF α 20'
Control + CYR
RANKL 5' + CYR
RANKL 10' + CYR
RANKL 15' + CYR
RANKL 20' + CYR
TNF α 5' + CYR
TNF α 10' + CYR
TNF α 20' + CYR

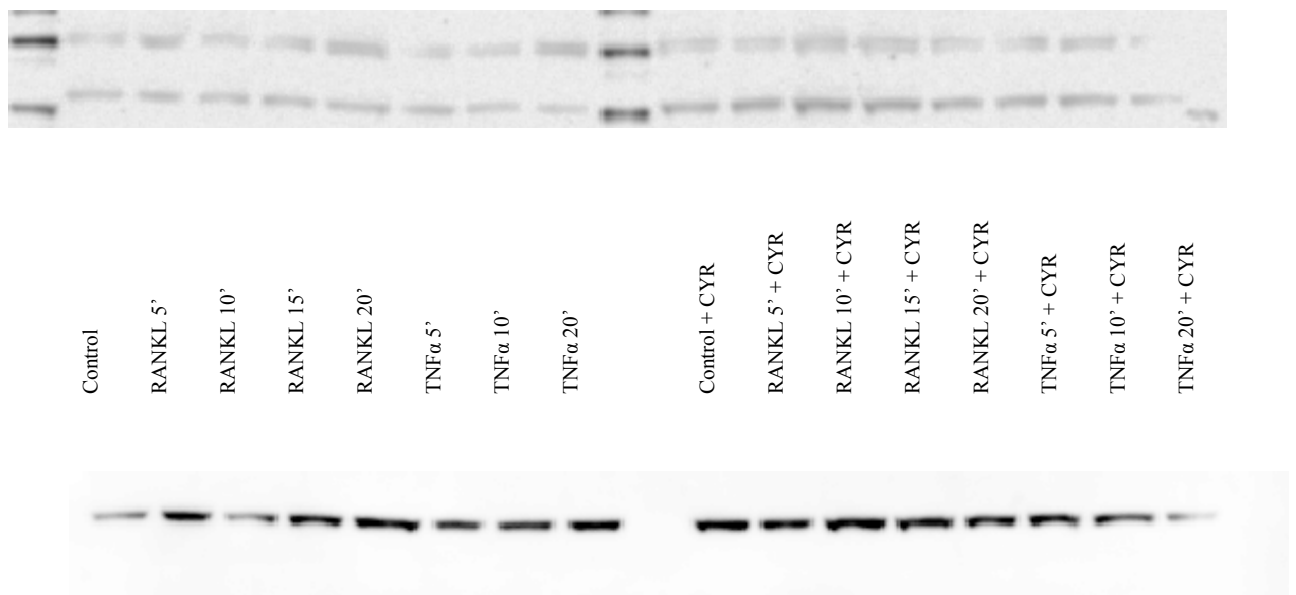
TotalI κ B

Abb. 3.6.4: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase I κ B mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.

3.6.5 S6-Kinase

Die Abb. 3.6.5 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die Banden der phosphorylierten Kinase S6. Als Standard wurde Tubulin verwendet. Die Zellen der rechten acht Banden wurden 24 Stunden lang mit 1000ng/ml hCYR61 stimuliert. Die Zellen wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml und TNF α in einer Konzentration von 1/1000 5, 10 und 20 Minuten inkubiert.

PhosphoS6Kinase



Tubulin

Abb. 3.6.5: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte Kinase S6Kinase und das House Keeping Gen Tubulin mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.

3.7 Gleichzeitige Stimulation mit hCYR61

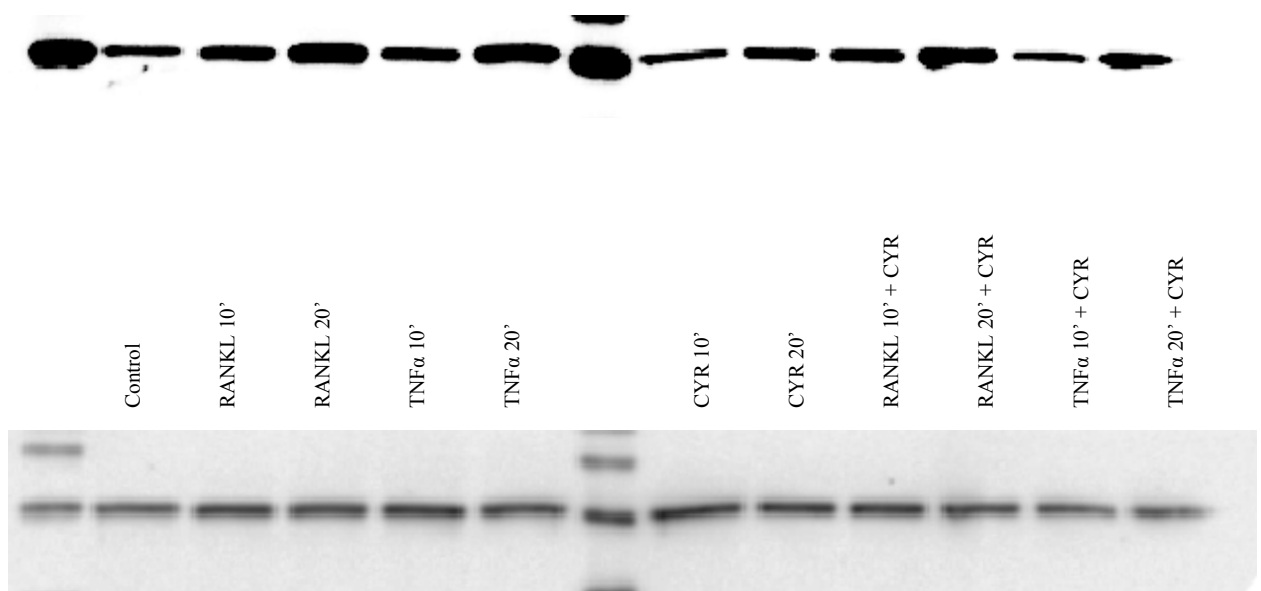
Die RAW264.7 Makrophagen wurden mit RANKL und TNF α allein oder gleichzeitig mit hCYR61 stimuliert. Die Intensität der einzelnen Banden wurde mittels Densitometrie gemessen. Die Antwort der phosphorylierten Kinase p38 auf RANKL und TNF α lässt sich in der Abb. 3.7.1. und 3.7.2 erkennen. Während sich eine deutliche Abnahme unter der Behandlung von RANKL und hCYR61 erkennen ließ, waren die Ergebnisse für TNF α and hCYR61 nicht konsistent.

Interessanterweise zeigte sich ein Effekt von hCYR61 auf p38. Die Abbildungen 3.7.1, 3.7.2 und das Diagramm 3.7 zeigen eine Zunahme der phosphorylierten Kinase p38.

3.7.1 p38

Die Abb. 3.7.1 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die Banden der phosphorylierten und der totalen Kinase P38 bei 43kDA. Die Zellen links des Markers wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml oder TNF α in einer Konzentration von 1/1000 10 und 20 Minuten inkubiert. Rechts des Markers wurden die Zellen zusätzlich mit hCYR61 in einer Konzentration von 1000ng/ml für 10 oder 20 Minuten stimuliert.

p38



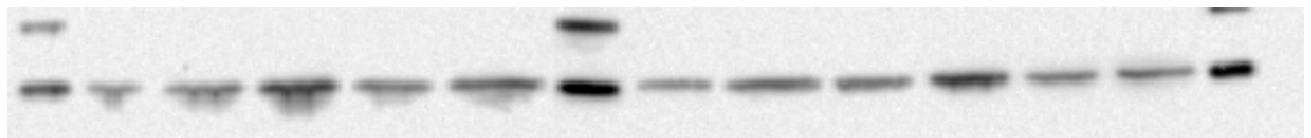
Total-p38

Abb. 3.7.1: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase p38 mit und ohne gleichzeitige Behandlung mit hCYR61.

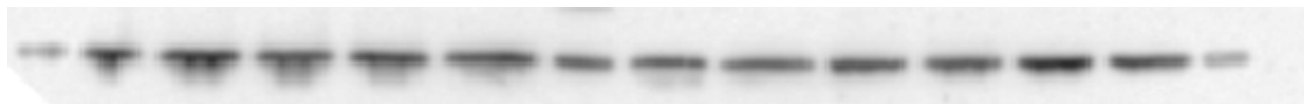
3.7.2 p38

Die Abb. 3.7.2 zeigt einen Western Blot von RAW264.7 Zellen. Man sieht die Banden der phosphorylierten und der totalen Kinase P38 bei 43kDA. Die Zellen links des Markers wurden mit RANKL in einer Konzentration von 100ng/ml oder TNF α in einer Konzentration von 1/1000 10 und 20 Minuten inkubiert. Rechts des Markers wurden die Zellen zusätzlich mit hCYR61 in einer Konzentration von 1000ng/ml für 10 oder 20 Minuten stimuliert.

Phospho-p38



Control RANKL 10' RANKL 20' TNF α 10' TNF α 20' CYR 10' CYR 20' RANKL 10' + CYR RANKL 20' + CYR TNF α 10' + CYR TNF α 20' + CYR



Total p38

Abb. 3.7.2: Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase p38 mit und ohne gleichzeitige Behandlung mit hCYR61.

Die densitometrische Analyse der Western Blots 3.7.1 und 3.7.2 in dem folgenden Diagramm zeigt die typische, zeitabhängige Zunahme der Menge von phosphoryliertem P38 unter der Stimulation mit RANKL und TNF α . Diese fällt unter der Costimulation mit hCYR61 insbesondere bei RANKL deutlich geringer aus. Interessanterweise scheint hCYR61 allein auch eine Zunahme zu bewirken.

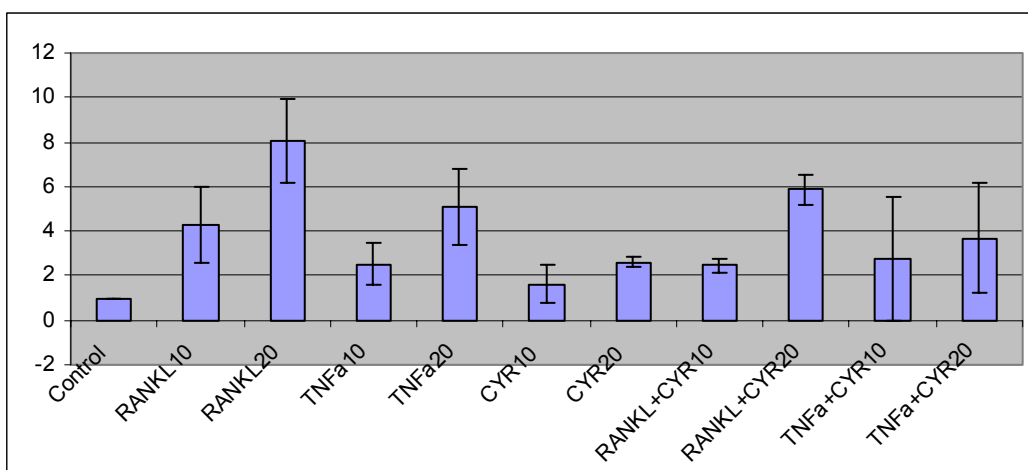


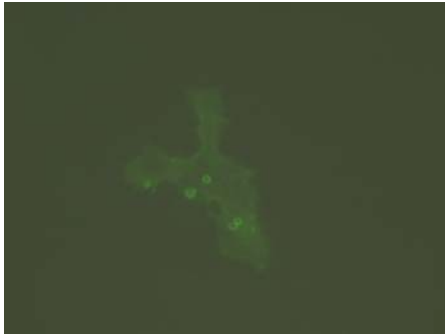
Abb. 3.7.3: Diagramm der densitometrischen Analyse der Blots 3.7.1 and 3.7.2 bezogen auf total p38 und auf die Kontrolle.

3.8 Effekt von hCYR61 auf die Proliferation von murinen Knochenmarksmakrophagen mittels Immunhistochemie

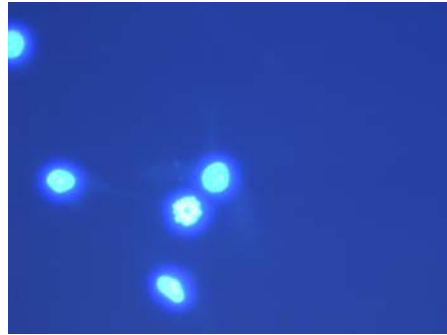
Die M-CSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus wurden mit 25ng/ml M-CSF, 100ng/ml RANK-L und 1000ng/ml hCYR61 kultiviert. Der Effekt von hCYR61 wurde mittels der Osteoklastenmarkerproteine Calcitonin Rezeptor und dem Integrin $\alpha\beta 3$ untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Die Zellkultur von immungefärbten, M-CSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus zeigte eine Abnahme der Anzahl und Größe der Osteoklasten unter der Behandlung von hCYR61. (Abb. 3.8.1 und 3.8.2). Es ließen sich keine großen Osteoklasten mit der typischen hufeisenförmige Anordnung der Zellkerne unter der Stimulation mit hCYR61 entdecken. Auch zeigte sich eine geringere Immunfärbung auf den Calcitoninrezeptor (Abb. 3.8.1) und die Integrin Untereinheit $\beta 3$. Diese vorläufigen Ergebnisse werden von der Bone Group in Aberdeen mittels quantitativer PCR und Western Blot weiter untersucht.

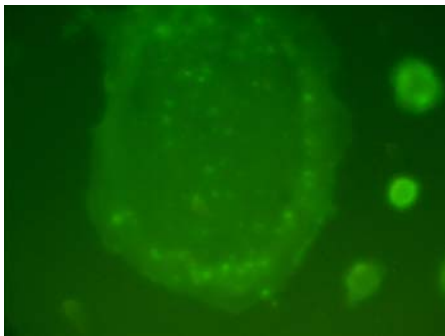
3.8.1 Effekt von hCYR61 auf die Expression des Integrin $\alpha\beta_3$ in MCSF abhängige Knochenmarksmakrophagen der Maus.



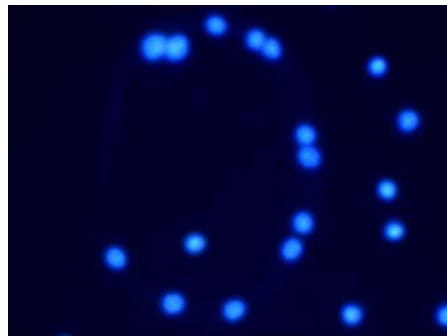
β_3 , +hCYR61 1000ng/ml



DAPI, +hCYR61 1000ng/ml



β_3 , control

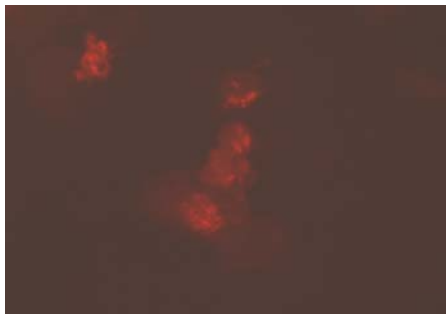


DAPI, control

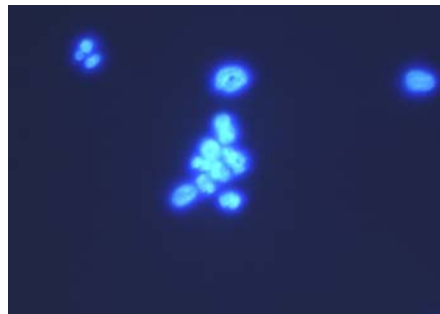
Abb.3.8.1: Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Integrin $\alpha\beta_3$ in MCSF abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus.

Die Abbildung 3.8.1 zeigt die Immunfärbung des Integrin β_3 Untereinheit in MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen. Die Integrin β_3 Untereinheit ist grün angefärbt. Die Zellkerne sind blau dargestellt. Während der Osteoklastenphänotyp in der Kontrollgruppe deutlich erkennbar ist, erscheint die Osteoklastenformation unter der Stimulation von hCYR61 inhibiert.

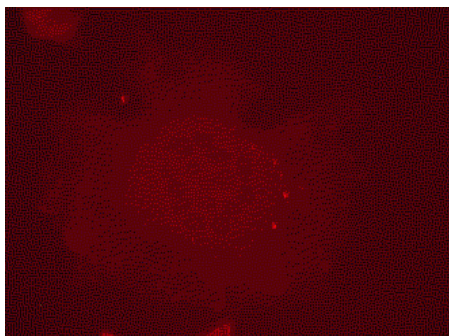
3.8.2 Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Calcitoninrezeptors in MCSF abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus.



hCYR61 1000ng/ml CTR



hCYR61 1000ng/ml DAPI



CTR (-hCYR61)



DAPI (-hCYR61)

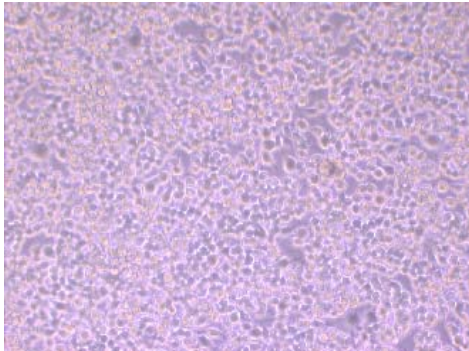
Abb.3.8.2: *Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Calcitoninrezeptors in MCSF abhängige Knochenmarksmakrophagen der Maus.*

Die Abbildung 3.8.2 zeigt die Immunfärbung des Calcitoninrezeptors in MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen. Der Calcitoninrezeptor ist rot angefärbt. Die Zellkerne sind blau dargestellt. Während der Osteoklastenphänotyp in der Kontrollgruppe deutlich erkennbar ist, erscheint die Osteoklastenformation unter der Stimulation von hCYR61 inhibiert.

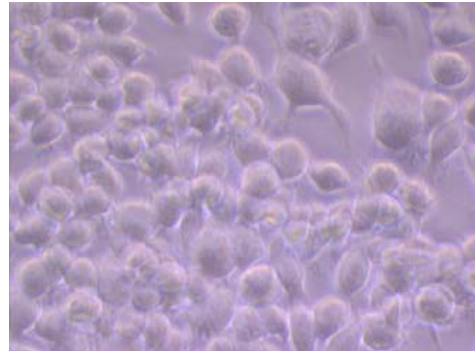
3.9 Effekt von hCYR61 auf die Fusion von murinen RAW264.7 Makrophagen

Raw264.7 Zellen der Maus wurden in einer hohen Dichte kultiviert und mit hCYR61 in einer Konzentration von 1000ng/ml 12 Stunden lang stimuliert. Danach wurden die Zellen auf TRAP (Tatrat resistente alkalische Phosphatase) gefärbt.

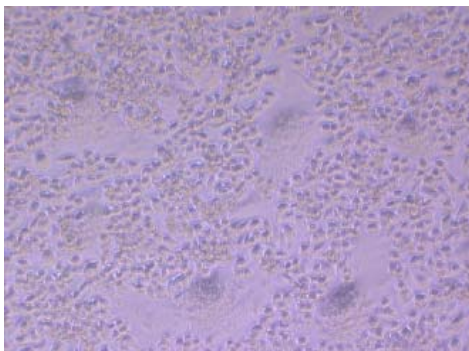
Dieses Experiment zeigte einen unerwarteten Effekt von hCYR61 auf Raw264.7 Zellen. Die Stimulation mit 1000ng/ml hCYR61 führte zu einer Fusion von Zellen. Dieser Effekt konnte nach nur 3 Stunden beobachtet werden. Diese großen, vielkernigen Zellen ließen sich nicht positiv auf TRAP färben. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Beschreibung eines vergleichbaren Effekts von hCYR61. Auf Grund der zeitlichen Begrenzung des Aufenthaltes in Aberdeen konnten diese Beobachtungen nicht weiter verfolgt werden.



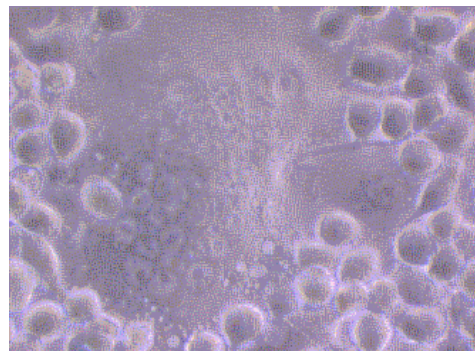
Kontrolle, 10x



Kontrolle, 40x



hCYR61 1000ng/ml, 10x



hCYR61 1000ng/ml, 40x

Abb. 3.9: Die Fusion von Raw264.7 Zellen unter der Stimulation von hCYR61.

Die Abbildung 3.9 zeigt die Fusion von Raw264.7 Zellen unter der Stimulation von hCYR61. Während der Osteoklastenphänotyp in Form von mehrkernigen Riesenzellen in den mit 1000ng/ml hCYR61 stimulierten Zellen deutlich erkennbar ist, zeigt die Kontrollgruppe keine Osteoklastenformation.

4 Diskussion

Zielsetzung war die Funktion von hCYR61 in Osteoblasten und in Osteoklasten näher zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit stand die Identifizierung der Funktionsdomänen von hCYR61 durch Stimulation von humanen fetalen Osteoblasten (hFOB) im Mittelpunkt. In dem zweiten Teil sollten die Effekte des Gesamtproteins auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen gezeigt werden.

Zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Funktionen des Proteins hCYR61 wurden verschiedene Teilbereiche des Proteins exprimiert. Entsprechend den bereits vorher untersuchten Effekten auf ausgewählte mRNA-Spezies wurden die verschiedenen Konstrukte auf ihre Funktion überprüft.

Bei der Untersuchung der Effekte von hCYR61 auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen stand die Rolle der hCYR61 abhängigen Osteoklastenformation im Mittelpunkt. Neben dem besonderen Schwerpunkt der Versuche auf den RANKL Signalweg, wurden auch osteoklastenspezifische Markerproteine untersucht.

4.1 Methodische Problematik

4.1.1 Zellkultur

hCYR61/CCN1 wird in vielen anderen Geweben außerhalb des Knochens exprimiert, zum Beispiel in der Leber, im Gehirn und in Muskelzellen. Da wir die Relevanz von hCYR61/CCN1 im Knochenstoffwechsel untersuchen wollten, wurden geeignete Zelllinien gesucht, um die Effekte sowohl auf Osteoblasten, als auch auf Osteoklasten und deren Vorläufer zu untersuchen.

4.1.1.1 Humane fetale Osteoblasten (hFOB)

Bei den humanen fetalen Osteoblasten handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie. Sie wurde aus der Transfektion einer Primärkultur mit einem Gen gewonnen, das für die temperatursensitive Mutante (ts A58) des großen T-Antigens des SV40-Virus kodiert. Mit zunehmender Konfluenz zeigt diese Zelllinie einen osteoblastären Phänotyp und die für Osteoblasten typischen Markerproteine. Dazu zählen mineralisierte Matrixnoduli,

Osteopontin, Osteonectin, Typ I Kollagen, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase. Im Vergleich mit einer primären Osteoblastenkultur lassen sich die hFOB-Zellen sehr viel einfacher handhaben. Sie unterscheiden sich nur durch ein mutiertes Gen und weisen somit sehr ähnliche biologische Eigenschaften bei sehr viel leichter Kultivierbarkeit auf. Somit handelt es sich hierbei um ein gut geeignetes Zellsystem für die Untersuchung der Effekte auf Osteoblasten.

In verschiedenen Versuchen zuvor wurden hFOB-Zellen auch von der Forschungsgruppe Schütze/Jakob erfolgreich verwendet, um die Effekte von hCYR61 auf Osteoblasten zu untersuchen. Auch in der vorausgegangenen Array Analyse wurden reproduzierbare Effekte auf Signalwege des Knochens gefunden, die zum Teil auch durch die eigenen Vorversuche bestätigt werden konnten. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass die Wahl dieses Zelltyps zu der mangelnden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in den folgenden Versuchen geführt hat, auch wenn der Effekt von hCYR61 sehr stark abhängig vom Zelltyp und dessen Differenzierungsgrad ist.

4.1.1.2 RAW 264.7 Zellen

Die RAW 264.7 Zellen sind in vivo durch den Abelsonschen Leukämievirus transformierte Makrophagen der Maus. Es ist somit eine immortalisierte Makrophagenzelllinie, die einfach zu kultivieren ist. Durch die Stimulation mit RANKL und TNF α differenzieren sich diese Zellen zu Osteoklasten. Nach der Fusion zeigen diese Zellen typische Osteoklastenmarker, wie den Calcitoninrezeptor oder TRAP. (tartratresistente alkalische Phosphatase). Sie weisen dann auch die typischen Eigenschaften, wie die Resorptionsfähigkeit auf. Da insbesondere humane Osteoklasten schwer in großer Anzahl zu gewinnen sind, handelt es sich hierbei um eine häufig verwendete Zelllinie, um die Effekte an Osteoklasten zu studieren.

4.1.1.3 MCSF-abhängige Knochenmarksmakrophagen

Bei den MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus handelt es sich um eine primäre Makrophagenzelllinie. Hierbei werden die Zellen des Knochenmarks der Extremitätenknochen mit MCSF kultiviert. Die Zugabe der Zytokine M-CSF und RANK-L führt zu einer Fusion der Zellen und zu einer Bildung von Osteoklasten⁵⁵. Auch wenn es

ein gutes System zur Untersuchung von Osteoklasten ist, handelt es sich dennoch um keine Reinkultur.

Bei den beiden letztgenannten Zelllinien ist als Hauptnachteil zu nennen, dass es sich nicht um humane Zellen handelt.

4.1.2 PCR

Um einen Effekt auf eine Stimulation in einer Zellkultur nachzuweisen, benutzt man sogenannte house keeping Gene als inneren Standard. Hierbei handelt es sich um konstant exprimierte Gene, die die basalen Zellfunktionen Aufrecht erhalten. Wir haben als Standard in den hFOB-Zellen den Elongationsfaktor $\alpha 1$ und β -Aktin verwendet. EF1 α macht etwa 1-3% des zytoplasmatischen Gesamtproteins aus und ist in viele unterschiedliche Zellfunktionen involviert. Bei β -Aktin handelt es sich um das häufigste, intrazelluläre Protein in eukaryontischen Zellen. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Expression dieser beiden Housekeeping Gene – genau wie das im Western Blot verwendete β -Tubulin - sowohl *in vivo* als auch *in vitro* unter experimentellen Bedingungen moduliert wird⁴.

Alle Ergebnisse in den Versuchen 3.2 bis 3.4 wurden auf EF1 α normalisiert, da keine Regulation von EF1 α in Osteoblasten vorliegt.

4.1.3 Western Blot

In den Versuchen 3.5 bis 3.7 wurde der Effekt von hCYR61 auf verschiedene Signalmoleküle untersucht. Hierbei wurde die aktive, phosphorylierte Kinase in Relation zu der totalen Kinase oder dem Housekeeping Gen β -Tubulin gesetzt. So musste derselbe Blot nach der Untersuchung der phosphorylierten Kinasen von den Antikörpern befreit werden, um dann die totalen Kinasen zu messen. Auch wenn der Erfolg dieses Strippings überprüft wurde, ist nicht auszuschließen, dass insbesondere bei sehr intensiven Blots nicht alle primären Antikörper entfernt werden konnten und die Kontrollen somit falsch positive Ergebnisse zeigten. Ein weiteres Problem war die Untersuchung von verschiedenen Proteinen auf denselben Blots. Dieses erforderte weiteres Stripping, um die jeweiligen Antikörper vor der Untersuchung anderer Proteine zu entfernen.

4.2 Eigenschaften des Proteins hCYR61

Auf Grund der großen strukturellen Ähnlichkeiten der CCN- Proteine, waren die funktionellen Unterschiede anfänglich nicht leicht zu verstehen. Mittlerweile zeigt sich, dass es sich bei den CCN-Proteinen um ein Regulationssystem der Homöostase handelt. Hierbei scheint ein Mitglied den Effekt zu vermitteln, während ein anderes den gleichen Prozess inhibieren kann. Obwohl die molekularen Details dieser Regulation noch nicht vollständig verstanden sind, erfreut sich dieses Konzept einer großen Aufmerksamkeit, da man neue Möglichkeiten der Therapie verschiedener Erkrankungen erwartet. So entscheiden die relativen Expressionslevel der einzelnen Mitglieder dieser Proteinfamilie, die ganzen oder kürzeren Versionen, über die Wirkungen in physiologischen und auch pathologischen Prozessen¹⁰⁷. Die Funktion der CCN-Proteine ist somit zell- und auch gewebsspezifisch und wahrscheinlich nicht redundant.

Die Forschung auf dem Feld der CCN-Proteine wurde lange Zeit dadurch erschwert, dass die *in vitro* Studien verschiedene Proteinquellen, Aufreinigungsmethoden und Antikörper benutzen mussten. Die größte Schwierigkeit war die Aufreinigung aktiver Proteine auf Grund der c-terminalen Domäne mit ihren Wiederholungen der Cysteinreste⁵⁹.

Wahrscheinlich ist dieser enorme Cysteinanteil (von etwa 10%) auch für die Instabilität der aktiven Proteine verantwortlich. Auf Grund der Instabilität des CYR61 ist man mittlerweile dazu übergegangen die biologische Wirksamkeit vor den Versuchen zu überprüfen.

Als Hauptproblem kann man die Expression von hCYR61 durch die Osteoblasten sehen. Die große Varianz der Ergebnisse, die positiven Kontrollen und die dadurch fehlende Signifikanz der verschiedenen Versuche sind wahrscheinlich dadurch zu erklären. So zeigten einzelne Versuche deutliche Effekte des Proteins auf die ausgewählten Signalwege, waren aber in Folge nicht reproduzierbar. Auch hat sich mittlerweile die Sichtweise auf die CCN- Proteine gewandelt. Während man sie anfänglich für klassische Wachstumsfaktoren gehalten hatte, geht man mittlerweile davon aus, dass sie neben eigenen unabhängigen Effekten vorwiegend die Signalwege anderer Moleküle modifizieren. Die Signalwege unterscheiden sich deutlich bei den unterschiedlichen verwandten CCN- Proteinen und Zellsystemen⁵⁹.

So zeigte die Forschungsgruppe Schütze/ Jakob, dass die Zellmigration von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen sowohl durch CYR61 als auch WISP3 stimuliert wird, wobei dieser Effekt ausschließlich bei WISP3 über Integrin $\alpha_v\beta_5$ vermittelt wird⁹⁴.

Auch der Differenzierungsgrad der Zellen spielt eine bedeutende Rolle. Die Formation von Osteoklasten wird nur bei frühen Vorläuferzellen der Osteoklasten gehemmt, während sich bei adulten Zellen kein Effekt zeigt¹⁹.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die Aktivität des CYR61, die Wahl des Zelltyps, als auch dessen Differenzierungsgrad entscheidend für einen erfolgreichen Versuchsaufbau sind.

4.3 Wertung der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

4.3.1 Wirkung des Proteins hCYR61 auf die hFOB Zellen

Bei der Suche nach den biologischen Wirkungen von hCYR61 im Knochenstoffwechsel spielen verschiedene Signalwege eine besondere Rolle. Die Gen- Chip Untersuchung zeigte einige potentielle Kandidaten für die Wirkung von hCYR61 auf die Osteoblasten. Dazu gehörten membranständige Rezeptoren wie Notch und BMP Rezeptor 1A, aber auch Transkriptionsfaktoren wie Gli 1,2,3, MAL und Hes 2. Die Wirkung auf diese Kandidaten lässt auf eine wichtige Rolle von hCYR61 in den Signalwegen der Bone Morphogenic Proteine, des Notch und des Indian Hedgehog schließen. Diese kontrollieren die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Zellen der Osteoblastenlinie. Während die Bone Morphogenic Proteine (BMPs) und Wnt die Osteoblastogenese vermitteln, werden für Notch vorwiegend inhibitorische Eigenschaften beschrieben¹².

4.3.1.1 Der Bone Morphogenic Protein Signalweg (BMPR1A)

BMPs werden für die Entwicklung, für das Aufrechterhalten der Homöostase des Knochens und die Frakturheilung benötigt. Sie haben die einzigartige Eigenschaft die Differenzierung von Zellen der Osteoblastenlinie zu induzieren und somit die Anzahl der erwachsenen Zellen zu erhöhen. Außerdem verstärken sie die Funktion der Osteoblasten¹³.

Als sekundärer Effekt zeigt sich eine Steigerung der Osteoklastogenese, gesteuert durch die Osteoblastogenese¹.

Um die genaue Rolle des BMP-Signalweges zu entziffern, wurden Mäuse mit gewebsspezifischen Deletionen der BMP Rezeptoren in Chondrozyten entwickelt. BMPR1A defiziente Mäuse zeigen verkürzte lange Knochen und eine Verzögerung der Ossifikation. Die Kombination mit der Deletion des BMPR1B führte zu einem Verlust von vielen enchondralen Knochen und einer eingeschränkten Differenzierung der Chondrozyten in den anderen Elementen des Skeletts¹⁰⁸.

Die Wirkungen von BMPs im Knochen erfolgt durch ihre Bindung an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche und durch Interaktionen mit anderen Wachstumsfaktoren. Die Bindung an einen Typ I oder Typ II Rezeptor aktiviert den Smad und MAPK (JNK, p38 and ERK 1/2) Signalweg²⁷.

Die Regulation der Transkription von hCYR61, CTGF, NOV, WISP 1 und WISP 2 im Osteoblasten gehört zu den Effekten von BMPs. Sowohl die Expression der mRNAs wie auch die Proteinlevel von CYR61 und CTGF wurde durch TGF β , Cortisol und BMP2 erhöht⁸⁴.

Interessanterweise haben die CCN- Proteine wiederum eine Wirkung auf die Differenzierung von Osteoblasten. So konnte für CTGF gezeigt werden, dass es die Wirkungen von BMP inhibiert und für die Chondrogenese benötigt wird⁶⁹. Die BMP-2 Effekte auf die Differenzierung der Osteoblasten werden durch WISP-1 vermittelt²³.

Entgegen dem für CTGF bekannten Effekt, fanden wir in den ersten Versuchen eine deutliche Heraufregulation der Expression von BMPR1A durch hCYR61. Dieses passte zu dem bekannten Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung. Auf Grund dieser deutlichen Wirkung, haben wir diesen Primer benutzt, um die Funktion von hCYR61 nach einstündiger Lagerung bei +4°C und -20°C zu untersuchen. Während sich in diesem Versuch keine Abnahme der Wirkung von hCYR61 zeigte, haben spätere Untersuchungen dieses Labors deutliche Funktionseinbußen bei der Lagerung bei -20°C gezeigt. Möglicherweise hat der kurze Zeitraum von einer Stunde noch nicht zu einer Abnahme der Wirkung geführt. In zwei der sechs Versuche, in denen die Wirkung der Funktionsdomänen überprüft wurde, ließ sich ein deutlicher Effekt der Domäne 2 allein und etwas weniger stark für die Domänen 1+2 feststellen. Für diese Domäne ist bereits

bekannt, dass dort Integrin $\alpha_v\beta_3$ an hCYR61¹² und der Wachstumsfaktor TGF- β an CTGF¹⁴ bindet.

Leider ließen sich diese Ergebnisse in Folge bei gleichem Versuchsaufbau nicht reproduzieren und blieben unter der Signifikanzgrenze. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre hierbei eine fehlende biologische Wirkung von hCYR61 in einigen Chargen, was allerdings nicht die teilweise deutlich positiven Effekte in der Kontrolle erklären würde. Dieses deutet eher auf eine eigene Expression von hCYR61 in hFOB Zellen hin.

4.3.1.2 Der Indian Hedgehog Signalweg. (Gli 2,3, Patch)

Auch bei dem Ihh handelt es sich um einen Schlüsselsignalweg bei der enchondralen Ossifikation. So wird durch den sezernierten Signalfaktor Ihh die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten und die Differenzierung der Osteoblasten im Perichondrium koordiniert. Die Signalübermittlung erfolgt über den Rezeptor Patched und ein zweites Transmembranprotein Smo. Dieses aktiviert die Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren der Gli –Familie über eine komplexe Signaltransduktionskaskade⁴⁸.

Diese sind die nukleären Transducer der Hedgehogsignalwege und funktionieren entweder als Aktivator oder Repressor der Transkription. Die kompletten Gli- Proteine Gli 1,2,3 aktivieren Hedgehog Zielgene, während die kurzen Repressorformen von Gli 1 und 2 diese bei fehlender Aktivierung inhibieren⁸¹. Während Ihh in den frühen hypertrophischen Chondrozyten der Knorpelanlagen exprimiert wird, findet man Ptch1, Smo, Gli1, Gli2 und Gli3 in den perichondrialen Zellen und in Chondrozyten^{48 70}.

Zwischen den einzelnen Signalwegen gibt es eine enge Verbindung. Diese zeigt sich in der Induktion der Expression von Ihh durch den BMP Signalweg in embryonalen Zellen. In Extremitätenorgankulturen ließ sich eine verspätete hypertrophische Differenzierung beobachten, die wahrscheinlich über die Stimulation des Ihh Signalweges durch BMP vermittelt wurde⁹⁷.

In den Vorversuchen finden wir eine deutliche Heraufregulation von Gli2 und Gli3 und keine eindeutigen Ergebnisse für Patch. Auch diese Effekte würden mit der bekannten Induktion der Differenzierung von Osteoblasten durch hCYR61 übereinstimmen. Leider ließen sich auch diese Ergebnisse im weiteren Verlauf nicht reproduzieren. In zwei Versuchen kamen zwei verschiedene Chargen von hCYR61 zum Einsatz, wobei sich bei

Gli 2 deutlich unterschiedliche Intensitäten zeigten. Auch das legt den Schluss nahe, dass die schwankenden Ergebnisse durch die unterschiedliche biologische Wirkung der verschiedenen Chargen hervorgerufen wurden.

4.3.1.3 Der Notch Signalweg (HES 2)

Auch der Notch Signalweg hat eine bedeutende Rolle im Remodeling des Knochens. Er hat eine inhibitorische Wirkung auf die Entwicklung und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten und im postnatalen Knochen. Der Notch Signalweg muss somit als Gegenspieler der Ihh und BMP Signalwege gesehen werden.

Eine Defizienz von Notch führte in dem skelettogenen Mesenchym der Extremitäten zwar zu einer Zunahme der trabekulären Knochenmasse bei erwachsenen Mäusen aber auch zu einer Abnahme der mesenchymalen Progenitorzellen im Knochenmark. Mit zunehmendem Alter entwickelten diese Tiere dann eine schwere Osteopenie. So erhält der Notch Signalweg die mesenchymalen Progenitorzellen des Knochenmarks durch Behinderung der Osteoblastendifferenzierung. Daneben reguliert er die Osteoklastogenese von Makrophagenvorläufern durch die Modulation der Produktion von RANKL und Osteoprotegerin in den Osteoblasten^{20 36}.

Bei den Notch Proteinen handelt es sich um single-pass Transmembranrezeptoren, die auf den Oberflächen von angrenzenden Zellen gefunden werden. Die Interaktion mit ihren Liganden führt zu einer Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch (NICD), deren Translokation in den Zellkern und ihre Bindung an Mitglieder der CSL-Familie von DNA-bindenden Proteinen. Der NICD-CSL Komplex induziert dann die Transkription von Genen die den hairy and enhancer of split (HES) und das HES-related Repressor Protein (HERP / HEY) kodieren. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung über die HES und HEY Familie vermittelt werden¹².

Wirkungen eines anderen CCN Proteins auf den Notch Signalweg sind bereits bekannt. NOV inhibiert die Differenzierung von Myoblasten über die Assoziation mit Notch1 mit der c-terminalen Domäne⁹¹.

Im Falle des Notch Signalweges sollten die mRNA Spiegel für HES 2 untersucht werden. Hierbei zeigten die Vorversuche keine eindeutigen Ergebnisse, deuteten aber auf eine Steigerung der Expression durch hCYR61 hin. Hier untersuchten wir also einen

gegenteiligen Effekt, da die Inhibierung der Osteoblastendifferenzierung über die HES Familie vermittelt wird. In den folgenden Versuchen stellte sich das Problem, dass wir zum Teil nur sehr geringe Intensitäten erzielen konnten. So konnten wir hierbei in nur vier Versuchen ein auswertbares Ergebnis erzielen. Dieses zeigte aber auch keine signifikanten Effekte auf diesem Signalweg.

4.3.1.4 Insulin like growth Faktor (IGF 2)

Zu den Wachstumsfaktoren mit positivem Einfluss auf die Knochenformation gehören auch die IGFs I und II. Ihre Bindung an den IGF1 Rezeptor ist bedeutsam für eine normale skelettale Entwicklung, das Bone Remodeling und die Reparaturfähigkeit. So sind Chondrozyten und Zellen des Knochens in der Lage IGFs zu produzieren und den IGF1 Rezeptor zu exprimieren. *In vitro* Studien zeigten, dass IGF1 die Proliferation von Osteoblasten stimuliert, deren Differenzierung beschleunigt und die Produktion von Knochenmatrix steigert. Auch ist IGF1 als kritischer Faktor für das Überleben der Zellen zu sehen. IGF1 scheint auch einen Effekt auf die Formation und Funktion von Osteoklasten zu haben. Entweder handelt es sich um einen direkten Einfluss, oder eine durch Osteoblasten vermittelte Wirkung³⁵.

Eine IGF I Rezeptor Defizienz bei Mäusen führte zu einer verlangsamten skelettalen Entwicklung, zu einer verlangsamten Ossifikation und zu neonatalem Tod⁷⁶. Die gezielte Ausschaltung des Rezeptors auf Osteoblasten führte zu einer verminderten Knochendichte und zu einer verringerten Mineralapposition¹⁰⁹. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von IGF1 zu einer verstärkten Knochenformation und Mineralisation¹¹⁰. In den meisten Geweben werden die Effekte der IGFs durch IGF Bindungsproteine vermittelt. Der erste Vorversuch deutete auf einen Effekt von hCYR61 auf IGF2 hin. Da der Wachstumsfaktor IGF2 einen positiven Effekt auf die Knochenformation hat, wäre eine IGF2 vermittelte Wirkung von hCYR61 denkbar. Dieses Ergebnis war in Folge nicht reproduzierbar.

4.3.1.5 Kollagen XIV

Bei Kollagen XIV handelt es sich um ein strukturelles Molekül der extrazellulären Matrix. Es ist ein Fibrillen-assoziiertes Kollagen, welches vorwiegend von Fibroblasten, Myofibroblasten und Lebersternzellen (HSC) gebildet wird und das während der späten

embryonalen Entwicklung exprimiert wird. In mesenchymalen Zellen konnten antiproliferative, ruhephasen- aber auch differenzierungsinduzierende Effekte nachgewiesen werden⁹⁰.

Kollagen XIV zeigte eine verstärkte Expression durch hCYR61 in den Vorversuchen. Auf Grund der oben beschriebenen differenzierungsinduzierenden Effekte, wäre auch hier eine Induktion durch hCYR61 denkbar, wurde aber in den Hauptversuchen nicht weiter verfolgt.

4.3.1.6 Serum Response Faktor Singalweg (MAL)

Viele Zellen reagieren auf Wachstumsfaktoren und andere Stimuli des Serums durch den SRF (Serum Response Faktor), indem sie ihre Morphologie ändern und die Genexpression starten. Die Zielgene dieses Transkriptionsfaktors wirken auf das Zellwachstum, die Proliferation, die Differenzierung und kontrollieren das Aktin Zytoskelett. MAL ist ein Koaktivator der Transkription der Myocardinfamilie für den Serum Response Faktor. MAL bindet an monomeres G-Aktin im Cytoplasma, reichert sich aber bei zunehmender F-Aktinbildung (und damit einhergehendem G-Aktinverbrauch) im Zellkern an. Dort bindet es an SRF Zielgene und aktiviert diese erst bei einer weiteren Abnahme der G-Aktinkonzentration im Zellkern^{101 105}.

Auch bei MAL fanden wir eine Steigerung der Expression in den Vorversuchen. Da der SRF-Signalweg bei der Differenzierung, der Proliferation und dem Zellwachstum eine große Bedeutung hat, wäre auch eine Vermittlung des Effekts von hCYR61 über diesen Signalweg denkbar. In den folgenden Versuchen ließ sich die Wirkung von hCYR61 nicht reproduzieren.

4.3.2 Effekt von hCYR61 auf Osteoklastenvorläuferzellen

Im Osteoklastenmodell erwarteten wir einen Einfluss der Stimulation mit CYR61 auf die RANKL und Integrin vermittelte Differenzierung, Resorption und das Überleben.

In der Forschungsgruppe von Prof. Rogers in Aberdeen hatte sich in Differenzierungssystemen des Osteoklasten eine massive Hemmung der TRAP Expression durch hCYR61 gezeigt, die eng mit der Funktion verknüpft ist.

4.3.2.1 Der RANK Signalweg (p38, ERK 1/2, JNK, I κ B, S6K)

Der RANK Signalweg spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Immunsystems und des Knochenstoffwechsels. RANKL induziert die Differenzierung von Osteoklastenvorläufern und stimuliert die Resorption genauso wie das Überleben von Osteoklasten. Die Signalmechanismen umfassen die Aktivierung von TNF Rezeptor assoziierten Faktor Proteinen (TRAF), die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF κ B, AP-1, NFAT2) und die Induktion von der Src- und Phosphatidylinositol 3 Kinase abhängigen AKT⁶².

Im Zusammenwirken mit M-CSF aktiviert RANKL eine intrazelluläre Signalkaskade, die p38, ERK1/2, und inhibitory- κ B enthält. Deren Aktivierung ist essentiell für die Differenzierung, die Resorption und das Überleben von Osteoklasten¹⁹. Dass diese Signalwege bei der CYR61 vermittelten Wirkung auf Osteoklasten eine Rolle spielen könnten, wurde auch durch andere Ergebnisse unterstützt:

Bei Mammakarzinomzellen stellte man fest, dass die Expression von CYR61 über eine NF κ B-abhängige Hochregulation der XIAP funktioniert⁶⁸. Bei CCN2 wurde die Proliferation von primären Lebersternzellen der Ratte durch die Wirkung der c-terminalen Domäne auf den Ras/MEK/ERK Signalweg vermittelt²⁵. Generell führen Wundheilung, Angiogenese und Gewebereparation zu einer verstärkten Expression von CCN1. Spezifische Signaltransduktionssysteme, die die Hochregulation von CCN1 vermitteln, beinhalten neben der C-Jun N-terminal Kinase und den Serum Response Faktor die RhoA GTPase, die p38 MAP Kinase und die p42/44MAP Kinase. Beim neuronalen Zelltod wurde die Expression von hCYR61/CCN1 über die Aktivierung der c-Jun n-terminalen Kinase und einer Serum Response like CA-rg Box gesteuert, jedoch nicht über den Faktor p-38 und den MAP Kinase Weg⁴⁵. In glatten Muskelzellen wurde die CYR61 induzierte Genexpression durch RhoA GTPase und p38 gemeinsam vermittelt³⁴. Die untersuchte S6 Kinase spielt eine wichtige Rolle in dem Überleben des Osteoklasten. Ihre Aktivität wird durch die p42/44 MAPK und Phosphatidylinositol 3 Kinase moduliert. Neben der Regulation durch den RANKL Signalweg, wird sie auch noch über den MCSF Signalweg und über Integrin $\alpha_v\beta_3$ reguliert und kann somit als ein Integrator verschiedener Signalwege gelten²⁸.

Um eine Wirkung von hCYR61 auf den RANK- Signalweg zu finden, haben wir verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle ausgewählt und mittels Western Blot untersucht. Dabei handelt es sich um die Kinasen p38, p42/44 MAPK, JNK, I κ B und S6. So konnte die Wirkung von hCYR61 auf die bekannten Effekte des RANK-Signalweges - die Differenzierung, die Resorption und das Überleben des Osteoklasten - erforscht werden. Um einen Effekt darzustellen, haben wir die aktive, phosphorylierte Kinase mit der Gesamtkinase und zum Teil mit dem Houskeeping Gen Tubulin verglichen. Zunächst wurde die Zellkultur von RAW264.7 Zellen 24h vor der Stimulation mit RANKL und MCSF mit hCYR61 inkubiert. Dieses führte zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen in vier Versuchen. Die Blots zeigten für Kinasen p38 und JNK eine typische Zunahme der Phosphorylierung durch RANKL und TNF α und eine Inhibierung dieses Effekts durch hCYR61. Leider zeigten auch die Blots des Gesamtproteins ein vergleichbares Muster. Ursächlich für dieses ungewöhnliche Muster in der Kontrolle könnte die Versuchsdurchführung sein. Da die Technik der gleichzeitigen Untersuchung des phosphorylierten und des Gesamtproteins durch den LiCor Odyssey infrared imager dem Labor in Aberdeen noch nicht zur Verfügung stand, mussten die Blots zur Auswertung der totalen Kinase von den Antikörpern für die phosphorylierte Kinase befreit werden. Ist dieses - trotz Kontrolle- unvollständig geschehen, könnte das dieses Muster und somit die fehlende Aussagekraft dieser Versuche erklären.

Kurz vor dem Ablauf des Stipendiums haben wir die Versuchsanordnung zugunsten einer gleichzeitigen Stimulation von hCYR61 und RANKL verändert. Auf Grund der geringen verbliebenen Zeit, wurde in diesem Versuch nur noch die Kinase p38 in zwei Durchführungen untersucht. Hierbei konnte man - auch im Vergleich mit der Kontrolle - die typische zeitabhängige Steigerung der Phosphorylierung unter der Stimulation mit RANKL und TNF α erkennen und eine Inhibierung dieses Effektes durch hCYR61. Interessanterweise scheint auch hCYR61 allein einen positiven Effekt auf die Phosphorylierung zu haben. Auch wenn aktuelle Ergebnisse der Forschungsgruppe in Aberdeen keinen Effekt von hCYR61 auf den RANKL Signalweg in humanen MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen beschreiben, deuten diese Ergebnisse auf eine RANKL vermittelte Wirkung von hCYR61 auf RAW264.7 Zellen hin¹⁹.

4.3.2.2 Integrin $\alpha_v\beta_3$

Neben den Effekten auf den RANK Signalweg wurden Effekte durch hCYR61 auf Integrine untersucht.

Effekte von CCN1 auf die Integrine $\alpha_v\beta_3$ auf menschliche Endothelzellen und $\alpha_v\beta_5$ von menschlichen Fibroblasten sind bekannt. So wird die Adhäsion, die Mitogenese und die Migration über diese Integrine vermittelt^{31 46}.

Neue Einblicke sowohl in die Expression als auch in die Wirkungsweise gewann man durch die Untersuchung von CCN1 in Zellen des Mammakarzinoms. Einerseits führt die Hochregulierung von CYR61 allein zu einer verstärkten Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$, andererseits ist CYR61 selbst in der Lage die Proliferation, das Überleben und die Taxol Resistenz dieser Zellen durch Integrin $\alpha_v\beta_3$ abhängigen ERK1/ERK2 MAPK- Signalweg zu steuern. So kann man von einer CYR61- Integrin $\alpha_v\beta_3$ autokrinen Schleife sprechen⁷⁵.

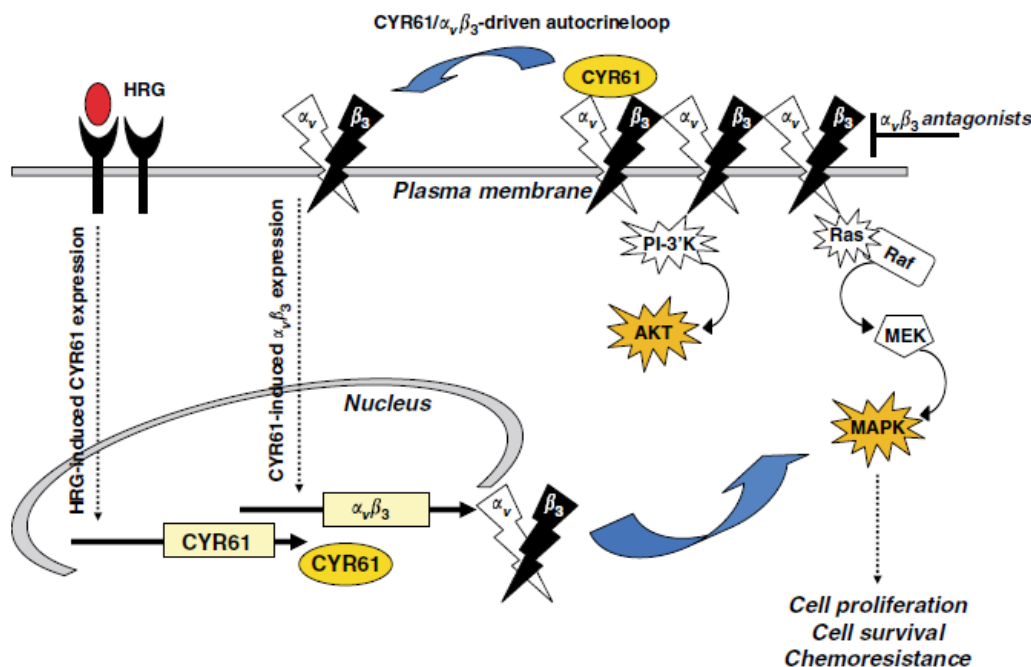


Abb. 4.3.3.2: Die HRG-induzierte Heraufregulation von CYR61 prädisponiert epitheliale Brusttumorzellen zu einer deregulierten Proliferation und zu Chemoresistenz. Dieses geschieht direkt oder durch eine autokrine Schleife über Integrin $\alpha_v\beta_3$ und die abhängigen Signalwege PI-3K und MEK / MAPK. Menendez et al, Oncogene 2005

Die Forschungsgruppe Schütze/Jakob zeigte aber, dass die chemotaktischen Eigenschaften von CYR61 auf MSCs komplett unabhängig von diesen Integrinen war, während sie bei WISP3 durch Integrin $\alpha_v\beta_5$ vermittelt wurde⁹⁴. Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird in großer Dichte auf den Osteoklasten exprimiert und gilt als das zentrale Molekül für die Knochenresorption. Integrin $\alpha_v\beta_3$ defiziente Knock out Mäuse entwickelten eine Osteopetrose nach 3 – 6 Monaten⁷². Hierbei spielt die $\alpha_v\beta_3$ vermittelte Inhibierung der Migration die größte Rolle⁷⁷. Auch Integrin $\alpha_v\beta_5$ findet sich in großer Menge in frühen Osteoklastenvorläufern und wird in der Differenzierung herabreguliert³. Das legte den Verdacht nahe, dass die Wirkungen von CYR61 auf Osteoklasten ebenfalls über die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt werden.

In dem Versuch 3.8.1 wurden MCSF-abhängige Knochenmarksmakrophagen der Maus mit RANKL, MCSF und hCYR61 kultiviert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl und Größe der Osteoklasten im Vergleich zu der Kontrolle ohne hCYR61. In der Immunfärbung zeigte sich eine deutlich geringere Anfärbung für die β_3 -Untereinheit des Osteoklastenmarkers Integrin $\alpha_v\beta_3$. Leider konnte die Quantifizierung und erneute Durchführung dieses Versuches auf Grund des Ablaufs des Stipendiums nicht mehr erfolgen. Die Forschungsgruppe in Aberdeen beschreibt in ihrer aktuellen Veröffentlichung diesen Effekt in humanen MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen und zeigt auch, dass diese Inhibierung der Osteoklastenformation durch hCYR61 dosisabhängig ist. Dieser Effekt ist allerdings nicht über die Integrine $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_v\beta_5$ vermittelt, wie Versuche mit hCYR61 ohne $\alpha_v\beta_3$ -Bindungsfähigkeit und β_5 negativen Makrophagen der Maus zeigten¹⁹.

4.3.2.3 Der Calcitoninrezeptor

Bei dem Calcitoninrezeptor handelt es sich um einen spezifischen Zellmarker des Osteoklasten. Die Inhibierung der Knochenresorption durch Calcitonin wird über diesen Rezeptor vermittelt. Die Expression der CTR mRNA erfolgt gleichzeitig mit der Entwicklung des Osteoklastenphänotyps in den Makrophagenzelllinien. Da der Calcitoninrezeptor nur in Osteoklasten exprimiert wird, ist er also deutlich spezifischer als die anderen bekannten Osteoklastenmarker. So können die TRAP (Tatrat resistente alkalische Phosphatase) oder der Vitronektinrezeptor auch bei aktivierten Makrophagen gefunden werden⁶¹.

In dem Versuch 3.8.2 wurde die Inhibierung der Osteoklastenformation durch hCYR61 an Hand des Osteoklastenmarkers Calcitoninrezeptor sichtbar gemacht. In Übereinstimmung mit dem vorherigen Versuch zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl und Größe der Osteoklasten im Vergleich zu der Kontrolle ohne hCYR61. In der Immunfärbung zeigte sich eine deutlich geringere Anfärbung für den Calcitoninrezeptor. Leider konnte auch hier die Quantifizierung und erneute Durchführung dieses Versuches auf Grund des Ablaufs des Stipendiums nicht mehr erfolgen.

4.3.2.4 Effekt von hCYR61 auf die Fusion von RAW264.7 Zellen

Der wahrscheinlich interessanteste Effekt von hCYR61 war die Beobachtung einer Fusion von RAW264.7 Zellen. Die Stimulation mit 1000ng/ml hCYR61 führte zu einer Fusion zu mehrkernigen großen Zellen. Dieser Effekt konnte nach nur 3 Stunden und somit ungewöhnlich früh beobachtet werden. Allerdings waren diese großen, vielkernigen Zellen nicht positiv für den Osteoklastenmarker Tatrato- resistente alkalische Phosphatase. Ein solcher Effekt auf die Zellfusion ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Auch hier machte die zeitliche Limitierung durch den Ablauf des Stipendiums weitere Durchgänge und eine Quantifizierung des Ergebnisses unmöglich.

4.4 Weitere mögliche Untersuchungen

Während die Gene Chip Untersuchungen einen deutlichen Effekt von hCYR61 auf verschiedene Signalwege in humanen fetalen Osteoblasten andeuteten, konnten diese in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Da die Wirkung auf die Osteoblasten bekannt ist, ist eine erneute Untersuchung dieser mRNA-Spezies mit einem anderen Versuchsaufbau denkbar. Da das Gesamtprotein für eine pharmakologische Anwendung sehr groß ist und viele verschiedene biologische Wirkungen hat, ist eine weitere Untersuchung der Effekte der einzelnen Domänen nach wie vor interessant. Auch die weiteren Untersuchungen über die Rolle des Proteins in der Osteoklastendifferenzierung sind sehr spannend. So sollte der neu entdeckte Effekt von hCYR61 auf die Fusion von RAW264.7 Zellen und den p38 Signalweg überprüft werden. Die neuen Forschungsergebnisse der Bone Group in Aberdeen zeigen einen deutlichen Effekt von hCYR61 auf den Osteoklasten ohne die bekannten Signalwege zu regulieren. Die Forschungsgruppe Schütze/Jakob zeigte aktuell, dass die Chemotaxis von humanen

multipotenten mesenchymalen Stromazellen unabhängig von den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ oder $\alpha_v\beta_5$ ist. In beiden Fällen wird die Suche nach dem genauen Wirkmechanismus und vielleicht einem neuen Signalweg eine besondere Bedeutung haben. Eine mögliche weitere Vorgehensweise wäre die Inhibition der endogenen CYR61 Produktion durch siRNA – gestützte Verfahren vor der Behandlung der Zellen mit exogenem CYR61.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war die Wirkung von hCYR61 auf Osteoblasten und auf Osteoklasten zu untersuchen. Dazu sollten die Funktionsdomänen von hCYR61 durch Stimulation von humanen fetalen Osteoblasten (hFOB) identifiziert werden. Eine vorangegangene Array-Analyse zeigte eine Wirkung von hCYR61 auf verschiedene Signalmoleküle des Osteoblasten. Es handelte sich um die Signalwege Bone Morphogenic Protein (BMP), Indian Hedgehog (IHH), Notch, Serum Response Factor (SRF), Insulin like growth factor (IGF) und Kollagen XIV. Neben den Effekten des Gesamtproteins wurden auch Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen auf ihre Wirkung überprüft. Während die Vorversuche noch die Ergebnisse der Arrayuntersuchung widerspiegeln, zeigten weder das Gesamtprotein hCYR61, noch die Konstrukte reproduzierbare Ergebnisse in den Hauptversuchen. Ursächlich ist hierbei wahrscheinlich die endogene Expression von hCYR61 in den hFOB-Zellen. Dieser Effekt würde auch die positiven Effekte in den Kontrollen erklären.

Bei der Untersuchung der Effekte von hCYR61 auf Osteoklasten, sowie deren Vorläuferzellen, stand die Rolle von hCYR61 bei der RANKL abhängigen Osteoklastenformation im Mittelpunkt. Hierbei zeigte sich, dass eine vorzeitige Inkubation von hCYR61 24h vor der Stimulation von RAW264.7 Zellen der Maus mit RANKL keine deutlichen Effekte auf verschiedene Signalmoleküle des RANK Signalwegs hat. Bei einer gleichzeitigen Stimulation mit hCYR61 und RANKL zeigte sich eine Inhibition der Phosphorylierung von p38 – einem Signalmolekül des RANK-Signalwegs in 2 Versuchen. Die Wirkung auf die phänotypische Inhibition der Osteoklastenformation bei MCSF-abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus durch hCYR61 konnte anhand der Immunfärbung der Osteoklastenmarker Calcitoninrezeptor und Integrin $\alpha_v\beta_3$ deutlich gemacht werden. Auch die aktuellen Ergebnisse der Bone Group in Aberdeen zeigen, dass in der Erforschung der Wirkung von hCYR61 noch großes Potential steckt. So sind die deutlichen Effekte von hCYR61 auf die Osteoklastogenese nicht durch die bisher bekannten Signalwege zu erklären und lassen neue Durchbrüche im Verständnis des Knochenstoffwechsels erwarten.

LITERATUR

1. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien C, Economides AN, Stahl N, Jilka RL, Manolagas SC. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res* 2000 ; 15:663–673
2. Abreu, J. G., Ketpura, N. I., Reversade, B. and De Robertis, E. M. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4, 599-604.
3. Anoue M, Ross FP, Erdmann JM, Abu-Amer Y, Wei S, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor α regulates $\alpha_5\beta_1$ integrin expression by osteoclast precursors in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2000; 141:284–290
4. Arukwe A. Toxicological Housekeeping Genes: Do They Really Keep the House? *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 7944-7949
5. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF. CYR61, a product of a growth factor inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6355-6360
6. Bork P. The modular architecture of a new family growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 1993; 327:125-130.
7. Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–42
8. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cystein rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN)family. *Endocrine Rev* 1999; 20:189-206
9. Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package, *Journal of Endocrinology* 2003; 178,169-175
10. Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR, Harding PA. 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. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 20275–20282
11. Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube K, Lam SC-T, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H. Proposal for a unified CCN nomenclature, *Mol. Pathol.* 2003; 56: 127 - 128.
12. Canalis E. Notch Signaling in Osteoblasts. *Science Signaling* 2008; 1 (17), pe17
13. Canalis E, Economides AN, Gazzero E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton *Endocrine Reviews* 2003; 24(2):218–235
14. Chen N, Leu SJ, Todorovic V, Lam S C-T, Lau LF. Identification of a Novel Integrin $\alpha_v\beta_3$ Binding Site in CCN1 (CYR61) Critical for Pro-angiogenic Activities in Vascular Endothelial Cells *J Biol Chem* 2004; 279(42): 44166–44176, 2004
15. Chen CC, Mo FE, Lau LF. The angiogenic factor CYR61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts, *J Biol Chem* 2001; 276(50):47329-37

16. Chen N, Chen CC, Lau LF. Adhesion of Human Skin Fibroblasts to Cyr61 Is Mediated through Integrin $\alpha_6\beta_1$ and Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J Biol. Chem* 2000; 275(32):24953-24961
17. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: An overview *Clin Biochem* 1997; 30(8): 573-593
18. Cooper C et al.: Epidemiology of osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 1999; 2:2-8, National Osteoporosis
19. Crockett JC, Schütze N, Tosh D, Jatzke S, Duthie A, Jakob F, Rogers MJ. The matricellular Protein CYR61 inhibits Osteoclastogenesis by a mechanism independent from $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$. *Endocrinology* 2007; 148(12):5761-5768
20. Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat. Med.* 2008; 14, 299–305
21. Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, Calenda V, Teiger E. Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13, 1461-1470
22. Fassbender WJ, DVO-Leitlinien zur Osteoporose – Eckpunkte der Entwicklung Evidenzbasierte Therapie der Osteoporose. 1. Aufl. Uni-Med 2006
23. French DM, Kaul RJ, D’Souza AL, Crowley CW, Bao M, Frantz GD, et al. WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am J Pathol* 2004; 165:855–67
24. Gao R, Brigstock DR. 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.* 2004; 279, 8848-8855.
25. Gao R, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 2004; 40, 431-438.
26. Gao R, Brigstock DR. 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.* 2003; 27, 214-220.
27. Gazzo E, Canalis E, Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7:51–65
28. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA and Reszka AA. MCSF, TNF α and RANK-ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Diff.* 2003; 10: 1165–1177
29. Grotendorst GR, Lau LF, Perbal B: CCN proteins are distinct from, and should not be considered members of, the IGFBP superfamily. *Endocrinology* 2000; 141:2254-2256.
30. Grzeszkiewicz TM, Lindner V, Chen N, Lam SC, Lau LF: The angiogenic factor cysteine-rich 61(CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin $\alpha_6\beta_1$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 2002; 143:1441-1450.

31. Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF: CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through integrin $\alpha_v\beta_5$ and enhances mitogenesis through integrin $\alpha_v\beta_3$ independent of its carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 2001; 276:21943-1950
32. Hadji P, Wüster C, Emons G, Schulz KD: Prävention der Osteoporose – eine Herausforderung für die gynäkologische Sprechstunde. *Frauenarzt* 1998; 39:1864-1877
33. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT. Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 1014-1023
34. Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B. Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways Role of CREB and AP-1 transcription factors *Eur. J. Biochem.* 2003; 270, 3408–3421
35. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts Mediate Insulin-Like Growth Factor I and II Stimulation of Osteoclast Formation and Function *Endocrinology* 1995; 136, 124–131
36. Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, Kronenberg HM, Teitelbaum SL, Ross FP, Kopan R, Long F. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat. Med.* 2008; 14, 306–314
37. Hofbauer LC, Heufelder AE Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243–253
38. Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, Takigawa M. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha_5\beta_1$. *FEBS Lett.* 2006; 580, 1376-1382.
39. Hurvitz JR, Suwari WM, Van Hul W, El-Shanti H, Superti-Furga A, Roidier J, Holderbaum D, Pauli RM, Herd JK, Van Hul EV, Rezai-Delui H, Legius E, Le Merrer M, Al-Alami J, Bahabri SA, Warmann ML. Mutations in the gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. *Nat Genet* 1998; 23:94-98
40. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM: Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130:2779-2791
41. Jakob F, Pathophysiologie der Primären Osteoporose, *Akt Rheumatol* 2001; 26
42. Jay P, Berge-Lefranc JL, Marsollier C, Mejean C, Taviaux S, Berta P. The human growth factor inducible early gene CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene* 1997; 14:1753-1757
43. Jedsadayamata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SCT. 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* 1999; 274: 24321-24327

44. Kanis JA, Johnall O. Requirements of DXA for the management of osteoporosis in Europe *Osteoporos Int* 2005; 16(3): 229-239
45. Kim KH, Min YK, Baik JH, Lau LF, Chaqour B, Chung KC. Expression of angiogenic factor CYR61 during neuronal cell death via the activation of c-Jun N-terminal kinase and serum response factor, *J Biol Chem* 2003; 220, 2405-2407
46. Kireeva ML, Lam SC-T, Lau LF. Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate early gene product *cyr61* is mediated through integrin $\alpha v\beta 3$. *J Biol Chem* 1998; 273: 3090-3096
47. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliviera Dos Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397:315–323
48. Didt-Kozziel L, Wuelling M, Vortkamp A The role of growth factors in chondrogenesis and osteogenesis *Current Opinion in Orthopaedics* 2006; 17:405–411
49. Kumar S, Hand AT, Connor JR, Dodds RA, Ryan PJ, Trill JJ, Fisher SM, Nuttall ME, Lipshutz DB, Zou C, Hwang SM, Votta BJ, James IE, Rieman DJ, Gowen M, Lee JC: Identification and cloning of a connective tissue growth factor-like cDNA from human osteoblasts encoding a novel regulator of osteoblast functions. *J Biol Chem* 1999; 274:17123-17131
50. Kubota S, Takigawa M. CCN family proteins and angiogenesis: from embryo to adulthood. *Angiogenesis* 2007; 10:1–11
51. Katsuki Y, Sakamoto K, Minamizato T et al. Inhibitory effect of CCN3/NOV on proliferation and differentiation of osteogenic mesenchymal stem cells, *Kusa-A1. Biochim Biophys Res Commun* 2008; 368:808–814
52. Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Yamada T, Matsumura T, Mandai T, Yao M, Maeda T, Lyons KM, Takigawa M. Functional requirement of CCN2 for intramembranous bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366:450–6
53. Kuiper EJ, Roestenberg P, Ehiken C, Lambert V et al. Angiogenesis is not impaired in connective tissue growth factor (CTGF) knock-out mice. *J Histochem Cytochem* 2007; 55:1139–1147
54. Kutz WE, Gong Y, Warman ML. WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease progressive pseudorheumatoid dysplasia, is not essential for skeletal function in mice. *Mol Cell Biol* 2005; 25:414–421
55. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation *Cell* 1998; 93:165–176
56. Lau LF, Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells *EMBO J* 1985; 4:3145-3151,

57. Lau LF et Lam STC, The CCN family of angiogenetic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999; 248: 44-57
58. Lazar N, Manara C, Navarro S, Bleau AM, Llombart-Bosch A, Scotlandi K, Planque N, Perbal B Domain specific antibodies as unique tools for structural and functional studies. *J Cell Commun Signal* 2007; 1:91-102.
59. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Science* 2006; 119:4803–4810
60. Lechner A, Schütze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F: A CYR61/ GFP fusion protein localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. *Bone* 2000; 27:53-60.
61. Lee SK, Goldring SR, Lorenzo JA, (1995) Expression of the Calcitonin Receptor in Bone Marrow Cell Cultures and in Bone: A Specific Marker of the Differentiated Osteoclast That Is Regulated by Calcitonin, *Endocrinology* 1995; 136:4572-4581
62. Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 305 211-214
63. Leu SJ, Lam SC, Lau LF: Proangiogenic activities of CYR61(CCN1) mediated through integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_6\beta_1$ human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:46248-46255.
64. Leu SJ, Liu Y, Chen N, Chen CC, Lam SC, Lau LF. Identification of a novel integrin $\alpha_6\beta_1$ binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61) *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 33801–33808
65. Leu SJ, Chen N, Chen CC, Todorovic V, Bai T, Juric V, Liu Y, Yan G, Lam SCT, Lau LF. Targeted mutagenesis of the angiogenic protein CCN1 (CYR61): selective inactivation of integrin $\alpha_6\beta_1$ -heparan sulfate proteoglycan coreceptor-mediated cellular activities. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:44177–44187
66. Lian JB and Stein GS. The cells of bone. In *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds) Academic Press, San Diego; 1999: 165-86
67. Lienau J, Schell H, Epari DR, Schütze N, Jakob F, Duda GN, Bail HJ. CYR61 (CCN1) protein expression during fracture healing in an ovine tibial model and its relation to the mechanical fixation stability. *J Orthop Res* 2006; 24: 254-262
68. Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, KuoML Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF- κ B-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem* 2004; 279:24015– 24023
69. Luo Q, Kang Q, Si W, Jiang W, Park JK, Peng Y, et al. Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2004; 279:55958–68.
70. Maeda Y, Nakamura E, Nguyen MT, Suva LJ, Swain FL, Razzaque MS, Mackem S, Lanske B. Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for

- maintaining a growth plate and trabecular bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104, 6382- 6387
71. Mc Collum EF, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. Studies on experimental rickets and experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293-312
 72. McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng M-H, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL. Mice lacking β_3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* 2000; 105:433–440
 73. Melton LJ III, Gabriel SE, Crowson CS, Tosteson ANA, Johnell O, Kanis JA. Cost-equivalence of different osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2003; 14(5): 383-388
 74. Menendez JA, Mehmi I, Griggs DW and Lupu R. The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. *Endocr. Relat. Cancer* 2003; 10, 141-152.
 75. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Teng PK Griggs DW and Lupu R. A novel CYR61-triggered ‘CYR61- $\alpha_v\beta_3$ integrin loop’ regulates breast cancer cell survival and chemosensitivity through activation of ERK1/ERK2 MAPK signaling pathway. *Oncogene* 2005; 24, 761–779
 76. Mukherjee A, Rotwein P, Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-5 Inhibits Osteoblast Differentiation and Skeletal Growth by Blocking Insulin-Like Growth Factor Actions *Molecular Endocrinology* 2007; 22(5):1238–1250
 77. Nakamura I , Duong LT, Rodan SB, Rodan GA, Involvement of $\alpha_v\beta_3$ integrins in osteoclast function *J Bone Miner Metab* 2007; 25:337–344
 78. Nakata E, Nakanishi T, Kawai A, Asami K, Yamaai T, Asano M, Nishida T, Mitani S, Inoue H & Takigawa M Expression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte-specific gene product 24 (CTGF/Hcs24) during fracture healing. *Bone* 2002; 31 441–447.
 79. Nesbitt S, Nesbit A, Helfrich M, Horton M Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$, and $\alpha_v\beta_1$ integrins. *J Biol Chem* 1993; 268:16737–16745
 80. Nishida T, Nakanishi T, Asano M, Shimo T, Takigawa M, Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. *J Cell Physiol* 2000, 184:197-206
 81. Nieuwenhuis E, Hui CC. Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Genet* 2005; 67:193–208.
 82. O` Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF Expression of *cyr 61*, a growth factor inducible immediate early gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3569-3577
 83. O`Brien TP, Lau LF, Expression of the growth factor-inducible immediate early gene CYR61 correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 645-654
 84. Parisi MS, Gazzero E, Rydziel S, Canalis E. Expression and regulation of CCN genes in murine osteoblasts, *Bone* 2006; 38 (2006) 671 -677
 85. Perbal B: NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol.Pathol* 2001, 54:57-79.]. 23:94-98].

86. Perbal B, Martinerie C, Sainson R, Werner M, He B, Roizman B: The C-terminal domain of the regulatory protein NOV is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: A clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:869-874
87. Pfeilschifter J, Mehr als ein Update – Die DVO-Leitlinien 2006 zur Osteoporose; *Arthritis + Rheuma* 2006 26 4: 213-213
88. Pientka L, Friedrich CH Osteoporose: Die epidemiologische und gesundheitsökonomische Perspektive *Za-eFQ* 2000;94:439-33.
89. Pientka L, Güger J, Die ökonomische Bedeutung der Osteoporose in Deutschland. *Der Kassenarzt* 1996; 8: 44 – 53
90. Ruehl M, Erben U, Schuppan D, Wagner C, Zeller A, Freise C, Al-Hasani H, Loesekann M, Notter M, Wittig BM, Zeitz M, Dieterich W, Somasundaram R, The Elongated First Fibronectin Type III Domain of Collagen XIV Is an Inducer of Quiescence and Differentiation in Fibroblasts and Preadipocytes, *THE J. Biol. Chem.* 2005; 280, NO. 46, pp. 38537–38543
91. Sakamoto K, Yamaguchi S, Ando R, Miyawaki A, Kabasawa Y, Takagi M, Li CL, Perbal B, Katsube K. The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 29399-29405.
92. Scheidt-Nave C, Ziegler R, Raspe H, Epidemiologie der Osteoporose. *Med. Klein* 1998 c;93: Suppl II:7-11
93. Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, Ye RD, Lau LF, Lam SC: 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* 2002; 99:4457-4465.
94. Schütze N, Schenk R, Fiedler J, Mattes T, Jakob F, Brenner RE, CYR61/CCN1 and WISP3/CCN6 are chemoattractive ligands for human multipotent mesenchymal stroma cells *BMC Cell Biology* 2007, 8:45
95. Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hüfner M, Köhrle J, Jakob F, The human analogue of murine cysteine rich protein 61 is a 1 α -25-dihydroxyvitamine D3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: Regulation by cytokines, growth factors and serum. *Endocrinology* 1998; 139: 1761-1770
96. Seibel MJ, Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26:97-122
97. Seki K, Hata A. Indian hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:18544–18549
98. Takigawa, M; Nakanishi, T; Kubota, S; Nishida, T. Role of CTGF/Hcs24/ecogenin in skeletal growth control. *J Cell Physiol.* 2003; 194:256–66
99. Tong X, O’Kelly J, Xie D, Mori A, Lemp N, McKenna R, Miller CW and Koeffler HP(2004) Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the b-catenin–c-myc–p53 pathway *Oncogene* 2004; 23, 4847–4855

100. Tsai M-S, Bogart DF, Castaneda JM, Li P and Lupu R. Cyr61 promotes breast tumorigenesis and cancer progression *Oncogene* 2002; 21, 8178–8185.
101. Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R. Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL, *Science* 2007; 316, 1749 - 52
102. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Osteoporosis is markedly underestimated: a nationwide study from Denmark *Osteoporosis Int* 2005;16(2): 134-141
103. Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF, Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate –early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol* 1997; 192:492-508
104. World Health Organisation (WHO) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of WHO study group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994;843: 1-129X
105. Wu JI, Crabtree GR, Nuclear Actin as Choreographer of Cell Morphology and Transcription, *Science* 2007; 316 1710 - 11
106. Xie D, Yin D, Tong X, O’Kelly J, Mori A, Miller C, Black K, Gui D, Said JW and Koeffler HP. Cyr61 Is Overexpressed in Gliomas and Involved in Integrin-Linked Kinase- Mediated Akt and -Catenin-TCF/Lef Signaling Pathways. *Cancer* 2004;Res., 64, 1987–1996.
107. Yeger H, Perbal B. The CCN family of genes: a perspective on CCN biology and therapeutic potential. *J. Cell Commun. Signal.* ,2007 1:159–164
108. Yoon BS, Ovchinnikov DA, Yoshii I, et al. *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:5062–5067.
109. Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von SD, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL. Osteoblast-specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 2002; 277:44005–44012
110. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 2000;141:2674–2682

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1.1:	Bone Remodelling, Basic Biology of Bone and Cartilage, Metra Biosystems.....	2
Abb. 1.1.2:	Hormonelle Kontrolle der Knochenresorption. Schematische Darstellung des Mechanismus pro-resorptiver Faktoren(a)und anaboler Faktoren (b) Boyle WJ, Simonet S, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003; 423: 337–42.....	4
Abb. 1.2:	Die Proteine der CCN-Familie (Schütze) Quelle	5
Abb. 1.4.1	Struktureller Aufbau des Proteins hCYR61 mit den charakteristischen Proteindomänen und ihrer z.T. noch spekulativen Effekte. (Schütze) Quelle	8
Abb. 1.4.2:	Darstellung der Signalübertragung bei Mitgliedern der CCN Familie an den entsprechenden Domänen Leask A, Abraham DJ (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. J Cell Science 119:4803–4810.....	10
Abb. 1.6	Das Gesamtprotein hCYR61 und die verschiedenen Konstrukte. Schütze. Quelle.....	11
Abb. 2.5.2:	Primäre und sekundäre Antikörper beim Western Blotting	17
Tab. 2.6:	Primäre und sekundäre Antikörper für die Immunfärbung	18
Abb.3.2.1:	Stimulation der Expression verschiedener Signalproteine durch zwei Konzentrationen von hCYR61 (von 50 und 1000 ng/ml) in hFOB Zellen für eine Stunde.....	21
Abb.3.2.2:	Stimulation der Expression von BMPR1A in hFOB Zellen durch Konzentrationen von hCYR61 zwischen 50 und 1000 ng/ml. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	22
Abb.3.3:	Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB Zellen durch hCYR61 (100ng/ml) welches zuvor 24h bei +4°C oder -20°C	

	gelagert wurde. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	23
Abb. 3.4.1:	Stimulation der Expression von Gli2 und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	24
Abb. 3.4.1:	Stimulation der Expression von Gli2 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2) Gli 3	25
Abb. 3.4.2:	Stimulation der Expression von Gli3 und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	26
Abb. 3.4.2:	Stimulation der Expression von Gli3 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2).....	27
Abb. 3.4.3:	Stimulation der Expression von Patched und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	28
Abb. 3.4.3:	Stimulation der Expression von Patched in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2).....	29
Abb. 3.4.4:	Stimulation der Expression von Mal und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder	

	kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	30
Abb. 3.4.4:	Stimulation der Expression von MAL in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2).....	31
Abb. 3.4.5:	Stimulation der Expression von BMPR1A und EF1 α in hFOB- Zellen durch zwei verschiedene Chargen von hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	32
Abb. 3.4.5:	Stimulation der Expression von BMPR1A in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=6, hCYR FC2, I+Start, IV, n=2)	33
Abb. 3.4.6:	Stimulation der Expression von HES2 und EF1 α in hFOB- Zellen durch hCYR61 (250ng/ml) und Konstrukte der einzelnen oder kombinierten Domänen in entsprechender molarer Konzentration. Die Stimulation erfolgte am siebten postkonfluenten Tag über eine Stunde.	34
Abb. 3.4.6:	Stimulation der Expression von HES2 in hFOB- Zellen durch das Gesamtprotein hCYR61 und verschiedene Domänen normalisiert auf EF1 α und bezogen auf die Kontrolle. (n=4, hCYR FC2 n=2)	35
Abb. 3.5.1:	Die Hauptsignalwege von RANK in der Differenzierung, Resorption und dem Überleben des Osteoklasten. Z.H.Lee, H.-H.Kim /Biochemical and Biophysical Research Communications 305 (2003) 211-214.....	36
Abb. 3.6.1:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase P38 mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.	38

Abb. 3.6.2:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte Kinase ERK 1/2 und das House Keeping Gen Tubulin mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.	39
Abb. 3.6.3	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase JNK mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.	40
Abb. 3.6.4:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase I κ B mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.	41
Abb. 3.6.5:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte Kinase S6Kinase und das House Keeping Gen Tubulin mit und ohne Vorbehandlung von hCYR61 24 Stunden zuvor.	42
Abb. 3.7.1:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase p38 mit und ohne gleichzeitige Behandlung mit hCYR61.	44
Abb. 3.7.2:	Die Effekte der Zytokine RANKL und TNF α an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die phosphorylierte und totale Kinase p38 mit und ohne gleichzeitige Behandlung mit hCYR61.	45
Abb. 3.7.3:	Diagramm der densitometrischen Analyse der Blots 3.7.1 and 3.7.2 bezogen auf total p38 und auf die Kontrolle.	46
Abb.3.8.1:	Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Integrin α v β 3 in MCSF abhängigen Knochenmarksmakrophagen der Maus.	47
Abb.3.8.2:	Der Effekt von hCYR61 auf die Expression des Calcitoninrezeptors in MCSF abhängige Knochenmarksmakrophagen der Maus.	48
Abb. 3.9:	Die Fusion von Raw264.7 Zellen unter der Stimulation von hCYR61.	49
Abb. 4.3.3.2:	Die HRG- induzierte Heraufregulation von CYR61 prädisponiert epitheliale Brusttumorzellen zu einer deregulierten Proliferation und	

zu Chemoresistenz. Dieses geschieht direkt oder durch eine autokrine Schleife über Integrin $\alpha\beta3$ und die abhängigen Signalwege PI-3K und MEK / MAPK. Menendez et al, Oncogene

2005 62

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeit und die große Unterstützung bei meinem Auslandsaufenthalt.

Bei Herrn Prof. Michael Rogers und seinem Team möchte ich mich herzlich bedanken, die mich in Aberdeen sehr gastfreundlich empfangen haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein großer Dank gilt auch der European Calcified Tissue Society, die mir den Aufenthalt in der Bone Group in Aberdeen durch ihr Stipendium erst möglich gemacht hat.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Meffert möchte ich für die Übernahme der Aufgaben des Koreferenten danken.

Allen MTAs in Würzburg und Aberdeen insbesondere Manuela Kunz, Sabine Jatzke und Denise Tosh möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die stets angenehmen Arbeitsbedingungen und Hilfestellungen bei allen Arbeiten.

Meiner Schwester Anne Schröter danke ich für die aufmerksamen Korrekturen und die Hilfe beim Formatieren der Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken: Meinem Vater Dr. Michael Schröter und meiner Mutter Gisela Schröter, die diesen Tag leider nicht mehr miterleben kann. Sie haben mich während meiner ganzen Ausbildung immer bedingungslos unterstützt und mir ein sehr schönes Studium in Würzburg, Innsbruck und Bonn sowie zahllose Auslandsaufenthalte ermöglicht.