

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**Analyse polymorpher Sequenzbereiche des Promotors des  
Humanen Cystein-Reichen Proteins 61 (hCYR61/CCN1)**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

Vorgelegt von

**Holger Hans Staab**

aus Aschaffenburg

Würzburg, im August 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. Nat. Norbert Schütze

Koreferent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2005

Der Promovend ist seit dem 19.1.04 Arzt

Allen, die diese Arbeit möglich gemacht haben, insbesondere  
meinen Eltern!

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Die CCN-Familie	3
1.2. Die Gewebeexpression von hCYR61/CCN1	7
1.3 Die biologischen Wirkungen von CYR61 und hCYR61/CCN1	8
1.4 Die Signaltransduktion von hCYR61/CCN1	10
1.5 Die Bedeutung von hCYR61/CCN1 im Knochenstoffwechsel	11
1.6 Der Promotor von hCYR61/CCN1	12
1.7 Zielsetzung der Arbeit	15
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1 PCR der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte	16
2.2 Agarose Gelelektrophorese	16
2.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten	16
2.4 Restriktion von Plasmiden	17
2.5 Dephosphorylierung von restringierten Plasmiden	17
2.6 Klonierung von hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten in Plasmide	17
2.6.1 Klonierung von Promotorkonstrukten in TOPO pCr <sup>TM</sup> 2.1 und Trans-formation in E-Coli Bakterien	17
2.6.2. Klonierung von Fragmenten in den Luziferasevektor pgl3-Basic	18
2.7 Transformation von pgl3-Basic in kompetente E-coli Bakterien	18
2.8 Mini-Präparation von klonierter DNA	18
2.9 Plasmid Präparation	19
2.10 Restriktionskontrolle der Klonierungen	19
2.10.1 Restriktion von TOPO pCr <sup>TM</sup> 2.1 Klonierungen	19
2.10.2 Restriktion von pgl3-Basic Klonierungen	19
2.11 Fragmentanalyse	20
2.12 DNA-Sequenzierung	20
2.13 Zellkultur	21
2.14 Transfektion der Promotorkonstrukte in die Zellsysteme	22
2.15 Kultivierung und Ernte der transfizierten Zellen	22

<b>2.16 Luziferase Assay</b>	<b>23</b>
<b>2.17 Proteinbestimmung nach Bradford</b>	<b>23</b>
<b>2.18 Statistische Testverfahren</b>	<b>23</b>
<b>2.19 Überblick über den Experimentalverlauf</b>	<b>24</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Auswahl der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Klonierung der PCR-Produkte</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Restriktion der TOPO-und pgl3-Basic Klone</b>	<b>29</b>
3.4 Fragmentanalyse der klonierten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte	32
3.5 Sequenzierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte	34
<b>3.6 Bestimmung der Promotoraktivität über einen Luziferase Assay</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Datenauswertung</b>	<b>36</b>
<b>3.8 Ergebnisse der Transfektionen mit den hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukten variabler Länge von 200bp-1000bp</b>	<b>40</b>
3.8.1 Transfektionen der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen	41
3.8.2 Transfektionen der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen	42
3.8.3 Transfektionen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in T/C28a <sub>2</sub> Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen	44
3.8.4 Transfektionen der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in T/C28a <sub>2</sub> Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen	45
<b>3.9 Ergebnisse der Transfektionen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge</b>	<b>47</b>
3.9.1 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in h-fob Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen	47
3.9.2 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in h-fob Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen	49
3.9.3 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in T/C28a <sub>2</sub> Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen	50
3.9.4 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in T/C28a <sub>2</sub> Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen	52
<b>3.10 Vergleich der Zelllinien und Kulturbedingungen</b>	<b>53</b>
3.10.1 Vergleich der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen und T/C28a <sub>2</sub> Zellen	54
3.10.2 Vergleich der Kultivierungsbedingungen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in T/C28a <sub>2</sub> Zellen	55
3.10.3 Vergleich der Kultivierungsbedingungen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Längen in T/C28a <sub>2</sub> Zellen	56

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Charakterisierung des hCYR61/CCN1 Promotors</b>	<b>58</b>
4.1.1 Ergebnisse der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-1000bp	58
4.1.2 Ergebnisse der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit variabler CA-Repeat Länge	60
4.1.3 Vergleich der serumfreien und serumhaltigen Kultivierungsbedingungen	61
<b>4.2 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext aktueller Literatur</b>	<b>62</b>
4.3 Kritische Wertung der Experimentergebnisse	67
4.3.1 Zellkultur	67
4.3.2 Die Methode der Elektroporation als Transfektionsverfahren	68
4.3.3 Der Luziferase Assay	68
<b>4.4 Mögliche weitere Untersuchungen</b>	<b>69</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>70</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>

# 1 Einleitung

Krankheiten, die den Knochenstoffwechsel betreffen, haben und hatten schon immer eine große Relevanz in der Medizingeschichte. Der Grund hierfür mag durch ihre hohe Inzidenz bedingt sein, wie dies beispielsweise bei der Rachitis, die bis ins letzte Jahrhundert hinein eine Volkskrankheit darstellte, der Fall war. Vielleicht mag aber möglicherweise auch die teilweise sehr skurrilen Erscheinungsformen von Knochenkrankungen, wie beispielsweise bei der Akromegalie, der Osteogenesis imperfecta, oder dem Kretinismus das Interesse an diesen Erkrankungen geweckt haben. Die morbide Faszination dieser Erkrankungen ging teilweise sogar soweit, dass Menschen mit solchen Defekten öffentlich in Wanderzirkussen zur Schau gestellt wurden und so das schauernde Aufsehen der breiten Masse der Bevölkerung erregten. Auch noch in der heutigen Zeit scheinen Erkrankungen dieser Art zu faszinieren, so dass sie nicht nur in so manchem James Bond Film tragende Rollen spielen.

Wissenschaftlich beginnt die Auseinandersetzung mit dem Knochenstoffwechsel mit der ersten Beschreibung der Rachitis im Jahr 1650 durch Glisson, DeBoot und Whistler (Hollick, 1994). Der Morbus Paget, die Osteogenesis imperfecta, oder exotische Erkrankungen, wie die Fibrodysplasia ossificans progressiva, bis hin zur Osteoporose, einer Erkrankung, mit einer enormen Inzidenz und Tragweite der heutigen Zeit, folgten in der Erforschung.

Um das Krankheitsbild der Rachitis zu verstehen und deren Pathogenese aufzuklären vergingen 250 Jahre. Dabei wurde ein wichtiges Glied im Knochenstoffwechsel, der antirachitische Faktor, das Vitamin D, von McCollum (McCollum et al., 1922), im Jahre 1922 erstmals beschrieben. Da die Rachitis eine monofaktorielle Erkrankung ist, war damit zugleich eine kausale Therapie der Erkrankung gefunden. Das Krankheitsbild der Rachitis wurde durch Gabe von Vitamin D heilbar und verlor seinen Schrecken.

Eine wissenschaftliche Herausforderung heutiger Zeit ist es multifaktorielle Erkrankungen des Knochenstoffwechsels, wie zum Beispiel die Osteoporose, besser zu verstehen. Bekannt ist die Erkrankung schon lange, man denke nur an die Beschreibung der buckeligen Hexen in den Märchen der Gebrüder Grimm, die eine eindrucksvolle Beschreibung des klinischen Spätstadiums der Osteoporose darstellt. Diese Erkrankung ist ein Beispiel mit einer enormen Inzidenz in den Industriegesellschaften und gerade im Hinblick auf die sich weiter wandelnde Altersstruktur der Bevölkerung wird die Bedeutung der Osteoporose noch stärker zunehmen. Betrachtet man nur die Kosten, die alleine für die Therapie Osteoporose-bedingter Frakturen in Deutschland aufgewendet werden müssen, es sind über 5 Milliarden € jährlich, wird die Bedeutung dieser Erkrankung offensichtlich. Nicht nur im Hinblick auf die volkswirtschaftlichen Kosten der Osteoporose, sondern gerade im Hinblick auf die Zahl der

betroffenen Patienten wird deutlich, wie nötig eine adäquate kausale Therapie wäre, an der es zur Zeit noch mangelt. Erste Ansätze einer Pharmakotherapie der Osteoporose wurden erst in den 50-iger Jahren unseres Jahrhunderts, angeregt durch die Beobachtung von Verknöcherungen an den Akren von Bergarbeitern in Fluorid Bergwerken, gefunden. Man nahm an, dass das Fluorid diese Ossifikationen bewirke. In der Tat ist Fluor auch heute immer noch eine alternative Therapieoption zur Behandlung der Osteoporose, zusätzlich zu der sogenannten Basistherapie, mit Vitamin D, Calcium und weiteren Pharmaka wie dem Parathormon, Calcitonin und der wichtigen Gruppe der Bisphosphonate.

Eine innovative Therapie der Osteoporose müsste allerdings über die bisherigen pharmakologischen Ansätze hinausgehen, die derzeit nur eine Verzögerung des Knochenabbaus, oder nur leichten Zuwachs an Knochenmasse, wie das für die Bisphosphonate gilt, bewirken können.

Ziel müsste es aber sein, frühzeitig erkennen zu können wann es zu einem pathologischen Knochenabbau kommt, bevor pathologische Frakturen auftreten. Hierzu ist jedoch eine genaue Kenntnis des Knochenmetabolismus vonnöten. Aus dieser kann man möglicherweise zu einer Behandlung gelangen, die hochwertigen Knochen, vergleichbar dem natürlichen aufbaut. Dazu muss das Therapeutikum allerdings eine anabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel ausüben und im Effekt Knochen erzeugen, der biomechanisch dem natürlichen Knochen entspricht.

Ein weiteres Problemfeld der Osteoporoseforschung ist es, Risikopopulationen anhand von spezifischen genetischen Markern zu erkennen und diese Population regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen, in Form von Knochendichtemessungen, zukommen zu lassen. Solche Marker werden als Mikrosatellitenmarker schon in anderen Feldern der Medizin, wie der forensischen Medizin und der Onkologie genutzt. Dies würde eine große finanzielle Entlastung des Gesundheitswesens bedeuten, da so nur Personen mit hohem Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose gescreent werden müssten und die Früherkennung und Frühdiagnose der Osteoporose, nicht wie bisher nur an Alter, Geschlecht und spezifische Symptomatik, wie pathologischen Frakturen geknüpft wäre.

Dafür bedarf es der weiteren Erforschung des Knochenstoffwechsels, mit seinen beteiligten Faktoren auf genomischer wie auf proteomischer Ebene. Dadurch ließe sich möglicherweise ein Modell der am Knochenaufbau beteiligten Faktoren entwickeln, um mit Hilfe dieses Modells Faktoren zu finden, die einen hochwertigen und tragfesten Knochen entstehen lassen. Mit diesen Erkenntnissen könnte langfristig eine effektive knochenaufbauende Therapie etabliert werden, deren Bedeutung dann natürlich weit über die Aspekte der Osteoporose



hinausginge. Fände man sensitive Mikrosatellitenmarker für die Osteoporosegenese, so wäre dies schon ein nicht unerheblicher Schritt in diese Richtung.

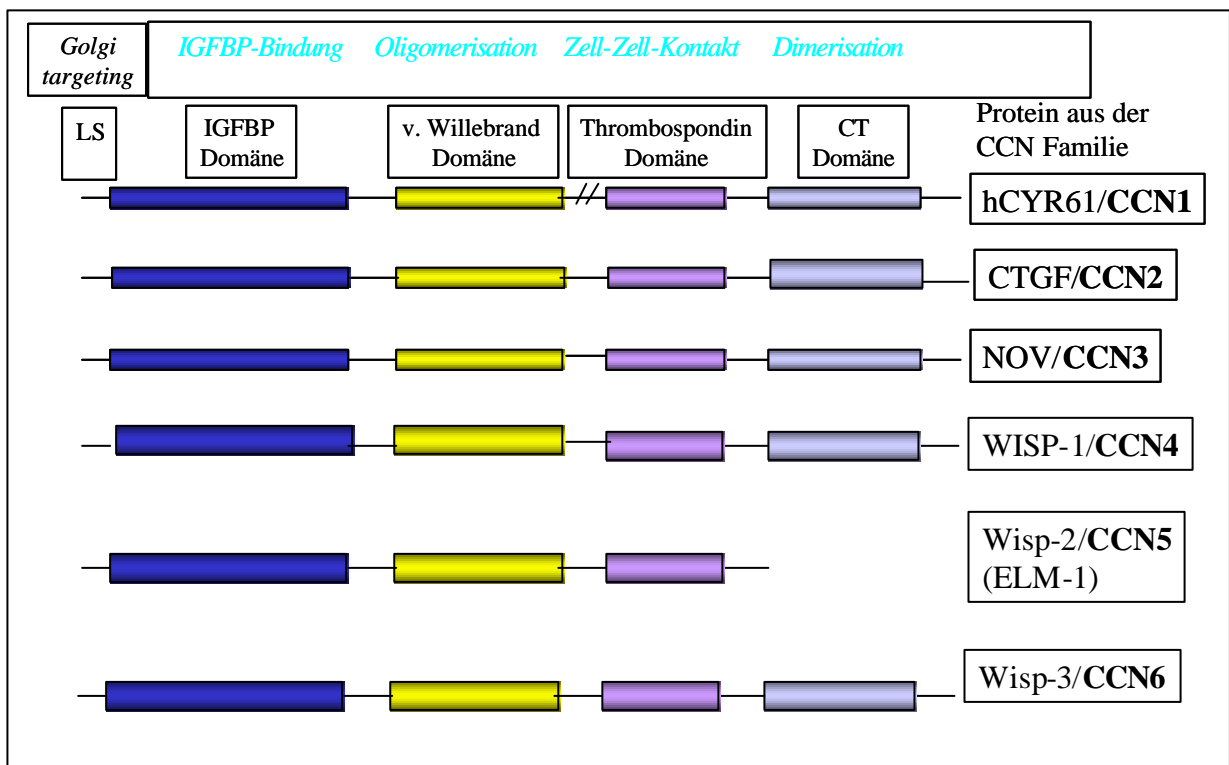
Ein möglicherweise, relevantes Glied im Knochenstoffwechsel bei Umbau-, Proliferations- und Signalprozessen innerhalb des Knochenstoffwechsels könnte ein Mitglied der noch jungen CCN-Proteinfamilie sein.

## 1.1 Die CCN-Familie

hCYR61/CCN1 (Nomenklatur verwendet nach dem Vorschlag einer einheitlichen Nomenklatur der CCN Familie von Brigstock et al., 2003) ist Mitglied einer relativ jungen Proteingruppe, der CCN-Proteinfamilie.

Diese Nomenklatur bezieht sich auf die drei prototypischen und zugleich namensgebenden Mitglieder der Familie, nämlich Cysteinreiches Protein 61 (hCYR61), Connective Tissue Growth Factor (CTGF) und Nephroblastoma overexpressed (nov). Weitere Mitglieder dieser Familie sind elm-1, WISP-1, Cop-1, WISP-2 und WISP-3.

Die Zuordnung zu dieser Proteinfamilie erfolgt über den gleichen strukturellen Aufbau, es handelt sich also nicht um eine funktionell charakterisierte Proteinfamilie, sondern um eine Strukturfamilie.



*Abbildung 1: Schematischer Überblick über die Mitglieder der CCN Familie mit ihren charakteristischen Proteindomänen und ihren aktuell noch spekulativen Funktionen.*

Charakteristisch für die CCN-Familie ist eine Domäne mit 38 konservierten Cystein Resten (Brigstock, 1999). Die Bedeutung dieses enormen Cystein Anteils, von fast 10 Prozent des Gesamtproteins ist jedoch noch ungeklärt. Die Mitglieder sind modular aufgebaut und weisen neben einer Sequenzierungs-Signalsequenz vier konservierte Domänen auf, die jeweils durch ein Exon codiert sind (Bork, 1993). Diese Domänen weisen Homologien zu folgenden Proteindomänen auf:

- **Insulin like Growth Factor binding Protein (IGFBP)**
- **v. Willebrand Faktor Typ C**
- **Thrombospondin Typ 1 Domäne**
- **C-terminales Cystein Knotenmotiv**

Welche Funktionen diese Domänen besitzen, darüber liegen noch keine gesicherten experimentellen Daten vor, obgleich über Adhäsionseigenschaften und Oligomerisierungsfunktionen spekuliert wird (siehe Abbildung 1).

Über die Mitglieder der CCN-Familie ist gegenwärtig folgendes bekannt:

**-hCYR61/CYR61, CEF10 diese entsprechen CCN1**

CEF10 ist ein Phorbolster-hemmbares und v-src induzierbares Gen des Hühnchens (Simmons et al., 1989).

CYR61 wurde als Wachstumsfaktor-induzierbares immediate early responsive Gen in Mausfibroblasten identifiziert (O'Brien et al., 1990). CYR61 ist direkt in der Lage Mesenchymale Hüftzellen der Maus zu Knorpelzellen zu differenzieren (O'Brien et al., 1992). CYR61 dient in vivo als Induktor der Angiogenese und bewirkt Zellmigration, Zellproliferation und mediiert Zellsignalprozesse (Chen et al., 2001).

hCYR61 repräsentiert ein Signalmolekül der Extrazellulären Matrix des Menschen (Jay et al., 1997; Schütze, 1998)

**-Fisp-12/CTGF entspricht CCN2**

Fisp-12 ist auch ein Wachstumsfaktor-induzierbares Gen, welches in Mausfibroblasten gefunden wurde (Ryseck et al., 1991).

CTGF (Connective Tissue Growth Factor) ist das human Analogon zu fisp-12 (Bradham et al., 1991; Igarashi et al., 1993) und spielt eine Rolle in der Wirkung von TGF- $\beta$  auf Fibroblasten (Grotendorst et al., 1997).

### **-NOV/hNOV entspricht CCN3**

Nov ist ein Gen des Hühnchens, welches bei Myoblastose assoziiertem Virus Typ1 induziertem Spheroblastom überexprimiert ist (Jolio et al., 1992). Beim Menschen und bei *Xenopus laevis* wurde es ebenfalls nachgewiesen (Martinierie et al., 1992; Ying und King, 1996). Hierbei kodiert das Gen wohl für einen Wachstumsfaktor, der die Tyrosin-Phosphorylierung modifiziert (Liu et al., 1999)

### **-ELM-1/WISP-1 entspricht CCN4**

ELM-1 zählt zu den Vertretern der CCN-Familie mit tumorsupprimierender Wirkung, was anhand von metastasierenden Melanom-Zellen der Maus nachgewiesen werden konnte (Hashimoto et al., 1998). Das humane Genprodukt WISP-1 ist demgegenüber bei Wnt-1 transformierten Zellen hochreguliert (Pennica et al., 1998)

### **-rCOP-1/CTGF-L/WISP-2 diese entsprechen CCN5**

Durch ddPCR-Analyse zur Identifizierung von p-53, bzw. ras-Zielgenen konnte aus dem Vergleich von normalen Fibroblasten der Ratte und solchen, die transformiert worden waren, rCOP-1 als ein negativer Regulator der Zell-Transformation identifiziert werden (Zhang et al., 1998).

Das humane Protein wurde aus Osteoblasten kloniert und als CTGF-L bezeichnet (Kumar et al., 1999) und ist auch unter dem Namen WISP-2 bekannt (Pennica et al., 1998).

### **-WISP-3 entspricht CCN6**

WISP-3 wurde aus Datenbankanalysen (EST-Daten) identifiziert. Mutationen des Gens stehen im Zusammenhang mit der Entstehung der pseudorheumatoiden Dysplasie (Hurvitz et al., 1999).

Die Mitglieder der CCN-Familie scheinen zusammenfassend eine wichtige Rolle in biologischen Signalprozessen zu spielen. So haben sie tragende Funktionen bei der Zelladhäsion, Zellmigration, Zellproliferation, Embryonalentwicklung, der Angiogenese und der Geweberegeneration (Grotendorst et al., 2001). Aufgrund dieser vielfältigen Regulationsprozesse insbesondere auf die Zellproliferation und die Angiogenese, ist die CCN Familie zudem in die Tumorgenese involviert. Ein neuester Versuch der Klassifikation der vielseitigen physiologischen Effekte der CCN Familie, sieht nach Brigstock (Brigstock, 2003), wie folgt aus:

### **Tumorgenese und Hormonaktivität:**

CYR61/CCN1 und CTGF/CCN2 sind Östrogen induzierbare Wachstumsfaktoren. In gynäkologischen Tumoren, wie dem Mamma Karzinom und dem Uterus Karzinom sind

CYR61/CCN1 und CTGF/CCN2 überexprimiert (Tsai et al., 2000; Sampath et al., 2001; Tsai et al., 2002)

WISP-3/CCN6 gilt als Tumorsuppressor im inflammatorischen Mamma Karzinom (Kleer et al., 2002).

Außerhalb des Tumorwachstums spielt CTGF/CCN2, Östrogen-und Progesteron gesteuert eine Rolle in der Modellierung der extrazellulären Matrix des ovariellen Stromas (Rageh et al., 2001).

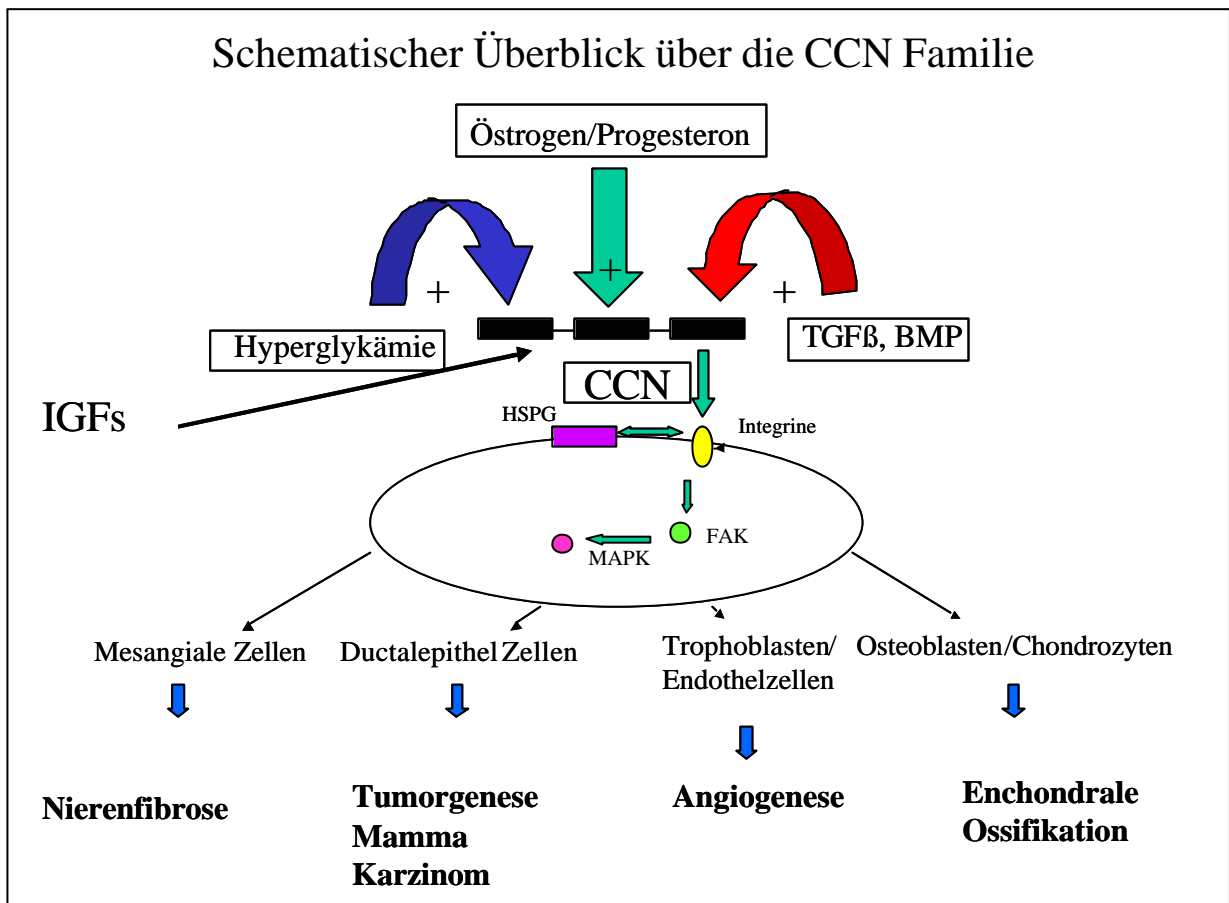


Abbildung 2: Übersicht über die Beteiligung der CCN-Familie an verschiedenen physiologischen Prozessen in den wichtigsten Gewebetypen.

### Skelettwachstum:

CTGF/CCN2 spielt eine große Rolle in der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation wie Takigawa et al., 2003 kürzlich zeigen konnten. So wird das CTGF/CCN2 deutlich von proliferierenden Osteo-und Chondroblasten bei der Frakturheilung exprimiert (Nakata et al., 2002).

CTGF/CCN2 wird durch BMP-2 und TGF- $\beta$  hochreguliert. CTGF/CCN2 defiziente Mäuse haben multiple skelettale Defekte (Ivkovic et al., 2003).

hCYR61/CCN1 ist ein Vitamin D<sub>3</sub> reguliertes immediate early Genprodukt, welches ebenso bei der enchondralen Ossifikation exprimiert wird.

Hurvitz konnte die Assoziation von CCN3 mit der autosomal rezessiven pseudo-rheumatischen Dysplasie, die mit Knorpelverlust einhergeht, nachweisen (Hurvitz et al., 1999).

### **Angiogenese und Plazentaangiogenese:**

CTGF/CCN2 und hCYR61/CCN1 regulieren Umbauprozesse der Extrazellulären Matrix des Stromas des Uterus, wahrscheinlich über Metalloproteinasen, aber darüber hinaus auch angiogenetische und endotheliale Umbauprozesse.

### **Diabetes induzierte Fibrose und besonders Nierenfibrose:**

Diabetes Mellitus Typ 1 führt zu Organfibrosen. In Frühstadien der diabetischen Nephropathie, lassen sich in der Niere mesangiale Hypertrophie und Matrixproduktion beobachten. Diese Vorgänge werden sehr wahrscheinlich über TGF- $\beta$ , das durch hohe Glukosekonzentrationen freigesetzt wird und damit die Expression von CTGF/CCN2 stimuliert, vermittelt (Wahab et al., 2002; Riser et al., 2000).

## **1.2. Die Gewebeexpression von hCYR61/CCN1**

hCYR61/CCN1 wurde von Jay et al. (1997) und Schütze et al. (1998) beim Menschen identifiziert. In Mausfibroblasten ist CYR61/CCN1 als Wachstumsfaktor induzierbares immediate early Gen schon seit 1990 bekannt (O'Brien, Yang, Sanders et al., 1990).

Die Gewebeverteilung der Expression von hCYR61/CCN1 ist ähnlich wie bei der Maus, nämlich vor allem im Herz- und Skelettmuskel, Plazenta, Ovar, Lunge, Kolon, Pankreas und nach neuen Erkenntnissen, auch im proliferierenden Knochen (Hadjiargyrou et al., 2000).

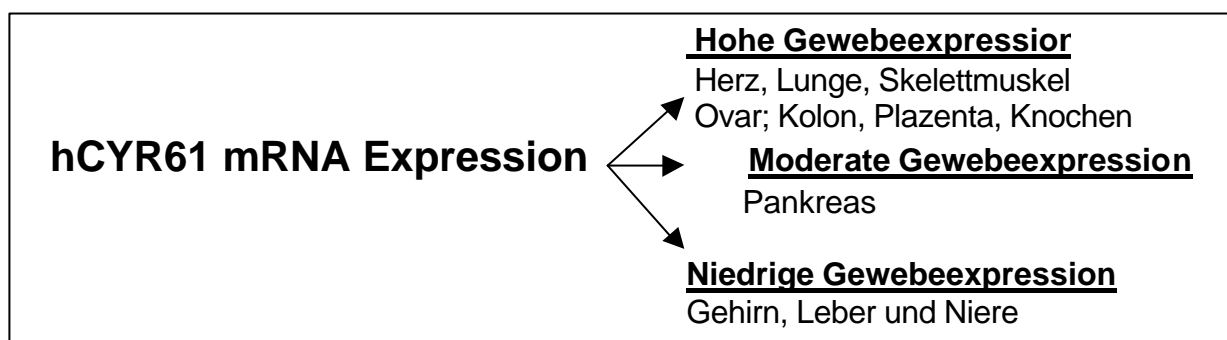


Abbildung 3: Gewebeexpressionen von hCYR61/CCN1 (nach O'Brien und Lau, 1992; Leng et al., 2002)

### **1.3 Die biologischen Wirkungen von CYR61 und hCYR61/CCN1**

hCYR61/CCN1 wurde als ein immediate early Gen in Osteoblasten charakterisiert, welches durch  $1-25(\text{OH})_2\text{Vit D}_3$ , Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert wird (Schütze et al., 1998).

Das Gen von hCYR61/CCN1 konnte von Jay dem Genlocus 1p22-p31 zugeordnet werden (Jay et al., 1997) (Genbank Zugangsnummer AF003594).

Mit dem murinen CYR61 deckt sich hCYR61 zu 85%. Wobei eine 87%-ige Übereinstimmung in der codierenden Region zu finden ist, während die 5' flankierenden Bereiche nur zu 67% mit dem murinen CYR61 übereinstimmen (Kolesnikov et al., 1998). Interessanterweise fehlt bei dem Vergleich der Promotorregion zwischen CYR61 und hCYR61 beim humanen Promotor ein Serum Response Element (SRE), dafür existieren bei hCYR61/CCN1 zusätzlich Adenosin- und Uracilreiche Elemente (Leng et al., 2002).

Dem Genlocus 1p22-p31 werden Assoziation zum Brustkrebs (Hainsworth et al., 1992), dem Neuroblastom (Gehring et al., 1995), dem Phäochromozytom (Shin et al., 1993) und dem Primären Hepatom [(Simon et al., 1991); (Jay et al., 1997)] zugeschrieben. Da diese Untersuchungen größtenteils nur lokalisatorische Assoziationen untersuchten, ist ihre Aussagekraft bezüglich der funktionellen Bedeutung von hCYR61 und den Genloci eher gering. Neuere Untersuchungen zeigen aber für das Mamma Karzinom, dass das Metastasierungspotential mit der Expression von hCYR61 verknüpft ist (Xie et al., 2001; Tsai et al., 2002). Es fand sich beim invasiv duktalem Adenokarzinomen der Mamma, das etwa 80% aller Mamma Karzinome ausmacht, ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhter CYR61/CCN1 Expression und der Ausbildung des Östrogen-Rezeptors. Der Östrogen-Rezeptor wird in der Regel mit einer günstigeren Prognose des Mamma Karzinoms assoziiert, da hier unter anderem eine antihormonelle Therapie als Zusatzoption zu Verfügung steht. CYR61/CCN1 war in 70% der Tumoren überexprimiert. CYR61/CCN1 wirkte hier über die Wirkung als Angiogenesefaktor hinaus als Wachstumsfaktorabhängiger Kopplungsfaktor von Tumorwachstumsprozessen (Sampath et al., 2002).

hCYR61/CCN1 wird deshalb auch als Tumorpromotor angesehen, da sich nach stabiler Transfektion der hCYR61/CCN1 cDNA in RF-1 Magen-Adenokarzinomzellen und

nachfolgender Transplantation in immunodefiziente Mäuse, größere Tumoren entwickelten, als in der nichttransfizierten Kontrollgruppe. Doch dieser Befund lässt sich auch durch die Angiogenesewirkung von hCYR61/CCN1 erklären. Widersprüchlich hierzu ist zudem der Befund, dass die Expression von hCYR61/CCN1 in kleinzelligen Lungen Karzinomen als tumorsuppressiv beschrieben wurde (Tong et al., 2001).

Ebenso wurde beschrieben, dass die Expression von hCYR61/CCN1 in Prostata Karzinomen supprimiert ist, was ebenso einen tumorsuppressiven Effekt andeutet (Pilarsky et al., 1998).

Im Tiermodell wirkte hCYR61/CCN1 als Angiogenese-Promotor, indem die Neovaskularisation in vivo stimuliert wurde und darüber hinaus eine gerichtete Stimulierung der Migration von humanen mikrovaskulären Endothelzellen beobachtet wurde (Babic et al., 1998). Die stimulierende Wirkung auf die Angiogenese durch CYR61/CCN1 ist so eindrucksvoll, dass es als therapeutischer Kandidat zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit betrachtet wird (Fataccioli et al., 2002).

Auch auf dem Gebiet der Neurologie gibt es Hinweise in Bezug auf die Differenzierung von hippocampalen Zellen durch CYR61/CCN1 (Chung et al., 1998). Bei der Untersuchung muscariner Acetylcholin Rezeptoren im Zentralen Nervensystem, die bei der Genese der Alzheimer Erkrankung eine wichtige Rolle spielen, fand sich hCYR61/CCN1 unter 11 weiteren Genen, die signifikant hochreguliert wurden (von der Kammer et al., 2001). In einem Rattenmodell, mit dem der ischämische Schlaganfall untersucht wurde, fand man auch hier CYR61/CCN1 bei fokaler zerebraler Ischämie in gesteigerter Konzentration (Schwarz et al., 2002). Sehr interessant war der Befund, dass die Expression von hCYR61/CCN1 bei neuronalem Zelltod über die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase und einer Serum Response like CA-rg box gesteuert wird, jedoch nicht über den Faktor p-38 und den MAP Kinase Weg (Kyung et al., 2002).

Bei akutem Nierenversagen ist CYR61/CCN1 ein Faktor, der 30-40 Minuten nach akuter Ischämie im Urin von Ratten nachgewiesen werden konnte (Muramatsu et al., 2002). Somit könnte CYR61/CCN1 als Frühmarker des akuten Nierenversagens dienen. Diese Befunde könnten im Zusammenhang mit der Angiogenese Induktion von CYR61/CCN1 stehen, wobei postischämisch die Expression von CYR61/CCN1 hochreguliert wird.

hCYR61/CCN1 besitzt ein N-terminales Sequenzmotiv, mit Sequenzhomologie zu den etablierten Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktor-Bindungsproteinen (IGFBP). Es wird eine Rolle dieses Motivs bei IGF-1 abhängigen und unabhängigen Signalprozessen zur Regulation normalen und neoplastischen Wachstums diskutiert (Kim et al., 1997). Doch auch dieser Befund ist kritisch zu bewerten, da die Bindungsfähigkeit für Vertreter der CCN Familie, am

Beispiel von CTGF, verglichen mit etablierten IGFBP, reduziert ist. Somit ist die Relevanz dieser Sequenzhomologie nicht eindeutig belegt (Collet und Candy, 1998; Grotendorst et al., 2001), zumal die C-terminale IGFBP Konsensussequenz nicht vorhanden ist. Deshalb wurde nach einem Konsensbeschluß der „CCN-Society“ (Perbal, 2001a) diese Homologie als funktionell nicht relevant eingeschätzt.

## 1.4 Die Signaltransduktion von hCYR61/CCN1

Bei hCYR61/CCN1 handelt es sich um ein Extrazellulär-Matrix-assoziiertes Genprodukt mit Signalwirkung. Über die Signaltransduktion von hCYR61/CCN1 gibt es Ergebnisse, die eine Bindungsfähigkeit von hCYR61 an das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in vitro belegen (Kireeva et al., 1998). Dies ist dadurch sehr interessant, da das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in besonders großer Dichte auf der Zelloberfläche von Osteoklasten exprimiert wird (Rodan, Rodan, 1997). Dies könnte darauf hindeuten, dass hCYR61 eine Rolle bei der Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten spielt.

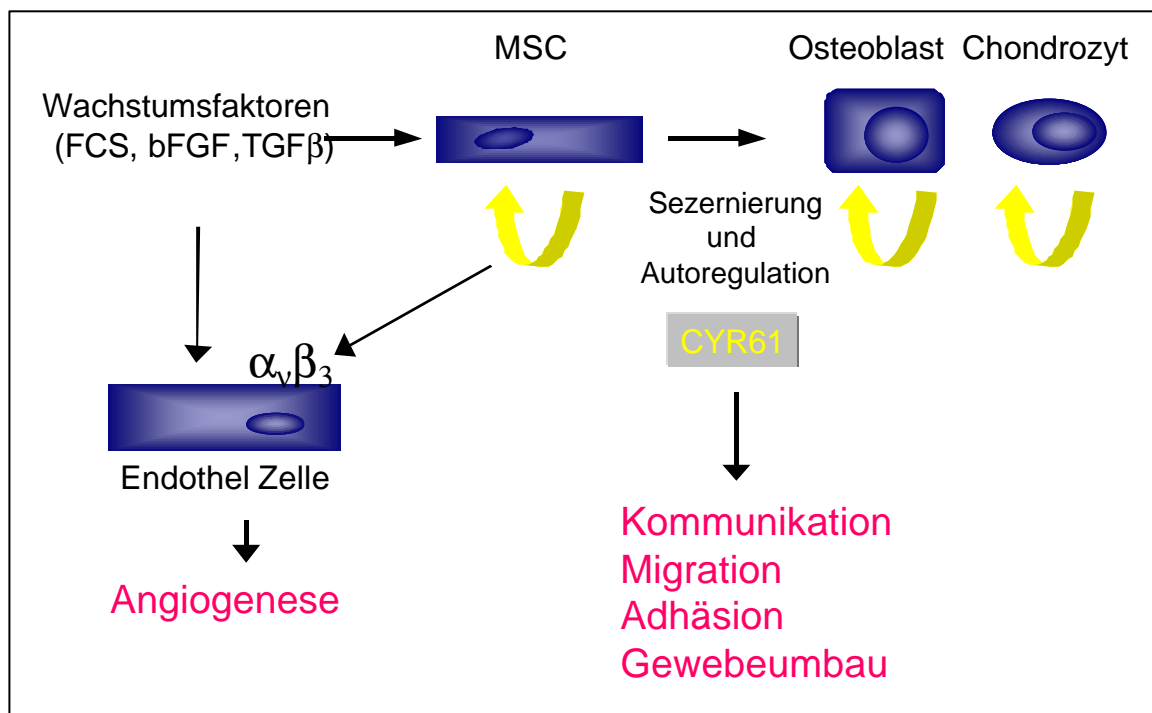


Abbildung 4: Modell der Funktionen von hCYR61/CCN1.

Die Expression von hCYR61/CCN1 wird durch Wachstumsfaktoren und Fetales Kälberserum (FCS) stimuliert. Das Protein wirkt als Signalmolekül der Extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei Zelladhäsions- und Zellmigrationsprozessen. Die proliferative und



*angiogenetische Wirkung von hCYR61 an Endothelzellen wird wahrscheinlich über das Integrin  $\alpha_7\beta_3$  mediiert.*

Durch ein Anti-Integrin Antiserum, konnte die hCYR61/CCN1 abhängige Adhäsion und Migration von Endothelzellen verhindert werden (Kireeva et al., 1998). Ähnliche Befunde gibt es auch für weitere Integrine, nämlich Integrin  $\alpha_{2b}\beta_3$  (Jedsadayanmata et al., 1999), Integrin  $\alpha_6\beta_1$ , Integrin  $\alpha_7\beta_5$  und Integrin  $\alpha_M\beta_2$  (Grzeszkiewicz et al., 2001 und 2002; Schober et al., 2002).

Eine aktuelle Untersuchung konnte das Integrin  $\alpha_M\beta_2$  als das Hauptintegrin identifizieren, mit dem Monozyten, die das Integrin  $\alpha_M\beta_2$  auf ihrer Oberfläche exprimieren, spezifisch über hCYR61/CCN1 und CTGF/CCN2 an Endothelzellen adhären und in den extravasalen Raum einwandern (Schober et al., 2003).

Daraus kann man die Annahme ableiten, dass die biologischen Effekte von hCYR61/CCN1 durch Bindung an die obengenannten Integrin Partner vermittelt werden. Zumal bekannt ist, dass Integrine die Zell-Migration und Wachstumsfaktor-Signalvermittlung beeinflussen können (Clark und Brugge, 1995).

## **1.5 Die Bedeutung von hCYR61/CCN1 im Knochenstoffwechsel**

Über die Bedeutung von hCYR61/CCN1 im humanen Knochenstoffwechsel in vivo liegen nur Ergebnisse der Arbeitsgruppe Schütze (Schütze, 2001) vor. Diese untersuchte in humanen Knochenschnitten mittels einer in-situ Hybridisierung die Expression von hCYR61/CCN1 mRNA. Man fand stark positive Signale, also eine hohe Expression an hCYR61/CCN1 mRNA über eine Antisense Sonde im Schnittmaterial von Frakturkallus, während man im ruhenden Knochen keine Signale detektieren konnte. Untersuchte man den Frakturkallus näher, so ergab sich die stärkste Aktivität bei mesenchymalen Vorläuferzellen und geringere bei differenzierten mesenchymalen Zellen, bzw. bei Osteoblasten.

Immunhistologische Untersuchungen konnten diese Befunde bestätigen. Es waren wiederum deutliche Signale im Frakturkallus zu beobachten und der normale, ruhende Knochen zeigte keine Signale.

In heterotopen Ossifikationen konnte eine starke hCYR61/CCN1 Expression nachgewiesen werden. Ein weiterer Befund, der die Rolle von hCYR61/CCN1 im Knochenstoffwechsel demonstriert zeigt, dass in einer humanen Wachstumsfuge eines Digitus I eines Kindes, durch immunhistologische Untersuchungen, eine starke lokale Expression nachgewiesen werden konnte. Diese fand sich in einem Bereich von wenigen Zellschichten, die sich kurz vor

Einsetzen der Mineralisierung befanden (unveröffentlichte Ergebnisse von Schütze et al., 2003).

All diese Befunde deuten daraufhin, dass hCYR61/CCN1 eine Rolle als Kopplungsfaktor im Mikroenvironment des Knochens spielt. Die Expression ist mit Bedingungen des erhöhten Knochenumbaus korreliert und betrifft die Angiogenese und die enchondrale Ossifikation. Unterstützt wird diese Vermutung durch tierexperimentelle Befunde mit dem murinen CYR61/CCN1 der Maus. Hier ist das Protein in die Chondrogenese involviert (Wong et al., 1997). In der Ratte hat das CYR61/CCN1-Protein teilweise ähnliche Funktionen, wie die, die man im Menschen fand, da auch hier eine 10-fach erhöhte Expression im Frakturkallus im Vergleich zum ruhenden Knochen beobachtet wurde (Hadjjargyrou et al., 2000).

Erste Experimente unserer Arbeitsgruppe mit rekombinant hergestelltem hCYR61/CCN1 Protein identifizierten Osteoblasten, Osteoklasten und mesenchymale Stammzellen als Zielzellen von hCYR61/CCN1. Eine Chip Array Analyse mit 1000 knochenspezifischen Genen konnte einige sicher von hCYR61/CCN1 gesteuerte Genprodukte identifizieren. So fand man als Genprodukte intrazelluläre Signalmoleküle, Transkriptionsfaktoren und membranständige Rezeptoren die einen Hinweis auf einen hCYR61/CCN1 vermittelten Signalweg geben könnte (unveröffentlichte Ergebnisse von Schütze et al., 2003).

In Osteoklasten des Kaninchens fand sich bei Gabe von rekombinantem hCYR61/CCN1 eine massive Reduktion der Tartrat resistenten Sauren Phosphatase (TRAP). Hieraus ergibt sich ein Bild, dass hCYR61/CCN1 als Kopplungsfaktor von Gewebe-modulierenden Prozessen wirken könnte und Prozesse der Migration, Proliferation und Adhäsion steuert.

So ist über die Bindung an Integrinrezeptoren die Regulierung von intrazellulären Signalwegen, wie dem MAP-Kinase Signalweg, die Regulation der Genexpression von hCYR61/CCN1 denkbar, die zum einen die Produktion Extrazellulärer Matrix zur Folge hat und zum anderen die Angiogenese zur Gewebeversorgung stimuliert.

## **1.6 Der Promotor von hCYR61/CCN1**

Das Gen von hCYR61/CCN1 ist auf dem Chromosom 1p22-p31 lokalisiert (Jay et al., 1997). Durch Array Filter Hybridisierung mit der hCYR61 cDNA konnte unsere Arbeitsgruppe, aus genomischen Klonen, zwei hochpolymorphe CA-Repeat Motive in der 5' flankierenden Region des Gens ausfindig machen (Schütze et al., 1998 und 2001; Lechner et al., 2000). Diese Region stellt die Promotorregion von hCYR61/CCN1 dar.

Durch Sequenzanalysen des 5` flankierenden Bereichs von hCYR61/CCN1 fanden sich mehrere Bereiche mit hoher Übereinstimmung mit dem Mauspromotor von CYR61/CCN1. In diesen Bereichen fanden sich für Promotoren typische Motive, so eine TATA-Box und diverse Motive für Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren, wie SP1, CEBP $\beta$ , CREB, FREAK-1, NF $\kappa$ B und von besonderer Bedeutung nach neuesten Untersuchungen AP-1. Diese Sequenzhomologien sprachen für das Vorliegen eines Promotors, der schematisch in der folgenden Abbildung skizziert wird.

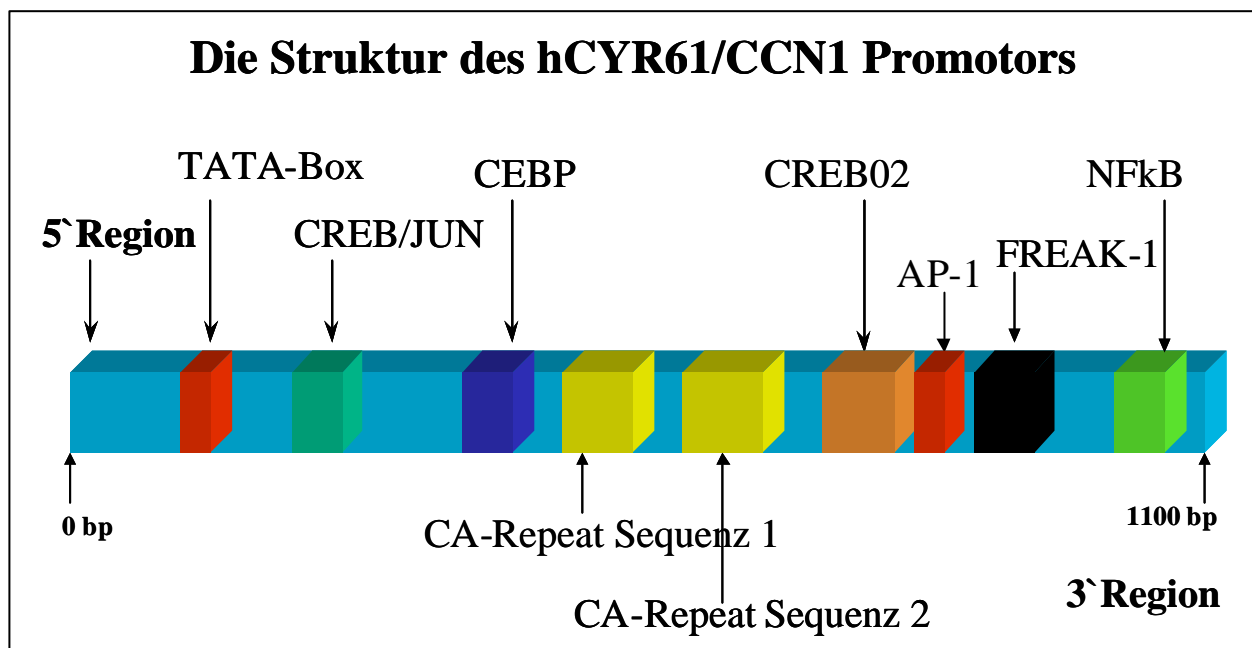


Abbildung 5: Schematische Struktur des Promotors von hCYR61/CCN1 mit den Sequenzhomologien zu bekannten Transkriptionsfaktoren, wie NF $\kappa$ B, CREB, FREAK-1 und hervorgehoben AP-1. Des weiteren sind die beiden CA-Repeat Sequenz Polymorphismen eingezeichnet.

Interessant bei der näheren Charakterisierung des Promotors waren die beiden CA-Repeat Stretches in der Promotorsequenz. In der Literatur gibt es Hinweise auf die funktionelle Relevanz von CA-Repeats und deren Polymorphismen, so beispielsweise bei neurologischen Erkrankungen, wie der Spinomuskulären Atrophie und der Spinozerebellären Ataxie.

Erste Untersuchungen in einem Mutter Tochter Kollektiv dieser polymorpher CA-Repeats innerhalb des hCYR61/CCN1 Promotors Bereiche deuten eine Assoziation bestimmter Polymorphismen mit der Körpergröße an.

Durch nähere Charakterisierung dieser Region konnte noch ein weiteres hochpolymorphes CA-Repeat Motiv in der 3'-Region des Gens lokalisiert werden und zudem einige in der Normalbevölkerung vorkommende Polymorphismen dargestellt werden (Schütze et al., 2001), vergleiche auch Tabelle 1.

Durch eigene Analysen der Polymorphismen innerhalb der CA-Repeat Sequenz 1 (in der 5' Region), des Promotors bei 36 nicht verwandten und gesunden Probanden, konnten 5 häufige Allele identifiziert werden.

Die Anzahl der CA-Repeats reichte von 17 bis zu 21. Es ergab sich eine Heterozygotenfrequenz von 0,75. Dies zeigt zusammengefasst die folgende Tabelle.

<b>Allele</b>	<b>Größe der PCR Produkte</b>	<b>Anzahl der CA Repeats</b>	<b>Häufigkeit</b>
1	164	17	0,241
2	166	18	0,037
3	168	19	0,278
4	170	20	0,222
5	172	21	0,222

n=36

*Tabelle 1: Zeigt die Größe und Verteilung des CA-Repeat Motivs bei 36 gesunden Probanden, anhand einer DNA Fragmentanalyse der Probanden.*

Nach einer aktuellen Publikation über die Regulation der Expression von CYR61/CCN1 (Han et al., 2003), scheint diese über die Transkriptionsfaktoren CREB und AP-1 vermittelt zu werden. Hierbei wird die Promotoraktivität von CYR61/CCN1 mittels Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) schnell und transient hochreguliert, was sowohl auf Proteinebene, wie auch auf der mRNA-Ebene nachweisbar war. Die S1-P Stimulation wird über die RhoA GTPase und den p38-MAP-Kinase Signalweg vermittelt (Han JS et al., 2003). Diese Veröffentlichung ist die

erste, die einen Mechanismus für die Genexpression von Cyr61/CCN1 aufzeigt, die über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren des Cyr61/CCN1-Promotors vermittelt wird.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll der Promotor von hCYR61/CCN1 funktionell charakterisiert werden und somit ein Anhalt für die spezifischen Regulationsmechanismen des Promotors von hCYR61/CCN1 gefunden werden.

Ziel war es vier unterschiedlich lange Stücke des hCYR61/CCN1 Promotors, mittels PCR zu amplifizieren und in einen Reportervektorsystem zu klonieren. Diese hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte wurden in Zellsysteme transfiziert und die Promotoraktivität der unterschiedlichen Konstrukte mittels eines Luziferase Assay Systems gemessen.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit ist ein polymorphes CA-Repeat Motiv des Promotors von hCYR61/CCN1 zu charakterisieren und ebenfalls funktionell auf seine Einflüsse auf die hCYR61/CCN1 Promotor Aktivität hin zu untersuchen.

Dazu sollen die unterschiedlichen CA-Repeat Längen in einem hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt der Länge 450bp per PCR amplifiziert werden. Danach sollen die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt der Länge 450bp in ein Reportervektorsystem kloniert und hernach in einem Zellsystem die Promotoraktivitäten ebenfalls mittels eines Luziferase Assay Systems in Abhängigkeit von der CA-Repeatlänge gemessen werden.

Langfristig könnte das Ziel verfolgt werden, sofern sich eine funktionelle Relevanz der CA-Repeat Polymorphismen ergeben sollte, diese Polymorphismen als Mikrosatellitenmarker für die Vulnerabilität einzelner Individuen zur Entwicklung einer Osteoporose zu etablieren.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 PCR der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte**

Der PCR Puffer, ein 1x Puffer, bestand aus 10mM Tris (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dNTP's.

Es wurde eine Taq Polymerase (Advan Taq Plus von Clontech), mit 5 IU, was 1 µl entsprach, benutzt.

Der PCR Ansatz wurde in einem Mastermix angesetzt, der mit Aqua bidest auf 30µl aufgefüllt wurde.

Alle verwendeten Primer stammen von der MWG-Biotech AG.

Für die PCR waren 40 Zyklen angesetzt, mit 94°C für 4min, für den ersten Zyklus,

94°C für 30 sec

60°C für 1min 15 sec

72 °C für 1min 30 sec

Durchgeführt wurde die PCR in dem Multi Cycler PTC 200 von MJ Research.

### **2.2 Agarose Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wie PCR-Produkte und Plasmide wurden auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel (0,5 µg/µl Ethidiumbromid) in 1xTBE-Puffer (10,8 g/l Tris-Puffer, 5,5 g/l Borsäure, 20 mM EDTA) aufgetragen und bei 100 V und einer 20 minütigen Laufzeit elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA-Proben wurden mit einem DNA-Probenpuffer (1xTBE, 60% Glycerol, 0,4% Bromphenylblau, 0,4% Xylen Cyanol) im Verhältnis 5:1 gemischt.

Zum Größenvergleich diente ein 100bp Größenstandard (100bp Leiter, DNA Leiter Plus von peq Gold).

### **2.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Gelextraktionen von DNA-Fragmenten wurden mit dem Gibco BRL Rapid Gel Extraction Set, nach Maßgabe des Herstellers, aufgereinigt.

Das Eluat wurde in 100µl TE-Puffer gelöst und eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde die 2,5-fache Menge 100% Ethanol zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einer Speed-Vac Zentrifuge getrocknet.

Anschließend wurde das Pellet in 20µl Aqua bidest resuspendiert.

## **2.4 Restriktion von Plasmiden**

Zur Restriktion von Plasmiden verwendeten wir folgenden Ansatz:

1µg des Plasmids (entsprach etwa 1µl)

2µl des Restriktionsenzym Bgl II (New England Bio Labs)

3µl des Restriktionspuffers III (New England Bio Labs)

14µl Aqua bidest

Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 1,5 Stunden inkubiert.

## **2.5 Dephosphorylierung von restringierten Plasmiden**

Um die Religation restringierter Vektoren zu verhindern wurden selbige wie folgt dephosphoryliert.

20µl restringierter Vektor,

2µl Alkalische Phosphatase (Boehringer Ingelheim),

10µl Alkalische Phosphatase Puffer,

Aqua bidest auf 100µl aufgefüllt

Dieser Ansatz wurde 15 min bei 37°C, 15 min bei 56°C und 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach diesem ersten Zyklus erfolgte die Zugabe von weiteren 2µl Alkalischer Phosphatase und der oben beschriebene Zyklus wurde nochmals durchgeführt.

## **2.6 Klonierung von hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten in Plasmide**

### **2.6.1 Klonierung von Promotorkonstrukten in TOPO pCr™2.1 und Transformation in E-Coli Bakterien**

Die Klonkompetenten E-Coli Bakterien (One shot™, Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut.

1µl des TOPO pCr™ 2.1-Vektor

5µl des zu klonierenden hCYR61/CCN1 Vektor-Promotorkonstruktes

werden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem angegebenen Zeitraum 2µl einer Stop Solution hinzugegeben.

Dieser Ansatz wurde auf X-Gal (40µl in der Konzentration von 40ng/ml in Dimethylformamid) präparierten LB-Agarplatten (5g/l Bacto-yeast-extract, 10g/l NaCl, 10 g/l Bactotryptone, 15g/l Bacto Agar, pH 7) ausplattiert.

### **2.6.2. Klonierung von Fragmenten in den Luziferasevektor pgl3-Basic**

Als Zielvektor der Klonierung der hCYR61/CCN1 Promotorfragmente wurde der pgl3-Basic Luziferase Reporter Vektor, von Promega verwendet.

Folgender Ligationsansatz wurde eingesetzt:

100ng des mit Bgl II restringierten und dephosphorylierten Vektors pgl3-Basic,  
50ng des ebenfalls mit Bgl II restringierten und zu klonierenden Promotorkonstruktes,  
1µl einer T4-DNA Ligase (1U/µl, Boehringer Ingelheim),  
1µl eines 10xPuffers (Boehringer Ingelheim),  
auf 10µl mit Aqua bidest aufgefüllt.

Der Ansatz wurde bei 22°C im PCR-Cycler (Multi Cycler PTC 200, von Biozym) über Nacht inkubiert.

### **2.7 Transformation von pgl3-Basic in kompetente E-coli Bakterien**

Für die Transformation von pgl3-Basic hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukten werden 3 µl des Ligationsansatzes zu den auf Eis aufgetauten E-Coli Bakterien hinzupipettiert und 1 min bei 42°C inkubiert.

Zu dieser Lösung wird 250µl SOC-Medium dazugeben. Diese Suspension wird wiederum für 30 min bei 37°C leicht geschüttelt. 300µl SOC-Medium werden zum Ansatz dazugeben und 60 min bei 37°C gerüttelt.

Die Bakteriesuspension wird bei 37°C über Nacht inkubiert.

Danach wurden 150µl des Ansatzes auf LB-Ampicillin Agarplatten (50µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

### **2.8 Mini-Präparation von klonierter DNA**

Aus den auf Agarplatten kultivierten Kolonien wurden 3-10 Klone ausgewählt und über Nacht in 10ml SOC-Medium kultiviert. Aus dieser Zellsuspension wurde über eine Mini-DNA-Präparation (Ultra clean mini Plasmid Kit von Mo-Bio Systems) nach Maßgaben des Herstellers, die entsprechende DNA extrahiert



## **2.9 Plasmid Präparation**

Aus LB-Medium Kulturen, der Mini Präparationen wurden 3ml in einer Übernachtskultur angesetzt. Diese Zellsuspension wurde nach 24 Stunden am folgenden Tag in 200ml LB-Medium wiederum über Nacht kultiviert.

Die Plasmid-Präparation erfolgte mit einem Quiagen Midi Plasmid Präparations Kit und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die aufgereinigte DNA wurde mit einer Ethanolfällung aufkonzentriert.

Dazu wurde die 2,5 fache Menge an 100% Ethanol zugegeben, diese Lösung 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus).

Nach Abschütten des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol resuspendiert und gewaschen und wieder für 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgeschüttet und das Pellet in einer Speed Vac luftgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 100µl TE-Puffer gelöst.

## **2.10 Restriktionskontrolle der Klonierungen**

### **2.10.1 Restriktion von TOPO pCr™2.1 Klonierungen**

10µl der präparierten DNA,

2µl des Restriktionsenzym EcoRI (New England Bio Labs ),

2µl des zu ECO RI gehörigen Enzym Puffers (New England Bio Labs )

Aqua bidest auf 20µl aufgefüllt.

Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach auf ein 1,5 %-iges Agarose Gel (0,5µg/µl Ethidiumbromid) aufgetragen.

### **2.10.2 Restriktion von pgl3-Basic Klonierungen**

10µl der präparierten hCYR61/CCN1 Vektor-Promotorkonstrukt DNA,

1µl des Restriktionsenzym Kpn I und Hind III (New England Bio Labs),

2µl des Enzym Puffers(Puffer II New England Bio Labs)

mit Aqua bidest auf 20µl aufgefüllt

Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach auf ein 1,5 %-iges Agarose Gel (0,5µg/µl Ethidiumbromid) aufgetragen. Der Größenvergleich der restringierten

Fragmente wurde mit einem 100 bp Größenstandard (100 bp Leiter, DNA Leiter Plus, von peg Gold) durchgeführt.

## 2.11 Fragmentanalyse

Zur Überprüfung der Längen der CA-Repeats innerhalb der verschiedenen Konstrukte und um diese normieren zu können, war eine Fragmentanalyse notwendig.

-Template DNA der Promotorkonstrukte	0,5µg	(1µl)
-ca 5` rev Primer (MWG –Biotech)	50pmol	(1µl)
-pro 1rev Primer (MWG –Biotech)	50pmol	(1µl)
-dNTP`s	25µM	(1µl)
-10xPuffer		(3µl)
-Taq Polymerase (Amersham)	1Unit	(1µl)
-Aqua bidest		(22µl)

Die PCR wurde mit 28 Zyklen durchgeführt: für den ersten Zyklus, 94°C für 3 min,  
für alle folgenden Zyklen 94°C für 30 sec  
61°C für 30 sec  
72°C für 30 sec

## 2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode mit dem Sequenzing™ Kit von Applied Biosystems. Hierbei werden in einer PCR vor allem fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingebaut, die einen Kettenabbruch bewirken. Die unterschiedlichen Längen der PCR Fragmente werden über eine dünne mit Gel gefüllte Kapillare des Sequenzers (Abi Prism 310®, Applied Biosystems) aufgetrennt und analysiert.

Für die Sequenz PCR benutzten wir: 0,5µg (5µl ) des jeweiligen Plasmids als Template  
1µg (1µl ) des jeweiligen Primers  
8µl Big Dye Terminator™ Kit (Applied Biosystems)  
7µl Aqua bidest

Das Big Dye Terminator™ v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, mit Ampli Taq® DNA Polymerase enthält folgende Reagenzien:

- A-Big Dye Terminator v3.0

- G-Big Dye Terminator v3.0
- T-Big Dye Terminator v3.0
- Desoxynucleosid Triphosphate ( dATP, dCTP,dITP, dUTP)
- Ampli Taq DNA Polymerase, FS
- MgCl<sub>2</sub>
- Tris-HCl Puffer, pH 9,0

Die PCR Bedingungen:

Die PCR wurde mit 30 Zyklen durchgeführt : 94°C für 4min, für den ersten Zyklus,

94°C für 30 sec

54°C für 1min

60 °C für 20 sec

Die PCR–Produkte wurden über Auto-Seq Säulen aufgereinigt. Auf die aufgereinigten PCR-Produkte wurden 60µl Aqua bidest, 8,1µl NaAcetat (pH 4,3), 220µl 100% Ethanol, aufgetragen und die Lösung 10min auf Eis inkubiert. Hernach wurde die Lösung mit 12000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und wieder mit 12000 U/min für 10 min zentrifugiert.

Dieser Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wird in einer Speed Vac luftgetrocknet.

Das Pellet wurde in 25µl TSR gelöst.

## **2.13 Zellkultur**

Es wurden immortalisierte h-FOB-Zellen, die von Dr. T. C. Spelsberg (Mayo Clinic Rochester, Mn) zu Verfügung gestellt wurden. Dies ist eine durch eine temperatursensitive Mutante (tsA58) des großen T-Antigens des SV40-Virus immortalisierte Zelllinie.

Gewonnen wurde diese aus einer Primärkultur humaner fetaler Osteoblasten (Harris et al., 1995).

h-FOB-Zellen müssen bei 34°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Als Medium diente DMEM/F12 (Gibco) mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS; Gibco), 10000 U/I Penicillin, 10mg Streptomycin. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden dritten Tag.

Desweiteren wurden T/C 28a<sub>2</sub> Zellen, eine Zelllinie humaner Chondrozyten, die von Dr. V. M. Golding, USA zur Verfügung gestellt wurden, kultiviert. Das verwendete Medium entsprach dem der h-FOB Zellen. Das Medium wurde hier ebenfalls jeden dritten Tag gewechselt.

Sie wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **2.14 Transfektion der Promotorkonstrukte in die Zellsysteme**

Als Zielzellen der Transfektion wurden zwei humane Zelllinien ausgewählt, h-Fob und T/C28a<sub>2</sub>. Da beide Zelllinien mit Liposomen vermittelten Methoden schlecht transfizierbar waren, erfolgte die Transfektion mit dem jeweiligen hCYR61/CCN1 Promotor-Vektor-konstrukt beider Zelllinien mittels Elektroporation.

Die Zellen wurden aus der Kultivierung nach Erreichen der Konfluenz mit kaltem PBS-Puffer gespült und mit 3ml Trypsin für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde den Zellen 7ml serumhaltiges Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in 50ml Tubes überführt und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus).

Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 11ml serumfreien Medium resuspendiert. Nachdem die Zellsuspension gut durchmischt wurde, wurden 0,5ml abgezogen, davon wurden 10µl auf eine Neubauer Zählkammer aufgebracht. Es wurden die 8 Leukozytenfelder der Neubauer Zählplatte ausgezählt und aus den bestimmten Zellzahlen ein Mittelwert gebildet. Der gebildete Mittelwert mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert ergab die Zellzahl in einem Mililiter der Zellsuspension.

Für die Elektroporation wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro transfiziertem Triplikate benötigt. Dazu wurden die  $1 \times 10^6$  Zellen in 400µl serumfreien Medium gelöst.

In Polystyrolröhrchen wurden 5µg der zu transfizierenden hCYR61/CCN1 Promotor-konstrukt-Vektor DNA vorgelegt und mit 400µl Zellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen) vermischt. Nach 20 sec vortexen wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung in sterile Küvetten transferiert (0,2cm Spaltbreite, Bio Rad).

Die Zellen wurden mit 0,12kV und 0,975µF elektroporiert (Gene Pulser II, Bio Rad, München).

Die elektroporierten Zellen wurden in Fraktionen zu 120µl in 1ml, jeweils nach Versuchsbedingung variierend, serumhaltigen, oder serumfreien Medium zugegeben. Es wurden Triplikate der jeweiligen Konstrukte in einem sterilen 12-well Plate kultiviert.

## **2.15 Kultivierung und Ernte der transfizierten Zellen**

Nach 24-stündiger Kultivierung, bei 37 °C für T/C28a<sub>2</sub> Zellen und 34 °C für h-Fob Zellen, wurde das Medium durch 1ml frisches Medium ersetzt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen nach 2-maligem Spülen mit PBS-Puffer, in 200µl RLP-Lösung (Reaction Lysis Puffer, Promega) gelöst und mit einem Zellschaber von dem Boden des 12-Well Plates gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf Tube aufgenommen und bei 4°C mit 12000 U/min für

5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Tube pipettiert und konnte so für den Luziferase Assay und die Proteinbestimmung verwendet werden.

## **2.16 Luziferase Assay**

Das Verfahren des Luziferase Assays beruht auf Fluoreszenz Photometrie. Der Reportervektor pgl3-Basic besitzt ein Luziferase Gen aus des amerikanischen Leuchtkäfers, welches fluoresziert, wenn es durch die Aktivität des klonierten Promotorfragmentes stimuliert wird. Über die Intensität der Fluoreszenz lässt sich ein Rückschluss auf die Promotoraktivität des jeweiligen klonierten Konstruktes ziehen.

Zur Durchführung eines Luziferase Assays wurden 20µl der Zellsuspension auf eine Lochplatte pipettiert.

Die Luziferase Aktivität wurde in einer Einfachbestimmung in einem Micro Lumat LB 96P von EG&G Berthold bestimmt.

## **2.17 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurden 10 µl der geernteten Zellsuspension in 400 µl Bradford Reagenz (Bio Rad) gegeben, durchmischt, 10 Minuten inkubiert und danach wurde photometrisch der Farbumschlag gemessen. Es erfolgte eine Doppelbestimmung jedes einzelnen Triplikates.

## **2.18 Statistische Testverfahren**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows und Excel für Windows.

Es wurde das übliche Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zu Ablehnung der Nullhypothese festgelegt.

Testverfahren:

Um die Unterschiede der Promotoraktivitäten des Luziferase Assays auf statistische Signifikanz zu überprüfen benutzten wir die univariate Varianzanalyse.

Als nichtparametrischer Test bei ordinalskalierten Fragen zum Vergleich zweier Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet.

## 2.19 Überblick über den Experimentalverlauf

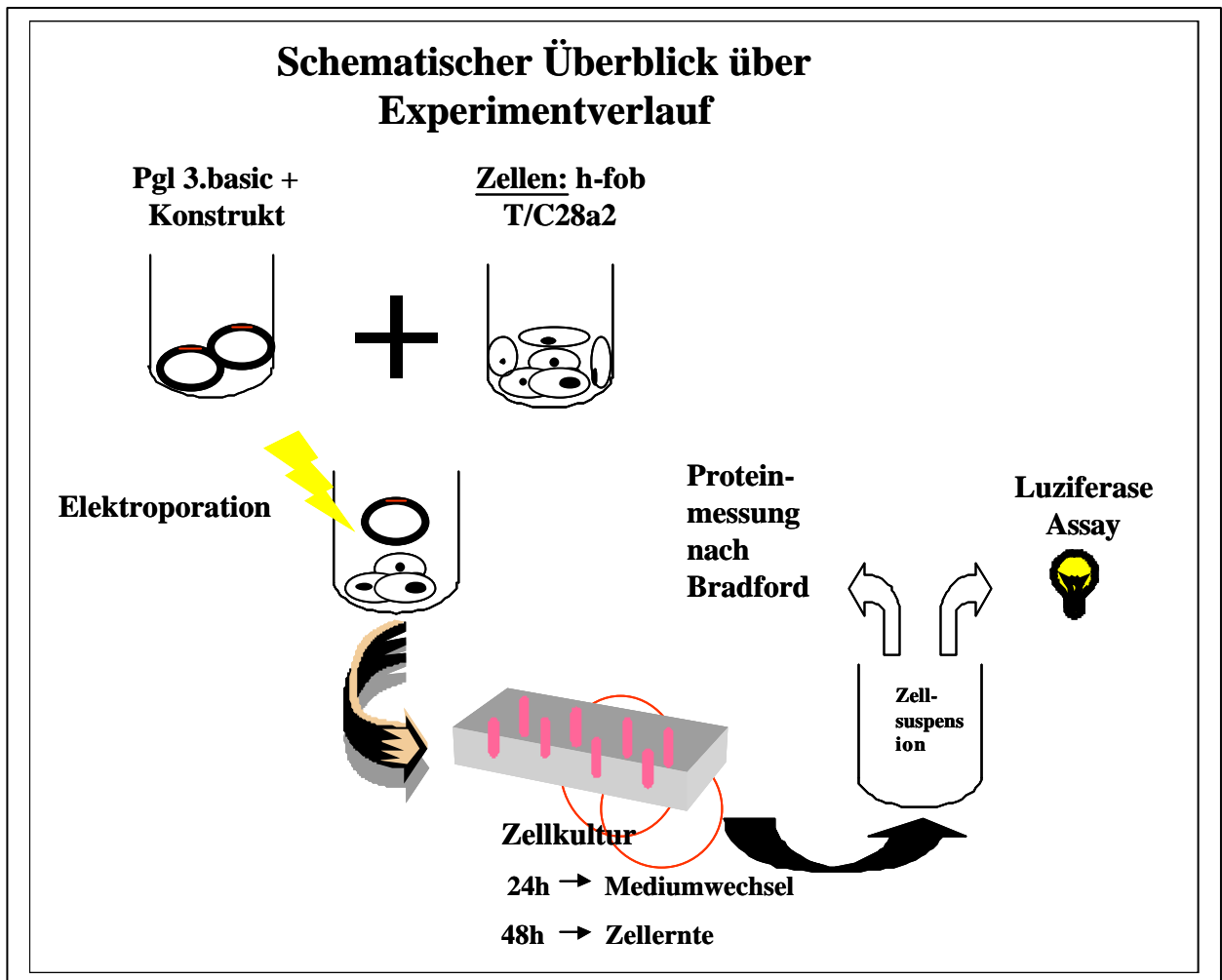


Abbildung 6: Überblick über den Ablauf der Transfektionsexperimente. Beginnend mit der Transfektion der hCYR61/CCN1-Promotor-Konstrukte in den pgl3-Basic Vektor mittels Elektroporation, des weiteren der Kultivierung der transfizierten Zellen und deren Behandlung und schließlich der Auswertung durch einen Luziferase Assay und Messung der Proteinkonzentration nach Bradford.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Auswahl der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte

Die Wahl der zu transfizierenden hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte orientierte sich nach der bekannten Sequenz des 5' flankierenden Bereichs von hCYR61/CCN1, die von Jay et al. (1997) und Schütze et al. (1998) sequenziert und veröffentlicht wurde. Diese Region besitzt wie Schütze et al., 2000 zeigen konnten Promotoraktivität.

Dies beschreibt exemplarisch die folgende Graphik, die neben dem strukturellen Aufbau des hCYR61/CCN1 Proteins, auch die Promotorstruktur enthält.

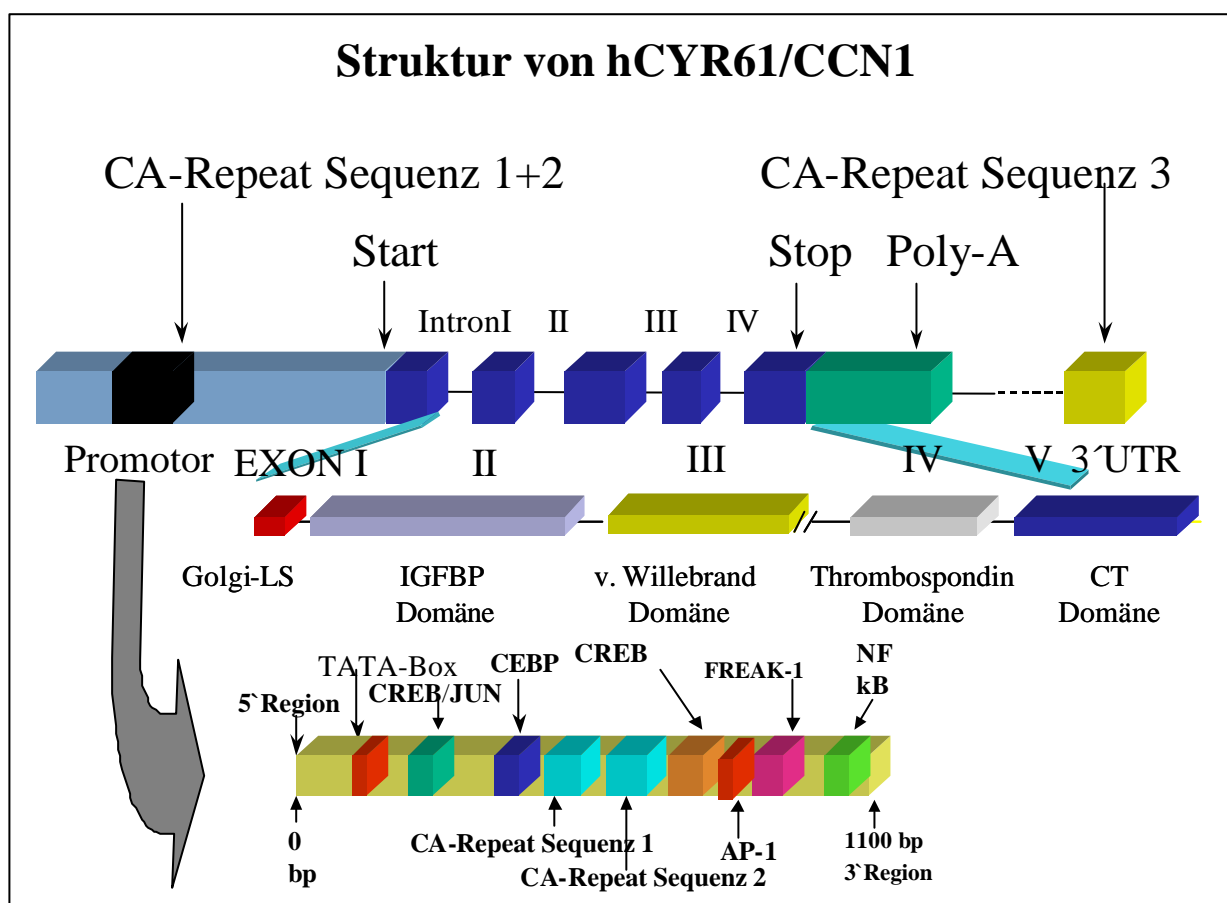


Abbildung 7: Struktur von hCYR 61/CCN1 modifiziert nach Schütze et al., 2001.

Kodiert wird das hCYR61/CCN1 Protein durch jeweils 5 verschiedene Exons, die mit I-V gekennzeichnet sind. Unterhalb der schematischen genomischen Darstellung von hCYR61, sind die Homologien zu bekannten Strukturproteinen angegeben. Das Exon I codiert für ein Proteinmotiv, den Golgi-LS, welches als Signalprotein für das intrazelluläre Proteintargeting bekannt ist. Das Exon II codiert für einen Wachstumsfaktor, IGFBP. Hierüber könnten

wachstumsstimulierende Signale mediiert werden. Das Exon III codiert für die v. Willebrand Domäne Typ C, mit Oligomerisationsfunktion. Das Exon IV codiert für die Thrombospondin Typ I Domäne, welche bei Zelladhäsionsprozessen beteiligt ist. Das Exon V codiert das C-terminale Cystein Knotenmotiv, die CT-Domäne mit Dimerisationseigenschaften.

Nachfolgend ist die Originalsequenz des hCYR61/CCN1 Promotors dargestellt.

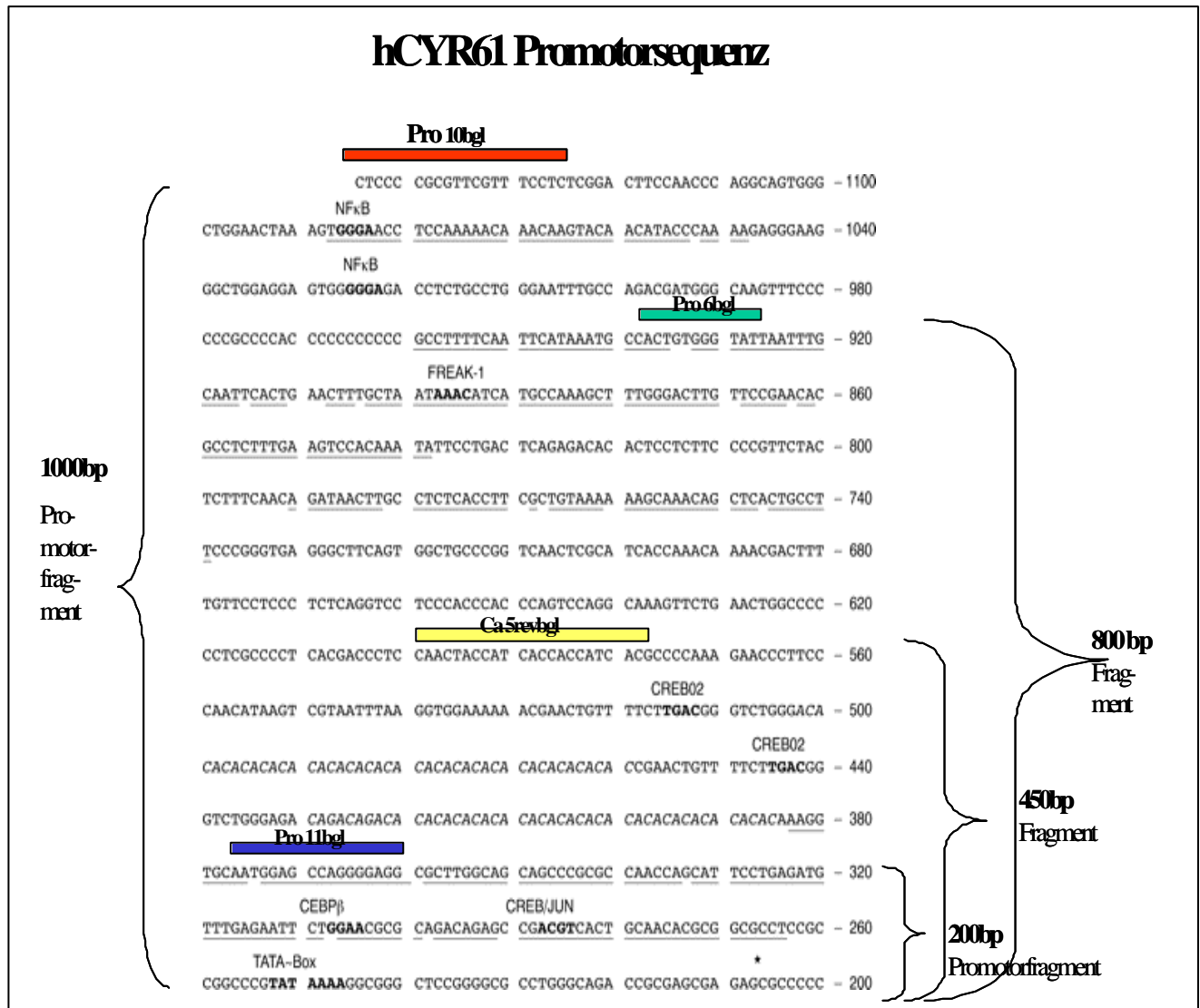


Abbildung 8: Promotorsequenz von hCYR61/CCN1 (nach Schütze et al., 1999). Über der Sequenz sind bekannte Sequenzhomologien von Transkriptionsfaktoren dargestellt. Es sind die in der PCR verwendeten Primersequenzen farblich hinterlegt und über der Sequenz eingetragen. Seitlich sind die Größen der verwendeten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte aufgezeichnet.

hCYR61/CCN1 besitzt 3 verschiedene Poly-CA-Repeat Bereiche. Zwei innerhalb des Promotors, die mit CA-Repeat Sequenz 1 und 2 gekennzeichnet sind und einen, upstream in



3'Richtung des Gens. Für den Promotor sind in Abbildung 7 und 8 schematisch die Sequenzhomologien zu bekannten Transkriptionsfaktoren angegeben. So befindet sich eine TATA-Box und mehrere Motive für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie CREB, FREAK-1, NF $\kappa$ B und AP-1 in den kodierenden Regionen des Promotors von hCYR61/CCN1.

Aus der Kenntnis der Sequenz von hCYR61/CCN1 wurden 4 Konstrukte, die alle die TATA-Box des Promotors enthielten ausgewählt.

Es wurde ein 200bp Konstrukt ausgesucht, mit welchem das Aktivitätsniveau eines minimalen hCYR61/CCN1 Promotorfragments untersucht werden sollte. Die anderen drei hCYR61/CCN1 Promotorfragmente, 450bp, 800bp und 1000bp, sollten in Abstufungen die Aktivität des hCYR61/CCN1 Promotors erfassen.

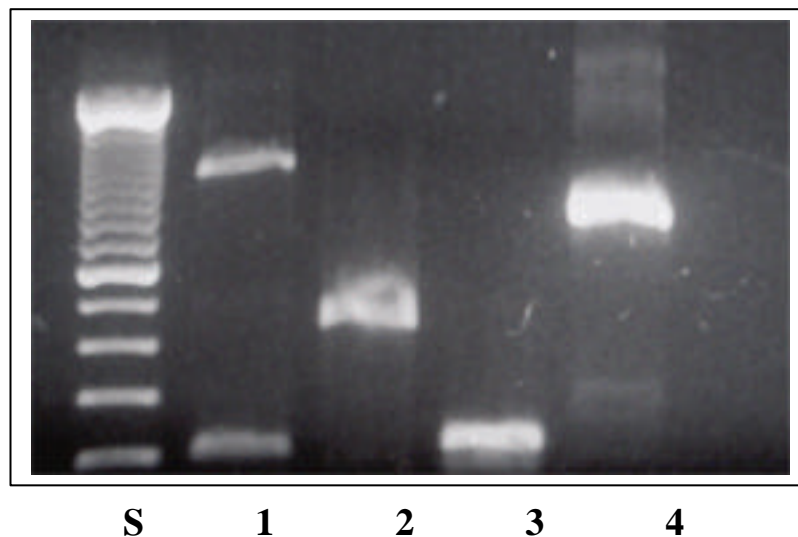
Das für die PCR verwendete Template, der Klon J23219, wurde aus einer Lambda Phagendatenbank bezogen. Die Primer wurden von der Primärdatenbank des Ressourcenzentrums Berlin bezogen, dies ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

<b>Primer</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Position der Primer</b>	<b>hCYR61/CCN1 Promotorkonstruktgröße</b>
Ca 5 reverse bgl entspricht <i>reverse 1</i>	5`ATCGAGATCTCAA CTACCATCACCACG C3`	125bp	
Cyr 5.3 bgl entspricht <i>forward 1</i>	5`GAGATCTGGAGAA GGCGCGGAGGG3`	575bp	Prom 3 <i>reverse 1+forward 1</i> 450bp
pro 10 bgl entspricht <i>forward 2</i>	:5`ATCGAGATCTCT CCCCGCGTTCGTTT CCTC3`	1125bp	Prom 1 <i>reverse 1+forward 2</i> 1000bp
pro 6 bgl entspricht <i>forward 3</i>	:5`ATCGAGATCTCT GTGGGTATTTTGCA ATTC3`	925bp	Prom 2 <i>reverse 1+forward 3</i> 800bp
pro 11 bgl entspricht <i>forward 4</i>	5`ATCGAGATCTAAT GGAGCCAGGGGCG3`	360bp	Prom 4 <i>reverse 1+forward 4</i> 235bp

*Tabelle 2: Darstellung der verwendeten Primer, mit ihren Sequenzen und den sich daraus ergebenden hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten.*

In der PCR wurden Bgl-Primer verwendet, die eine einfache Klonierung in den Expressionsvektor ermöglichen sollten.

Die folgende Abbildung demonstriert die Gelelektrophorese einer PCR mit dem Template J23219 und den obengenannten Primern. Das Ergebnis waren die vier erwünschten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte mit den Längen 200bp, 450bp, 800bp und 1000bp.



*Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese der PCR mit dem Template J23219.*

*1: Prom 1 = 1000bp, 2: Prom 3 = 450bp, 3: Prom 4 = 200bp, 4: Prom 2 = 800bp,  
S: 100bp Leiter Standard*

### **3.2 Klonierung der PCR-Produkte**

Es stellte sich jedoch heraus dass eine direkte Klonierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte in den pgl3-Basic Vektor eine zu geringe Effizienz besaß, so dass ein Umweg über ein alternatives Klonierungssystem nötig wurde. Dies lag vermutlich an der geringen Restriktionseffizienz des Bgl Restriktionsenzym für die Bgl-Primer PCR-Produkte.

Als Alternative fand sich die Doppeltklonierung zuerst in das TOPO pCr™2.1 und erst danach in den Expressionsvektor pgl3-Basic. Hierdurch konnte die gewünschte Effektivität der Klonierung erreicht werden.

Die jeweiligen Banden der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der PCR wurden aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und in ein TOPO pCr™ 2.1-Vektor-System von Invitrogen kloniert.

Der linearisierte Vektor TOPO pCr™2.1 enthält an seinen restringierten 3`-Enden einen Thymidin Overhang. Dort befindet sich die Topoisomerase I, die die Religation der Vektorenden verhindert, so dass der Vektor nicht dephosphoryliert werden muss. So lassen sich PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert wurden bequem klonieren, da diese immer einen 3` Adenosin Overhang besitzen und somit komplementär zum Thymidin Overhang des Vektors sind.

Die erfolgreich ins TOPO Blueprint TA Cloning System transformierten Zellen wurden durch eine Blau-Weiß Selektion auf X-Galaktose präparierten LB-Agarplatten ausgewählt. Das Prinzip der Selektion beruht darauf, dass der Blueprint Vektor mit der erfolgreichen Transformation die Sequenz für das Enzym Galaktosidase verliert und die E-Coli Bakterien hiermit nicht mehr in der Lage sind, die Galaktosidase-Reaktion durchzuführen. Deshalb bleiben die wahrscheinlich erfolgreich transformierten Bakterien Klone auf den mit X-Galaktose inkubierten Agarplatten weiß, wohingegen die untransformierten E-Coli Klone weiterhin die Galaktosidase Reaktion und somit die Farbumsetzung betreiben können.

Nach Inkubation über Nacht wurden dann 3-5 weiße Klone ausgewählt und in 3ml LB-Medium kultiviert.

Aus der Zellsuspension wurde in einer Mini DNA-Präparation, die Vektor DNA extrahiert und aufgereinigt.

### 3.3 Restriktion der TOPO-und pgl3-Basic Klone

Die aufgereinigte DNA wurde dann einem Restriktionsverdau zugeführt, der zeigen sollte, ob die Inserts tatsächlich in den TOPO pCr™ 2.1-Vektor kloniert wurden. Dazu wurde das Restriktionsenzyme Eco RI verwendet, für das 2 Schnittstellen links und rechts der Multiple Cloning Site (MCS) vorhanden sind. Dies ist in Abbildung 10 demonstriert.

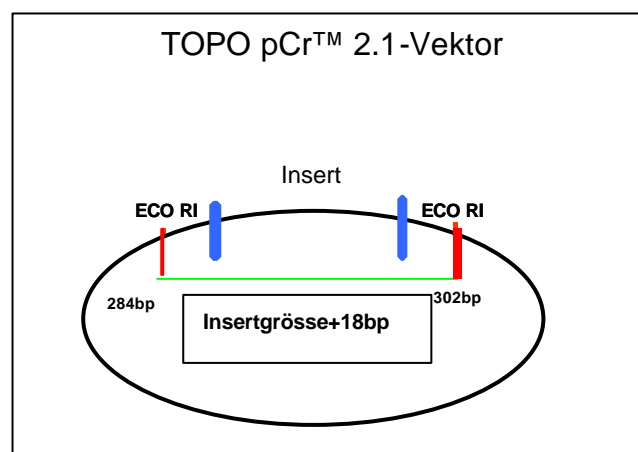
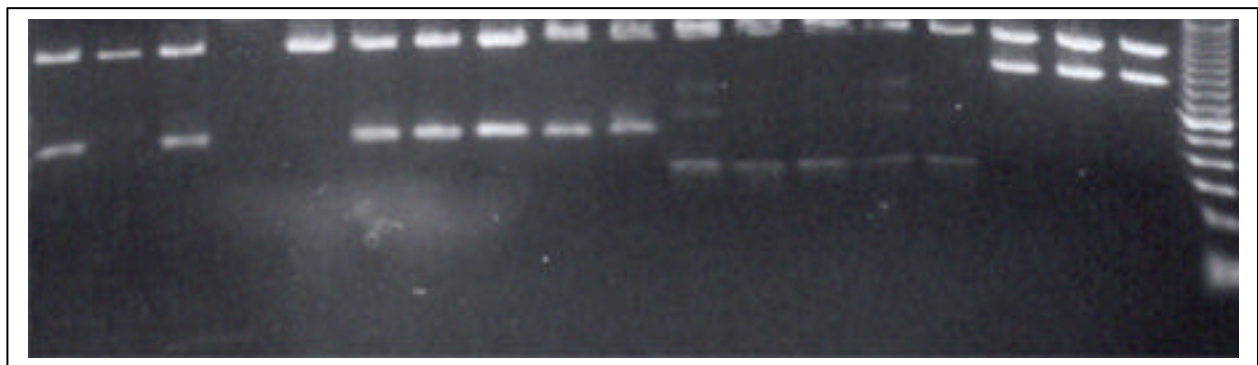


Abbildung 10: Vektormap von TOPO pCr™ 2.1-Vektor mit *ECO RI* Schnittstellen. Es ist erkennbar, dass zu der Größe des klonierten Inserts nur 18 bp hinzugefügt wurden, um die Größe des Restriktionsfragmentes mit *ECO RI* zu erhalten.

Die Restriktion wurde mit einer Gelelektrophorese überprüft und ist auf der folgenden Abbildung zu sehen.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 S  
 Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese einer Restriktion von TOPO pcR 2.1 mit *ECO RI* zur Überprüfung der klonierten Promotorinserts.

**1-3: Prom 1 1000bp**

**5-9: Prom 3 450bp**

**10-14: Prom 4 200bp**

**15-17: Prom 2 800bp**

**S: 100bp Ladder Standard**

Die Promotor PCR-Konstrukte richtiger Größe wurden ausgewählt, mit dem Restriktionsenzym *Bgl II* restringiert und dann in den ebenso mit *Bgl II* restringierten Vektor *pgl3-Basic* kloniert. Hernach wurde das Vektor-Promotorkonstrukt in kompetente *E-coli* Bakterien transformiert. Aus den Übernackturen auf LB-Ampicillin Agarplatten wurden 3 Klone ausgewählt und in 3ml LB-Ampicillin Medium weiterkultiviert. Als erste Erfolgskontrolle wurde eine Doppeltrestriktion mit *Kpn I* und *Hind III* durchgeführt, die jeweils links und rechts der Multiple Cloning Site Restriktionsstellen besitzen. Die Restriktion mit *Bgl II* war nicht möglich, da der *pgl3-Basic* Vektor mehrere *Bgl II* Schnittstellen besitzt und somit die Zuordnung der klonierten Promotorkonstrukte unmöglich gemacht wurde.

Durch die Doppeltrestriktion mit *Kpn I* und *Hind III* entstand ein zusätzlicher Overhang von 48bp zur Größe der Inserts.

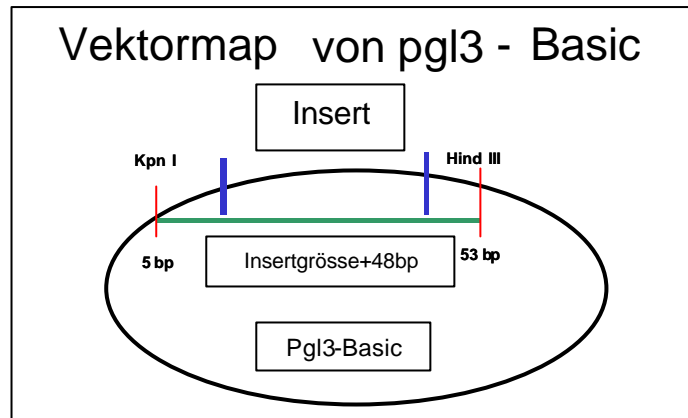
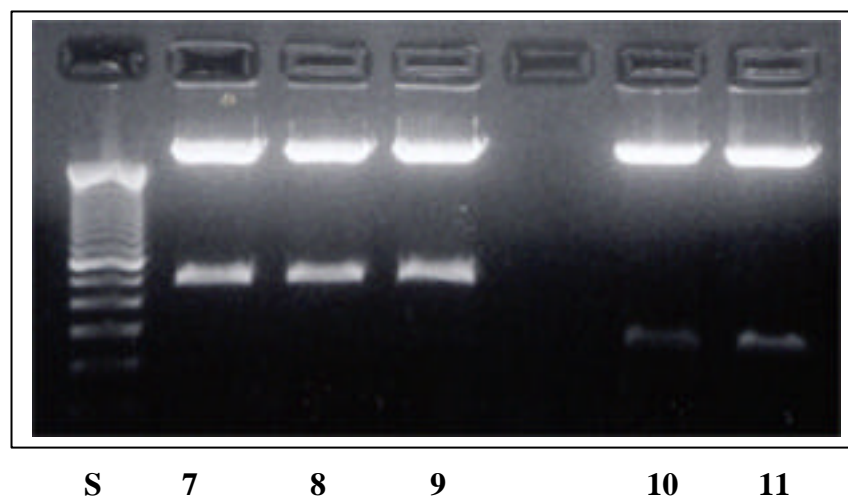
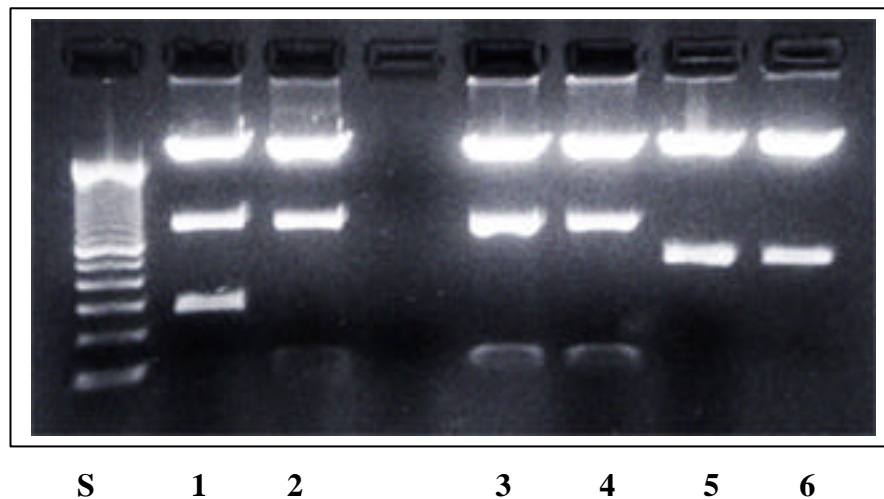


Abbildung 12: Vektormap von pgl3-Basic mit Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme. Zur Größe des klonierten Inserts müssen noch 48 bp hinzugefügt werden, um die Größe des Restriktionsfragmentes mit Kpn I und Hind III zu erhalten.

Man kann auf folgenden Abbildungen die Gelelektrophoretische Darstellung der Restriktionen von pgl3-Basic-Promotorkonstrukten mit KpnI und Hind III erkennen.



*Abbildung 13: Gelelektrophorese einer Restriktion mit Hind III und Kpn I von Midi-Präp DNA aus einer pgl3-Basic Klonierung der folgenden Promotorkonstrukte:*

**1: Prom 1=1000bp; 2-4: Prom 2=800bp; 5-9: Prom 3=450bp; 10-11: Prom 4=200bp;**

**S: 100bp Leiter Standard**

*Die erste Bande entspricht dem linearisierten pgl3-Basic Vektor, die zweite Bande dem hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt.*

### **3.4 Fragmentanalyse der klonierten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte**

Neben der Fragestellung der Promotorregulation wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob ein CA-Repeat Polymorphismus innerhalb des Promotors von hCYR61/CCN1 Auswirkungen auf die Promotoraktivität besitzt. Wir untersuchten den in sämtlichen Graphiken mit CA-Repeat Polymorphismus 1 bezeichneten Abschnitt in 3' Richtung vom Transkriptionsstart des hCYR61/CCN1 Promotors. Hierzu verwendeten wir das hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt Prom 3 mit der Länge von 450bp, um diese Fragestellung zu bearbeiten.

Wir verwendeten als Template der PCR keine genomische DNA, um die Polymorphismen zu erzeugen, sondern wir nutzten ein identisches Template (J23212). Um die Variationsbreite der CA-Repeats zu erreichen wurde die Fehlerproduktion der Taq-Polymerasen ausgenutzt. So konnten die unterschiedlichen CA-Repeat Längen des hCYR61/CCN1 Promotorkonstruktes Prom 3 mit 450bp Länge erzeugt werden. Durch die Syntheseungenauigkeit, den sogenannten Stotterbanden der Taq-Polymerase konnten die gewünschte Breite an CA-Repeat Polymorphismen im 450bp hCYR61/CCN1 Promotor-Konstrukt erzeugt werden, die vorher als natürlich vorkommende Polymorphismen anhand genomischer DNA-Proben dokumentiert worden waren (siehe Tabelle 1).

Dies waren die Repeatlängen von 17 CA-Repeats bis zu 22-CA Repeats, die wir im 450bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt testeten (was einer Länge von 164 bp bis zu 174 bp in der Fragmentanalyse entspricht). Allerdings fehlte das Fragment 450bp mit 18 CA Repeats, was 166 bp in der Fragmentanalyse entspricht. Dieses Konstrukt ließ sich weder durch eine entsprechende humane DNA-Probe, noch über die Varianz der Taq-Polymerase mit dem Template J23212 herstellen.

Die Tabelle auf der folgenden Seite zeigt alle verwendeten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte. Es sind die CA-Repeat Längen der CA-Repeat Sequenz 1 und 2 angegeben, wobei wir nur die CA-Repeat Sequenz 1 variierten.

Konstruktabelle:

<b>Konstrukte:</b>	<b>CA-Repeatsequenz 1 CA-Repeat Länge</b>	<b>CA-Repeatsequenz 2 CA-Repeat Länge</b>
<b>Vektor only</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>200 bp</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>450 bp</b>	<b>17 19 20 21 22</b>	<b>19 19 19 19 19</b>
<b>800 bp</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<b>1000 bp</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<b>umgekehrte Orientierung:</b>		
<b>200 bp</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>450 bp</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<b>800 bp</b>	<b>21</b>	<b>19</b>
<b>1000 bp</b>	<b>21</b>	<b>19</b>

*Tabelle 3: CA-Repeatlängen der in den Klonierungen verwendeten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte.*

Um die Länge der CA-Repeats in den unterschiedlichen hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten kontrollieren zu können wurde eine Fragmentanalyse durchgeführt. Auch für die Promotorkonstrukte 800bp und 1000bp war diese Kontrolle nötig, da diese Fragmente auf eine CA-Repeat Länge von 19 CA-Repeats normiert wurden. Durch eine Fragmentanalyse kann die Länge von DNA-Fragmenten bestimmt werden. Der höchste Peak der Messung gibt den Endpunkt des Fragments an und ist somit die Messpunkt für die Größe des Fragmentes und damit auch indirekt der Länge der darin enthaltenen variablen Sequenzen. Somit konnte die Länge der CA-Repeats bestimmt werden.

Die Fragmentanalyse wurde teilweise vor der Klonierung in den pGL3-Basic Vektor, aus TOPO Klonen vorgenommen, teilweise erst nach der Klonierung in den pGL3-Basic Vektor.

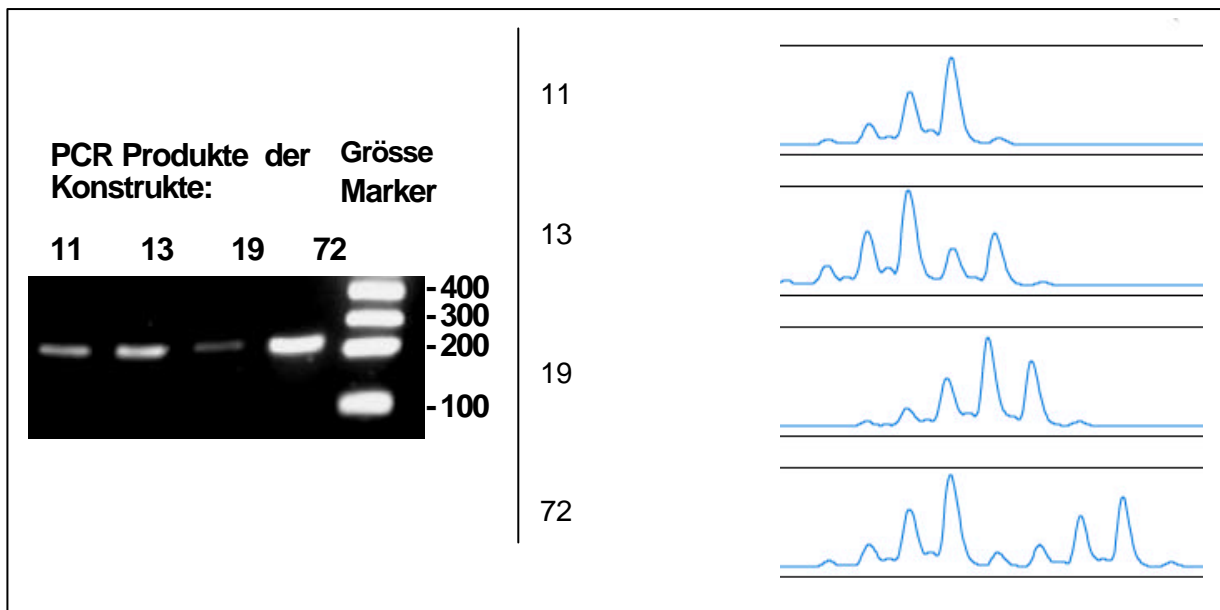


Abbildung 14: Fragmentanalyse einiger hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte

Die Abbildung zeigt die typische Struktur eines Dinukleotid Repeats, als Signalgruppe. Hierbei entspricht das Signal mit dem höchsten Peak dem erwarteten Molekulargewicht des PCR-Produktes und die anderen Banden entsprechen den sogenannten Stotterbanden, die durch Überspringen der CA-Repeats zustande kommen.

### 3.5 Sequenzierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte

Die letzte Kontrolle der in pgl3-Basic klonierten Inserts erfolgte mittels Sequenzierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte. Durch die Sequenzierung konnte über die Fragmentanalyse hinaus, nicht nur die CA-Repeat Längen bestimmt werden, sondern die gesamte Sequenz des Promotorkonstruktes überprüft werden. Mit der Sequenzierung wurde gleichzeitig die Sequenz der Klone mit der Original Templatessequenz verglichen, um Synthesefehler der Taq Polymerase auszuschließen. Eine Exemplarische Sequenz ist in der Abbildung auf der folgenden Seite zu sehen.

Der letzte Arbeitsschritt bestand in der Herstellung größerer Mengen an hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt-Vektor DNA, die über Plasmid Präparationen hergestellt wurden. Dazu waren mehrere Plasmid Präparationen nötig.

Die Konzentration der Promotorkonstrukt-Vektor DNA wurde photometrisch für alle verwendeten hCYR61/CCN1 Promotor-Vektor Konstrukte auf 750 µg/ml normiert.



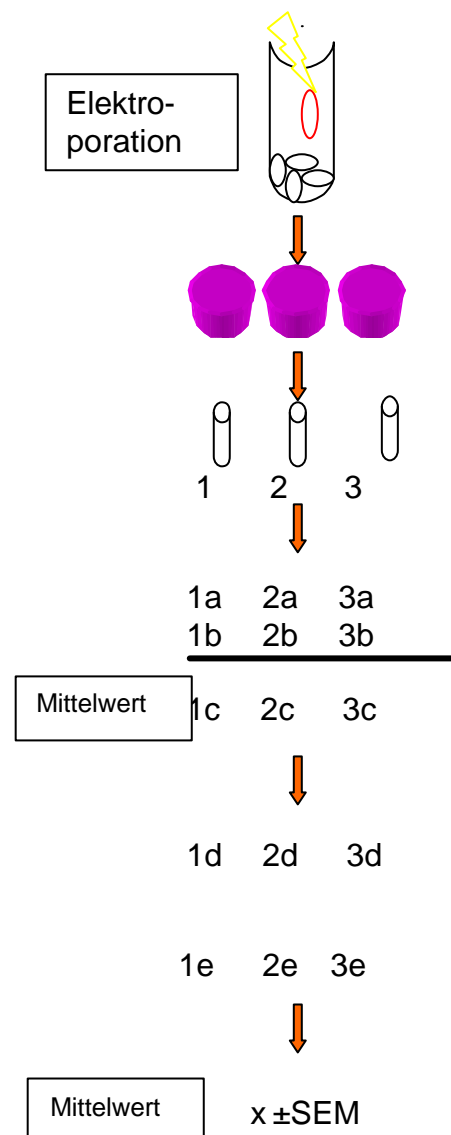


Auch diese Fragestellung wurde unter serumhaltigen und serumfreien Zellkulturbedingungen untersucht. Eine Übersicht der in diesen Versuchen verwendeten Plasmide gibt Tabelle 3.

### 3.7 Datenauswertung

Im folgenden soll nun exemplarisch aufgeführt werden, wie die Transfektionen durchgeführt und wie die entstandenen Daten ausgewertet wurden. Dieses Procedere wurde für alle weiteren Versuche standardisiert in der gleichen Form durchgeführt.

10 <sup>6</sup> Zellen in 400µl serumfreien Medium 5µg Vektor-Promotorkonstrukt transfiziert mittels Elektroporation
Aufteilung der Medium-Zell-Promotor Suspension in 3 Wells (Triplikate) Nach 24h Mediumwechsel
Nach 48h Zellernte
Proteinmessung in Doppelbestimmung  Bestimmung des Mittelwertes <b>[in µg/ml Protein]</b>
Bestimmung der Luziferaseaktivität mittels Luziferase-Assay <b>[FU/µl]</b>
Normierung auf Proteingehalt <b>e=d/c</b> <b>[FU/ µg Protein]</b>
Berechnung des <b>Mittelwertes</b> und des Standardfehler des Mittelwertes ( <b>SEM</b> )
Normierung auf <b>pgl 3-Basic</b> oder <b>450bp- 21CA-Repeats</b>



Als Transfektionsverfahren benutzen wir die Elektroporation der Zellen. Dies gilt für beide verwendeten Zelllinien. Die Elektroporation stellte sich im Versuchsverlauf bei den von uns verwendeten Zelllinien, mit einer Effizienz von etwa 30%, der Liposomen vermittelten Transfektion, als überlegen heraus. Dies ist auf zellspezifische Unterschiede zurückzuführen. Deshalb verwendeten wir in der Datenauswertung nur Daten von Transfektionen mittels Elektroporation.

Um die Luziferaseaktivitäten unabhängig von der Zellzahl vergleichbar zu machen, wurde die mittlere Luziferaseaktivität auf den Mittelwert der Proteinkonzentrationen normiert. Die Proteinkonzentrationen maßen wir in einer Doppelbestimmung. Wir erhielten so die **Relative Luziferasaktivität in FU/µg Protein**.

Im folgenden ist die Auswertung der Daten exemplarisch anhand eines Experiments dargestellt. Jede Elektroporation eines Promotorkonstruktes in die Zielzelllinie wurde in 3 Wells aufgeteilt, somit entstanden immer Triplikate einer Versuchsreihe, die gemittelt wurden. Es wurden die Daten der Transfektion von h-fob Zellen verwendet, die serumhaltig kultiviert wurden.

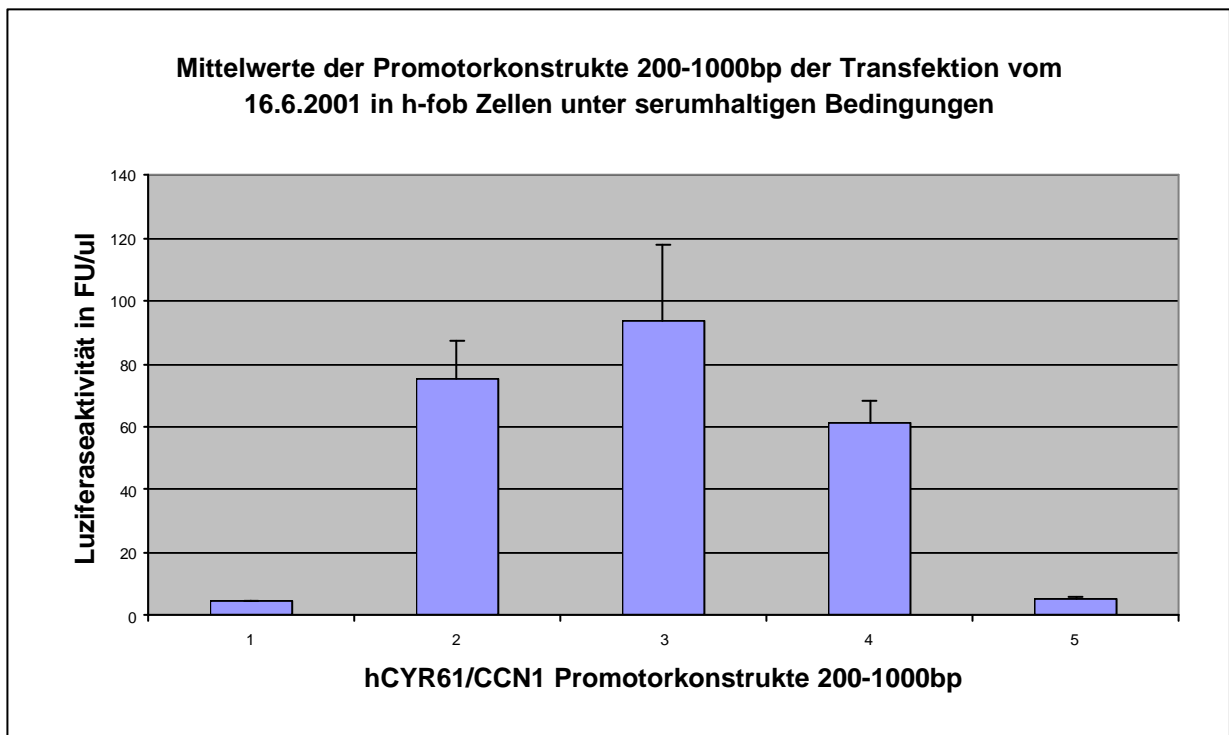
### **Transfektion in h-fob Zellen bei serumhaltiger Kultivierung vom 16.6.2001**

Well	KONSTRUKT	PROTEINGEHALT			LUZIFERASAKTIVITÄT			
		µg/ml			FU/ µl	FU/ µg Protein		
		Nr.1	Nr.2	Mittelwert µg/ml		Werte	Mittelwert	SEM
1	Pgl3-Basic	240,0	230,0	235,0	4,9	20,6	<b>21,9</b>	<b>1</b>
2		213,0	200,0	206,3	4,8	23,3		
3		186,0	192,0	189,0	4,1	21,7		
1	200bp	235,0	238,0	236,5	60,8	257,1	<b>336</b>	<b>57,5</b>
2		241,0	230,0	235,5	71,4	303,0		
3		209,0	212,0	210,5	94,2	447,5		
1	450bp	211,0	215,0	213,0	70,7	332,0	<b>415</b>	<b>82</b>
2		239,0	224,0	231,5	77,4	334,0		
3		238,0	220,0	229,5	132,8	579,5		
1	800bp	212,0	222,0	217,0	60,8	280,0	<b>297</b>	<b>11</b>
2		226,0	209,0	217,5	68,5	315,0		
3		199,0	202,0	201,5	57,4	285,0		
1	1000bp	209,0	171,0	190,0	6,1	53,0	<b>46,5</b>	<b>4</b>
2		185,0	186,0	185,5	4,7	39,5		
3		163,0	153,0	158,0	4,7	46,0		

-200bp	1	133,0	167,0	150,0	19,3	128,5	<b>168,5</b>	
	2	141,0	139,0	140,0	29,2	208,5		
	3	135,0	128,0,	131,5	22,1	167,5		
-450bp	1	143,0	148,0	145,5	6,4	43,5	<b>42,5</b>	
	2	147,0	153,0	150,0	5,5	36,5		
	3	122,0	118,0	120,0	5,7	47,5		
-800bp	1	155,0	160,0	157,5	5,5	35,0	<b>36,5</b>	
	2	153,0	149,0	151,0	5	33,0		
	3	117,0	121,0	119,0	5,5	41,5		
-1000bp	1	138,0	145,0	141,5	6,4	45	<b>47</b>	
	2	125,0	127,0	151,0	6,7	44		
	3	110,0	111,0	110,5	5,8	52		

**Tabelle 4:** Transfektion der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp- 1000bp in h-fob Zellen bei serumhaltiger Kultivierung. Die Promotorkonstrukte mit positivem Vorzeichen sind in richtiger Orientierung und die mit negativem Vorzeichen gekennzeichneten Konstrukte in umgekehrter Orientierung in den pgl3-Basic Expressionsvektor kloniert. Die Tabelle enthält Daten des Experiments vom 16.6.2001.

Die Daten aus Tabelle 4 wurden in der folgenden Grafik verwendet, die einem Überblick über die Aktivitäten der unterschiedlichen Konstrukte dienen soll.



**Abbildung 16:** Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der hCYR61/CCN1 Promotoraktivitäten im Luziferase Assay, der Transfektion vom 16.6.01 in h-fob Zellen unter serumhaltiger Kultivierung.

**1: pgl3-Basic; 2: 200bp; 3: 450bp-21CA; 4: 800bp-21CA; 5: 1000bp-21CA**

Die Fehlerbalken geben die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) an.

Im Folgenden wurden nach dem gleichen Prinzip 5 weitere Transfektionen unter den identischen Bedingungen, also mit h-fob Zellen unter serumhaltiger Kultivierung, durchgeführt. So wollte man eine statistisch valide Aussage über die Aktivität der Konstrukte 200bp-1000bp bei serumhaltiger Kultivierung gewinnen. Die Promotoraktivitäten dieser Experimente wurden zusammengefasst. Aus den Triplikaten wurden die Mittelwerte für den Proteingehalt aus der Doppelbestimmung nach Bradford durchgeführt und ebenso der Mittelwert aus den Triplikaten des Luziferaseassays. Die Relative Luziferaseaktivität wurde aus dem Quotienten der Mittelwerte der Proteinbestimmung und den Mittelwerten des Promotoraktivität des Luziferase Assays gebildet.

Dies ist exemplarisch für h-fob Zellen unter serumhaltiger Kultivierung in der folgenden Tabelle dargestellt

**Übersicht über 5 Transfektionsexperimente mit h-fob Zellen bei Serumhaltiger Kultivierung**

<b>Konstrukte</b>	<b>Exp 1 FU/µl</b>	<b>FU/µg</b>	<b>Exp 2 FU/µl</b>	<b>FU/µg</b>	<b>Exp 3 FU/µl</b>	<b>FU/µg</b>	<b>Exp 4 FU/µl</b>	<b>FU/µg</b>	<b>Exp5 FU/µl</b>	<b>FU/µg</b>
<b>Pgl3-Basic</b>	7,12	<b>24</b>	4,5	<b>21,5</b>	5,6	<b>28,5</b>	5,7	<b>27,5</b>	3,7	<b>19,5</b>
<b>200bp</b>	242,6	<b>778,5</b>	75,5	<b>336</b>	450,6	<b>2146</b>	885,2	<b>4090</b>	91,7	<b>487,5</b>
<b>450bp- 21CA</b>	187	<b>782</b>	93,6	<b>415</b>	535	<b>3045</b>	902,8	<b>4188</b>	164,4	<b>943,5</b>
<b>800bp- 21CA</b>	138,3	<b>588,5</b>	61,8	<b>297</b>	316,4	<b>1374</b>	517,8	<b>2292</b>	159,5	<b>883,5</b>
<b>1000bp- 21CA</b>	9,3	<b>38</b>	5,2	<b>46,5</b>	14,6	<b>60</b>	21,7	<b>102,5</b>	10,2	<b>57,5</b>

<b>-200bp</b>			23,5	<b>168,5</b>	53,3	<b>249,5</b>				
<b>-450bp</b>			5,835	<b>42,5</b>	6,2	<b>26</b>				
<b>-800bp</b>			5,2	<b>36,5</b>	9,8	<b>38,5</b>				
<b>-1000bp</b>			6,3	<b>47</b>	4,9	<b>26</b>				

***Tabelle 5:** Übersicht über 5 Transfektionsexperimente mit den Luziferaseaktivitäten und den dazugehörigen relativen Luziferaseaktivitäten der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukten, in h-job Zellen bei serumhaltiger Kultivierung. Aus den Triplikaten wurde der Mittelwert der Luziferaseaktivität für jedes Promotorkonstrukt gebildet. Ebenso wurde bei der Proteinbestimmung verfahren.*

Die Relative Luziferaseaktivität des **pgl3-Basic Vektors** wurde im Vergleich der 4 hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp, 450-21CA; 800-21CA, 1000-21CA als Normierung verwendet und erhielt den Zahlenwert 1. Das heißt, dass alle relativen Luziferaseaktivitäten, der erwähnten Promotorkonstrukte auf pgl3-Basic bezogen wurden.

Das Konstrukt **450-21CA** wurde für den Vergleich der 450bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte als Normierung verwendet und erhielt ebenso den Zahlenwert 1.

Auf diese Weise wurden alle anderen Konstrukte per Quotient normiert. Diese relativen Werte der Konstrukte wurden über die Anzahl n der verschiedenen Experimente gemittelt und ein Mittelwert der Luziferaseaktivität über alle Experimente gebildet.

Aus den auf das jeweilige Konstrukt normierten Einzelergebnissen, aus den mindestens 5 Experimenten wurde ein Mittelwert für jedes Promotorkonstrukt gebildet.

### **3.8 Ergebnisse der Transfektionen mit den hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukten variabler Länge von 200bp-1000bp**

Wir führten zwei verschiedene Kultivierungsbedingungen der Zellkulturen durch, eine serumfreie und eine serumhaltige Versuchsbedingung. Hierbei wurde Fetales-Kälber-Serum, FCS mit einer Konzentration von 10% in dem serumhaltigen Versuchsarm verwendet. Diese Unterscheidung war notwendig, da für den hCYR61/CCN1 Promotor eine Seruminduktion in der Literatur beschrieben ist (Leng, et al. 2000). Noch ist unklar wie diese vermittelt wird, da

dem humane hCYR61/CCN1 Promotor im Unterschied zum Maus Promotor ein Serum Response Element fehlt. Durch die beiden unterschiedlichen Versuchssarme wollten wir den Seruminduktionseffekt nachweisen und mögliche Ursachen des Effekts auf der Ebene der Promotorregulation eruieren.

Der Promotor wurde ansonsten ohne weitere Stimulation durch Hormone untersucht. Alle verwendeten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte hatten eine normierte CA-Repeat Länge von 21 CA-Repeats, für das erste, bzw. 19 CA-Repeats für das zweite CA-Repeat innerhalb des hCYR61/CCN1 Promotors (siehe Abbildung 7)

### 3.8.1 Transfektionen der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen

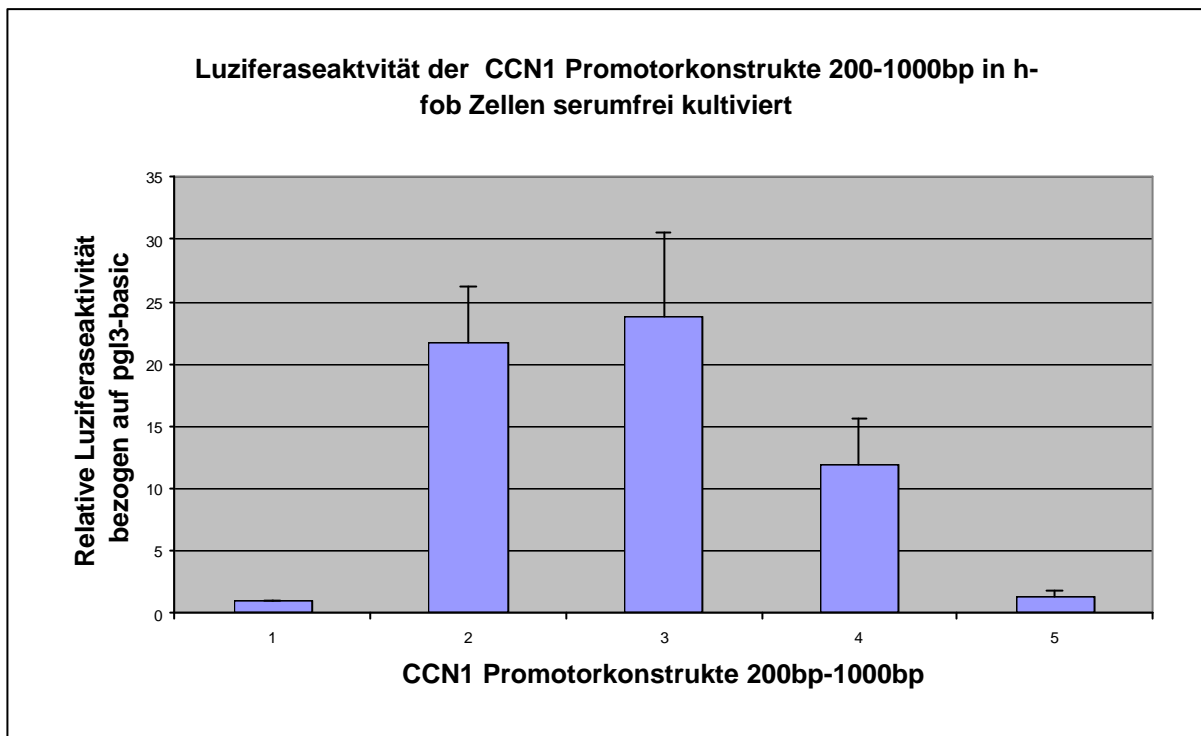
Die Ergebnisse umfassen 6 Transfektionsexperimente der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-1000bp. Die Kultivierung der Osteoblastenzelllinie h-fob erfolgte serumfrei.

In der Tabelle sind die relativen Luziferaseaktivitäten der Einzelexperimente aufgeführt, die zu einem Mittelwert und der dazugehörigen Standardabweichung des Mittelwertes zusammengefasst wurden.

Konstrukte in <i>h-fob</i> -Zellen, serumfrei	Exp1 FU/μg	Exp2 FU/μg	Exp3 FU/μg	Exp4 FU/μg	Exp5 FU/μg	Exp6 FU/μg	Mittelwert	SEM
PGL3-Basic	36,5	34,5	54,5	39	27	41	39,5	3,25
200bp	689,5	479	571,5	781,5	776	1808	883	146
450bp-21CA	714	313,5	342,5	1407	688,5	2221,5	948,5	275
800bp-21CA	897	276,5	151,5	380,5	212,5	937,5	433,5	128
1000bp-21CA	92	53	49	45,5	45	68,5	52	7,5

**Tabelle 6:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp, aus 6 Transfektionsexperimenten in *h-fob* Zellen unter *serumfreien* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von den Mittelwerten (SEM) der Experimente.

In der folgenden Graphik sind die auf den Vektor pgl3-Basic normierten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200-1000bp aus 6 Transfektionsexperimenten in h-fob Zellen bei serumfreier Kultivierung aufgeführt. Die Graphik enthält den Standardfehler der Mittelwerte, SEM als Fehlermaß.



**Abbildung 17:** *h-fob* Zellen unter *serumfreier* Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 1: Pgl3-Basic; 2: 200bp; 3: 450bp-21CA; 4: 800bp-21CA; 5: 1000bp-21CA; Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über *n=6* Experimente. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf das Konstrukt *pgl3-Basic*. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Experimente wieder.

### 3.8.2 Transfektionen der hCYR61/CCN1-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen

Wegen eines möglichen Seruminduktionseffektes wurden die Zellkulturbedingungen der h-fob Zellen auch für serumhaltige Kulturen ermittelt. Somit wollten wir einen möglichen Induktionseffekt des Serums auf die hCYR61/CCN1 Promotoraktivität genau quantifizieren und zusätzlich überprüfen ob dieser Effekt auf alle Promotorfragmente, unabhängig von ihrer Länge wirkt.

Die Ergebnisse dieser 5 Transfektionsexperimente der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp unter serumhaltigen Bedingungen in h-fob Zellen sind tabellarisch

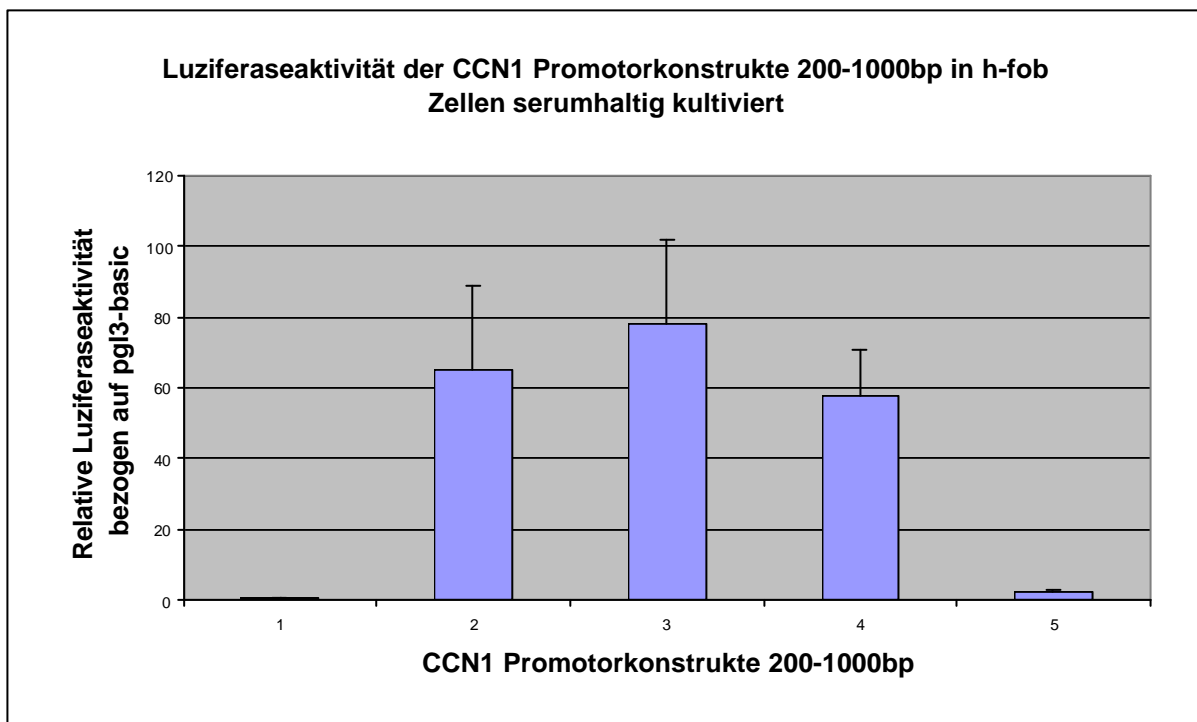


zusammengefasst. Die Tabelle enthält den Mittelwert über die 5 Experimente und den Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

Konstrukte in <i>h-fob</i> Zellen, <i>serumhaltig</i>	Exp1 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Mittel- wert	SEM
Pgl3-Basic	24	21,5	28,5	27,5	19,5	24	1,7
200bp	778,5	336	2146	4090	37,5	1567,5	707
450bp-21CA	797	415	304,5	4187,5	943,5	1877,5	737
800bp-21CA	588,5	297	1370	2292	883,5	1086	349,5
1000bp-21CA	38	48,5	60	102,5	57,5	57,5	13

**Tabelle 7:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 200bp-1000bp aus 5 Transfektionsexperimenten in *h-fob* Zellen unter *serumhaltigen* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Die Daten der obigen Tabelle wurden graphisch in der folgenden Abbildung aufbereitet.



**Abbildung 18:** *h-fob* Zellen unter *serumhaltiger* Kultivierung der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 1: *Pgl3-Basic*; 2: *200bp*; 3: *450bp-21CA*; 4: *800bp-21CA*; 5: *1000bp-21CA*;

Die **Säulen** zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über *n=5 Experimente*. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf *pgl3-Basic*.

Die Fehlerbalken geben die Standardfehler der Mittelwerte (*SEM*) der Experimente wieder

### 3.8.3 Transfektionen der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen

Die gleichen *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte, mit den Längen 200bp-1000bp, wurden auch für eine Kontrollzelllinie, den humanen Chondrozyten, *T/C28a<sub>2</sub>*, getestet. Hiermit wollten wir die zellspezifischen Auswirkungen auf die *hCYR61/CCN1* Promotoraktivität testen und kontrollieren.

Die Kultivierungsdauer und die weitere Behandlung der *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen war komplett identisch zur Kultivierung der *h-fob* Zellen. Auch hier wurden 2 Versuchbedingungen, eine serumfreie und eine serumhaltige getestet.

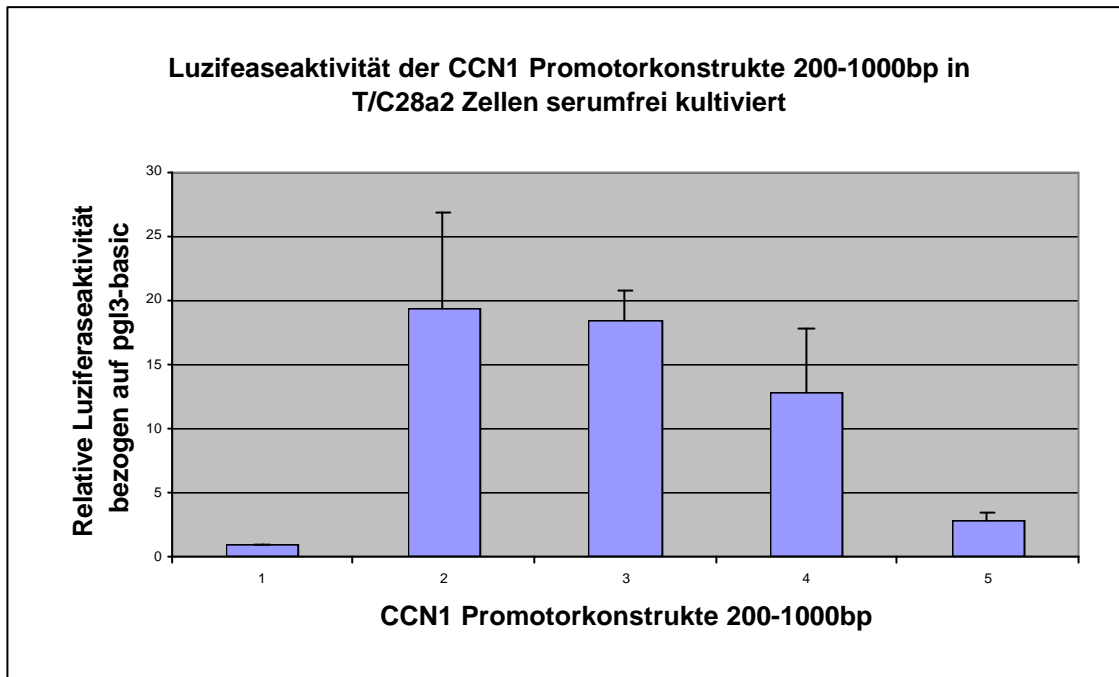
Die Ergebnisse der 5 Transfektionsexperimente bei serumfreier Kultivierung sind tabellarisch in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Konstrukte in <i>T/C28a<sub>2</sub></i> Zellen, <i>serumfrei</i>	Exp1 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Mittelwert	SEM
<i>Pgl3-Basic</i>	45	35	48	45	38	42	2,5
200bp	370	370	564,5	2178	597,5	815,5	344
450bp-21CA	395	590,5	709	1557,5	623,5	775	200,5
800bp-21CA	418,5	311,5	214	1129	616,5	538	162
1000bp-21CA	64	146	95,5	166,5	124	119	18

**Tabelle 8:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 200bp-1000bp aus 5 Transfektionsexperimenten mit *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen unter

*serumfreien* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Die nachfolgende Graphik enthält die auf pgl3-Basic normierten *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte.



**Abbildung 19:** *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen unter *serumfreier* Kultivierung der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 1: *Pgl3-Basic*; 2: *200bp*; 3: *450bp-21CA*; 4: *800bp-21CA*; 5: *1000bp-21CA*;

Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über *n=5* Experimente. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf *pgl3-Basic*.

Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Experimente wieder

### 3.8.4 Transfektionen der *hCYR61/CCN1*-Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen

Auch die humanen Chondrozyten, *T/C28a<sub>2</sub>* wurden unter serumhaltigen Versuchsbedingung kultiviert, um auch hier den möglichen Seruminduktionseffekt auf den *hCYR61/CCN1*-Promotor darstellen zu können.

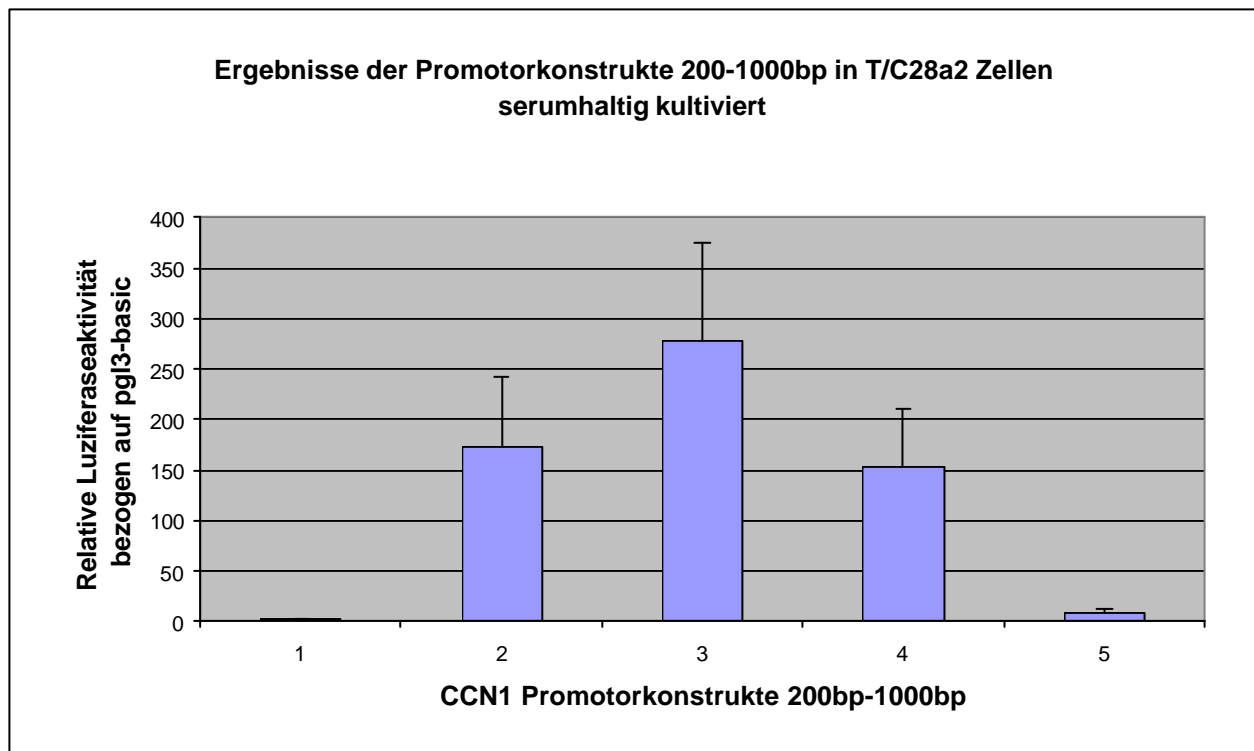
Es wurden 5 Transfektionsexperimente mit den *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen durchgeführt. Getestet wurden die *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte der Länge 200-1000bp mit konstanter CA-Repeat Länge.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind auf der folgenden Seite tabellarisch und graphisch zusammengefasst.

Konstrukte in <i>T/C28a2</i> Zellen, <i>serumhaltig</i>	Exp1 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Mittelwert	SEM
Pgl3-Basic	33,5	42	32,5	61,5	25	39	6,5
200bp	2182	505,5	8609	19685	3498,5	5948	1533,5
450bp-21CA	3803	2391,5	5965	5212,6	3694,5	8381	4455
800bp-21CA	3415	600,5	7145	15635	2195	5889	2768,5
1000bp-21CA	165	84,5	376,5	770	205	320	122

Tabelle 9: Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 200bp-1000bp aus 5 Transfektionsexperimenten mit *T/C28a2* Zellen unter *serumhaltigen* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Die graphische Darstellung mit der Normierung auf den Expressionsvektor pgl3-Basic ist im folgenden zu sehen.



**Abbildung 20:** : T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter *serumhaltiger* Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 1: Pgl3-Basic; 2: 200bp; 3: 450bp-21CA; 4: 800bp-21CA; 5: 1000bp-21CA;

Die **Säulen** zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über *n=5 Experimente*. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf *pgl3-Basic*.

Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Experimente wieder

### **3.9 Ergebnisse der Transfektionen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge**

Im folgenden wird die Fragestellung der Auswirkungen der CA-Repeat Polymorphismen innerhalb des hCYR61/CCN1 Promotors auf die Aktivität des 450bp hCYR61/CCN1 Promotorfragmentes untersucht.

Hierzu wurden ein hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte mit der konstanten Länge 450bp, mit insgesamt 5 verschiedenen CA-Repeat Längen von 17-22 CA-Repeats untersucht (siehe Tabelle 2). Dafür wurden ebenso wieder zwei Zellsystemen, h-fob Zellen und T/C28a<sub>2</sub> Zellen mit jeweils zwei Versuchskonstellationen pro Zelllinie, einer serumfreien und einer serumhaltigen auf mögliche Aktivitätsunterschiede des hCYR61/CCN1 Promotorfragmentes der Länge 450bp hin untersucht.

#### **3.9.1 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in h-fob Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen**

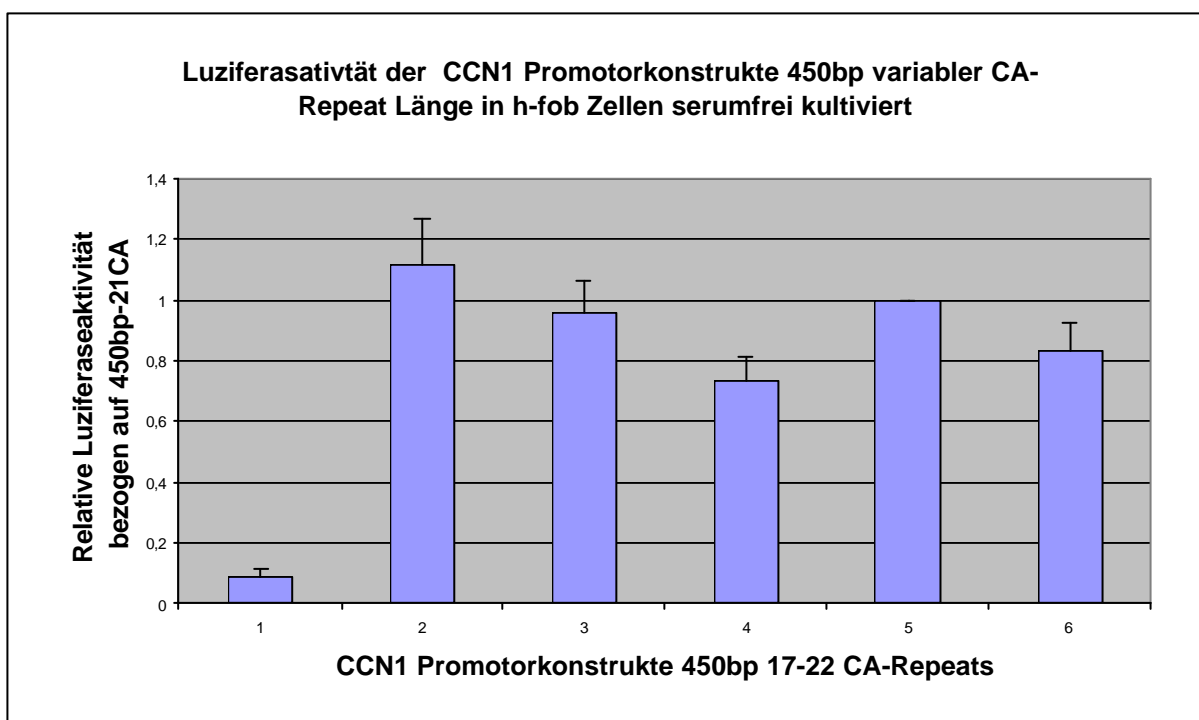
Im folgenden Abschnitt soll die Relevanz des Polymorphismus des hCYR61/CCN1 Promotors anhand der Konstrukte mit der konstante Länge von 450bp untersucht werden. Die Normierung der verschiedenen 450bp langen Konstrukte erfolgte auf das 21CA-Repeats messende hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt. Der Grund hierfür ist, dass dies auch die standardisierte Länge der CA-Repeats in der vorigen Untersuchung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp darstellte.

In der umseitigen Tabelle finden sich die relativen Luziferaseaktivitäten der Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge aus 6 Transfektionsexperimenten mit h-fob Zellen bei serumfreier Kultivierung.

Konstrukte in <i>h-fob</i> Zellen, <i>serumfrei</i>	Exp1 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Exp6 FU/ $\mu$ g	Mittel- wert	SEM
Pgl3-Basic	36,5	34,5	54,5	39	27	41	39,5	3,5
450bp-17CA	973	487,5	313,5	1078,5	731,5	1314	979,5	160
450bp-19CA	935	275	262,5	1126,5	876,5	1182,5	701	142,5
450bp-20CA	501	292	185,5	1125	445	1008	542	142,5
450bp-21CA	714	313,5	342,5	1407,5	688,5	2221,5	843,5	275
450bp-22CA	955,5	362	204,5	1023	503	1108,5	619	152,5

**Tabelle 10:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 450bp mit variablen CA-Repeat Länge aus 5 Transfektionsexperimenten in *h-fob* Zellen unter *serumfreien* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Graphisch zusammengefasst finden sich hier die auf das Promotorkonstrukt 450bp21 CA-Repats normierten Luziferaseaktivitäten der Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge.



**Abbildung 21: h-fob Zellen unter serumfreier Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotor-konstrukte 1: Pgl3-Basic; 2: 450bp-17 CA-Repeats; 3: 450bp-19 CA-Repeats; 4: 450bp-20 CA-Repeats; 5: 450bp-21 CA-Repeats; 6: 450bp-22 CA Repeats;**

Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über  $n=7$  Experimente. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf das Konstrukt 450bp-21CA Repeats.

Die Fehlerbalken geben den Standardfehler ( SEM) der Experimente wieder

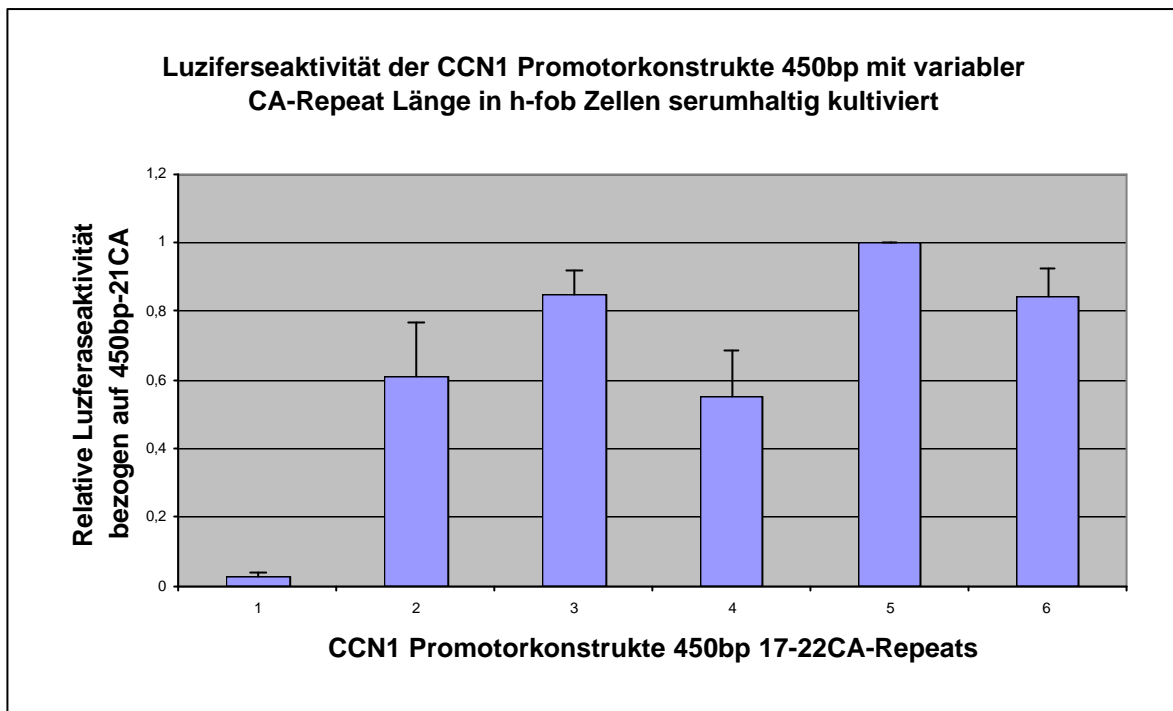
### 3.9.2 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in h-fob Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen

Im Folgenden wurde die gleiche Fragestellung wie oben beschrieben für serumhaltige Bedingungen untersucht. Die Hypothese war hierbei dass die serumhaltige Kultivierung auf die unterschiedlichen CA-Repeatlängen einen Aktivitätsunterschied zeigen könnte, also auch hier ein Seruminduktionseffekt nachweisbar sei.

Konstrukte in h-fob Zellen, serumhaltig	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Mittelwert	SEM
PGL3-Basic	24	21,5	28,5	27,5	19,5	24	1,5
450bp-17CA	1170	462,5	1822	1567	750,5	1155	250,5
450bp-19CA	803	363,5	3214	3002,5	683,5	1613,5	615,5
450bp-20CA	835	313	710	2157	662	935,5	317
450bp-21CA	797	415	3045	4157,5	943,5	1877,5	737,5
450bp-22CA	845,5	340	3886	2005	858,5	1585	636

**Tabelle 11:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit variablen CA-Repeat Länge aus 5 Transfektionsexperimenten in h-fob Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Die Ergebnisse sind graphisch wie folgt zusammengefasst:



**Abbildung 22:** *h-fob Zellen unter serumhaltiger Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten 1: Pgl3-Basic; 2: 450bp-17 CA-Repeats; 3: 450bp-19 CA-Repeats; 4: 450bp-20 CA-Repeats; 5: 450bp-21 CA-Repeats; 6: 450bp-22 CA Repeats; Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte über  $n=7$  Experimente. Die Normierung der Werte der Relativen Luciferaseaktivität erfolgte auf das Konstrukt 450bp-21CA Repeats.*

*Die Fehlerbalken geben den Standardfehler ( SEM) der Experimente wieder*

### 3.9.3 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen

Die 5 verschiedenen hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Längen wurden zusätzlich zu den h-fob Zellen wiederum in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen untersucht. Auch hier wurde ein serumfreier und eine serumhaltiger Versuchsarm geprüft.

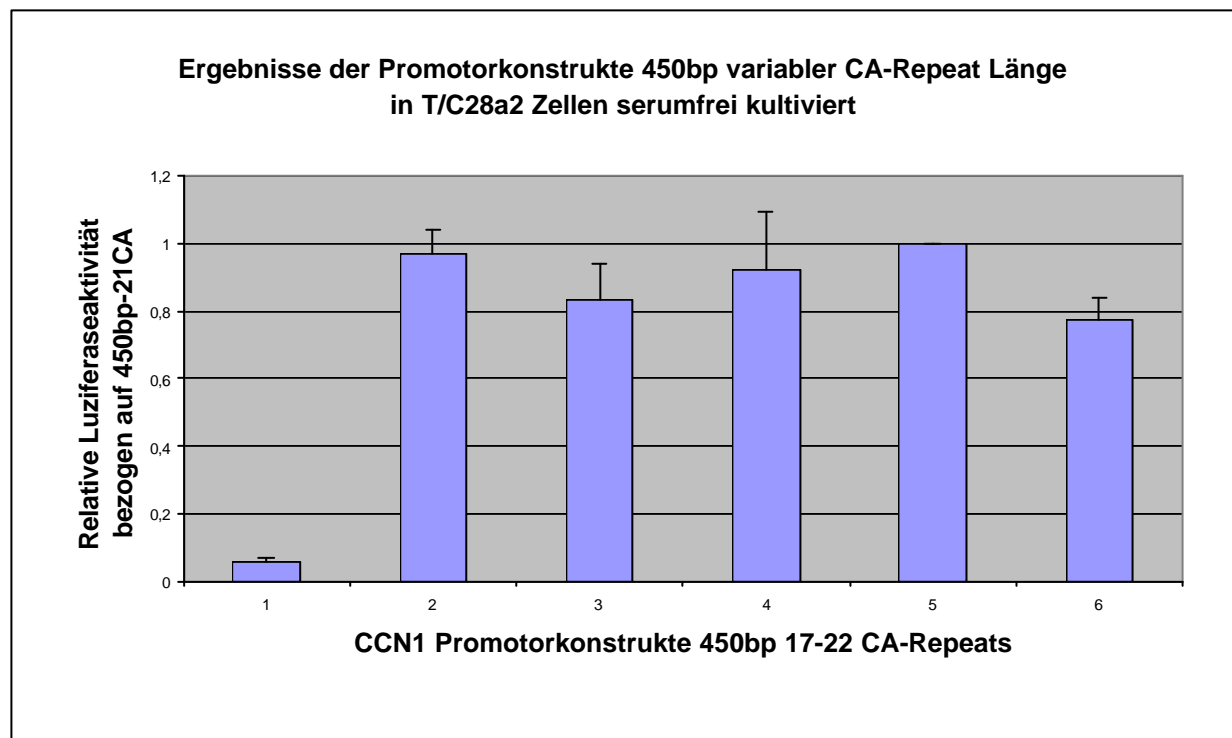
In der folgenden Tabelle sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge aufgeführt.



Konstrukte in <i>T/C28a<sub>2</sub></i> Zellen, <i>serumfrei</i>	Exp1 FU/ $\mu$ g	Exp2 FU/ $\mu$ g	Exp3 FU/ $\mu$ g	Exp4 FU/ $\mu$ g	Exp5 FU/ $\mu$ g	Mittel- wert	SEM
Pgl3-Basic	45	34,5	48	45,5	38	42	2,5
450bp-17CA	487	539,5	613,5	1567,5	509	743,5	207
450bp-19CA	341,5	294	584	1249,5	735	641	172
450bp-20CA	382,5	225,5	534	1820	835	759,5	283,5
450bp-21CA	395	590,5	709	1557,5	623,5	775	202
450bp-22CA	360,5	490	399	1343,5	443	607	185,5

**Tabelle 12:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der *hCYR61/CCN1* Promotorkonstrukte 450bp mit variablen CA-Repeat Länge aus 5 Transfektionsexperimenten in *T/C28a<sub>2</sub>* Zellen unter *serumfreien* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Im folgenden ist die graphische Zusammenfassung der Experimente wiedergegeben.



**Abbildung 23:** *T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter serumfreier Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 1: Pgl3-Basic; 2: 450bp-17 CA-Repeats; 3: 450bp-19 CA-Repeats; 4: 450bp-20 CA-Repeats; 5: 450bp-21 CA-Repeats; 6: 450bp-22 CA Repeats* Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Konstrukte über *n=7 Experimente*. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf das Konstrukt *450bp-21CA*

Die Fehlerbalken geben den *Standardfehler ( SEM)* der Experimente wieder

### 3.9.4 Transfektionen des hCYR61/CCN1-Promotorkonstruktes 450bp variabler CA-Repeat Länge in T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen

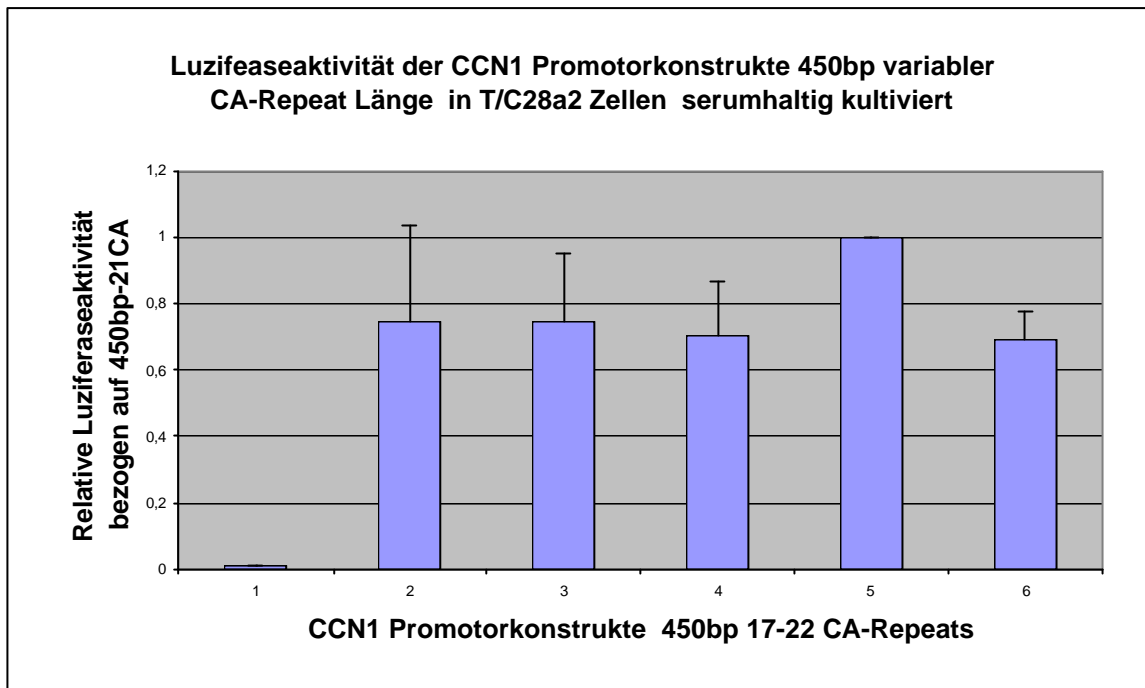
Die folgenden Experimente mit den Promotorkonstrukten 450bp variabler CA-Repeat Länge in T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter serumhaltigen Bedingungen erfolgte wiederum zur Überprüfung eines möglichen Seruminduktionseffektes auf den Promotor von hCYR61/CCN1.

Die Ergebnisse sind hierzu im folgenden aufgeführt.

Konstrukte in T/C28a <sub>2</sub> Zellen, serumhaltig	Exp1 FU/μg	Exp2 FU/μg	Exp3 FU/μg	Exp4 FU/μg	Exp5 FU/μg	Mittelwert	SEM
Pgl3-Basic	33,5	32,5	32	61,5	25	39	6,5
450bp-17CA	7310	1695	7245	10220	3270	5948	1538
450bp-19CA	3600	743	8087,5	1399,5	3107	5906,5	2345
450bp-20CA	2921,5	1058,5	7890	21315	1710	7039	3756
450bp-21CA	3803	2391,5	5965	26050	3694,5	8381	4455
450bp-22CA	3167,5	1060	4688,5	17545	3045	5899,5	2968

**Tabelle 13:** Übersicht über die relativen Luziferaseaktivitäten der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit variablen CA-Repeat Länge aus 5 Transfektionsexperimenten in T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter *serumhaltigen* Kultivierungsbedingungen. Jeweils angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM) der Experimente.

Die normierten Luziferaseaktivitäten der Experimente sind in der nachfolgenden Graphik zusammengestellt.



**Abbildung 24:** T/C28a<sub>2</sub> Zellen unter serumhaltiger Kultivierung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 1: Pgl3-Basic; 2: 450bp-17 CA-Repeats; 3: 450bp-19 CA-Repeats; 4: 450bp-20 CA-Repeats; 5: 450bp-21 CA-Repeats; 6: 450bp-22 CA-Repeats; Die Säulen zeigen die Mittelwerte der normierten relativen Luziferaseaktivität der Promotorkonstrukte über *n*=7 Experimente. Die Normierung der Werte der Relativen Luziferaseaktivität erfolgte auf das Konstrukt 450bp-21CA

Die Fehlerbalken geben den Standardfehler ( SEM) der Experimente wieder

### 3.10 Vergleich der Zelllinien und Kulturbedingungen

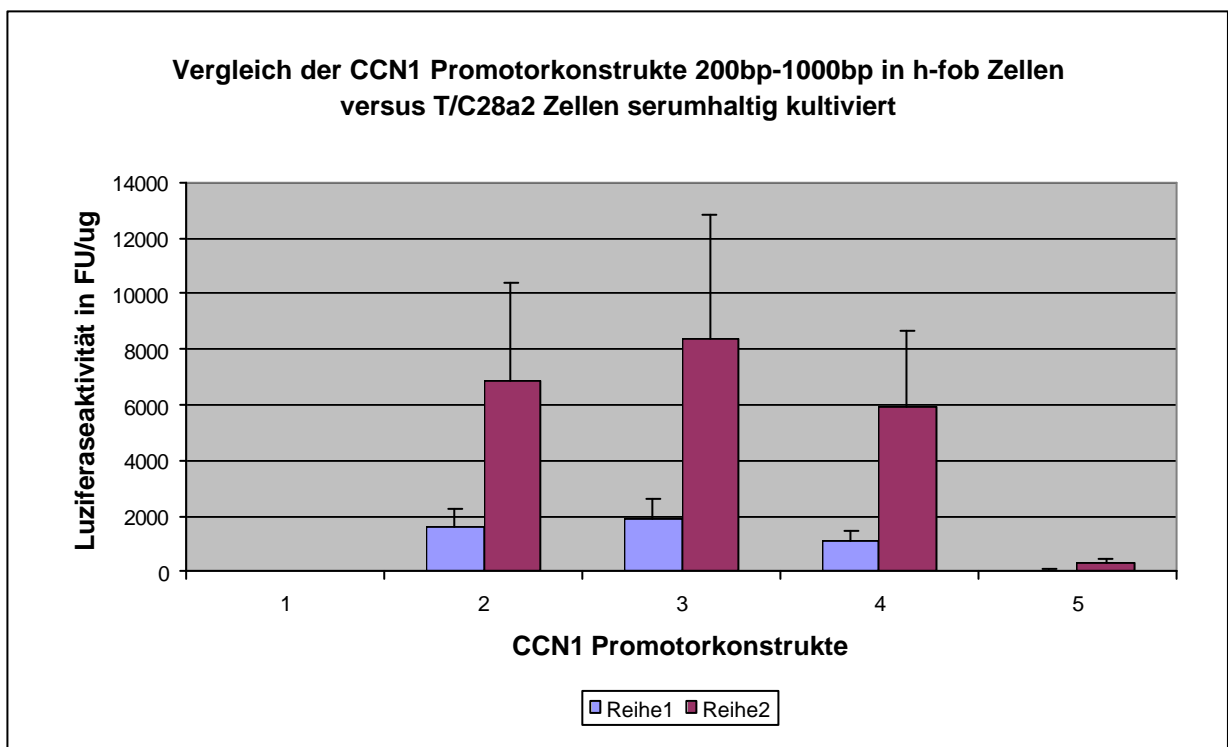
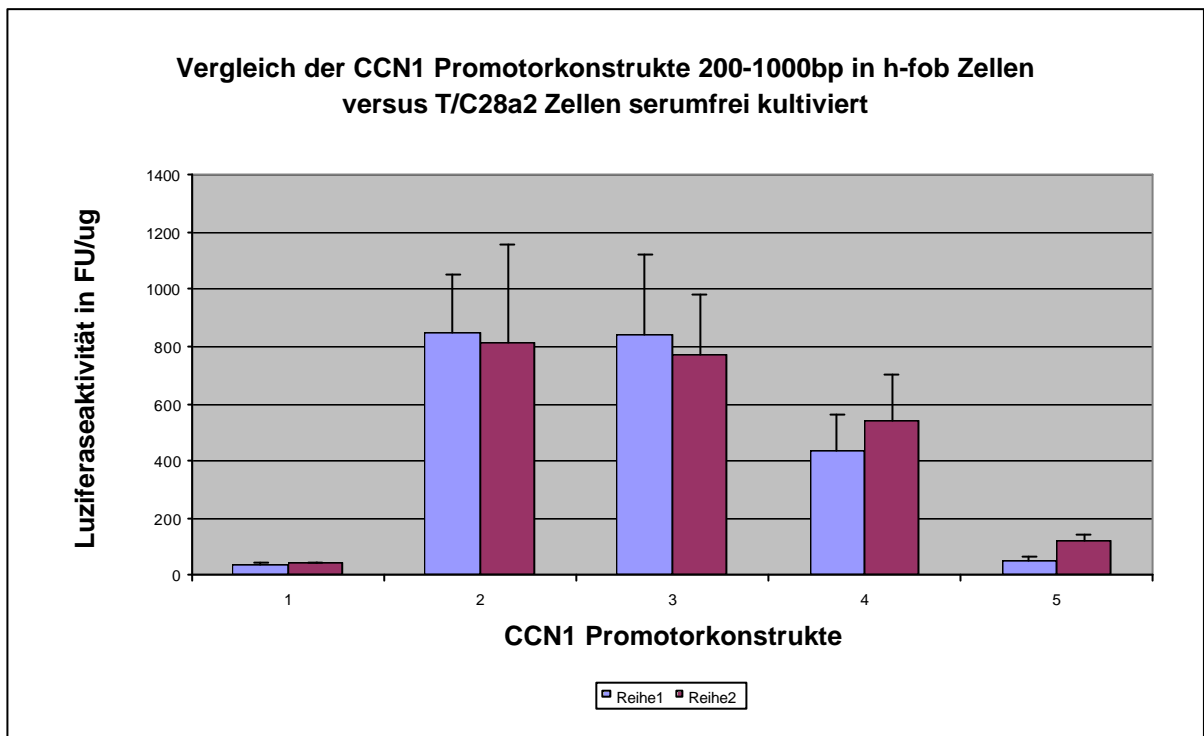
Um die Ergebnisse der einzelnen Versuchsbedingungen besser vergleichen zu können wurden im folgenden die Ergebnisse graphisch vergleichend zusammengefasst.

Die Schaubilder ermöglichen mit einem Blick die prägnanten Auffälligkeiten der verschiedenen Versuchsarme zu erfassen.

In sämtlichen folgenden Diagrammen wurden die Mittelwerte der relativen Luziferaseaktivitäten aus den Einzelexperimenten verwendet. Erst dieser Vergleich ermöglicht den absoluten Luziferaseaktivitätsunterschied der einzelnen Zelllinien und Zellkultivierungsbedingungen zu erkennen.

### 3.10.1 Vergleich der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in h-fob Zellen und T/C28a<sub>2</sub> Zellen

Die erste Graphik zeigt die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp bei serumfreier Kultivierung. Direkt darunter ist der Vergleich der beiden Zelllinien unter serumhaltigen Bedingungen zu sehen.



**Abbildung 25 und 26:** Vergleich der unnormierten Luziferaseaktivitäten der hCYR6/CCN1 Promotorkonstrukte 1: PGL3-Basic; 2: 200bp; 3: 450bp-21CA; 4: 800bp-21CA; 5: 1000bp-21CA in h-fob Zellen versus T/C28a<sub>2</sub> Zellen.

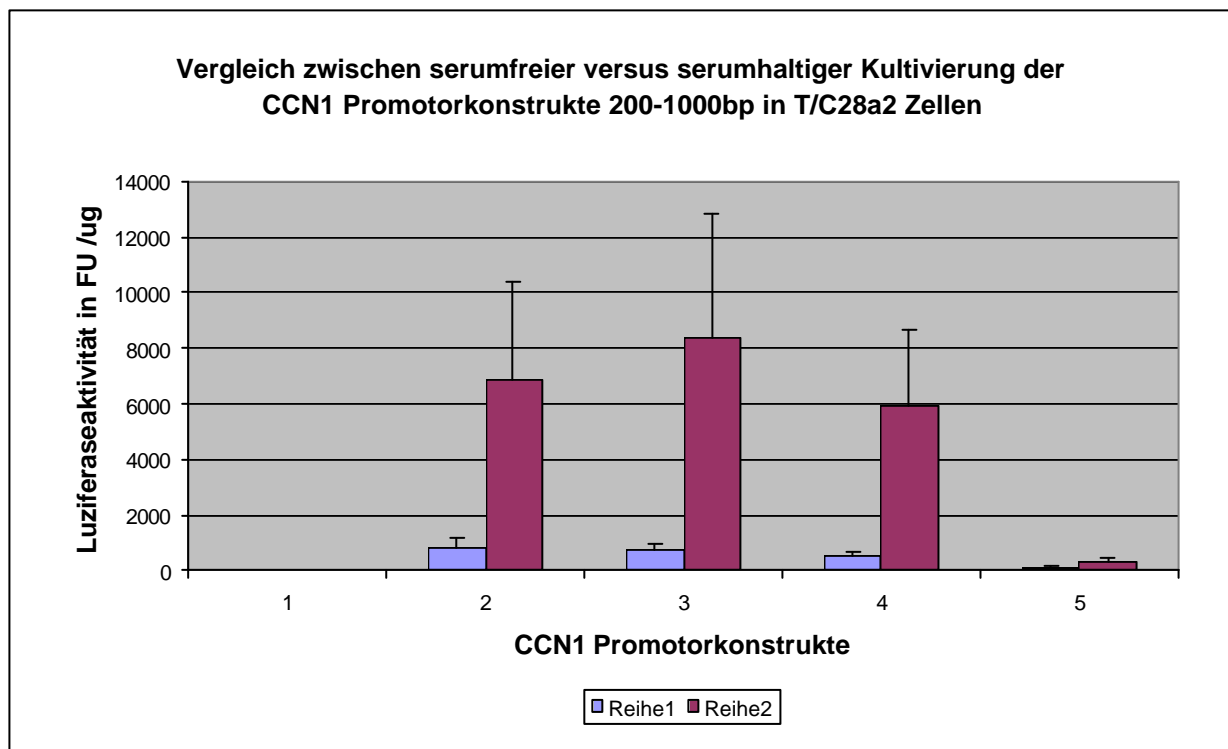
Die **Reihe 1** zeigt die h-fob Zellen. Die **Reihe 2** zeigt die T/C28a<sub>2</sub> Zellen. Die Fehlerbalken geben den **Standardfehler** der Mittelwerte der Experimente wieder.

Die erste Graphik gibt die serumfreie, die zweite Graphik gibt die serumhaltige Kultivierung wieder.

Die beiden Graphiken dienen der Darstellung des zellspezifischen Effektes auf die Aktivität der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp. Bei serumfreier Kultivierung sind die Aktivitäten der Promotorkonstrukte quasi identisch. Betrachtet man jedoch die serumhaltige Kultivierung, so zeigt sich ein deutlicher zellspezifischer Unterschied in der Promotoraktivität.

### 3.10.2 Vergleich der Kultivierungsbedingungen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in T/C28a<sub>2</sub> Zellen

Diese Graphik soll den Seruminduktionseffekt der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen verdeutlichen. Es wurden die serumfreien Bedingungen mit den serumhaltigen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp-1000bp verglichen.



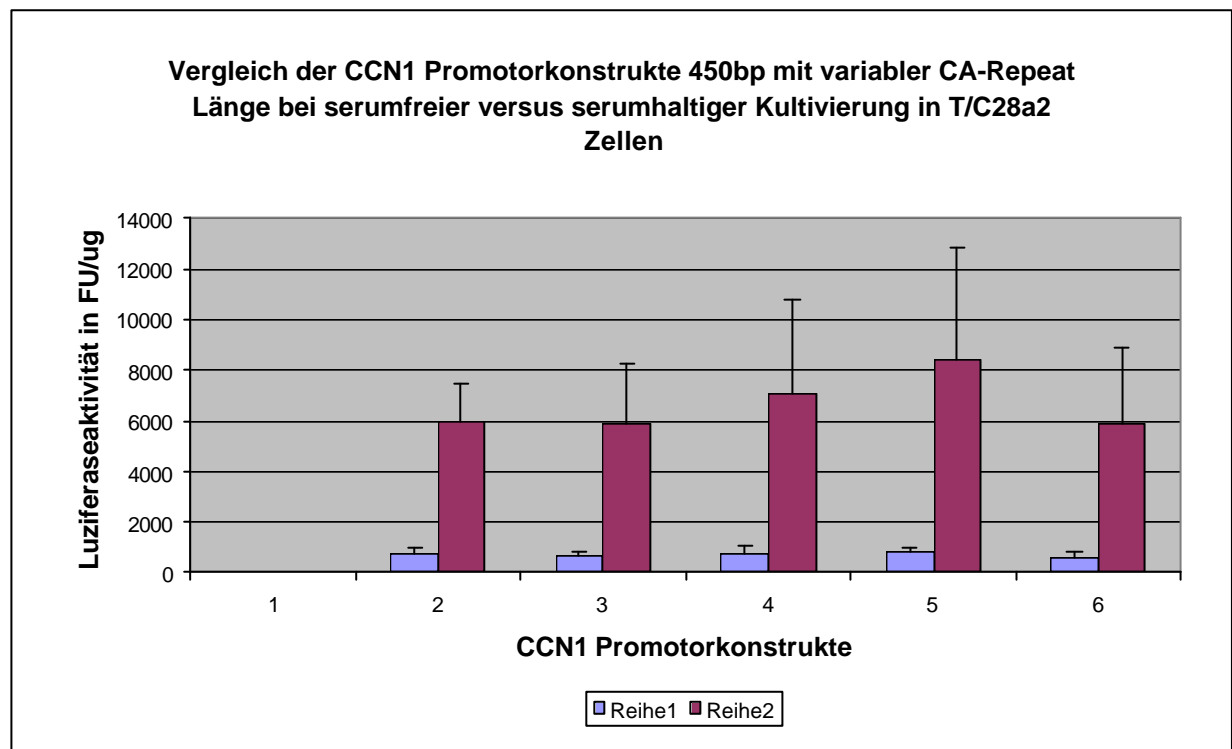
**Abbildung 27:** Vergleich der unnormierten Luziferaseaktivitäten der hCYR6/CCN1 Promotorkonstrukte 1: PGL3-Basic; 2: 200bp; 3: 450bp-21CA; 4: 800bp-21CA; 5: 1000bp-21CA in T/C28a<sub>2</sub> Zellen, bei serumfreier versus serumhaltiger Kultivierung.

Die **Reihe 1** zeigt die **serumfrei** Kultivierung. Die **Reihe 2** zeigt **serumhaltige** Kultivierung.

Die **Fehlerbalken** geben den **Standardfehler** der Mittelwerte der Experimente wieder

### 3.10.3 Vergleich der Kultivierungsbedingungen der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Längen in T/C28a<sub>2</sub> Zellen

Um den Seruminduktionseffekt auch auf die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge nachzuweisen dient die folgende Graphik.



**Abbildung 28:** Vergleich der unnormierten Luziferaseaktivitäten der hCYR6/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp variabler CA-Repeat Länge, 1: PGL3-Basic; 2: 450bp-17CA; 3: 450bp-19CA; 4: 450bp-20CA; 5: 450bp-21CA; 6: 450bp-22CA in T/C28a<sub>2</sub> Zellen, bei serumfreier versus serumhaltiger Kultivierung.

Die **Reihe 1** zeigt die **serumfrei** Kultivierung. Die **Reihe 2** zeigt die **serumhaltige** Kultivierung. Die **Fehlerbalken** geben den **Standardfehler** der Mittelwerte der Experimente wieder

Der Seruminduktionseffekt auf hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp war ebenso in den h-fob Zellen nachzuweisen (siehe Abbildung 17 und 18, bzw. 21 und 22). Auf die Graphische Darstellung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Doch ergab sich auch hier ein gleichsinniger Effekt, der dem in den in T/C28a<sub>2</sub> Zellen entsprach.

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung des hCYR61/CCN1 Promotors

#### 4.1.1 Ergebnisse der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-1000bp

Als grundlegendes Ergebnis ist festzuhalten, dass der hCYR61/CCN1 Promotor und Fragmente des Promotors ein hohes basales Luziferaseaktivitätsniveau aufweisen.

So erreichen die Luziferaseaktivitäten bei serumfreier Kultivierung in beiden Zelllinien ein Niveau welches um den Faktor 15-40 für die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp, 450bp und 800bp und dem Faktor 2 für das 1000bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt über der Aktivität des ohne Promotorkonstrukt, leer transfizierten pGL3-Basic Vektors lag, der ein Mass der Hintergrundaktivität darstellt (siehe Abbildung 25).

Die Aktivität des hCYR61/CCN1 Promotors ist nicht direkt proportional an die Länge der Promotorfragmente geknüpft. So erreicht schon das hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt mit der 200bp Länge eine ähnlich hohe Aktivität wie die Konstrukte mit den Längen 450bp und 800bp. Diese 3 Konstrukte unterscheiden sich nicht signifikant in ihren Luziferaseaktivitäten.

Augenscheinlich ist der signifikante Abfall der Luziferaseaktivität ( $p=0,024$  für h-fob Zellen und  $p=0,037$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen) für das 1000bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt im Vergleich zu den anderen 3 Promotorkonstrukten. Dieser Effekt ist für beide verwendeten Zelllinien, also sowohl für die h-fob Zellen, als auch für die T/C28a<sub>2</sub> Zellen, wie auch für beide verwendeten Versuchsbedingungen, serumhaltige und serumfreie Kultivierung festzustellen (siehe Abbildungen 17-20). Die Aktivität des 1000bp Promotorkonstruktes lag nur leicht, etwa um den Faktor 2 über der Hintergrundaktivität des ohne Promotorkonstrukt transfizierten pgl3-Basic Vektors, der als Kontrolle der Hintergrundaktivität verwendet wurde.

Der interessanteste Aspekt der Ergebnisse dieser Arbeit ist sicherlich der signifikante Abfall der Aktivität des 1000bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstruktes verglichen mit der Aktivität der anderen hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp, 450bp und 800bp.

Als Erklärungsmöglichkeit für diesen experimentellen Befund lässt sich eine Bindungsstelle für Repressoren der Transkription auf dem hCYR61/CCN1 Promotor zwischen 800bp und 1000bp postulieren. Dies könnte beispielsweise die FREAK-1 Bindungsstelle sein, die bei 860bp Länge auf dem hCYR61/CCN1 Promotor aufzufinden ist. Diese Bindungsstelle kann bekanntermassen die Hemmung der Transkription vermitteln, also als Transkriptionsrepressor wirken. In weiteren Studien der Arbeitsgruppe wurden hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte



der Längen 1,5kb und 2kb in h-fob Zellen transfiziert. Diese wiesen ebenso wie das 1000bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt eine niedrige Luziferaseaktivität auf. Durch Mutagenese der FREAK-1 Bindungsstelle konnte aber in keinem der untersuchten hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 1,5kb und 2kb eine Aktivitätssteigerung festgestellt werden. Somit konnte die Möglichkeit der Transkriptionsrepression durch die FREAK-1 Bindungsstelle ausgeschlossen werden.

Was aber weiterhin vorstellbar ist, dass andere Repressoren auf dem hCYR61/CCN1 Promotor diesen Aktivitätsabfall bewirken.

Möglich wäre aber auch, dass sich ab der Promotorlänge von 1000bp eine Tertiärstruktur der DNA ausbildet, durch die die Anlagerung von DNA-bindenden Strukturen, wie etwa von Transkriptionsfaktoren oder der RNA-Polymerase selbst, unterbunden wird. Dadurch könnte die Transkriptionsleistung des hCYR61/CCN1 Promotors so deutlich herunterreguliert werden.

Da die Aktivitäten der anderen hCYR61/CCN1 Promotorfragmente 200bp-800bp sich nicht signifikant voneinander unterscheidet ( $p=0,57$  in h-fob Zellen und  $p=0,66$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen bei serumfreier Kultivierung), scheint für den hCYR61/CCN1 Promotor und seine basale Aktivität keiner der Transkriptionsfaktoren, zu denen Sequenzhomologien bekannt sind (siehe Abbildung 8), hinreichend zu sein, um die Aktivität des hCYR61/CCN1 Promotors signifikant zu steigern oder zu reduzieren. Interessant wäre es die hCYR61/CCN1 Promotoraktivität und die der Promotorfragmente noch unter spezifischer Stimulation mit Hormonen und Wachstumsfaktoren zu untersuchen. So ließen sich detaillierte Aussagen über die Steuerung des Promotors von hCYR61/CCN1 treffen.

Dazu wurden in einer aktuellen Untersuchung Daten veröffentlicht, in der die CYR61/CCN1 Transkription mittels Sphingosin-1-Phosphat (S-1P) deutlich aktiviert wird. Der dazu identifizierte Signalweg wird über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der als Endothelialer Differenzierungs Rezeptor bekannt ist und dessen Agonist S-1P ist, mediiert. Durch die Rezeptorbindung wird die RhoA-GTPase, die wiederum c-jun und c-fos aktiviert und deren Effektor kinase unter anderem auch die p38-MAP-Kinase darstellt, als Signalpfad benutzt. Die Regulation auf dem CYR61/CCN1 Promotor wird nach dieser Publikation über die beiden Transkriptionsfaktoren, CREB, und AP-1 gesteuert (Han et al., 2003).

#### **4.1.2 Ergebnisse der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit variabler CA-Repeat Länge**

Innerhalb des hCYR61/CCN1 Promotors gibt es, wie in der Einleitung beschrieben, wurde zwei unterschiedliche CA-Repeat Motive. Wir wählten zur funktionellen Analyse das CA-Repeat Motiv in 5'-Richtung zum Gen hin aus.

Dieses CA-Repeat Motiv umfasste in einer Gesundenpopulation von 36 untersuchten Personen die CA-Repeatlängen von 17-21 CA-Repeats (siehe Tabelle 1). Diese CA-Repeatlängen nahmen wir als Längenorientierung für unsere hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte mit der variablen CA-Repeat Länge. Darüberhinaus setzten wir das zweite CA-Repeat-Motiv mit einer konstanten Länge von 19 CA-Repeats fest.

Die Hypothese die der Untersuchung der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte zugrunde lag war dass es einen Aktivitätsunterschied der einzelnen Promotorkonstrukte in Abhängigkeit von ihrer CA-Repeat Länge gibt.

Zuerst bleibt auch hier zu konstatieren, dass die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit variabler CA-Repeatlänge eine basal hohe Luziferaseaktivität besitzen.

In einer univariaten Varianzanalyse der verschiedenen CA-Repeat Konstrukte ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Promotorkonstrukten in Abhängigkeit von der CA-Repeat Länge ( $p=0,495$  für h-fob Zellen und  $p=0,514$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen).

Zusammenfassend kann somit für diesen CA-Repeat Polymorphismus im Promotor von hCYR61/CCN1 keine signifikante funktionelle Relevanz auf die Aktivität des Promotors festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der zweite CA-Repeat Polymorphismus relevante regulatorische Funktionen besitzt.. Zwischen den beiden CA-Repeat Motiven innerhalb des Promotors liegen nur wenige Basenpaaren. Damit ist die Möglichkeit eine PCR zu etablieren, die selektiv nur den einen CA-Repeat Bereich oder den anderen darstellt, sehr eingeschränkt. Es gelang nur die selektive Amplifikation des 5'-gelegenen CA-Repeats. Die Amplifikation des Gesamtbereiches ist zwar unproblematisch, jedoch ist die gleichzeitige Untersuchung beider CA-Repeats aus einem Konstrukt in der Fragmentanalyse durch die Stotterbanden problematisch, da in beiden Bereichen die CA's nicht eindeutig zuzuordnen sind. Die Analyse einfach zugänglicher Variationen der DNA, wie z.B. Basenaustausch wären daher für Polymorphismusuntersuchungen besser geeignet. Jedoch sind bislang weder aus Datenbanken, noch aus Experimenten der Arbeitsgruppe solche Polymorphismen bekannt.

Selbst wenn es gelungen wäre die beiden CA-Repeat Motive selektiv zu erzeugen, so hätte man methodisch große Schwierigkeiten gehabt, die Untersuchung valide durchzuführen.

Kombinatorisch erhält man hierbei sehr schnell eine unüberschaubare Anzahl von Konstrukten ( $5^5$  verschiedene Kombinationen), die gegeneinander zu testen fast unmöglich geworden wäre.

Die durchgeführten Experimente kann man als Vorversuch auffassen, die grob darüber Auskunft geben sollten, ob die CA-Repeat Polymorphismen eine Relevanz besitzen.

Nach meinen Daten haben sie jedoch keine signifikante Bedeutung.

Es ist als nachrangiges Ergebnis allerdings nicht überraschend, dass auch hier ein deutlicher Seruminduktionseffekt nachweisbar war. Am stärksten ist dieser in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen ausgeprägt, in denen die Aktivitätssteigerung der Promotorkonstrukte 450bp mit variabler CA-Repeat Länge im Mittel um den Faktor 10 liegt, wohingegen der Induktionseffekt in den hFOB Zellen nur um den Faktor 2 liegt.

Auch hier wird die Aktivität über alle Promotorkonstrukte gleichmäßig durch das FCS gesteigert.

Unter serumfreien Bedingungen sind die Aktivitäten der 450bp Promotorkonstrukte in beiden Zelllinien fast identisch. Unter serumhaltigen Bedingungen ist der Induktionseffekt in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen wesentlich stärker ausgeprägt, die Relationen der einzelnen Konstrukte bleibt aber über die Zelllinien hinweg konstant. So dass auch hier ein proportionaler Induktionseffekt in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen auf die 450bp hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte nachzuweisen ist.

### **4.1.3 Vergleich der serumfreien und serumhaltigen Kultivierungsbedingungen**

Der Vergleich zwischen den serumfreien und den serumhaltigen Kultivierungsbedingungen zeigt deutlich den Induktionseffekt des fetalen Kälberserums (FCS) auf die hCYR61/CCN1 Promotoraktivität.

Dieser Effekt ist in beiden Zelllinien zu konstatieren, wobei die hCYR61/CCN1 Promotorinduktion in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen höher ausfällt.

Unter serumfreien Bedingungen sind die Aktivitäten aller hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte in beiden verglichenen Zelllinien nahezu identisch (siehe Abbildung 25). Hier ergibt sich also kein Zellspezifischer Effekt auf die Promotorkonstrukte. Unter serumhaltigen Bedingungen ist jedoch der Induktionseffekt des Serums in den T/C28a<sub>2</sub> Zellen wesentlich stärker ausgeprägt (siehe Abbildung 26).

In den h-fob Zellen liegt die Aktivität der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp, 450bp, 800bp und 1000bp um den Faktor 1,5-3 über der Luziferaseaktivität bei serumfreier Kultivierung.

In den T/C28a<sub>2</sub> Zellen liegt dieser Effekt für die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 200bp, 450bp, 800bp und 1000bp um den Faktor 8-11 über der serumfreien Kultivierung (p=0,001 in h-fob Zellen und p=0,002 für T/C28a<sub>2</sub> Zellen) (siehe Abbildung 25, 26, und 27).

Die Steigerung der Aktivität der hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte in den h-fob Zellen fiel mit einer Steigerung um nur 1,5-3 signifikant niedriger aus (p=0,024).

Der Induktionseffekt wirkt somit auf alle hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte in den beiden verglichenen Zelllinien gleichmäßig und somit liegt eine konstante Induktion des Serums auf alle hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte unterschiedlicher Länge vor. Dies ist daran zu erkennen, dass die Steigerungen der Promotoraktivitäten der einzelnen Promotorfragmente im Vergleich zwischen serumfreier und serumhaltiger Kultivierung proportional für jedes Fragment gesteigert waren. Diese Ergebnisse sind eine Bestätigung der Literaturangaben, die eine Seruminduktion des hCYR61/CCN1 Promotors beschreiben (Leng et al., 2002; Arsenian et al., 1998; Latinkic et al, 2001).

Es ist jedoch ein bemerkenswerter Effekt, da ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Maus Promotor CYR61/CCN1 und dem humanen hCYR61/CCN1 Promotor, das Fehlen eines Serum Response Elements ist (Leng, et al, 2002), so dass es noch einen anderen alternativen Mechanismus der Seruminduktion auf den hCyr61/CCN1 Promotor geben muß.

## ***4.2 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext aktueller Literatur***

Eine der Hauptzielsetzungen dieser Arbeit war es Hinweise über die Regulationsmechanismen des hCYR61/CCN1 Promotors zu erhalten. Hierzu wurden Promotorfragmente unterschiedlicher Länge auf ihre unstimulierte Promotoraktivität in einem Luziferase Assay System untersucht. Hierdurch erhofften wir uns Zusammenhänge zwischen der Regulierung des Aktivitätsniveaus des Promotors von hCYR61/CCN1 in Abhängigkeit von den verschiedenen bekannten Sequenzhomologien von Transkriptionsfaktoren auf dem hCYR61/CCN1 Promotor, die diesen möglicherweise regulieren, finden zu können.

Theoretisch gibt es sehr viele Möglichkeiten der Regulation eines Promotors. Die erste Beschreibung einer Promotorregulation verfassten Francois Jacob und Jaques Monod für die Synthese von  $\beta$ -Galaktosidase in Escherichia coli Bakterien. Sie schlugen ein Modell vor, indem ein sogenanntes Operon die Genexpression von Strukturgenen im Zusammenspiel mit einem Repressorgen reguliert (Mc Knight, Yamamoto, Hrsg.). Dieses Modell wurde allerdings für Prokaryoten entwickelt. In eukaryotischen Zellen sind die Regulationsmöglichkeiten der Genexpression deutlich komplexer und gehen weit über dieses erste, jedoch grundlegende

Modell hinaus. Ein Grund hierfür ist sicherlich das größere Genom von Eukaryoten, welches deshalb komplexer organisiert ist und damit wird die Transkriptionskontrolle natürlicherweise verkompliziert.

Die Genexpression wird im Allgemeinen vor allem auf der Ebene der Transkription kontrolliert. Um die Transkription zu starten, ist die Formierung eines Transkriptionskomplexes an der TATA-Box des Promotors nötig. Auf die Transkriptionsaktivität nehmen eine Vielzahl von Proteine Einfluß, die über bestimmte DNA-Motive an das zu regulierende Gen binden können. Solche DNA-Motive sind beispielsweise Zinkfinger, Leucinreißverschlüsse, Hormon responsive Elemente (HRE), oder wie im Beispiel des hCYR61/CCN1 Promotors, Motive für Transkriptionsfaktoren, wie CREB, AP-1, FREAK-1, oder NF $\kappa$ B. Wobei CREB zur Familie der Transkriptionsfaktoren der B-Zip Familie gehört. Über Hormon responsive Elemente wirken hauptsächlich hydrophobe Steroidhormone, die frei durch die Zellmembran permeieren können. Im Nukleosol lagern sie sich dann an die entsprechenden DNA-Bindungsstelle, die Hormon response element binding site an. Diese Anlagerung an die DNA bewirkt eine Konformationsänderung der DNA und in dieser Folge wird die Anlagerung von weiteren Transkriptionsfaktoren möglich. Das Ergebnis dieses Prozesses, ist die Synthese von mRNA.

Dieser grobschematisch skizzierte Mechanismus ist nur eine beispielhafte Möglichkeit unter vielen weiteren der Steuerung der Transkriptionsaktivität eines Gens.

Durch Schleifenbildung beispielsweise, also Konformationsänderung in der Tertiärstruktur der DNA, wird es möglich, dass Transkriptionsfaktoren in großer Entfernung von mehreren Kilobasen vom Transkriptionsort trotzdem wirksam werden können. So wird über die Ausbildung von Tertiärstrukturen der DNA großer Einfluß auf die Transkriptionsleistung eines derartig gesteuerten Gens ausgeübt. Die bislang bekannten Steuerungsmöglichkeiten von hCYR61/CCN1 sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Die Mechanismen der Steuerung der Gentranskription sind sehr komplex verwoben und bislang nur teilweise aufgeklärt. Deshalb bleibt bei der Erklärung von Steuerungsmechanismen der Genregulation häufig nur die Spekulation über die tatsächliche Regulation.

Dies gilt auch für die Diskussion der Ergebnisse der unterschiedlichen hCYR61/CCN1 Promotorlängen, mit dem deutlich Aktivitätsabfall zum längsten Promotorfragment hin, die durch noch unbekannte Repressoren auf dem hCYR61/CCN1 Promotor bewirkt werden könnte, oder aber durch Konformitätsänderung der DNA Struktur ab einer gewissen Länge. Dies jedoch müssen weitere Untersuchungen klären.

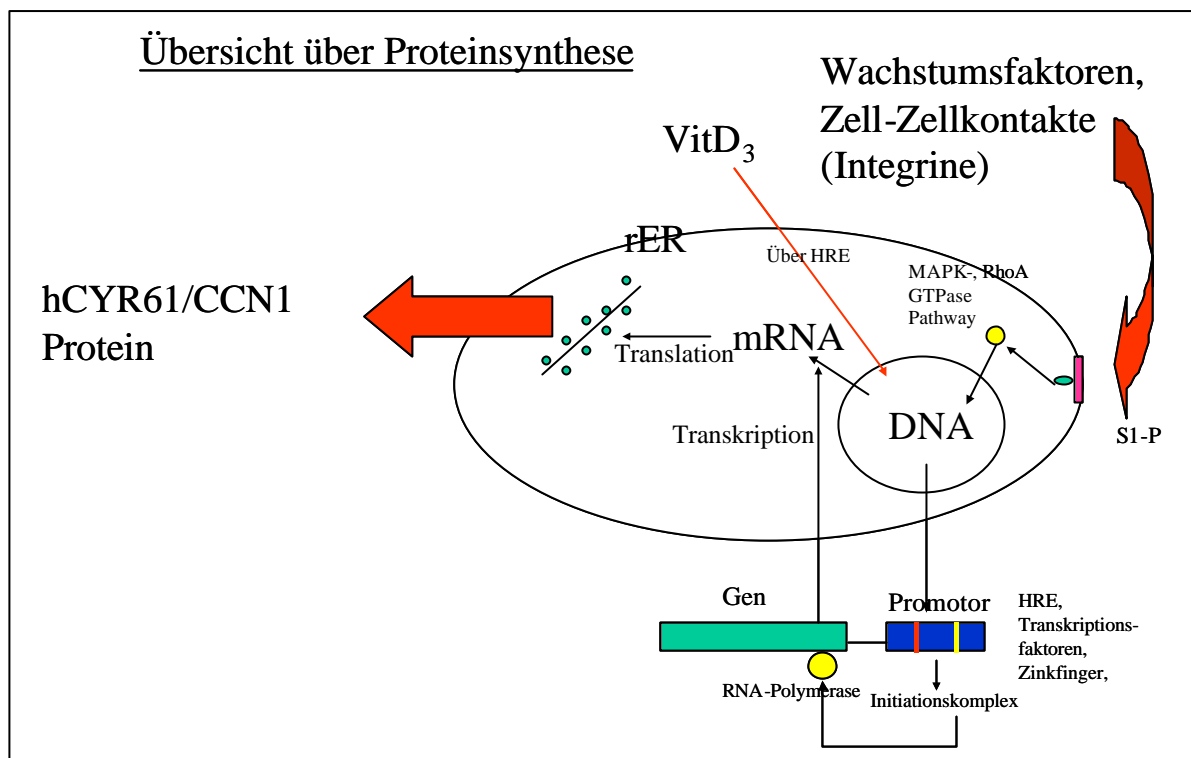


Abbildung 29: Überblick über die Regulationsmechanismen der Transkription bei hCYR61/CCN1. Nach Han et al 2003 bindet S-1P an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der als Endothelialer Differenzierungs Rezeptor bekannt ist. Dieser aktiviert die RhoA-GTPase, die wiederum c-jun und c-fos aktiviert und deren Effektor kinase auch die p38-MAP-Kinase darstellt. Die Transkriptionsaktivierung auf dem Cyr61/CCN1 Promotor wird über die beiden Transkriptionsfaktoren, CREB und AP-1 gesteuert.

Die zweite Hauptfragestellung dieser Arbeit war die Untersuchung der funktionellen Relevanz des polymorphen CA-Repeat Motivs 1 innerhalb des Promotors, auf die basale unstimulierte Promotoraktivität von hCYR61/CCN1.

Um die Fragestellung einzuleiten sei erwähnt, dass derartige CA-Repeat Sequenzen wie bei dem hCYR61/CCN1 Promotor per se nicht aussergewöhnlich im humanen Genom zu finden sind. Sie sind die häufigsten variablen Genstretches des menschlichen Erbgutes und kommen viel-zehntausendfach im menschlichen Genom vor (de la Chapelle, 2003). Diese variablen, also polymorphen CA-Repeat Sequenzen eignen sich, wenn sie konstante differente Ausprägungen zwischen verschiedenen Personen haben, zur genetischen Charakterisierung, dem sogenannten Fingerprinting. Derartige polymorphe Genom Areale werden auch Mikrosatelliten Marker genannt. Diese werden in der forensischen Medizin häufig benutzt, um zum Beispiel die Vaterschaft zu klären, oder zur Täterbestimmung bei Sexualdelikten und

anderen Straftaten. Des weiteren eignen sich Mikrosatelliten Marker um Krankheiten und die Schwere ihrer Ausprägung zu charakterisieren. Am besten ist dies für neurologische Erkrankungen bekannt. So ist das Trinukleotid Motiv CAG für die Entstehung von Chorea Huntington Verantwortlich. Überschreitet der Stretch die Länge von 39 CAG-Repeats, so erkrankt die betreffende Person an Chorea Huntington. Ist der Stretch größer als 60 CAG-Repeats so setzt die Erkrankung früher ein und desto schwerer ist auch deren Verlauf. Die gleichen Mechanismen gelten ebenso für weitere neurologische Erkrankungen, wie der Myotonen Dystonie, der Spinocerebellären Ataxie, der Spinobulbären Muskelatrophie Typ 1 und dem Fragilen X-Syndrom.

In der Onkologie spielen Mikrosatelliten Marker ebenso eine immer wichtigere Rolle, so um beispielsweise die Dignität von Tumoren bestimmen zu können. So lässt sich über den Grad der Deletionen in Bereichen von Mikrosatelliten Markern eine Aussage im Hinblick auf die Ansprechrate der Tumoren auf Chemotherapeutika und deren prognostischer Verlauf gewinnen. Dies ist sehr gut für das Kolon Karzinom und das Ansprechen auf eine Standardchemotherapie mit Fluoruracil gezeigt (Ribich et al., 2003). In dieser Untersuchung konnte man zeigen, dass Mikrodeletionen im Bereich von Mikrosatelliten Markern zwar eine höhere Tumorgraduierung und eine aggressivere lokale Infiltration in das umgebende Gewebe von Kolon Karzinomen zeigten, doch dass ihre Prognose bezüglich ihres Überlebens deutlich besser war als die, die Tumoren mit Chromosomalen Veränderungen, wie Translokationen und Inversionen aufwiesen.

Weitere interessante Anwendungen der CA-Repeat Stretches innerhalb der Onkologie ist es diese in normalen Zellen zu untersuchen und diese dann mit deregulierten Tumorzellen im Hinblick auf den Verlust von Heterozygotie (Loss of Heterozygosity) zu vergleichen. Je grösser die Abweichung der Tumorzellen von dem normalen Genom, desto höher ist deren Grad der Entdifferenzierung. Hiermit lässt sich ein noch genaueres System der Graduierung der Dignität von Tumorzellverbänden entwickeln, als das bisher angewandte der histologischen Graduierung.

Bei der Untersuchung der CA-Repeat Polymorphismen im Insulin-like-Growthfactor-Binding-Protein-1 Gen (IGFBP-I Gen), zu welchem die CCN-Familie ja bekannterweise Sequenzhomologien aufweist, fand man in einigen Studien einen Zusammenhang zwischen der CA-Repeat Länge im Promotor und der Wahrscheinlichkeit der Osteoporoseentstehung (Rosen, 1999). So fand man in dieser Studie einen positiven Zusammenhang zwischen Osteoporose und der Länge der CA-Repeats im IGFBP-I Gen. Hinsichtlich der Konzentration von IGF-I im Blut fand man einen negativen Zusammenhang. Es wurde allerdings ein

positiver Zusammenhang zwischen Serum IGF-I Konzentrationen und der Entstehung des Mamma Karzinoms, sowie des Prostata Karzinoms postuliert. Diese Ergebnisse konnten jedoch in weiteren Studien nicht verifiziert werden (Takacs et al., 1999; Jernström et al., 2001). Man hatte bezüglich der CA-Repeats in nicht kodierenden Regionen die Hypothese, dass mit der grösseren Länge des CA-Repeats eine reduzierte Genexpression einhergehe, also ein Funktionsverlust (Loss of function), wie dies auch für einige neurologische Erkrankungen, allen voran der schon erwähnten Chorea Huntington, gilt (Campuzano et al., 1996).

Im Gegensatz dazu stehen allerdings die Ergebnisse zweier aktueller Studien. Die eine untersuchte die Aktivität der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in Abhängigkeit von CA-Repeat Polymorphismen innerhalb des Promotors. Man fand hier eine verstärkte Expression des Gens je länger die CA-Repeats waren (Peters et al., 1999). Die zweite Studie untersuchte ein Tetranukleotid Repeat in einem Gen welches für eine Tyrosin Hydroxylase kodiert und fand den selbigen gleichsinnigen, verstärkenden Expressionseffekt in Abhängigkeit von der Tetranukleotidlänge (Meloni et al., 1998). Hier fand man also statt eines Funktionsverlustes (Loss of function) wie dies Rosen zeigte, stattdessen eine Funktionsverstärkung (Gain of function). Deshalb wurde in diesem Fall postuliert, dass die CA-Repeat Stretches als Bindungsstelle für Proteine, die die Transkription positiv regulieren dienen könnten. (Kato et al., 2003).

Neueste Untersuchungen unterstützen interessanterweise letztere Hypothese des Funktionsgewinns durch verlängerte CA-Repeat Stretches. Sie konnten die funktionelle Rolle von CA-Repeat Stretches in Introns von Genen, für das differentielle Splicing von RNA und für die RNA Stabilität zeigen. Dies wurde für das Gen der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) gezeigt. Hierbei muss an den in der Länge passenden CA-Stretch ein hnRNP-L binden, um seine Splicingaktivität auf mRNA Ebene aktivieren zu können, ist dies nicht der Fall da die Stretchlänge unpassend ist, so kann keine Splicingaktivität entfaltet werden ( Hui et al., 2003). Dies ist zwar nur für ein Gen gezeigt, doch könnten ähnliche Mechanismen auch für Promotoren anderer Gene gelten.

Vor diesem Hintergrund der divergierenden experimentellen Daten zu der Bedeutung von CA-Repeat Stretches in Promotoren erscheint der beschriebene Polymorphismus des CA-Repeats innerhalb des Promotors von hCYR61/CCN1 sehr interessant und für eine nähere Untersuchung sehr lohnenswert.

Hierzu wurden für eine hCYR61/CCN1 Promotorkonstruktlänge, nämlich das 450bp Promotorkonstrukt, unterschiedliche in der humanen Population vorkommende CA-Repeatlängen (siehe auch Tabelle 1) von 17 bis 22 CA Repeats untersucht. Hierdurch wollte



man eine Aussage über die Abhängigkeit der Promotoraktivität von den entsprechenden CA-Repeatlänge ableiten.

Die Hypothese ist, dass hCYR61/CCN1 als Vitamin D<sub>3</sub> induzierbares und responsives immediate early Gen des Knochenstoffwechsels, die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität modulieren kann und somit die Knochenmorphologie beeinflusst. Darüber hinaus kann man postulieren, dass hochpolymorphe Strukturen innerhalb des Promotors einen Einfluß auf die Promotoraktivität und damit auf die Expression des hCYR61/CCN1 Proteins haben und somit einen Einfluß auf die Knochenmorphologie haben könnten.

Sollte es Hinweise für diese Hypothesen geben, könnte man bei dem Nachweis der funktionellen Relevanz der Promotorpolymorphismen in vitro, über Effekte der Polymorphismen, den Knochenstoffwechsel in vivo betreffend, spekulieren.

Falls sich diese Zusammenhänge bestätigen sollten, so wäre dies interessant zur Etablierung molekularer Marker (Mikrosatelliten Marker) zur Diagnostik und Prognostik von Knochenerkrankungen.

### **4.3 Kritische Wertung der Experimentergebnisse**

#### **4.3.1 Zellkultur**

Als Störfaktor bei der Untersuchung der Promotoraktivität muss man natürlich die verwendeten Zellsysteme betrachten. hCYR61/CCN1 wird in vielen anderen Geweben außerhalb des Knochens exprimiert, so zum Beispiel in der Leber, im Gehirn und in Muskelzellen. Da wir die Relevanz von hCYR61/CCN1 im Knochenstoffwechsel untersuchen wollten verwendeten wir eine Zelllinie humaner fetaler Osteoblasten, h-fob Zellen, die eine immortalisierten Zelllinie darstellen.

Diese 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.

Als Osteoblastenmodell ist die Zelllinie geeignet, da nach Erreichen der Konfluenz ein osteoblastärer Phänotyp ausgebildet wird. Die Zellen bilden mineralisierte Matrixnoduli, Osteopontin, Osteonectin, Typ I Kollagen, Osteocalcin und Alkalische Phosphatase.

Gegenüber einer Osteoblastenprimärkultur lassen sich die h-fob Zellen wesentlich simpler kultivieren. Des weiteren ist h-fob mit nur einem mutierten Gen, weniger entdifferenziert von seinem Ursprungsgewebe, als es Tumorzelllinien oder viral immortalisierte Zelllinien sein

können. Aus diesen Überlegungen heraus sind die h-fob Zellen fast das ideale Zellsystem zur Untersuchung von Fragestellung des Knochenstoffwechsels.

Die T/C28a<sub>2</sub> Zellen wurden als Kontrollzellsystem verwendet, die die Effekte der h-fob Zellen verifizieren sollten.

### **4.3.2 Die Methode der Elektroporation als Transfektionsverfahren**

Als Transfektionsverfahren benutzten wir die Methode der Elektroporation. Im Rahmen meiner Versuche war die Elektroporation effektiver als alternative Verfahren der DNA Einschleusung, wie zum Beispiel Transfektionen mittels Lipofektamin.

Der Nachteil der Elektroporation ist jedoch der große Zellstress über die hohe angelegte Spannung von 120 Volt. Diese Spannung überleben nur ein Teil der elektroporierten Zellen. Diese große Schwankungsbreite, die man experimentell nicht kontrollieren kann ist natürlich hinderlich um sehr feine Effekte nachzuweisen.

Ein großes Problem der Transfektionen stellte die konstante Zellzahl pro well dar. Wir zählten die Zellzahl in Mühlbauer Zählkammern aus und elektroporierten immer ein Triplikat. Inkonstant blieb die Anzahl der Zellen, die ausgesät wurden und die Elektroporation überlebten. Dies zeigte sich in der großen Streuung der Proteinwerte pro well, trotz konstant ausgezählter Zellzahl vor der Elektroporation.

Dieser Störfaktor könnte bei sehr geringen Effekten in der Promotoraktivität, gerade bei den 450bp Konstrukten mit den unterschiedlichen CA-Repeat Längen einen signifikanten Effekt verhindern.

### **4.3.3 Der Luziferase Assay**

Als Messverfahren etablierten wir einen Luziferase Assay, der an sich einen hohe Sensitivität aufweist. Die Messwerte des Assays kombinierten wir mit dem Proteingehalt des entsprechenden Wells. Somit erhielten wir einen Aussage über die relative Luziferaseaktivität pro Zelle. Diese Aussage trifft jedoch nur dann zu, wenn alle Zellen tatsächlich über die Elektroporation mit Promotorkonstrukt transfiziert wurden. Dies ist aber nicht der Fall. So unterschätzt der Quotient aus Luziferaseaktivität und Proteingehalt pro well den tatsächlichen Effekt. Um dies zu verhindern müsste man mit den Promotorkonstrukten ein Enzymsystem kotransfizieren, zum Beispiel  $\beta$ -Galaktosidase. Über einen  $\beta$ -Gal-Assay der Zellsuspension lässt sich so die Transfektionseffizienz pro Elektroporation überprüfen.

Da der Effekt jedoch unterschätzt wird und nicht überschätzt, kann man die Ergebnisse dennoch valide verwenden.

#### **4.4 Mögliche weitere Untersuchungen**

Zur weiteren Untersuchung der Fragestellung wären noch feinere Untersuchungen des Promotors denkbar, indem man selektiv bestimmte Transkriptionsfaktoren aus dem Promotor per Restriktion herausschneidet, um dann die basale Aktivität zu untersuchen.

Zur untersuchten CA-Repeat Länge ließe sich noch der zweite CA-Repeat Polymorphismus zuerst isoliert untersuchen und bei Aktivitätssignifikanz noch in Kombination mit dem zweiten Polymorphismus. Doch dies ist zum einen ein technisches Problem der Klonierung, da nur wenige Basenpaare zwischen den beiden Polymorphismen liegen, die eine Restriktion, ebenso wie eine selektive PCR sehr erschweren, zum Zweiten ergäbe sich aufgrund der Permutationen der CA-Repeat Varianten eine extrem hohe Zahl an Kombinationen, die anhand des zu erwartenden schwachen Effekts den Aufwand schwerlich lohnen.

Darüber hinaus könnte man beide Untersuchungen noch mit der Stimulation des hCYR61/CCN1 Promotors durchführen. Denkbar wären hier beispielsweise Wachstumsfaktoren und Hormonen, um so in vitro Effekte der Stimulation und der stimulierende Agentien testen zu können und um dadurch möglicherweise den Signaltransduktionsweg näher zu charakterisieren.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Doktorarbeit war es den Promotor des Wachstumsfaktor und 1,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> regulierten immediate early Genproduktes von Osteoblasten und Signalmolekül im Mikroenvironment des Knochens, hCYR61/CCN1, funktionell zu charakterisieren.

Hierbei standen zwei Fragestellungen im Mittelpunkt. Zum einen sollten 4 unterschiedliche hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte, mit den Längen von 200bp-1000bp auf ihre Promotoraktivität getestet werden, um so eine Vorstellung der Regulationsmechanismen des hCYR61/CCN1 Promotors zu gewinnen.

Die andere Fragestellung befasste sich mit der Relevanz eines CA-Repeat Polymorphismus innerhalb des hCYR61/CCN1 Promotors, der anhand einer Gesundenpopulation nachgewiesen worden war. Das Interesse war hierbei, ob unterschiedliche CA-Repeat Längen in einem hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt von 450bp Länge auch unterschiedliche Promotoraktivitäten erzeugen. Für den Fall dass dieser Effekt in vitro nachweisbar wäre, so wäre dieser CA-Repeat Polymorphismus interessant im Hinblick auf die Verwendung als Mikrosatelliten Marker für pathologische Veränderungen des Knochenstoffwechsels.

Die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-1000bp wurden mittels PCR eines Templates (J23219 aus einer Lambda Phagendatenbank) hergestellt. Die Länge und die Sequenz der Promotorkonstrukte überprüften wir durch Sequenzierung und Fragmentanalysen. Ausgewählte hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte wurden daraufhin in ein Luziferase-Vektor-System kloniert. Die entstandenen hCYR61/CCN1 Promotor-Vektorkonstrukte wurden in zwei Zellsysteme, h-fob Zellen (humane Osteoblasten) und T/C28a<sub>2</sub> Zellen (humane Chondrozyten) durch Elektroporation transfiziert. Die Zellen wurden über 48h kultiviert, geerntet und die Promotoraktivität in einem Luminometer in Fluoreszenz Units (FU) gemessen.

Es wurden zwei verschiedene Kultivierungsbedingungen der beiden Zelllinien geprüft, nämlich eine serumfreie und eine serumhaltige, um einen in der Literatur beschriebenen Seruminduktionseffekt nachweisen und überprüfen zu können.

Insgesamt wurden für die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-1000bp Experimente in h-fob Zellen und T/C28a<sub>2</sub> Zellen, jeweils unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen durchgeführt. Für die 450bp langen hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte mit den variierenden CA-Repeats von 17-22 CA-Repeats, wurden ebenso Transfektionsexperimente in beiden Zelllinien und unter beiden Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Pro Versuchsreihe wurden zwischen 5 und 7 Transfektionsexperimente ausgeführt.

Als Ergebnisse ist zusammengefasst festzuhalten, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten unterschiedlicher Länge von 200bp-1000bp und ihrem Promotoraktivitätsniveau besteht. Die hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte der Länge 200bp-800bp besitzen eine sehr hohe basale Promotoraktivität, die um den Faktor 4-5 bei serumfreier Kultivierung über der Hintergrundsaktivität liegt. Die Aktivität des 1000bp Promotorfragmentes ist signifikant niedriger ( $p=0,024$  in h-fob Zellen und  $p=0,037$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen bei serumhaltiger wie serumfreier Kultivierung), als die der übrigen Promotorfragmente, die sich untereinander nicht signifikant in ihren Aktivitäten unterscheiden ( $p=0,57$  in h-fob Zellen und  $p=0,66$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen bei serumfreie Kultivierung).

Es besteht weiterhin ein signifikanter Seruminduktionseffekt, der für alle Konstrukte und beide Zelllinien nachzuweisen ist. Dieser ist bei den hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukten der Länge 200bp-1000bp, ebenso wie bei den hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukte 450bp mit den variablen 17-22 CA-Repeats nachweisbar ( $p=0,001$  in h-fob Zellen und  $p=0,002$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen). Der Seruminduktionseffekt ist für alle Konstrukte proportional und wirkt signifikant stärker auf die T/C28a<sub>2</sub> Zellen, als auf die h-fob Zellen. So liegt die durchschnittliche Steigerung der hCYR61/CCN1 Promotoraktivität etwa bei dem Faktor 1,5-3 in h-fob Zellen, in T/C28a<sub>2</sub> Zellen jedoch um den Faktor 8-11. Dieser Effekt wirkt auf den Promotor von hCYR61/CCN1, da die basale Hintergrundsaktivität gemessen anhand der Transfektion des leeren Expressionsvektors pgl3-Baisc, davon unbeeinflusst bleibt.

Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den CA-Repeat Polymorphismen 17-22 CA-Repeats in dem hCYR61/CCN1 Promotorkonstrukt der Länge 450bp und deren Promotoraktivitäten ( $p=0,495$  in h-fob Zellen und  $p=0,514$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen bei serumfreier Kultivierung und  $p=0,397$  in h-fob Zellen und  $p=0,488$  für T/C28a<sub>2</sub> Zellen bei serumhaltiger Kultivierung). Die Konstrukte haben also unabhängig von der Zahl der CA-Repeats keine unterschiedliche Promotoraktivität gemessen im Luziferase Assay. Somit lässt sich in diesem in vitro System kein relevanter Effekt hinsichtlich der funktionellen Relevanz diese CA-Repeat Polymorphismus nachweisen.

Abschließend lässt sich sagen, dass der Mechanismus des signifikanten Aktivitätsabfalles des hCYR61/CCN1 Promotorkonstruktes 1000bp unverstanden ist. Die Erklärung der Downregulation des Aktivitätsniveaus durch die FREAK-1 Bindungsstelle bei 860bp auf dem hCYR61/CCN1 Promotor, die als Repressor in der Literatur beschrieben wurde, wurde durch Mutagenese der FREAK-1 Bindungsstelle untersucht, doch dies erwies sich als nicht zutreffend.

Weitere Experimente werden Auskunft über kausale Regulationsmechanismen des hCYR61/CCN1 Promotors und die Relevanz von hCYR61/CCN1 innerhalb des Knochenstoffwechsels geben.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschlager M, Ruther U, Nordheim A (1998) Serum Response factor essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* 17, 6289-6299
- 2) Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF (1998) CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6355-6360
- 3) Babic AM, Chen CC, Lau LF (1999) Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin  $\alpha_7\beta_3$ , promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19: 2958-2966
- 4) Bork P (1993) The modular architecture of a new family growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327:125-130.
- 5) Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114:1285-1294
- 6) Brigstock DR (1999) The connective tissue growth factor/cysteine rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Rev* 20:189-206
- 7) Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube K-I, Lam S C-T, Lau LF, Lyons K, Naus C, Perbal B, Riser B, Takigawa M, Yeger H (2003) *J Clin Pathol Mol Pathol* 2003; 56: 127-128
- 8) Brigstock DR (2003), The CCN family: a new stimulus package, *Journal of Endocrinology* (2003) 178,169-175
- 9) Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. (1996) Friedreich's Ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intron GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271:1423-1427
- 10) Chaqour B, Whitbeck C, Han JS, Macarak E, Horan P, Chichseter P, Levin R (2002). CYR61 and CTGF are molecular markers of bladder wall remodeling after outlet obstruction, *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283 (4):E765-E774
- 11) Chen CC, Mo FE, Lau LF (2001) The angiogenic factor CYR61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts, *J Biol Chem* 276(50):47329-37
- 12) Clark EA and Bruegge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken *Science* 268: 233-239
- 13) Collet C and Candy J (1998) How many insulin-like growth factor binding proteins? *Mol Cell Endocrinol* 139:1-6
- 14) Chung KC, Ahn YS (1998) Expression of immediate early gene CYR61 during differentiation of immortalized embryonic hippocampal neuronal cells. *Neurosci Lett* 255(3):155-8
- 15) De la Chapelle A (2003) Microsatellite Instability. *N Engl J Med* 349;3
- 16) Fan-E Mo, Andrew Muntean, Chih Chiun Chen, Donna B. Stolz, Simon C. Watkins, and Lester F. Lau (2002) Cyr61 (CCN1) Is Essential for Placental Development and Vascular Integrity, *Molecular and Cellular Biology*, Dec. 2002, p.8709-8720
- 17) Fataccioli V, Abergel V, Wingertsmann L, Neuville P, Spitz E, Adnot S, Calenda V, Teiger E (2002) Stimulation of angiogenesis by cyr61 gene: a new therapeutic candidate, *Hum Gene Ther* 12: 1461-70
- 18) Grotendorst GR, Lau LF and Perbal B (2000) CCN proteins are distinct from and should not be considered members of the IGFBO superfamily. *Endocrinology* 141:2254-2256
- 19) Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF (2001) Cyr61 stimulates human skin fibroblasts migration through integrin  $\alpha_7\beta_5$  and enhances mitogenesis through integrin  $\alpha_7\beta_3$ , independent of its carboxyl-terminal domain, *J Biol Chem* 276: 21943-21950
- 20) Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15: 1014-1023
- 21) Holick M.F. Mc Collum Award Lecture 1994, Vitamin D-new horizons for the 21<sup>st</sup> century. *Am J Clin Nutr* 1994;60:619-30
- 22) Hess AF, Unger LF. Cure of infantile rickets by sunlight. *J Am Med Assoc* (1921); 77:39
- 23) Hui J, Reither G, Bindereif A, Novel functional role of CA Repeats and hnRNP L in RNA stability; *RNA*, 2003 Aug ;9(8):931-936
- 24) 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, (1999) Mutations in the gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. *Nat Genet* 23:94-98
- 25) Holt et al 1990

- 26) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637-645
- 27) Jay P, Berge-Lefranc JL, Marsollier C, Mejean C, Taviaux S, Berta P (1997) The human growth factor inducible early gene CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene* 14:1753-1757
- 28) Jedsadayamata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC-T (1999) Activation-dependent adhesion of human platelets to cyr61 and FISP12/ mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J Biol Chem* 274: 24321-24327
- 29) Jernström H, Deal C, Wilkin F, et al. (2001) Genetic and non genetic factors associated with of plasma level of IGF-I and IGFBP-3 in healthy premenopausal women, *Cancer Epi Biomarkers.Prev* 2001;10:377-384
- 30) Ji-Soo Han, Edward Macarak, Joel Rosenbloom, Kwank Chul Chung, Brahim Chaquor (2003) Regulation of CYR61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways, *Eur. J. Biochem.* 270, 3408-3421 (2003)
- 31) Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B (1992) Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol* 12:10-21
- 32) Kato I, Eastham J, Li B, Smith M, Yu H, Genotype-phenotype analysis for the polymorphic CA repeat in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene, *Eur J Epidemiol.* 2003;18(3):203-9
- 33) Kim KH, Min YK, Baik JH, Lau LF, Chaquor B, Chung KC (2003) 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* 220, 2405-2407
- 34) Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts Jr CT, Rosenfeld RG (1997) Identification of a family of low affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP's): Characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12981-12986
- 35) Kireeva ML, Lam SC-T, Lau LF (1998) Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate early gene product cyr61 is mediated through integrin  $\alpha_7\beta_3$ . *J Biol Chem* 273: 3090-3096
- 36) Kolesnikova TV, Lau LF (1998). Human CYR61-mediated enhancement of bFGF- induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene* 16: 747-754
- 37) Kumar S, Hand AT, Connor JR, Dodds RA, Ryan PJ, Trill JJ, Fisher SM, Nuttall ME, Lipshutz DB, Zhou C, Hwang SM, Votta BJ, Riemann DJ, Gowen M, Lee JC (1999) Identification and cloning of a connective tissue growth factor like cDNA from human -osteoblasts encoding a novel regulator of osteoblast functions. *Jbio Chem* 274: 17123-17131
- 38) Latinkic BV, O'Brien TP, Lau LF (1991). Promotor function and structure of the growth factor inducible immediate early gene CYR61. *Nucleic Acids Res* 19:3261-3267
- 39) Latinkic BV, Mo FE, Greenspan J A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ross SR, Lau LF (2001) Promotor function of the angiogenic inducer Cyr61 gene in transgenic mice: tissue specificity, inducibility during wound healing and role of the serum response element. *Endocrinology* 142, 2549-2557
- 40) Lau LF, Lam ST-C (1999) The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 248: 44-57
- 41) Leng E, Malcolm T, Tai G, Estable M, Sadowski I ((2002) Organization and Expression of the CYR61 Gene in Normal Human Fibroblasts, *J Biomed Sci* 9: 59-67
- 42) Liu C, Liu X-J, Crove PD, Kelner GS, Fan J, Barry G, Manu F, Ling N, De Souza EB; Maki RA (1999) Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation. *Gene* 238:471-478
- 43) Martinerie C, Viegas-Pequignot E, Guenard I, Dutrillaux B, Nguyen VC, Bernheim A, Perbal B (1992) Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene* 7:2529-2534
- 44) Masaharu Takigawa, Tooru Nakashina, Satoshi Kubota and Takashi Nishida (2003), Role of CTGF/HCS24/Endogenin in Skeletal Growth Control, *Journal of Cellular Physiology* 194:256-266 (2003)
- 45) Mc Collum EF, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG (1922) Studies on experimental rickets and experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293-312
- 46) Meloni R, Albanese V, Ravassard P, Treihou F, Mallet J. (1998) A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. *Hum Mol Gen* 1998; 7:423-428
- 47) Miyao M, Hosoi T, Inoue S et al. (1998) Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density, *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2286-2290



- 48) Muramatsu Ytsujie M, Kohda Y, Pham B, Perantoni AO, Zhao H, Jo SK, Yuen PST, Craig L, Hu XZ, Star RA, (2002). Early detection of cstein rich protein 61 (CYR61,CCN1) in urine following renal ischemic reperfusio injury, *Kidney International* 62(5): 1602-1610
- 49) O'Brien TP, Lau LF (1992) Expressiion of the growth factor-inducible immediate early gene CYR61 correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. *Cell Growth Differ* 3: 645-654
- 50) O` Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990) Expression of cyr 61, a growth factor-inducible immediate early gene. *Mol Cell Biol* 10: 3569-3577
- 51) Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV (2000). Factor VII a and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa tissue factor induced signal transduction. *J Biol Chem* 275: 14632-14641
- 52) Pendurthi UR, Mylinh Ngyuen, Patricia Andrade Gordon, Lars C: Petersen, L. Vijaya Mohan Rao (2002): Plasmin Induces CYR61 Gene Expression in Fibroblasts Via Protease-Activated Receptor-1 an p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependant Signalling Pathway, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1421-1426
- 53) Pennica D, Swannson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Guerny AL, Botstein D, Levine AJ (1998) Wisp genes are members of the connective tissue growth factor family that are upregulated in Wnt-1 transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14717-14722
- 54) Perbal B, Brigstock DR, Lau L F (2003), Report on the second international workshop on the CCN family of genes, *J Clin Pathol:Mol Pathol* 2003;56:80-85
- 55) Peters DG, KassamA, ST Jean PL, Yonas H, Ferrel RE.(1999) Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promotor as a potential risk facor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999,30:2612-2616
- 56) Ribic CM,Sargent DJ, Moore JM, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg M, Hamilton SR, Puig PL (2003), Tumor Microsatellite-Instability Staus as a Predictor if benefit from Fluoruracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer, *N Engl J Med*2003;349:247-57
- 57) Rosen CJ (1999), Serum insulin like growth factor and insulin like growth factor binding proteins: Clinical implications, *Clin Chem* 1999; 45: 1384-1390
- 58) Ryseck RP, Macdonald-Bravo H, Mattei MG, Bravo R (1991) Structure mapping and expression of fisp-12, a growth factor-inducible gene encoding a secreted cystein rich pteoin. *Cell Growth Differ* 2: 225-233
- 59) Safadi FF, Yucha DT, Kanaan RA, Healy DR, Li Y, Li M, Smock SL, Popoff SN, Owen TA (2000) The role of connective tissue growth factor (CTGF) in a fracture repair model in the rat. *J Bone Miner Res* 15: S366
- 60) Sampath D, Winneker RC, Zhang Z (2002) The angiogenic factor CYR61 is induced by the progestin R5020 and is necessary for mammary adenocarcinoma cell growth. *Endocrine* 18(2): 147-59
- 61) Sampath D, Winneker RC, Zhang Z (2001) CYR61 a Member of the CCN Family, Is required for MCF-7 Cell Proliferation: Regulation by 17b- Estradiol and Overexpression in Human Breast Cancer, *Endocrinology* 142:2540-2548 (2001)
- 62) Schober J M, L F Lau, T P Ugarova, S C T Lam (2003): Identification of a novel Integrin amb2 Binding site in CCN1(CYR61), a Matricellular Protein Expressed in Healing Wounds and Atherosclerotic Lesions, *Journal of Biological Chemistry* Volume 278,No.28.25808-25815
- 63) Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hufner M, Köhrle J, Jakob F, (1998) The human analogue of murine cysrein rich protein 16 is a 1a-25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: Regulation by cytokines, growth factors and serum. *Endocrinology* 139: 1761-1770
- 64) Schwarz DA, Barry G, Mackay KB, Manu F, Naeve GS, Vana AM, Verge G, Conlon Pj, Foster AC, Maki RA (2002) Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke, *Brain Res Mol Brain Res* 101(1-2):12-22
- 65) Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erickson RL (1998) Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1178-1182
- 66) Takacsi, Koller DL, Peacock M et al.(2001), Sibling pair linkage and association studies between bone mineral density and the IGF-I gene locus, *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4467-4471
- 67) Von der Kammer H, Demiralay C, Andresen B, Albrect C, Mayhaus M, Nitsch RM (2001) Regulation of gene expression by muscarine acetylcholine receptors. *Biochem Soc Symp* (67):131-40

- 68) Votta BJ, Lipshutz DB, Blake SM, Gowen M, Lee JC, Kumar S (2000) Connective tissue growth factor-like (CTGF-L) protein promotes an osteoblastbone formation phenotype. *J Bone Miner Res* 15: S265
- 69) Wong M, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF, (1997) Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate –early gene, regulates chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Dev Biol* 192:492-508
- 70) Ying Z und King ML (1996) Isolation and characteriaztion of xnov, *Xenopus laevis* ortholog of the chicken nov gene. *Gene* 171: 243-248
- 71) Yu H, Li BD, Smith M, Shi R, Berkel HJ, Kato I (2001), Polymorphic Carepeats in the IGF-I gene and breast cancer, *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Nov;70(2):117-22
- 72) Zhang R, Averboukh L, Zhu W, Zhang H, Jo H, Dempsay PJ, Coffey RJ, Pardee AB, Liang P (1998) Identification of rCop-1, a new member of the CCN protein family, as a negative regulator for cell transformation. *Mol Cell Biol* 187: 6131-6141

## **Danksagung**

Ich danke

In ganz besonderem Maße Herrn Priv.-Doz. Dr. Norbert Schütze für die engagierte Betreuung der Doktorarbeit und dafür immer ein offenes Ohr für meine Belange, die sich nicht nur um die Doktorarbeit herum drehten, gehabt zu haben.

Frau Jutta Müller, die mich durch alle Untiefen der Laborarbeit mit größter Gelassenheit und Freundlichkeit geleitet hat und ohne die ich sicher nicht zum Abschluß dieser Arbeit gekommen wäre.

Frau Jutta Schneidereit, die mir ebenso freundlich das Rüstzeug für die Laborarbeit übermittelte.

Herrn Olaf Pöppelmeier für die beste Zusammenarbeit während und um die Doktorarbeit herum.

Und allen weiteren Personen, die am Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beteiligt waren!!

Herzliches Dankeschön!!

# LEBENS LAUF

Holger Hans Staab

Geburtsdatum: 7. Mai 1975

Geburtsort: Aschaffenburg, Deutschland

Familienstand: ledig

## **Schulbildung:**

Von 1981 bis 1985 Besuch der Grundschule Heigenbrücken

Von 1985 bis 1994 Besuch des Hanns-Seidel Gymnasiums Hösbach, mit dem Erwerb der allgemeinen Hochschulreife, mit den Leistungskursen Deutsch und Physik.

## **Zivildienst:**

Von Juli 1994 bis Oktober 1995 Zivildienst auf der Schwerstpflegestation des Seniorenstifts St. Elisabeth in Aschaffenburg.

## **Studium:**

Von November 1995-1997 Studium der Politologie und Psychologie in Bamberg

Von Mai 1997 an Studium der Humanmedizin in Würzburg

März 1999 Ärztliche Vorprüfung,

März 2000 Erstes Medizinisches Staatsexamen

August 2002 Zweites Medizinisches Staatsexamen

November 2003 Drittes Medizinisches Staatsexamen

## **Famulaturen:**

April 1999: Urologische Klinik des Klinikums Aschaffenburg

April 2000: Psychiatrische Klinik der Universität Würzburg

Februar 2001: Anästhesiologie der Hofgartenklinik Aschaffenburg

August 2001: Innere Medizin und Neurologie an der Tribhuvan Universität Kathmandu, Nepal

Oktober 2001: Neurochirurgie im Modell Hospital in Kathmandu, Nepal

**PJ-Stationen:**

28.10.02-9.2.03 Neurologische Universitätsklinik Würzburg

9.2.03-5.4.03 Chirurgische Universitätsklinik Würzburg

7.4.03-1.6.03 Viszeralchirurgie CHU Grenoble

2.6.03-21.9.03 Medizinische Onkologie Inselspital Bern

**Arbeitsstelle:**

Seit dem 19.1.2004 Arzt im Praktikum in der Allgemein-Viszeral und Thoraxchirurgie des Julius Spitals in Würzburg

**Holger Hans Staab**