

# Untersuchungen zur molekularen Funktion des Connective Tissue Growth Factor im Trabekelwerk



## **Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der naturwissenschaftlichen Fakultät III  
-Biologie und Vorklinische Medizin-  
der Universität Regensburg

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Benjamin Junglas**  
im Mai 2010

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ernst R. Tamm

Promotionsgesuch eingereicht am 11. Mai 2010

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Wirth

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst Tamm

2. Gutachter: Prof. Dr. Anja Bosserhoff

3. Prüfer: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Connective Tissue Growth Faktor (CTGF) .....	6
<b>2 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
3.1 Materiallisten.....	11
3.1.1 Reagenzien .....	11
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3 Geräte .....	15
3.1.4 Kits .....	16
3.1.5 Puffer und Lösungen .....	16
3.1.5.1 Allgemeine Puffer .....	16
3.1.5.2 Puffer für spezifische Anwendungen .....	19
3.1.6 Gele für SDS-PAGE .....	23
3.1.7 Oligonukleotide für qPCR und PCR.....	23
3.1.8 Oligonukleotide zur Herstellung der siRNA.....	25
3.1.9 Antikörper.....	25
3.2 Zellkultur .....	26
3.2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen.....	26
3.2.2 Passagieren von Zellen und Zellzählung .....	27
3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	28
3.2.4 Etablierung von humanen Trabekelwerkzellen .....	28
3.2.5 Zellbehandlungen.....	29
3.2.6 Zellkulturbasierende Versuche .....	29
3.2.6.1 Immunzytologische Färbungen.....	29
3.2.6.2 Luciferase-Assay .....	30
3.2.6.3 Adhäsionsassay .....	31
3.2.6.4 Migrationsassay .....	32
3.2.6.5 Proliferationsassay .....	33
3.2.6.6 Kollagenkontraktionsassay.....	33
3.3 Methoden der Molekularbiologie .....	34
3.3.1 RNA-Isolation .....	34
3.3.2 Herstellung von cDNA (complementäre DNA) .....	35

3.3.3	Durchführung der quantitativen Real-Time Reverse Transcription-PCR .....	36
3.3.4	Durchführung des Northern Blots .....	38
3.3.5	Herstellung und Transfektion von CTGF siRNA und des pSiCTGF Vektors .....	41
3.3.5.1	Herstellung der CTGF-siRNA .....	41
3.3.5.2	Herstellung des pSiCTGF-Vektors.....	42
3.3.5.3	Klonierung .....	43
3.3.5.4	Transiente Transfektion der CTGF-siRNA .....	44
3.3.5.5	Stabile Transfektion des pSiCTGF-Vektors .....	45
3.4	Proteinbiochemische Methoden .....	45
3.4.1	Proteinisolation mittels RIPA-Puffer .....	45
3.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	46
3.4.2.1	BCA-Assay .....	46
3.4.2.2	Quantitatives Silbergel.....	46
3.4.3	Western Blot.....	47
3.4.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	47
3.4.3.2	Semidry-Blotting .....	48
3.4.3.3	Nachweis spezifischer Proteinbanden .....	48
3.4.3.4	Coomassiefärbung zur Ladungskontrolle.....	49
3.4.4	Silberfärbung .....	50
3.4.5	RhoA-Aktivitätsassay.....	50
3.4.6	Zymographie .....	51
3.4.7	Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem humanem CTGF.....	52
3.5	Analyse von Mäusen mit spezifischer CTGF-Überexpression in den Linsenzellen des Auges.....	54
3.5.1	Tierhaltung .....	54
3.5.2	Genotypisierung von $\beta$ B1-CTGF-Mäusen.....	54
3.5.3	Messung des intraokulären Drucks.....	55
3.5.4	CTGF-Expressionsanalyse.....	56
3.5.5	Herstellung von immunhistochemischen Präparaten .....	56
3.5.6	Färbungen von Gefrierschnitten .....	57
3.6	Anzahl der Experimente und statistische Auswertung .....	57

## **4 Ergebnisse..... 58**

4.1	Induktion der CTGF-Expression im humanen Trabekelwerk.....	58
4.2	Der Einfluss von CTGF auf die Komponenten der extrazellulären Matrix .....	61
4.2.1	Herstellung von rekombinantem CTGF.....	61

4.2.2	Der Einfluss von CTGF auf die extrazelluläre Matrix humaner Trabekelwerkzellen.....	64
4.2.3	CTGF-Silencing.....	67
4.2.4	Autoinduktion von CTGF .....	68
4.2.5	Der Einfluss von CTGF auf das extrazelluläre proteolytische System von TWZ .....	68
4.2.6	Der Einfluss von CTGF auf die Expression von Integrin-Untereinheiten in TWZ.....	71
4.3	Der Einfluss von CTGF auf Bestandteile und Regulationsmechanismen des Aktinzytoskeletts .....	73
4.3.1	Einfluss auf die Bestandteile des Aktin-Zytoskeletts .....	73
4.3.2	Einfluss auf die Regulationsmechanismen des Aktinzytoskeletts.....	76
4.4	Analyse von CTGF-Überexpressionsmäusen .....	80
4.4.1	Bestimmung der CTGF-Expression im Auge der einzelnen Linien.....	80
4.4.2	Immunhistochemische Färbungen der vorderen Augenkammer .....	82
4.4.3	Messung des intraokulären Drucks.....	83
4.5	Hemmung der CTGF-Expression im humanen Trabekelwerk.....	84
4.5.1	Allgemeine Beobachtungen.....	85
4.5.2	Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf molekularer Ebene .....	86
4.5.3	Immunhistologische Färbungen zur Untersuchung der Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf das Aktinzytoskelett .....	89
4.5.4	Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Adhäsion von Trabekelwerkzellen .....	93
4.5.5	Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Migrationsfähigkeit von Trabekelwerkzellen .....	94
4.5.6	Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Proliferationsgeschwindigkeit von Trabekelwerkzellen.....	96
4.5.7	Einfluss einer Behandlung von pSiCTGF-Zellen mit rekombinantem CTGF auf molekularer Ebene .....	96

## **5 Diskussion..... 104**

5.1	Induktion von CTGF in humanen TWZ.....	104
5.2	Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanem CTGF .....	107
5.3	Der Einfluss von CTGF auf die Synthese der extrazellulären Matrix .....	108
5.4	Der Einfluss von CTGF auf das Aktomyosinsystem humaner TWZ .....	111
5.5	CTGF-Überexpressionsmäuse .....	114
5.6	Analyse der Signalwege an HTM5 und pSiCTGF-Zellen .....	115
5.6.1	RhoA .....	117
5.6.2	Focal Adhesion Kinase (FAK).....	118
5.6.3	Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) 1/2 .....	119

<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
--------------------------------	------------

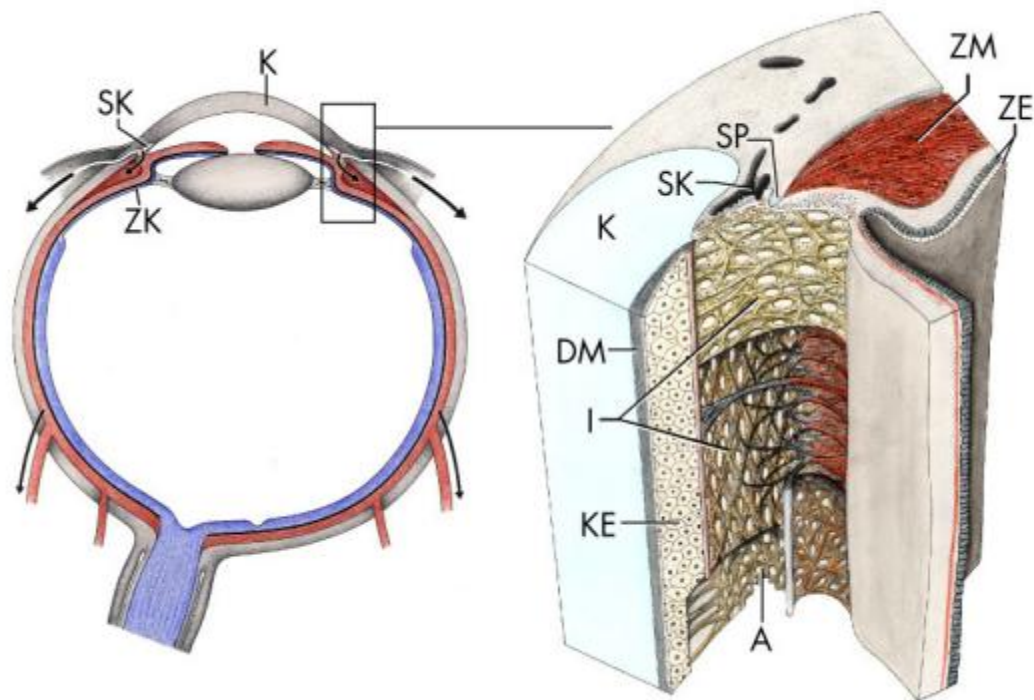
<b>7 Anhang.....</b>	<b>125</b>
----------------------	------------

7.1 Literaturverzeichnis.....	125
7.2 Abkürzungsverzeichnis .....	141
7.3 Abbildungsverzeichnis .....	143
7.4 Tabellenverzeichnis.....	145
7.5 Danksagung.....	146
7.6 Erklärung.....	148

## 1 Einleitung

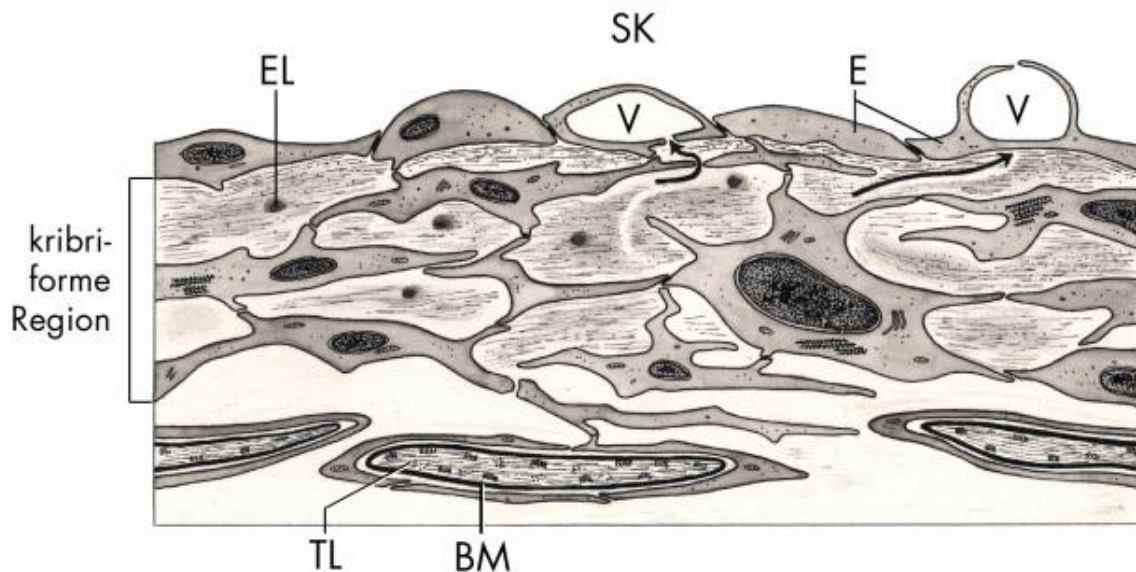
Das Glaukom, welches auch gemeinhin als grüner Star bezeichnet wird, ist weltweit eine der Hauptursachen für irreversible Erblindungen (Quigley 1996). Die Gruppe der Glaukome ist durch eine Optikusneuropathie charakterisiert, die ohne medizinische Behandlung zum Verlust von Axonen im *Nervus opticus* und schließlich zum Untergang von retinalen Ganglienzellen (Foster *et al.* 2002) führt. Die häufigste Form der Glaukomerkrankungen stellt das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) dar. Etwa 1 – 2 % der westlichen Bevölkerung über 40 Jahren sind von dieser Erkrankung betroffen (Tuck und Crick 1998). Bislang konnte in prospektiven, randomisierten Multizenterstudien als einziger pathogenetischer Risikofaktor ein erhöhter Augeninnen- bzw. intraokulärer Druck (IOD) identifiziert werden (1998; 1998; TheAGISInvestigators 2000; Gordon *et al.* 2002; Leske *et al.* 2003). Der IOD eines gesunden Menschen beträgt normalerweise zwischen 10 und 21 mmHg. Beim POWG kann dieser Druck auf über 21 mmHg ansteigen, wobei besonders ältere Menschen betroffen sind. Die Regulation des IOD wird durch das Kammerwasser (KW)-Zirkulationssystem bestimmt. Ein physiologischer IOD ist nötig, um das Auge in seiner Form zu stabilisieren. Die Funktion des KW besteht in der Ernährung der bradytrophen Gewebe des vorderen Augenabschnittes. Hierbei handelt es sich um Linse, Kornea und Trabekelwerk (TW), die nicht durchblutet sind und dadurch über Diffusion vom KW versorgt werden müssen. Das KW wird von den Epithelzellen des Ziliarkörpers in die hintere Augenkammer sezerniert und fließt durch die Pupillenöffnung in die vordere Augenkammer. Von dort gelangt das KW in den sogenannten Kammerwinkel, der von Iris und Kornea eingefasst wird und fließt hier durch ein Maschenwerk aus Zellen und Bindegewebe, dem TW, und mündet in den Schlemmkanal (SK), der mit dem intra- und episkleralen Venensystem verbunden ist (Abb. 1). Neben diesem trabekulärem Abfluss wird zudem ein zweiter Abflussweg beschrieben, der sogenannte uveosklerale Abfluss, der jedoch nur etwa 10 – 15 % des gesamten Kammerwasserabflusses ausmacht (Grehn 2008; Kanski und Burk 2008). Die trabekulären Abflusswege setzen dem Kammerwasserabfluss einen Widerstand entgegen, der zum Aufbau des IOD führt.





**Abb. 1:** Schematische Darstellung des TW und des Kammerwasserabflusssystems des menschlichen Auges; Schlemm Kanal (SK), verlaufend im Limbusbereich zwischen Kornea (K) und Sklera. A = Äußere nicht lamelläre kribriiforme Region, die mit der Innenwand des SK verbunden ist; DM = Descemet Membran; I = Inneres uveales und korneosklerales trabekuläres Maschenwerk; KE = Korneaendothel; SP = Skleralsporn; ZE = Ziliarepithel; ZK = Ziliarkörper; ZM = Ziliarmuskel. (Lütjen-Drecoll und Rohen 2001).

Bei der Gliederung des TW soll hier der Einteilung von Lütjen-Drecoll und Rohen gefolgt werden. So lässt sich das TW in einen inneren und einen äußeren Abschnitt unterteilen. Während der innere oder uveale (bzw. korneosklerale) Teil, den das Kammerwasser im Kammerwinkel zuerst passieren muss, aus mit Zellen bedeckten Bindegewebslamellen (daher der Name Trabekelwerk) aufgebaut ist, zeigt sich der äußere oder juxtakanalikuläre (bzw. kribriiforme) Teil, der dem Schlemmkanalendothel benachbart ist, im Aufbau eher als lockeres Bindegewebe (Lütjen-Drecoll und Rohen 2001). Zusammen mit dem Endothel des SK bildet das juxtakanalikuläre TW die sogenannte Innenwandregion („inner wall region“) (Johnson 2006) (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Innenwand des Schlemm Kanals (SK) und der angrenzenden kribri-formen Region. Das Innenwandendothel bildet stellenweise große Vakuolen (V) aus. An diesen Stellen ist die Basalmembran (BM) des Endothels (E) unterbrochen und das Endothel stattdessen mit optisch leeren Straßen der kribri-formen Region in Kontakt (Pfeile). Die Zellen der kribri-formen Region sind miteinander, mit dem Innenwandendothel und mit dem Endothel der Trabekellamellen (TL) verbunden. Zwischen den Zellen ist ein elastisches Netz (EL) aufgespannt, das in einer extrazellulären Matrix eingebettet ist. (Lütjen-Drecoll und Rohen 2001).

Der physiologische Abflusswiderstand wird nach weitestgehender Übereinstimmung in dieser Innenwandregion aufgebaut. (Ethier 2002; Johnson 2006). Während das KW in den beiden Trabekelwerkregionen zwischen den Zellen durch die lediglich mit extrazellulärer Matrix (EZM) gefüllten Zwischenräume fließen kann, wird die Passage durch das Schlemmkanalendothel durch Poren von 0,1 bis 3  $\mu\text{m}$  Durchmesser in den Zellen selbst und zwischen den Zellen ermöglicht (Johnson 2006). Berechnungen zeigten jedoch, dass die Summe der Widerstände von uvealem und juxta-kanalikulärem TW sowie des Schlemmkanalendothels nicht ausreichen würde, einen ausreichend hohen IOD aufzubauen, wie er experimentell gemessen wird. Abhilfe schafft hier das sogenannte „funneling“-Modell (Kamineffektmodell) von Overby et al., welches die Verwirbelungen des KW durch das TW mit einbezieht und somit in einem synergistischen Modell annähernd die Diskrepanz zwischen gemessenem und berechnetem Widerstand zu erklären vermag (Overby et al. 2009).

Die Fragen, nach der Regulation des Abflusswiderstandes sowie nach der Ursache seines Anstiegs bei Patienten mit POWG, sind jedoch nicht abschließend geklärt. In den Focus der Untersuchungen rückte hier hauptsächlich die Trabekelwerkregion, da

hier die Größe der Durchflussöffnungen für das KW auf physiologischem Wege reguliert werden kann.

Zum einen ist es durch eine Kontraktion des Ziliarmuskels möglich, die Abflusswege des TW zu erweitern, was die Kammerwasserabflussrate erhöht (Gong *et al.* 1996). Jedoch bereits 1988 konnten in Trabekelwerkzellen (TWZ) glattmuskuläre Elemente nachgewiesen werden (Iwamoto und Tamura 1988), was die Vermutung nahelegte, dass auch das TW für sich durch Veränderungen im Zytoskelett aktiv den Abflusswiderstand zu regulieren vermag. In einem bovinen Perfusionsmodell des vorderen Augenabschnittes konnte gezeigt werden, dass durch Kontraktion des TW unter anderem mittels Carbachol und Endothelin eine Erhöhung des Abflusswiderstandes bewirkt werden kann. Um Verfälschungen durch Kontraktionen des Ziliarmuskels zu vermeiden, wurden die Vorderkammern vor dem Versuch von dem selbigen befreit (Wiederholt *et al.* 1995). Entgegengesetzt führten verschiedene kontraktionshemmende Substanzen in Experimenten zu einer Relaxation isolierter Trabekelwerkstreifen und konnten auch in Organkultur mit isolierten vorderen Augenkammern eine Erniedrigung des Abflusswiderstandes erzielen (Wiederholt 1998). Hier sind vor allem das Zytoskelett-depolymerisierende Latrunculin sowie der Serin-Threonin-Kinase-Inhibitor H-7 zu nennen. Latrunculine (Latrunculin A und B) binden an G-Aktin und verhindern damit die Polymerisierung des Aktins, was durch die Dynamik des Aktinzytoskeletts unweigerlich zu einem Abbau von Aktinfasern führt. H-7 bewirkt eine Inhibition von diversen Proteinkinasen, unter anderem der Myosin Light Chain Kinase und der Rho-Kinase. Beide Substanzen führten *in vitro* zu einer Störung des Aktinzytoskeletts in TWZ (Epstein *et al.* 1999; Cai *et al.* 2000), zu einer Erhöhung der Kammerwasserabflussrate in Organkultur mit Schweine- und Menschaugen (Bahler *et al.* 2004) (Epstein *et al.* 1999; Ethier *et al.* 2006; Hu *et al.* 2006) und zu einer vom Ziliarmuskel unabhängigen Senkung des IOD in behandelten Affen Augen *in vivo* (Tian *et al.* 1999; Peterson *et al.* 2000; Okka *et al.* 2004).

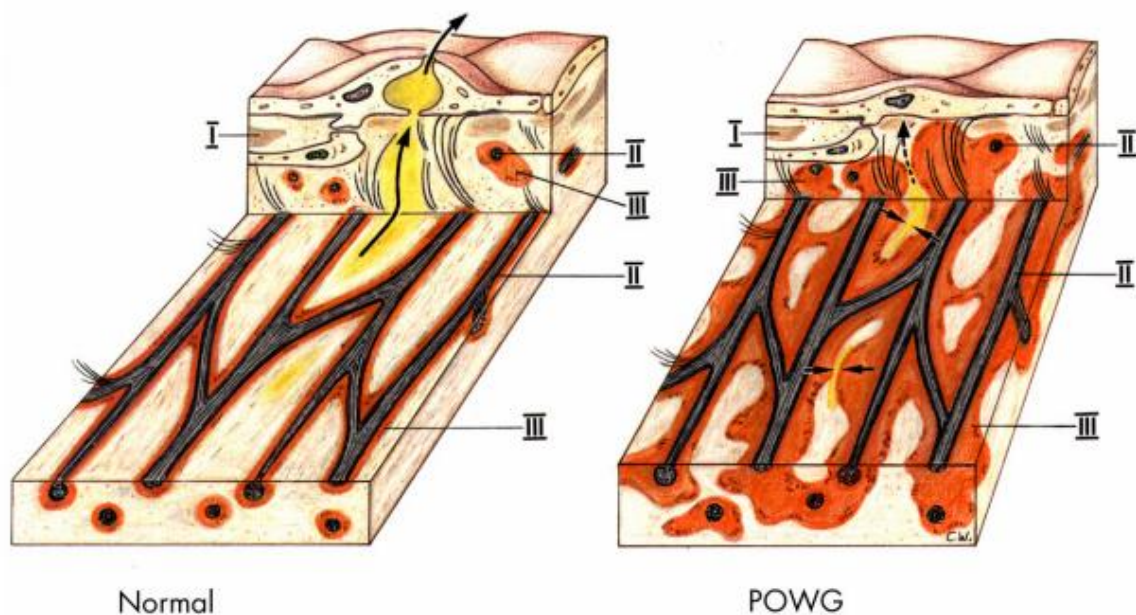
Sucht man in diesem Zusammenhang nach Faktoren, die eine Kontraktion des TW in glaukomatösen Augen bedingen, findet man neben Endothelin den Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$ -Behandlung führt in vielen Zelltypen zu einer Aktivierung der kleinen GTPase RhoA, welche über die Rho-abhängige Kinase (ROCK) sowie über die Myosin light chain Kinase (MLCK) zur Ausbildung von

Aktin-Stressfasern und damit zu einer Kontraktion der Zellen führen kann. Bovine TWZ zeigten nach Behandlung mit TGF- $\beta$  eine von RhoA abhängige, gesteigerte Kontraktion sowie eine Zunahme an Aktin-Stressfasern (Nakamura *et al.* 2002). TGF- $\beta$ 2 ist auch im KW vorhanden und ist bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten mit POWG in seiner Konzentration deutlich erhöht (Tripathi *et al.* 1994; Picht *et al.* 2001).

Neben chemischen Faktoren konnte zudem an humanen TWZ *in vitro* gezeigt werden, dass auch mechanischer Stress in der Lage ist, eine von RhoA abhängige Kontraktion zu verursachen und damit dem Durchfluss einen höheren Widerstand entgegen zu setzen (Ramos *et al.* 2009).

Neben der Regulation des Abflusswiderstandes über eine Kontraktion bzw. Relaxierung der TWZ, wird die Menge und Zusammensetzung der EZM im Bereich der Innenwandregion als möglicher Faktor zur Regulation des Abflusswiderstands diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Vielzahl von Patienten mit POWG der Anteil an EZM, unter anderem an fibrillären Kollagenen (Rohen *et al.* 1993; Lütjen-Drecoll und Rohen 2001) sowie an Fibronektin (FN), einem der Hauptbestandteile der EZM im TW (Babizhayev und Brodskaya 1989), im Bereich des juxtakanalikulären Maschenwerks erhöht ist. Umgekehrt konnte durch Perfusion von menschlichen Augen in Organkultur mit Metalloproteinasen eine deutliche Senkung des trabekulären Widerstands beobachtet werden (Bradley *et al.* 1998). Zusätzlich zeigt sich eine Anhäufung von extrazellulärem Material, welches als „Plaquematerial“ bezeichnet wird und fibrilläre Strukturen umfasst, die in verschiedene Glykosaminoglykane eingebettet sind (Lütjen-Drecoll *et al.* 1986). Das Plaquematerial entsteht durch die Verdickung der Hüllen der elastischen Fasern im juxtakanalikulären Maschenwerk (Abb. 3). Obwohl die molekulare Natur des Plaquematerials bislang unbekannt ist, konnte doch ein Zusammenhang zwischen dessen Vermehrung und dem Ausmaß des axonalen Schadens hergestellt werden (Gottanka *et al.* 1997). Diese Korrelation sowie die Beobachtung von vermehrter Kollagenablagerung implizieren einen Einfluss der Menge an extrazellulärem Material auf die Pathogenese des POWG. Als Faktor, der diese pathologischen Veränderungen auf molekularer Ebene zu regulieren vermag, wird wiederum TGF- $\beta$ 2 gehandelt. Neben seinem Einfluss auf die Gestalt des Aktomyosinsystems ist TGF- $\beta$ 2 zudem an einer ganzen Reihe von fibrotischen Erkrankungen des gesamten Organismus beteiligt. In

Versuchen mit TWZ konnte TGF- $\beta$ 2 *in vitro* die Expression an FN erhöhen (Welge-Lüssen *et al.* 2000) und umgekehrt den Abbau der EZM über eine Regulation des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) inhibieren (Fuchshofer *et al.* 2003). Diese Befunde sowie das vermehrte Vorkommen von TGF- $\beta$ 2 im KW von POWG-Patienten weisen auf eine Schlüsselrolle von TGF- $\beta$ 2 bei der Pathogenese des POWG hin.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des kribriformen elastischen Netzes und seiner Veränderung beim POWG. I = Amorphes Material; II = Kern einer elastischen Faser; III = Hülle der elastischen Fasern. Der Verlauf der Fasern ist als Tangentialschnitt parallel zur Innenwand des Schlemmkanals (SK) und als Sagittalschnitt dargestellt. Sagittalschnitte durch die elastischen Fasern werden als SD-Plaques bezeichnet. Man beachte, dass die Flächen der SD-Plaques bei POWG durch Verbreiterung der Hüllen signifikant zunehmen und dadurch die Strömungswege eingeengt sind. Pfeile = Strömungswege durch die kribriforme Region zur Innenwand des SK (Lütjen-Drecoll und Rohen 2001).

## 1.1 Der Connective Tissue Growth Faktor (CTGF)

Ein Faktor, der als sogenannter Downstream-Mediator von TGF- $\beta$  sowie als Vermittler seiner fibrotischen Effekte gehandelt wird, ist der Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Die Promotorregion von CTGF besitzt ein TGF- $\beta$ -Response Element, welches durch TGF- $\beta$  über die Smad-Proteine aktiviert werden kann (Holmes *et al.* 2001; Bartholin *et al.* 2007). Daneben wird eine Induktion über den RhoA/ROCK-Signalweg diskutiert (Heusinger-Ribeiro *et al.* 2001). So konnte unter anderem an humanen Astrozyten des Optikuskopfes *in vitro* gezeigt werden, dass CTGF die FN-induzierende Eigenschaft von TGF- $\beta$ 2 vermittelt (Fuchshofer *et al.* 2005). CTGF ist zudem ein Faktor, der für die Pathogenese von fibrotischen

Veränderungen verschiedener Organe diskutiert wird (Ito *et al.* 1998; Sato *et al.* 2000; di Mola *et al.* 2004; Cicha *et al.* 2005; Yamamoto *et al.* 2005). Das parallele Vorkommen von TGF- $\beta$  und CTGF bei diesen pathologischen Veränderungen führte zu der Vermutung, dass generell die fibrosierende Wirkung von TGF $\beta$ 2 über CTGF vermittelt werden könnte (Ihn 2002; Leask und Abraham 2004).

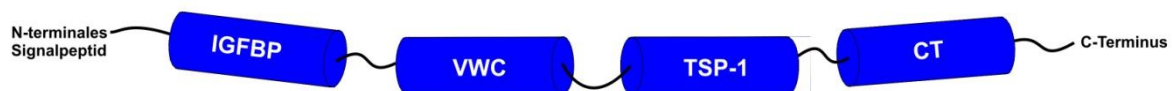
CTGF-orthologe Gene wurden erstmals 1988 nach einem cDNA-Screening von Serum-stimulierten NIH3T3-Zellen („fibroblast-inducible secreted protein“; fisp-12) (Almendral *et al.* 1988) sowie 1991 von TGF- $\beta$ 2-behandelten Maus-AKR-2B-Zellen (b1G-M2) beschrieben (Brunner *et al.* 1991). Ebenfalls 1991 wurde das humane CTGF erstmalig von Bradham *et al.* beschrieben (Bradham *et al.* 1991). CTGF gehört zur Familie der CCN-Proteine, einer Gruppe, welche erst in den letzten Jahren vermehrt zum Gegenstand der Forschung wurde. Der Name CCN ergibt sich aus den Anfangsbuchstaben der ersten bekannten Mitglieder dieser Familie: Cyr61 (CCN1), CTGF (CCN2) und NOV (CCN3). Weitere Mitglieder sind die WNT-induced secreted proteins, WISP 1-3 (CCN4-6) (Bork 1993). CCN-Proteine sind glykosylierte und sezernierte, mit der EZM assoziierte Proteine, welche an einer Vielzahl zellulärer Vorgänge beteiligt sind. Hierzu zählen unter anderem die Regulation von Migration (Igarashi *et al.* 1993), Adhäsion (Kireeva *et al.* 1997; Babic *et al.* 1999), Produktion der EZM (Frazier *et al.* 1996), des Zellzyklus (Bradham *et al.* 1991) sowie der Differenzierung und Wundheilung.

CTGF selbst ist ein Protein aus 349 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von 38 bis 42 kDa. Die Schwankungen der Bandenhöhe im Western Blot resultieren aus unterschiedlichen Glykosylierungsgraden des Proteins (Yang *et al.* 1998). CTGF lässt sich unterteilen in ein C-terminales Signalpeptid (AS 1 - 26), welches für Ausschleusung von CTGF über den sekretorischen Weg verantwortlich ist, und in vier konservierte, homologe Domänen, denen jeweils einzelne Exons auf Genebene zuzuordnen sind:

1. Insulin-like growth factor -bindende Domäne (IGFBP; AS 27 – 97)
2. von-Willebrand Typ 1C repeat Domäne (VWC; AS 101 - 167)
3. Thrombospondin Typ 1 Domäne (TSP-1; AS 199 - 243)
4. Cystein-reiche Domäne (CT; AS 256 - 330)



Sechs der insgesamt zehn Cysteinreste der CT-Domäne sind an der Ausbildung der sogenannten Cystein-Knot-Struktur beteiligt (Bork 1993), die bei allen CCN-Proteinen mit Ausnahme von WISP-3 (hier fehlen vier Cysteinreste in der VWC-Domäne; (Pennica *et al.* 1998) charakteristisch ist. Durch die Verknüpfung der unterschiedlichen Domänen entsteht ein multifunktionales Protein, welches mit verschiedensten extrazellulären sowie membranständigen Molekülen interagieren kann (Abb. 4). Neben dem vollständigen Protein wurden zudem 10 und 20 kDa große, biologisch aktive C-terminale Fragmente beschrieben (Ball *et al.* 1998; Ball *et al.* 2003).



**Abb. 4:** Schema der CTGF Domänen; IGFB = Insulin-like growth factor -bindende Domäne; VWC = von-Willebrand Typ 1C Domäne; TSP-1 = Thrombospondin Typ 1 Domäne; CT = Cystein-reiche Domäne

Die zahlreichen Erkenntnisse über die Struktur und die Funktionen von CTGF, die bis heute ermittelt wurden, konnten allerdings bis heute nicht zur vollständigen Klärung beitragen, über welchen Signalweg diese Funktionen vermittelt werden. Durch die Bindung von diversen extrazellulären und membranständigen Proteinen ist CTGF unter anderem dazu in der Lage deren Funktionen zu beeinflussen. Daneben wurden auch einige direkte Interaktionen von CTGF mit membranständigen Rezeptoren beschrieben. So ist CTGF in der Lage an die Integrine  $\alpha V\beta 3$  (Babic *et al.* 1999),  $\alpha_{IIb}\beta 3$  (Jedsadayanmata *et al.* 1999),  $\alpha 5\beta 1$  (Gao und Brigstock 2005) und  $\alpha 6\beta 1$  (Heng *et al.* 2006) zu binden. Diese Transmembranproteine verbinden die EZM mit dem Aktinzytoskelett der Zellen und sind in der Lage sowohl chemische als auch mechanische Signale mittels Adaptermolekülen wie die Integrin-linked Kinase (ILK) oder die Focal Adhesion Kinase (FAK) weiterzuleiten. Diese Bindung erfolgt jedoch nicht über eine für Integrin-bindende Proteine wie etwa FN typische RGD-Sequenz sondern über eine 16 AS lange Sequenz in der CT-Domäne (Gao und Brigstock 2004). Weitere potentielle Rezeptoren sind der Korezeptor des WNT-Signalweges Lipoprotein receptor related protein 6 (LRP6) (Mercurio *et al.* 2004), der Neurotrophic Tyrosin Kinase Rezeptor (TrkA/NTKR) (Wahab *et al.* 2005) sowie das Low density

lipoprotein receptor related protein (LRP) (Segarini *et al.* 2001). Letzteres ist dabei allerdings eher für die Internalisierung und den Abbau des Proteins zuständig als für die Transduktion von Signalen. Aus dieser Menge an potentiellen Rezeptoren ergeben sich eine ganze Reihe von Signalwegen, welche die Funktionen von CTGF vermitteln können. Die Bindung an LRP6 lässt auf eine Verbindung zum  $\beta$ -Catenin-Signalweg schließen. Zudem wurden der MAP-Kinase- (ERK1/2)-Signalweg (Chen *et al.* 2004) oder die Transduktion über Integrine, c-Src und FAK mit CTGF in Verbindung gebracht.

Neben den zahlreichen Signalwegen, die CTGF für die Vermittlung der ihm zugeschriebenen Wirkungen zur Verfügung stehen, wird die Expression von CTGF ebenfalls durch eine ganze Reihe von Signalen reguliert. Zu nennen sind hier neben dem bereits erwähnten TGF- $\beta$  (Brunner *et al.* 1991; Igarashi *et al.* 1993; Grotendorst 1997) unter anderem der Hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  (Higgins *et al.* 2004; Fuchshofer *et al.* 2009), Sauerstoffradikale (Park *et al.* 2001), sowie Endothelin-1 (Shi-Wen *et al.* 2004), Angiotensin II (Iwanciw *et al.* 2003) und mechanischer Stress (Chaqour *et al.* 2006). Vor allem den letzten dreien kommt im Zusammenhang mit der Pathogenese des POWG besondere Bedeutung zu, da die Induktion über eine Beeinflussung der kleinen GTPase RhoA und damit des Aktinzytoskeletts verursacht wird. So konnte insbesondere an Endothelzellen gezeigt werden, dass eine hohe CTGF-Expression von einem intakten Aktinzytoskelett bzw. genauer von einem niedrigen G-Aktin-Level abhängig ist. Eine Inhibition der Aktinfaserpolymerisation mittels Latrunculin sowie eine Inhibition des RhoA-Signalwegs führte in diesen Studien zu einem Absinken der CTGF-Expression (Ott *et al.* 2003). Nachdem CTGF häufig als Downstream-Mediator der fibrotischen Effekte von TGF- $\beta$  wie auch von Angiotensin II (Ruperez *et al.* 2003) betrachtet wird, und nachdem diese beiden Faktoren wie auch Endothelin-1, als CTGF-induzierende Faktoren auch das Aktinzytoskelett beeinflussen, verwundert es, dass bisher noch keine Untersuchungen zur Wirkung von CTGF auf das Aktinzytoskelett bekannt wurden.

Auch im Auge sind die Informationen über das Vorkommen und die Wirkung von CTGF beschränkt. CTGF wurde zum einen im KW detektiert (van Setten *et al.* 2002) und vor kurzem konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit Pseudoexfoliationsglaukom erhöht ist (Ho *et al.* 2005), was zusammen mit den bisherigen Erkenntnissen auf eine relevante Rolle bei der Pathogenese des POWG hinweist.



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen lassen vermuten, dass CTGF aufgrund seiner multiplen Eigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des POWG einnimmt. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte die Funktion von CTGF im humanen Trabekelwerk untersucht werden.

Zuerst sollte analysiert werden, welche Glaukom-relevanten Signalmoleküle die Expression von CTGF im Trabekelwerk induzieren können. Anschließend sollte CTGF in einem eukaryotischen System rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden, um mittels von *in vitro* Versuchen den Einfluss von CTGF auf humane Trabekelwerkzellen zu analysieren. Die hier erhobenen Daten sowie resultierende Auswirkungen sollten in einem *in vivo* Modell weiter untersucht werden.

Abschließendes Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen einer Inhibition der CTGF-Expression auf die Physiologie von Trabekelwerkzellen zu untersuchen.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Die Untersuchung von möglichen Aktivatoren der CTGF-Expression in Trabekelwerkzellen *in vitro*.
2. Die Aufreinigung von rekombinant hergestelltem CTGF.
3. Die Untersuchung der Auswirkungen einer CTGF-Behandlung auf die extrazelluläre Matrix von Trabekelwerkzellen *in vitro*.
4. Die Untersuchung der Auswirkungen einer CTGF-Behandlung auf das Aktinzytoskelett von Trabekelwerkzellen *in vitro*.
5. Die Untersuchung einer Augen-spezifischen CTGF-Überexpression *in vivo*.
6. Die Analyse der Effekte einer CTGF-Inhibition auf die Physiologie von Trabekelwerkzellen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materiallisten

##### 3.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
1,4-p-phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
10 x PCR-Puffer	Bioline, Luckenwalde
96-Well qPCR Plate	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Aceton	Merck, Darmstadt
Adhesive PCR Seal	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Angiotensin II Actetat, human	Sigma, Taufkirchen
ATP, 2Na (Adenosin 5'-Triphosphat, Disodium)	Merck, Darmstadt
BCA Assay Reagenz A+B	Interchim, Montlucon Cedex, Frankreich
Borat (Natrums-tetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Brij 35	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Casyton	Roche/Innovatis, Bielefeld
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CoA (Coenzym A Trilithium Salz)	AppliChem, Darmstadt
Coomassie® Brillantblau R250	Sigma, Taufkirchen
DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DCTA (trans-1,2-Diamino Cyclohexantetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
DEPC Diethyl Pyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
Dig Easy Hyb	Roche, Mannheim
DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
D-Luciferin	p.j.k., Kleinblittersdorf
DMEM + Glutamax II	PAA, Pasching, Österreich
DMEM Pulver	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
DNA-Standards	New England Biolabs, Frankfurt
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
DTT (DL-Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen

EDTA	Roth, Karlsruhe
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Endothelin 1, human-porcine	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
F-10 HAM	PAA, Pasching, Österreich
Fetal Bovine Serum	Invitrogen, Karlsruhe
Fibronektin	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Fluorescein	BioRad, München
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd, 37 %	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Geneticinsulfat G418	Roth, Karlsruhe
Gentamycin (5 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd, 25 % in Wasser	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin-Agarose (aqueous ethanol solution)	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
IGF	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore, Billerica, USA
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kollagen-I (rat tail)-Lösung	BD Bioscience, San Jose, USA
Kollagen-IV-Lösung	Chemicon/Millipore, Billerica, USA
Laminin	Southern Biotech, Birmingham, USA
Latrunculin A	Sigma, Taufkirchen
LB Broth Ultrapure	Usb Corporation, Cleveland, USA
Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesium-Carbonat Hydroxid (x 5 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulphat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Roth, Karlsruhe

Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumacetat (Na(CH <sub>3</sub> COO))	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Natrium-L-Glutamat	AppliChem, Darmstadt
Natriumthiosulfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O)	Sigma, Taufkirchen
Nitrocellulosemembran	Roche, Mannheim
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen
Oligonukleotide	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Phosphatase-Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Mix M	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
pSilencer™ 4.1-CMV hygro	Ambion, Austin, USA
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Roti®-Free Stripping-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
SDS (Sodium Dodecyl Sulphat)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tergitol	Sigma, Taufkirchen
TGF-β2	Roche, Mannheim
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tricin	Merck, Darmstadt
Tris Ultrapure, MB Grade	USB Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,05 %)	Invitrogen, Karlsruhe

Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Tab. 1: Liste der verwendeten Reagenzien

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
35 mm Zellkulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Durapore Membrane Filters	Millipore, Billerica, USA
Flaschen für FibraStage	New Brunswick, Edison, USA
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
HisTrap FF crude column; 5 ml	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
HiTrap Heparin HP column; 5 ml	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten	Schott, Mainz
Mikrohomogenisator	Roth, Karlsruhe
Multi-Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Cups	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Rundfiltermembran; 0,45 µm	Millipore, Billerica, USA
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Rundboden-Röhrchen für Auto Lumat, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spectra Pov7 Dialyseschlauch MWCO 25000	Spectrum Medical Industries, Houston, USA
TripleFlasks	Nunc, Roskilde, Dänemark
Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Papier	Sartorius, Göttingen
Zellkulturobjektträger	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber (Cell Scraper)	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
34-Gauge-Nadel	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Aida Advanced Image Data Analyzer 4.06	Raytest, Straubenhardt
Äktaprime	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Auto Lumat LB953	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Axio Imager.Z1 mit Apotome	Zeiss, Göttingen
Axiovision 4.7	Zeiss, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Casy-Zellzähler	Roche/Innovatis, Bielefeld
Crosslinker	Stratagene, Cedar Creek, USA
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
ELISA-Reader	Tecan, Mainz
FibraStage	New Brunswick, Edison, USA
Hamilton-Spritze, 25 µl	Roth, Karlsruhe
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
HeraSafe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Horizontale Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Hybridisierungssofen HB-1000 Hybridizer	UVP Laboratory Products, Cambridge, UK
Innova 4200 Inkubator	New Brunswick, Edison, USA
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
inverses Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Göttingen
IQ5 Real-time PCR Detection System & iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Kryo Einfriergerät	Nunc, Roskilde, Dänemark
LAS 3000	Fujifilm, Düsseldorf
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International, Walldorf
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
NanoDrop; ND-2000c	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue™ Doppelgelsystem-Apparatur	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
PerfectBlue™ Semi-Dry Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

TonoLab Tonometer	Tiolat, Helsinki, Finnland
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

**Tab. 3:** Liste der verwendeten Geräte

### 3.1.4 Kits

Kits	Bezugsquelle
BrdU-Cell-Proliferation-ELISA (colorimetric)	Roche, Mannheim
HotStarTaq Kit	Qiagen, Hilden
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Rho Activity Assay Kit	Millipore, Billerica, USA
siRNA Silencer Kit	Ambion, Austin, USA
pSilencer™ 4.1-CMV hygro Construction Kit	Ambion, Austin, USA
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren

**Tab. 4:** Liste der verwendeten Kits

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

#### 3.1.5.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Agarosegel	
Agarose	1 g
1 x TBE	100 ml
Ethidiumbromid	5 µl

Auftragspuffer für Agarosegel, 4x	
Bromphenolblau	0,25 % ( w/v )
Xylencyanol FF	0,25 % ( w/v )
Ficoll	15 % ( w/v )

Beschichtungspuffer	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,05 M
NaHCO <sub>3</sub>	0,05 M
in H <sub>2</sub> O dest.	

Coomassie-Färbelösung	
Methanol	40 ml
Essigsäure	2 ml
Coomassie-Brilliant Blue R250	0,2 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 100 ml	

Coomassie-Entfärbelösung	
Methanol	500 ml
Essigsäure	10 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

Einfriermedium	
DMSO	5 ml
100 %-iges FBS	10 ml
DMEM 4500	35 ml

10 x Elektrodenpuffer	
Tris/HCl	250 mM
Glycin	400 mM
SDS	1 % (w/v)
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

4 % FA (Formaldehyd)	
PFA	4 g
Phosphatpuffer	100 ml
unter Rühren und Erwärmen lösen; pH 7,4	

LB-Agar	
LB Broth Ultrapure	20 g
Agar	15 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

LB-Medium	
LB Broth Ultrapure	20 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	



<b>Phosphatpuffer (PhP) 0,1 M</b>	
P1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	35,6 g auf 2 l
P2: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1H <sub>2</sub> O	13,8 g auf 1 l
P1:P2 = 5:1; pH 7,4	

<b>Proteinase K Lysepuffer</b>	
KCl	50 mM
Tris HCl (pH 8,3)	10mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
Gelatine	0,1mg/ml
Nonidet P-40	0,45 % (v/v)
Tween 20	0,45 % (v/v)
Kurz vor Gebrauch für 1 ml: 50 µl Proteinase K (20 mg/ml)	

<b>RIPA - Puffer</b>	
NaCl	150 mM
Tergitol	1 % (v/v)
Deoxycholsäure	0,5 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Tris (pH 8,0)	50 mM

<b>SDS-Lösung, 10 % (w/v)</b>	
SDS	10 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 100 ml	

<b>SDS-PAGE-Laufpuffer, 10x</b>	
Tris/HCl	250 mM
Glycin	400 mM
SDS	1 % (w/v)
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>SDS-PAGE Probenpuffer, 4x</b>	
Tris/HCl, pH 6,8	0,25 M
Glycerin	30 % (v/v)
SDS	8 % (w/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

<b>TBE, 10x</b>	
Tris	108 g
Borat	55 g
EDTA (0,5 M), pH 8,0	40 ml
in H <sub>2</sub> O dest. lösen, ad 1 l	

<b>TBS, 10x, pH 7,4</b>	
Tris/HCl	30 g
NaCl	80 g
KCl	2 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>TBS-T, 1x</b>	
10 x TBS	100 ml
Tween 20	0,05 % (v/v)
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>10x Transferpuffer</b>	
Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
Methanol	200 ml
SDS, 10 % (w/v)	3,7 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8</b>	
Tris	121,14 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l; pH einstellen	

<b>Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8</b>	
Tris	181,71 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l; pH einstellen	

**Tab. 5:** Liste der allgemein verwendeten Puffer und Lösungen

### 3.1.5.2 Puffer für spezifische Anwendungen

<b>Puffer für CTGF-Affinitätschromatographie</b>	
<b>Heparin-Waschpuffer</b>	
NaCl	0,3 M
Tris/HCl	10 mM
pH 7,2	
<b>Heparin-Elutionspuffer</b>	
NaCl	2 M
Tris/HCl	10 mM
pH 7,2	

<b>Nickel-NTA-Waschpuffer</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 M
NaCl	15 mM
pH 8,0	
<b>Nickel-NTA-Elutionspuffer</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 M
NaCl	15 mM
Imidazol	250 mM
pH 8,0	

<b>Puffer für Luciferase-Assay</b>	
<b>Lysepuffer</b>	
Tris-HCl	25 mM
DTT	4 mM
DCTA	3,5 mM
Triton-X-100	1 % (v/v)
Glycerin	10 % (v/v)
pH 7,8	
<b>Assaypuffer</b>	
Tricin	20 mM
Mg-Carbonat Hydroxid (x 5H <sub>2</sub> O)	1,07 mM
EDTA	0,1 mM
MgSO <sub>4</sub>	2,67 mM
DTT	33 mM
pH 7,8 - 8,0	
Kurz vor der Messung zugeben:	
CoA	300 µM
ATP	500 µM
D-Luciferin	500 µM

<b>Puffer für Northern Blot</b>	
<b>Northern Blot Agarosegel</b>	
Agarose	1,50g
DEPC-H <sub>2</sub> O	109,5 ml
10 x MOPS	15,0 ml
aufkochen, auf 50 °C abkühlen	
Formaldehyd	25,5 ml

<b>Northern Blot Samplebuffer</b>	
DEPC-H <sub>2</sub> O	110µl
10 x MOPS	50µl
Formaldehyd	90µl
Formamid	250µl
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	
Diethyl Pyrocarbonat	0,1 % (1 ml)
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
ü. N. 37 °C	
autoklavieren	
<b>10 x MOPS-Puffer</b>	
MOPS	41,9 g
Na-Acetat	4,1 g
Na 2 EDTA	4,45 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
pH 7,0	
<b>Methylenblaufärbelösung</b>	
500mM Na-Acetat	41 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
pH 5.2	
0,04 % Methylenblau	400 mg
<b>20 x SSC</b>	
NaCl	350,6 g
Na-Citrat	176,4 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 2 l	
pH 7,0	
<b>Northern-Waschpuffer</b>	
0,1 M Maleinsäure	23,22 g
0,15 M NaCl	17,52 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 2 l	
pH 7,5	
Tween 20	6 ml

<b>Lösungen für Silberfärbung</b>	
<b>Fixierlösung I</b>	
Ethanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>Fixierlösung II</b>	
Ethanol	300 ml
Natriumacetat	68 g
Natriumthiosulfat	2 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
vor Gebrauch (pro 100 ml) + 0,5 ml Glutaraldehyd	
<b>Silberlösung</b>	
Silbernitrat	2,5 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
vor Gebrauch (pro 100 ml) + 40 µl 37 % Formaldehyd	
<b>Entwicklungslösung</b>	
Natriumcarbonat	25 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
vor Gebrauch (pro 100 ml) + 20 µl 37 % Formaldehyd	
<b>Stopplösung</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	15 g
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
<b>Konservierungslösung</b>	
Ethanol	300 ml
Glycerin	40 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	

<b>Puffer und Lösungen für Zymogramme</b>	
<b>Zymogrammgele</b>	
H <sub>2</sub> O	2,5 ml
Gelatine (10 mg/ml)	1 ml
Tris-Puffer (pH 8,8)	3,75 ml
SDS (10 %)	50 µl
APS (10 %)	50 µl
Acrylamid	2,7 ml
TEMED	10 µl
<b>Zymogramm-Aktivierungspuffer</b>	
Tris/HCl	7,9 g
NaCl	11,7 g
CaCl <sub>2</sub>	0,74 g
Brij 35 (30 %)	1,7 ml
mit H <sub>2</sub> O dest. ad 1 l	
pH 7,5	

Tab. 6: Liste von Puffern und Lösungen für spezifische Anwendungen

### 3.1.6 Gele für SDS-PAGE

Proteingrößen		130 - 220 kDa	80 - 130 kDa	50 - 80 kDa	25 - 50 kDa	15 - 25 kDa
Gele für SDS-PAGE	Sammelgel	Trenngel 6 %	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %
	(1 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)
H <sub>2</sub> O dest.	0,68 ml	2,6 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml
Rotiphorese® Gel 30	0,17 ml	1,0 ml	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
Tris/HCl, 1 M, pH 6,8	0,13 ml			-		-
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	-	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml
10 % SDS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
10 % APS	0,01 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,004 ml	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

**Tab. 7:** Rezepte für die Herstellung verschieden dichter Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE in Bezug auf die Größe der aufzutrennenden Proteine

### 3.1.7 Oligonukleotide für qPCR und PCR

qPCR-Primer für	Sequenz	Position	T <sub>m</sub> (°C)
<b>α-Actinin 1</b> (ACTN1)	5'-TGGCAGAGAAGTACCTGGACA-3' 5'-GGCAGTTCACACGATGTCTT-3'	815 - 876	60 60
<b>α-Actinin 4</b> (ACTN4)	5'-TTCAACCACTTCGACAAGGA-3' 5'-ATGAGGCAGGCCTTGAAC-3'	2379 - 2443	59 59
<b>α-smooth muscle Aktin</b>	5'-CTGAAGTACCCGATAGAACATGG-3' 5'-TTGTAGAAAGAGTGGTGCCAGAT-3'	252 - 328	59 60
<b>B2M</b> (β2-Mikroglobulin)	5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3' 5'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-3'	105 - 190	60 59
<b>Caldesmon 1</b> (CALD1)	5'-AAGGCTCAGACATCTGATTGC-3' 5'-CATGGTGTGATTTCAGGTTCA-3'	392 - 462	59 59
<b>CTGF</b> (Connective tissue growth factor)	5'-CTCCTGCAGGCTAGAGAAGC-3' 5'-GATGCACTTTTGCCTTCTT-3'	884 - 977	59 60
<b>mDia1</b> (Diaphanous homolog 1; DIAPH1)	5'-TTGGACATTCTTAAACGACTTCAT-3' 5'-GCTTGTTCCGGCTATCGTAA-3'	715 - 784	59 60
<b>ERK1</b> (Extracellular signal regulated kinase 1)	5'-CCCTAGCCCAGACAGACATC-3' 5'-GCACAGTGTCATTTTCTAACAGT-3'	1103 - 1196	59 59
<b>ERK2</b> (Extracellular signal regulated kinase 2)	5'-CAAAGAACTAATTTTGAAGAGACTGC-3' 5'-TCCTCTGAGCCCTTGTCTT-3'	1269 - 1349	60 59
<b>FAK</b> (Focal adhesion kinase)	5'-TGAGGGAGAAGTATGAGCTTGC-3' 5'-TTGGCAAATAACGAATTCTCAA-3'	550 - 621	60 59
<b>Fibronektin</b> (FN)	5'-CCCTGATTGGAAGGAAAAAGA-3' 5'-ATGAAGATTGGGGTGTGGAA-3'	6217 - 6284	60 60
<b>GAPDH</b> (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)	5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3' 5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'	83 - 148	60 60
<b>GNB2L1</b> (Guanidine nucleotide binding protein 2 like 1)	5'-GCTACTACCCCGCAGTTCC-3' 5'-CAGTTTCCACATGATGATGGTC-3'	170 - 241	59 60

<b>Integrin <math>\alpha 5</math></b> (ITGA5)	5'-CCCATTGAATTTGACAGCAA-3' 5'-TGCAAGGACTTGTACTCCACA-3'	396 - 487	59 59
<b>Integrin <math>\alpha V</math></b> (ITGAV)	5'-CATGTCCTCCTTATACAATTTTACTGG-3' 5'-GCAGCTACAGAAAATCCGAAA-3'	1136 - 1201	60 59
<b>Integrin <math>\beta 1</math></b> (ITGB1)	5'-CGATGCCATCATGCAAGT-3' 5'-ACACCAGCAGCCGTGTAAC-3'	756 - 826	59 59
<b>Integrin <math>\beta 3</math></b> (ITGB3)	5'-CGCTAAATTTGAGGAAGAACG-3' 5'-GAAGGTAGACGTGGCCTCTTT-3'	2279 - 2360	59 59
<b>Lamin A/C</b>	5'-GACGAGGATGAGGATGGAGA-3' 5'-AGCGCAGGTTGTACTCAGC-3'	1869 - 1959	60 59
<b>MLC</b> (Myosin light chain 9; MYL9)	5'-GGACCTGCACGACATGCT-3' 5'-ACCCATGGTGGTGAGCAG-3'	250 - 325	60 60
<b>MMP2</b> (Matrix-Metalloproteinase 2)	5'-ATAACCTGGATGCCGTCGT-3' 5'-AGGCACCCTTGAAGAAGTAGC-3'	2148 - 2210	60 59
<b>MMP9</b> (Matrix-Metalloproteinase 9)	5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3' 5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'	126 - 192	60 60
<b>Profilin 1</b> (PFN1)	5'-CCTTCAATGTCACTGTCACCA-3' 5'-ACCACCGTGGACACCTTCT-3'	429 - 502	60 59
<b>RhoA</b>	5'-GGAGCTAGCCAAGATGAAGC-3' 5'-GCCAATCCTGTTTGCCATA-3'	663 - 732	59 59
<b>RPL32</b> (Ribosomal protein L32)	5'-GAAGTTCCTGGTCCACAACG-3' 5'-GCGATCTCGGCACAGTAAG-3'	319 - 395	60 60
<b>RPS9</b> (Ribosomal protein S9)	5'-CTGCTGACGCTTGATGAGAA-3' 5'-CAGCTTCATCTTGCCCTCA-3'	234 - 338	60 60
<b><math>\beta</math>-Tubulin</b>	5'-TTAACCATGAGGGAAATCGTG-3' 5'-CTGATCACCTCCCAGAACTTG-3'	122 - 201	59 59
<b>Vinculin</b>	5'-GATGAAGCTCGCAAATGGTC-3' 5'-TCTGCCTCAGCTACAACACCT-3'	2813 - 2889	60 60

PCR-Primer für	Sequenz	Position	T <sub>m</sub> (°C)
<b>FN-Northern fw</b> <b>FN-Northern rev</b>	5'-GAAGCTCTCTCTCAGACAACCA-3' 5'-AGGTCTGCGGCAGTTGTCAC-3'	6514	55,9
<b>CTGF-Northern fw</b> <b>CTGF-Northern rev</b>	5'--CACAAGGGCCTCTTCTGTGA-3' 5'-TCTCTTCCAGGTCAGCTTCG-3'	342	59,6
<b>SV40 fw</b> <b>SV40 rev</b>	5'-GTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTG-3' 5'-GTCCTTGGGGTCTTCTACCTTTCTC-3'	-	55,0

**Tab. 8:** Liste der verwendeten qPCR- und PCR-Oligonukleotidprimer. Fw = forward (vorwärts), rev = reverse (rückwärts)

### 3.1.8 Oligonukleotide zur Herstellung der siRNA

siRNA-Oligonukleotide	Sequenz	Position
<b>Antisense Template</b>	5'-AATGTTCTCTTCCAGGTCAGCCCTGTCTC-3'	978
<b>Sense Template</b>	5'-AAGCTGACCTGGAAGAGAACACCTGTCTC-3'	
<b>pSilencer Sense-Insert</b>	5'-GATCCTGTTCTCTTCCAGGTCAGCTTCAAGAG- AGCTGACCTGGAAGAGAACATTA-3'	978
<b>pSilencer Antisense-Insert</b>	5'-AGCTTAATGTTCTCTTCCAGGTCAGC- TCTCTTGAAGCTGACCTGGAAGAGAACAG-3'	

**Tab. 9:** Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung CTGF-spezifischer siRNA und des pSiCTGF-Vektors

### 3.1.9 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung (Histo.)	Puffer (Histo.)	Herkunft
gt anti $\alpha$ -Actinin-1, -3 und -4	1:500	0,5 % (w/v) MM in TBST	Santa Cruz, California, USA
ms anti $\alpha$ -smooth muscle Aktin	1:500 (1:100)	0,5 % (w/v) BSA in TBST (0,2 % (w/v) BSA in PBS)	Serotec, Kidlington, UK
anti-BrdU	1:100	Antibody-Dilution-Solution	Roche, Mannheim
gt anti CTGF	1:1.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
ms anti c-myc	1:2.000	0,5 % (w/v) MM in TBST	Biomol, Exeter, UK
anti-Digoxigenin, AP-gekoppelt	1:10.000	DIG-Blockierungslösung	Roche, Mannheim
rb anti ERK1/2	1:1.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Cell Signaling, Beverly, USA
rb anti Phospho-ERK1/2	1:1.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Cell Signaling, Beverly, USA
rb anti Fibronectin	1:1.000 (1:500)	0,5 % (w/v) MM in TBST (0,2 % (w/v) BSA in PBS)	Dako, Glostrup, Denmark
rb anti FAK	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
rb anti Phospho-FAK	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
ms anti GAPDH, HRP-gekoppelt	1:10.000	0,5 % (w/v) MM in TBST	Abcam, Cambridge, UK
ms anti penta-His	1:2.000	0,5 % (w/v) MM in TBST	Invitrogen, Karlsruhe
ms anti Integrin $\alpha$ V $\beta$ 3, Klon LM607	1:500	0,5 % (w/v) MM in TBST	Chemicon, Billerica, USA
rb anti Integrin $\beta$ 1	1:500	0,5 % (w/v) MM in TBST	Santa Cruz, California, USA
rb anti Kollagen Typ I	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	RDI, Concord, USA
rb anti Kollagen Typ III	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
gt anti Kollagen Typ IV	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Chemicon, Billerica, USA
rb anti Kollagen Typ VI	1:250	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Rockland, Philadelphia, USA
gt anti Matrix-Metalloproteinase 2	1:500	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
rb anti PAI-1	1:1.000	0,5 % (w/v) MM in TBST	Santa Cruz, California, USA
ms anti RhoA/B/C	1:333	5 % (w/v) MM in TBS	Millipore, Billerica, USA
ms anti Vinculin	1:1.000 (1:200)	0,5 % (w/v) BSA in TBST (0,2 % (w/v) BSA in PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim



Sekundärantikörper	Verdünnung	Puffer	Herkunft
ch anti gt, HRP-gekoppelt	1:2.000 bis 1:10.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
ch anti ms, HRP-gekoppelt	1:2.000 bis 1:10.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
ch anti rb, HRP-gekoppelt	1:2.000 bis 1:10.000	0,5 % (w/v) BSA in TBST	Santa Cruz, California, USA
ch anti ms, Alexa Flour 488	1:500	0,2 % (w/v) BSA in PBS	Invitrogen, Karlsruhe

**Tab. 10:** Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunhistochemische Färbungen; Verdünnungen und Puffer für Immunistochemie in Klammern

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Verwendete Zelllinien und deren Kulturbedingungen

Linie	Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
humane Trabekelwerkzellen (TWZ)	F10-HAM Medium + 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	37 °C / 5 %
HTM5 (pSiCTGF)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % (v/v) FKS (+ 250 µg/ml Hygromycin)	
Human Embryonic Kidney (HEK293)-Zellen (pCTGF)	DMEM + 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (+ 250 µg/ml G418)	
Mink Lung Epithelial Cells (MLEC)	DMEM + 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 250µg/ml G418	

**Tab. 11:** Liste der verwendeten Zelllinien mit Medien, Zusätzen (Selektionsantibiotika für transfizierte Zellen in Klammern) und Kulturbedingungen

Trabekelwerkzellen des Auges stellten in der vorliegenden Arbeit das hauptsächliche Untersuchungsobjekt dar. Sie wurden wie unter 3.2.4 beschrieben von Dr. Alice H. Yu und Prof. Dr. Ulrich Welge-Lüssen aus Erlangen in der Zellkultur etabliert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Junglas *et al.* 2009). Neben den primären Zelllinien kamen immortalisierte Simian-Virus 40 (SV40) transformierte humane TWZ zum Einsatz (HTM5, „human trabecular meshwork“). Diese Zelllinie wurde von Dr. Iok-Hou Pang und Dr. Louis DeSantis (Alcon Research Laboratories, Fort Worth, Texas) zur Verfügung gestellt. HEK293-Zellen wurden von Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall (Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt und dienten nach Transfektion mit einem CTGF-Überexpressionsvektor als Produzenten für rekombinantes, humanes CTGF. Mink Lung Epithelial

Cells (MLECs) kamen im Falle des Luciferase-Assays zum Einsatz. Diese Zellen wurden von Abe *et al.* mit einem Konstrukt stabil transfiziert, das das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle eines trunkierten PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) Promoters exprimiert (Abe *et al.* 1994).

### 3.2.2 Passagieren von Zellen und Zellzählung

Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (Monolayer) wurden die Zellen vom Gefäßboden abgelöst und zur weiteren Kultivierung in einer neuen Kulturflasche verdünnt ausgesät. Für die einzelnen *in vitro* Experimente wurden jeweils bestimmte Zellzahlen in entsprechende Kulturgefäße überführt. Hierzu wurde das Medium der Zellkulturflasche von den adhärennten Zellen abgenommen und die Zellen anschließend zweimal mit 8 ml sterilem 1 x PBS gewaschen, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden mit 2 ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA überschichtet und 5 min bei 37 °C inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit rundeten sich die Zellen ab und wurden durch leichtes Klopfen vom Plastikboden abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem Medium abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 1.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration wurden dem Versuch entsprechende Zellzahlen in neuen Kulturgefäßen ausgesät.

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mit Hilfe des Casy-Zellzählers. Hierzu wurden nach Abzentrifugieren und Wiederaufnehmen der Zellen im Medium jeweils 50 µl der Suspension in 10 ml steril filtrierten isotonischen Puffer (Casyton) gegeben und mit Hilfe des Casy-Zellzählers vermessen. Dieses verfügt über einen Messbereich von 0,7 - 120 µm und bestimmt die Zellzahl sowie die Größenverteilung einer Probe durch Messung des Widerstandes der angesaugten Zellsuspension mittels elektronischer Pulsflächenanalyse. Der Widerstand am Messpunkt ist vom Volumen und dem physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Der Messbereich wurde so gewählt, dass Verfälschungen durch Fremdpartikel weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

### 3.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Überzählige Zellen wurden bis zur nächsten Verwendung eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurde ein konfluenter Zellrasen entsprechend dem Vorgehen des Passagierens mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Gefäßboden abgelöst. Nach Zentrifugation bei 1.000 Upm wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert. Die auf diese Weise vorbereiteten Zellsuspensionen wurden in Kryoröhrchen überführt, in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gegeben und über Nacht (ü. N.) bei -80 °C langsam eingefroren (ca. 1 °C/min). Zur endgültigen Lagerung wurden die Zellen nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schütteln schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension in 5 ml Medium aufgenommen und bei 1.000 Upm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Nach leichtem Schwenken und mikroskopischer Kontrolle der homogenen Aussaat, wurden die Zellen in einem Inkubator kultiviert.

### 3.2.4 Etablierung von humanen Trabekelwerkzellen

Trabekulektomieexplantate von humanen Spendern wurden in Laminin beschichtete 35 mm Zellkulturschalen überführt, mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und in F10-HAM Medium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Für die Beschichtung wurden die Petrischalen mit jeweils 500 µl Lamininlösung (25 µg/ml) gespült und anschließend für 45 min getrocknet. Das Deckglas wurde entfernt, sobald ein zu ca. 30 % konfluenter Zellrasen entstanden war und die ersten Zellen auch neben der Glasabdeckung wuchsen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die TWZ in neue Kulturflaschen überführt und für den späteren Gebrauch weiter kultiviert.

Das Alter der Spender erstreckte sich von 34 bis 76 Jahre. Alle Methoden zur Entnahme von Geweben wurden auf humane Weise und mit der Einwilligung der Patienten durchgeführt und standen im Einklang mit der Erklärung von Helsinki.

### 3.2.5 Zellbehandlungen

TWZ der dritten bis vierten Passage wurden soweit nicht anders beschrieben in 6-Well-Platten mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät und nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens für 24 h im entsprechenden serumfreien Medium inkubiert, um alle Wirkungen der im FKS vorhandenen Wachstumsfaktoren abklingen zu lassen. Nach einem erneuten Wechsel des Mediums wurden die entsprechenden Faktoren und Inhibitoren, wie im Ergebnisteil für die einzelnen Versuche beschrieben, zugegeben und weiter für die Dauer des Versuchsansatzes inkubiert. Die jeweiligen Kontrollzellen wurden bis auf die Zugabe der Faktoren äquivalent behandelt. Die Versuche wurden mit je drei verschiedenen Linien (bei humanen TWZ) bzw. drei verschiedenen Chargen (bei HTM5, pSiCTGF und MELC) von Zellen durchgeführt, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen.

### 3.2.6 Zellkulturbasierende Versuche

#### 3.2.6.1 Immunzytologische Färbungen

Zur Herstellung immunzytologischer Färbungen wurden die entsprechenden Zellen auf Zellkulturobjektträgern mit je  $5 \times 10^4$  Zellen pro Kammer ausgesät und für 24 h entsprechend den jeweiligen Kulturbedingungen inkubiert, um ein vollständiges Ausbreiten der Zellen zu ermöglichen. Bei Untersuchungen zur Migration wurden die Zellen weiter inkubiert und nach Erreichen der Konfluenz, wie unter 3.2.6.4 beschrieben, ein Scratch eingebracht. Nach der für die verschiedenen Versuche entsprechenden Behandlung wurden die Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und zur Fixierung für 5 min mit 300 µl 4 % (w/v) Formaldehyd (FA) in PBS pro Well bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschgängen mit PBS-Puffer wurden die Zellen entweder getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder direkt für 5 min mit 300 µl 0,5 % Triton X-100 in PBS inkubiert, um eine Permeabilisierung der Zellmembran zu erreichen. Die Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte für 1 h mit 2 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in PBS bei RT. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und mit primären Antikörpern entsprechend Tab. 10 in 300 µl PBS-Puffer mit 0,2 % (w/v) BSA ü. N. bei 4 °C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges

Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Sekundärantikörperlösung inkubiert. Hier wurde neben dem sekundären Antikörper (gekoppelt an Alexa-Fluor 488, 1:500) zudem Phalloidin-TriTC 1:1.000 in PBS-Puffer mit 0,2 % (w/v) BSA verdünnt. Phalloidin bindet an F-Aktinfasern und erlaubt es somit, Aktin-Stressfasern zu markieren. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT im Dunkeln. Überschüssiger Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 min entfernt. Die Plastikbegrenzung der Wells wurde entfernt und auf die Objektträger jeweils 50 µl Fluorescent Mounting Medium mit 10 % DAPI pipettiert. Anschließend wurden die Deckgläser luftblasenfrei aufgesetzt und das Mounting-Medium bei 4 °C ü. N. ausgehärtet.

Die Aufnahmen wurden am Fluoreszenzmikroskop bei 20- bis 40-facher Vergrößerung durchgeführt und mit Axiovision 4.7 Software (Zeiss) ausgewertet.

### 3.2.6.2 Luciferase-Assay

Mit einem TGF- $\beta$ -sensitiven PAI-1 Luciferase-Reporter Assay wurde der Einfluss von CTGF auf den TGF- $\beta$ -Signalweg, sowie auf das Plasminogen/Plasmin-System untersucht.

Diese Experimente wurden mit stabil transfizierten MLECs durchgeführt. Der Vorteil des trunkierten Promoters ist seine TGF- $\beta$ -Spezifität. Andere Wachstumsfaktoren, wie etwa der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) können diesen trunkierten Promoter nicht aktivieren. Das heißt, die Menge an gebildeter Luciferase ist direkt proportional zur Menge an aktivem TGF- $\beta$ .

Die Messung der Menge an Luciferase erfolgte über die Messung ihrer Aktivität, also ihrer Fähigkeit ihr Substrat D-Luciferin umzusetzen. Bei dieser ATP-abhängigen Oxidation kommt es zu einer Quantenemission. Diese Lichtquanten können im Luminometer gemessen werden.

Zur Durchführung des Versuchs wurden MLECs zu je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well auf 96-Well-Platten ausgesät. Nach 3 h Inkubation zur Adhäsion auf der Plastikoberfläche wurde das Medium entfernt und durch 100 µl serumfreies Medium mit Zusatz von entweder 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2, 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2 + 10 ng/ml CTGF, 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2 + 50 ng/ml CTGF, 50 ng/ml CTGF oder 100 ng/ml CTGF ersetzt. Die so behandelten Zellen wurden für 24 h inkubiert, anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und mit 50 µl Lysepuffer pro Well für 30 min bei 4 °C aufgeschlossen.

Nach kurzem Anwärmen auf RT wurden die gesamten 50 µl in transparente Rundboden-Röhrchen überführt und in den Autolumat LB953 eingebracht. Die Luciferasereaktion wurde durch Einspritzen von jeweils 100 µl Assaypuffer pro Röhrchen gestartet. Die Messung erfolgte zwei Sekunden nach der Mischung von Probe und Assaypuffer. Die Luciferase-Aktivität wurde über eine Zeitspanne von drei Sekunden gemessen. Hierbei wurde im Luminometer die Menge an emittiertem Licht gemessen und in RLU (Relative Light Units) angegeben.

Zur Auswertung wurden alle Einzelmessungen einer Versuchsgruppe zusammengefasst und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt.

### **3.2.6.3 Adhäsionsassay**

Bei dem hier verwendeten Adhäsionsassay wird die Menge an Zellen bestimmt, die sich nach einer bestimmten Zeit an einer Oberfläche festgesetzt hat. Dabei werden nicht-adhärente Zellen durch Spülen mit PBS entfernt und die verbliebenen Zellen mit Toluidinblau angefärbt.

Die Messung wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden zum einen mit FN- oder Kollagen-IV-beschichtete, zum anderen unbeschichtete Wells verwendet. Zur Beschichtung wurden zunächst je 100 µl einer FN-, bzw. Kollagen-IV-Lösung (jeweils mit 100 ng/ml in Beschichtungspuffer) in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die überstehende Beschichtungslösung wurde abgesaugt und die Wells mit jeweils 100 µl PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Wells für 1 h mit je 100 µl 5 % (w/v) Magermilch in sterilem PBS inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Zellen zu je  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde dreimal mit 100 µl PBS gespült, um die noch nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die Fixierung der abgesetzten Zellen geschah anschließend mit je 50 µl 4 % (w/v) FA pro Well für 10 min bei RT. Danach wurde das Fixans entfernt und mit je 100 µl PBS gespült. Um die Zellmembranen für den Farbstoff permeabel zu machen, wurden pro Well je 50 µl 0,1 % (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O zugegeben. Zur Färbung der Zellen wurden pro Well 50 µl 0,5 % (w/v) Toluidinblau eingesetzt und für 30 min inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde verworfen und anschließend dreimal mit 100 µl PBS nachgewaschen. Die Messung der Farbintensität wurde bei 600 nm im Sunrise ELISA Reader durchgeführt.

### 3.2.6.4 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit von Zellen wurde *in vitro* durch die Methode des „Scratch-Assay“ (Wundheilungstest) betrachtet (Liang *et al.* 2007). Hierbei wurde ein vorgegebener Teil des konfluenten Zellrasens entfernt (Scratch) und anschließend in definierten Zeitabständen die Größe des unbewachsenen Bereichs durch mikroskopische Aufnahmen vermessen (Murohara *et al.* 1999).

Zur Durchführung des Assays wurden  $4 \times 10^6$  HTM5- bzw. HTM5-pSiCTGF-Zellen auf 35 mm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Mit Hilfe einer sterilen 1.000 µl Pipettenspitze wurden jeweils vier Kratzer (Scratches) in zwei ca. 5 x 3 mm großen, markierten Bereichen des konfluenten Zellrasens eingeführt. Die hierbei abgelösten Zellen wurden durch Spülen mit 1 ml PBS entfernt. Um die Proliferation zu unterdrücken wurde anschließend 5 µg/ml Mitomycin C in serumfreien Medium auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurden die Zellen entsprechend des Versuchsvorhabens mit 50 bzw. 100 ng/ml rekombinantem CTGF behandelt.

Zur Bildaufnahme wurde ein inverses Mikroskop Axiovert 200 M mit 10x PH1-Objektiv verwendet. Sowohl zur Aufnahme als auch zur Auswertung der Bilder diente das Programm Axiovision 4.7. Die Aufnahmen erfolgten zum einen direkt nach dem Einbringen der Scratches, sowie nach 12 h Inkubation bei den entsprechenden Kulturbedingungen.

Die Auswertung der Scratches erfolgte durch die Messwerkzeuge „Länge“ und „Kontur“ von Axiovision 4.7. Hiermit wurden Länge und Fläche des Scratches zum Startzeitpunkt und zusätzlich die Flächen der weiteren Zeitpunkte vermessen. Aus diesen Werten wurde durch Bildung der Differenz zwischen der Fläche zum Startzeitpunkt ( $A_0$ ) und der Fläche zum Zeitpunkt  $t$  ( $A_t$ ) die jeweilige Migrationsfläche ( $\Delta A$ ) errechnet. Zur Normierung dieser Werte wurde anschließend durch die Länge ( $s$ ) des Scratches zum Startzeitpunkt geteilt.

$$A_0 - A_t / s = \Delta A / s$$

### 3.2.6.5 Proliferationsassay

Zur Messung der Proliferation von Zellen wurde der BrdU-Assay von Roche verwendet. Dieser Assay basiert auf dem Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA. Je höher die Proliferationsrate der Zellen, desto mehr BrdU wird in die DNA eingebaut. BrdU kann anschließend mit einem spezifischen Antikörper markiert werden. Die Reaktion des farbigen Substrats Tetramethylbenzidin ist direkt proportional zur Menge des mit Peroxidase gekoppelten anti-BrdU Antikörpers. Hieraus konnten quantitative Aussagen über die Stärke der Proliferation getroffen werden.

Zur Durchführung des Assays wurden auf einer 96-Well-Platte  $6 \times 10^3$  Zellen der HTM5- als auch der pSiCTGF-Linie pro Well ausgesät und 24 h bei den entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, mit 100 µl PBS gewaschen, das serumfreie Behandlungsmedium zusammen mit BrdU (1:1.000) sowie gegebenenfalls mit den Behandlungsfaktoren CTGF (50 bzw. 100 ng/ml) zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Kontrollzellen wurden in serumfreiem Medium inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienten mit Mitomycin C (5 ng/ml) behandelte Zellen. Anschließend wurde das Medium ausgeklopft, zur Fixierung der Zellen 200 µl FixDenat pro Well zugegeben und für 30 min bei RT fixiert. Die Fixierungslösung wurde entfernt und jedes Well mit 120 µl Antikörperlösung (1:100 anti-BrdU in „Antibody Dilution Solution“) versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 200 µl 1x PBS für 5 min gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden in jedes Well 100 µl Substratlösung pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) abgestoppt. Die Messung erfolgte im ELISA Reader bei 450 nm. Der Referenzwert wurde bei 690 nm bestimmt.

### 3.2.6.6 Kollagenkontraktionsassay

Der Kollagenkontraktionsassay beruht auf der Fähigkeit bestimmter Zellen, welche innerhalb einer Kollagen-Gelmatrix kultiviert werden, diese durch Kontraktion des Aktinzytoskeletts zusammenzuziehen (Bell *et al.* 1979; Harris *et al.* 1981). Die Traktionskräfte werden hierbei von Aktomyosinsystem, vermittelt von Integrinen, auf Moleküle der EZM übertragen (Burgess *et al.* 1994).



Zur Durchführung wurden auf einer 6-Well-Platte pro Well je 1,4 ml 1,5-faches DMEM, 100 µl einfaches DMEM, 350 µl Kollagen I sowie 250 µl Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) zügig ausgebracht und durch Schwenken vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank unter den für die Zellen jeweiligen Bedingungen hatte sich eine feste Kollagenmatrix ausgebildet. Vorsichtig, um die Matrix nicht zu zerstören, wurden pro Well je 1 ml DMEM zusammen mit den entsprechenden Behandlungsfaktoren zugegeben. Die noch adhärierende Matrix wurde mit einem sterilen Spatel von der Oberfläche der Kulturschale abgehoben, so dass eine im Medium frei schwimmende Kollagenscheibe entstand. Der Versuchsansatz wurde für weitere 24 h bei entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde die Kollagenscheibe in der LAS 3000 imaging workstation digitalisiert und die Fläche in Pixeln mit der „AIDA image analyzer“-Software bestimmt.

### **3.3 Methoden der Molekularbiologie**

#### **3.3.1 RNA-Isolation**

Für die Isolation der RNA wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) angewendet. Hierzu kam das Reagenz peqGOLD TriFast™, eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat, zum Einsatz. Sowohl TWZ als auch HTM5-Zellen wurden mit je 500 µl TriFast™ pro Well aus 6-Well-Platten geerntet. Gewebeproben (Linsen, restliches Auge) wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit 300 µl TriFast™ versetzt, mit einem Pistill zerkleinert und weiter entsprechend den Zellen verarbeitet. Mit Hilfe von Chloroform wurde das Homogenisat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wurde dann mit Isopropanol aus der oberen wässrigen Phase ausgefällt. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 300 µl bzw. 500 µl peqGOLD TriFast™-Reagenz auf Gewebe/Zellen geben
- Zellen mit Zellschaber ablösen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen (Schritt entfällt bei Isolation aus Gewebe)
- 200 µl Chloroform pro ml peqGOLD TriFast™ zugeben, kräftig schütteln

- 20 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 4 °C bei 13200 Upm zentrifugieren
- wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
- wässrige Phase 1:1 mit Isopropanol mischen, kräftig schütteln
- RNA bei RT für 20 min ausfällen
- 20 min bei 4 °C bei 13.200 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 500 µl 70 % Ethanol aufnehmen, kräftig schütteln
- für 5 min bei 4 °C bei 13.200 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet je nach Größe in 10 - 20 µl Nuklease-freiem Wasser lösen
- bei – 80 °C lagern

Zur Feststellung eventueller Degradation wurden jeweils 1 µl der RNA zusammen mit 4 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O und 1 µl Auftragspuffer für DNA/RNA auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel geladen und bei 125 V für 45 min aufgetrennt. Scharfe Banden für die 28 S- und 18 S-rRNA wiesen dabei auf die vorhandene strukturelle Integrität der Gesamt-RNA hin. Die Konzentration der RNA wurde mittels spektralphotometrischer Messung über die Messung der Extinktion von 1 µl RNA-Lösung bei 260 nm im NanoDrop bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde durch die Multiplikation der Extinktion mit dem Methodenfaktor RNA (40 µg/ml) und dem RNA-Verdünnungsfaktor errechnet. Um die Reinheit der RNA bestimmen zu können, wurde die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen Nuklease -freies Wasser ermittelt. Bei einem Wert des Quotienten E 260/E 280 zwischen 1,8 und 2 wurde die RNA als rein betrachtet und für die Herstellung von cDNA verwendet.

### 3.3.2 Herstellung von cDNA (complementäre DNA)

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA in cDNA umzuschreiben. In dieser Form sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und lassen sich mit PCR Techniken analysieren. Als Primer wurden oligo-dT-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurde das iScript cDNA Synthese Kit verwendet.

Um Verunreinigungen der RNA abschätzen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase und einmal ohne reverse Transkriptase, angesetzt.

Reaktionsansatz	+RT	-RT
0,5 µg RNA	7,5 µl	8 µl
H <sub>2</sub> O		
5x iScript™ Reaction Mix	2 µl	2 µl
iScript™ Reverse Transkriptase	0,5 µl	-

**Tab. 12:** Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA aus RNA

Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	25 °C	5 min
2.	42 °C	30 min
3.	85 °C	5 min
4.	10 °C	∞

**Tab. 13:** Programm für Thermocycler zur Herstellung von cDNA aus RNA

Die reverse Transkription erfolgte im 2. Schritt bei 42 °C. Im 3. Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 85 °C inaktiviert. Nach dem letzten Schritt wurde die fertige cDNA bei -20 °C für qPCR Analysen aufbewahrt.

### 3.3.3 Durchführung der quantitativen Real-Time Reverse Transcription-PCR

Die Analyse der relativen Genexpressionen erfolgte mittels real time Reverse Transcription-PCR (quantitative PCR, qPCR). Genspezifische Primer wurden mit Hilfe der Universal ProbeLibrary der Seite [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com) erstellt und von der Firma Invitrogen bezogen. Bei der Auswahl der Primer wurden Sequenzen bevorzugt, welche ein Amplicon über Exon-Intron-Grenzen einschließen. Die Sequenzen aller Primer sind in Tab. 8, Kap. 3.1.7 aufgeführt. Die qPCR wurde nach folgendem Reaktionsansatz mit Hilfe des HotStarTaq DNA Polymerase Kits durchgeführt:

qPCR - Reaktionsansatz	
cDNA	0,15 µl
10 x PCR-Puffer	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6 µl
dNTPs (25mM)	0,12 µl
Sybr-Green I	0,19 µl
Fluorescein	0,015 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,06 µl
H <sub>2</sub> O	7,37 µl
Primermix	5 µl

Primermix	
H <sub>2</sub> O	121 µl
Primer forward (1 µM)	2 µl
Primer reverse (1 µM)	2 µl

**Tab. 14:** Reaktionsansatz für eine qPCR mit dem HotStarTaq-Kit in einem IQ5 Real Time PCR Detection System

Proben, die ohne reverse Transkriptase inkubiert wurden, kamen an Stelle von cDNA als Negativkontrolle zum Einsatz. Die qPCR wurde mit folgendem Programm an einem iQ5 Real-Time PCR Detection System durchgeführt:

qPCR Cyclerprogramm			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Aktivierung Taq-Polymerase	95 °C	15 min	1
Aufschmelzen der DNA	95 °C	10 s	40
Annealing und Amplifikation	60 °C	40 s	
Schmelzkurve	85 bis 40 °C	2 s	85

**Tab. 15:** Programm für eine qPCR mit dem HotStarTaq-Kit in einem IQ5 Real Time PCR Detection System

Der relative Gehalt des Amplicons erfolgte durch Messung der SybrGreen-Fluoreszenz. Am Ende jedes Laufes wurde eine 85 stufige Schmelzkurve der jeweils entstandenen Amplicons erstellt. Um eine relative Quantifizierung einzelner cDNAs zu ermöglichen, wurden sogenannte Housekeeping-Gene mit Hilfe des Programms Genex (MultiD Analysis, Göteborg, Sweden) (Vandesompele *et al.* 2002) identifiziert. Hierzu wurden vor Analyse jeder neuen Behandlung oder Transfektion qPCRs für die potentiellen Referenz-Gene Guanin nucleotide binding protein 2-like-1 (GNB2L1), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), Ribosomales Protein L32 (RPL32),  $\beta$ -Tubulin, Ribosomales Protein S9 (RPS9), Lamin A/C sowie

$\beta$ 2-Microglobulin (B2M) durchgeführt. Als geeignetestes Housekeeping-Gen erwies sich in allen Fällen GNB2L, weshalb es in sämtlichen weiteren Analysen Anwendung fand. Die Amplifikations- bzw. Schmelzdaten wurden mit der iCycler iQ Optical System Software Vers. 3.0a erhoben und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel ausgewertet. Die relative Expression der Transkripte wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001).

Hierfür wurden die relativen cDNA Spiegel X des Zielgens auf die  $C_T$ -Werte des Referenzgens normalisiert und auf die Menge der Standardbedingung bezogen. Die Formeln für die Berechnung lauten:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Referenzgen}) - C_T (\text{Zielgen}) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Standardbedingung}) - \Delta C_T (\text{Konditionierte Bedingung}) \quad (2)$$

$$X = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3)$$

### 3.3.4 Durchführung des Northern Blots

Bei der Northern Blot-Analyse wird RNA von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Auf dieser lassen sich die zu untersuchenden mRNAs mittels spezifischer markierter Sonden markieren und somit die mRNA-Menge ähnlich einem Western Blot quantifizieren.

Für die Herstellung der RNA-Sonden fand das DIG RNA Labeling Kit Anwendung. Hierzu wurden die zu markierenden Teile der CTGF- und FN-cDNAs mittels PCR amplifiziert, jedoch wurde ein Antisense-Primer mit der Sequenz des T7-Promotors am 5'-Ende verwendet.

Northern-Sonden-PCR	
cDNA (1:5)	2 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,25 µl
Primer fw (1:10)	0,5 µl
Primer rev T7 (1:10)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	9,5 µl

Northern-Sonden-PCR Cyclerprogramm			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
initiales Aufschmelzen	95 °C	5 min	1
Aufschmelzen	95 °C	30 s	35
Annealing	54/58 °C	30 s	
Amplifikation	72 °C	50 s	
abschl. Amplifikation	72 °C	10 min	1

**Tab. 16:** Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für eine PCR zur Herstellung von Northern-Sonden-Templates

Der PCR-Ansatz wurde in einem 1 %-igem Agarosegel aufgetrennt und das Produkt anschließend aus dem Gel mit Hilfe eines Nucleospin Extract II Kits aufgereinigt. Danach wurde das PCR-Produkt mit dem DIG RNA Labeling Kit markiert. Dabei wird die DNA durch die T7-DNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und im Reaktionsansatz vorhandene DIG-markierte UTP-Moleküle zufällig in die entstehende RNA eingebaut (Feinberg und Vogelstein 1983). Die Sonden wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

T7-Polymerase-Ansatz	
DNA (ca. 1-10µg)	13µl
10 x Transkriptionspuffer	2µl
DIG dNTPs	2µl
T7 Polymerase	2µl
RNase Inhibitor	1µl
2 h bei 37 °C	

**Tab. 17:** Reaktionsansatz zur Herstellung von RNA-Northern-Sonden aus DNA-Templates

Zur Northern Blot-Analyse wurden jeweils 2 µg RNA mit Auftragspuffer versetzt und nach 5 min Erhitzen bei 95 ° C auf ein 1 %iges (w/v) Agarosegel, versetzt mit 2,2 M Formaldehyd, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 2 h bei 120 V in 1 x MOPS-Puffer in einer horizontalen Gelelektrophoresekommer. Der Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte mittels der Kapillar-Blot Technik, bei der die RNA aus dem Agarosegel durch einen 20 x SSC-Puffer herausgelöst wird und beim Passieren der positiv geladenen Nylonmembran an dieser verbleibt. Durch UV-Bestrahlung mit einer Energie von 0,14 J in einem Stratagene Crosslinker wurde die RNA mit der Nylonmembran kovalent verknüpft (Crosslinking). Die Membran wurde mit 5 ml Dig Easy Hyb für eine Stunde bei 68 °C im Hybridisierungsofen HB-1000 Hybridizer prähybridisiert. Die Markierung der jeweiligen mRNAs erfolgte mit spezifischen RNA-Sonden, die in einer Konzentration von 50 ng/ml in Dig Easy Hyb zusammen mit der Membran ü. N. hybridisiert wurden.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Membranen zweimal für 10 min in 2 x SSC + 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) bei RT, einmal für 10 min in 0,2 x SSC + 0,1 % (w/v) SDS bei 70°C und einmal für 5 min in Northernwaschpuffer gewaschen. Nach Blockierung für 30 min bei RT in Blockierungslösung wurden die DIG-gekoppelten Sonden mittels eines mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (1:10.000 in Blockierungslösung) für 30 min bei RT markiert. Nach Inkubation wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min in Waschpuffer gewaschen und in Detektionspuffer äquilibriert. Zur Entwicklung des Northern Blots wurde die Membran für 5 min mit CDP-Star, 1:100 verdünnt in Detektionspuffer, inkubiert und die dabei erzeugte Chemilumineszenz in einer LAS 3000 imaging workstation detektiert. Zum Zwecke der Ladungskontrolle wurden die Membranen mit Methylenblau gefärbt und die 18 S- und 28 S-Banden der ribosomalen RNA (rRNA) sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmt. Die quantitative Vermessung der mRNA- sowie der rRNA-Banden erfolgte mit Hilfe der Software „AIDA Image analyzer“. Mit Hilfe dieses Programms wurde die quantitative Messung der Farbdichte der einzelnen Banden (densitometrische Auswertung) ausgeführt.

### 3.3.5 Herstellung und Transfektion von CTGF siRNA und des pSiCTGF Vektors

Die small interfering (si)RNA Technik ist eine Methode zur Hemmung der Expression spezifischer Zielgene durch induzierten Abbau der entsprechenden mRNA. siRNAs sind 21 – 28 Nukleotide lange RNAs, die von Dicer einer Typ III-RNase aus langen doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten werden. Diese kleinen doppelsträngigen RNAs werden anschließend in einen Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an der Ziel-mRNA. So wird der RISC-Komplex mit seinen RNA-Helicase- und Nuklease-Aktivitäten in räumliche Nähe gebracht. Die Folge ist ein Entwinden und Spalten der Ziel-mRNA. Da diese mRNA nun in ungeschützter Form vorliegt, wird sie schnell durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut (Campbell und Choy 2005).

#### 3.3.5.1 Herstellung der CTGF-siRNA

Zur Herstellung der siRNA mit dem Ambion siRNA Silencer Kit wurde mit Hilfe der Internetseite [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_design.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html) eine spezifische Zielsequenz in der CTGF-mRNA ermittelt. Aus dieser, sowie der komplementären Sequenz wurden Oligonukleotide hergestellt, an deren 5'-Ende eine AA-Sequenz, sowie am 3'-Ende eine 5'-CCTGTCTC-3'-Sequenz zur Bindung eines T7-Promotor-Primers angefügt wurde. Zuerst wurden die jeweiligen Einzelstränge mittels Klenow DNA-Polymerase zu doppelsträngiger DNA mit T7-Promotor aufgefüllt:

Reaktion 1	
T7 Promotor Primer	2 µl
DNA Hyb Buffer	6 µl
Sense- bzw. Antisense-Oligonukleotid (100 µM)	2 µl
70 °C, 5 min; abkühlen auf RT	
10 x Klenow Reaction Buffer	2 µl
10 x dNTP Mix	2 µl
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	4 µl
Exo-Klenow	2 µl
37 °C, 30 min	

**Tab. 18:** Reaktionsansatz zur Herstellung doppelsträngiger DNA-Templates für CTGF-siRNAs



Durch den Einsatz der T7-Polymerase wurden anschließend Sense- und Antisense-RNA-Einzelstränge der Zielsequenz erzeugt:

<b>Reaktion 2</b>	
Sense- bzw. Antisense-Produkt aus Reaktion 1	2 µl
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	4 µl
2 x dNTP Mix	10 µl
10 x T7 Reaction Buffer	2 µl
T7 Enzyme Mix	2 µl
37 °C, 2 h	

**Tab. 19:** Reaktionsansatz zur Herstellung doppelsträngiger CTGF-siRNAs mit 5'-Überhängen

Die beiden Einzelstranglösungen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt und ü. N. bei 37 °C inkubiert, um die Bildung von RNA-Doppelsträngen zu ermöglichen. Die noch überhängenden 5'-CCTGTCTC-3'-Sequenzen an den 5'-Enden der Einzelstränge wurden nun durch Ribonukleaseverdau entfernt:

<b>Reaktion 3</b>	
ges. Vol. an dsRNA	40 µl
Digestion Buffer	6 µl
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	48,5 µl
RNase	3 µl
DNase	2,5 µl
37 °C, 2 h	

**Tab. 20:** Reaktionsansatz zum Verdau von 5'-Überhängen an doppelsträngigen CTGF-siRNAs

Die verbleibenden doppelsträngigen fertigen siRNAs werden abschließend mittels Spinsäulen-Technik aufgereinigt und in nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde durch den Einsatz des NanoDrop bestimmt.

### 3.3.5.2 Herstellung des pSiCTGF-Vektors

Der pSilencer TM 4.1-CMV hygro Vektor beinhaltet einen starken, konstitutiv aktiven CMV Promotor (modifizierter Promotor aus dem Cytomegalie Virus) zur Expression von hairpin siRNA und eine Hygromycin B Resistenz zur Selektion. Nach Expression der RNA bildet sich aufgrund der Komplementarität von zwei 19 Basen langen Domänen eine Haarnadelstruktur („short hairpin“; shRNA). Diese ist über eine

Schleife bestehend aus fünf Basen miteinander verbunden und besitzt einen 3'-terminalen Überhang. Diese Struktur kann in Säugerzellen effizient mittels Interferenz die Genexpression des Zielgens reduzieren (Brummelkamp *et al.* 2002; Paddison *et al.* 2002). Basierend auf der Sequenz aus 3.3.5.1 wurden mit Hilfe des pSilencer™ Expression Vectors Insert Design Tools von Ambion die Insertsequenzen generiert und mit nukleasefreiem Wasser eine Verdünnung von 1 µg/ml hergestellt. Der Vektor wurde entsprechend den Reaktionen 1 und 2 hergestellt:

<b>Reaktion 1</b>	
Sense- bzw. Antisense-Oligonukleotid (100 µM)	2 µl
DNA Annealing Solution	46 µl
90 °C, 3 min	
37 °C, 1 h	

<b>Reaktion 2</b>	
dsDNA-Produkt aus Reaktion 1 (8 ng/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	6 µl
10 x T4 DNA Ligase Buffer	1 µl
pSilencer 4.1-CMV	1 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	1 µl
16 °C, 2 h	

**Tab. 21:** Reaktionsansätze zur Herstellung eines pSilencer 4.1-CMV-Vektors mit CTGF-siRNA-Template

### 3.3.5.3 Klonierung

Mit Hilfe der Klonierungstechnik wurde der für die Herstellung von pSiCTGF-Zellen verwendete Silencing-Vektor in *Escherichia coli* transformiert und vermehrt.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl kompetenten Zellen (DH5α) gegeben. Das Gemisch wurde für 30 min auf Eis, 90 s bei 42 °C und anschließend wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h geschüttelt und jeweils 50 µl auf LB-Platten ausgebracht, welche zur Selektion 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Die Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert. Angewachsene Kolonien wurden am nächsten tag in 3 ml LB-Medium mit einem Selektions-Zusatz von Ampicillin überimpft und wiederum ü. N. bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde bis auf einen Rest von 500 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die Zellen für 2 min bei

10.000 Upm abzentrifugiert und für die anschließende Plasmidextraktion mittels Plasmid-Extraction Kit lysiert. Der aufgereinigte Vektor wurde folgendem Testverdau unterzogen, um den korrekten Einbau der siRNA zu gewährleisten:

Testverdau	
<i>Bam</i> H I	0,5 µl
<i>Hind</i> III	0,5 µl
10 x NEB-Buffer 3	2,5 µl
10 x BSA	2,5 µl
H <sub>2</sub> O, nukleasefrei	17,5 µl
37 °C, 1h	

**Tab. 22:** Testverdau zur Überprüfung des korrekten Einbaus des CTGF-siRNA-Templates in den pSilencer 4.1 CMV-Vektor

Enthielten die Bakterien den korrekten Vektor wurden jeweils 500 µl der Suspension mit 600 µl Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für eine spätere Verwendung bei -80 °C gelagert (Glycerin-Stock).

#### 3.3.5.4 Transiente Transfektion der CTGF-siRNA

Für die Transfektion wurden HTM5 Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät, bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und pro Well 10 - 60 nM der reinen siRNA zusammen mit 1 µl Lipofectamin 2.000 für 15 min in 500µl DMEM + 10 % (v/v) FKS bei RT inkubiert und anschließend für 6 h auf die Zellen gegeben. Weitere 1,5 ml Medium wurden zugegeben und die Zellen nach 24 h Inkubation geerntet. Die mRNA wurde isoliert und mit Hilfe der qPCR der Gehalt an CTGF mRNA bestimmt. Der effektivste Knockdown der CTGF mRNA konnte mit 40 nM der CTGF-859 siRNA erzielt werden, weshalb diese Konzentration für die weiteren Versuche mit reiner siRNA zum Einsatz kam.

Um die Auswirkungen von TGF-β2 vermittelten Expressionsänderungen von CTGF und FN zu ermitteln, wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und mit 40 nM der CTGF-859 siRNA transfiziert, mit dem Unterschied, dass in diesem Fall serumfreies Medium verwendet wurde. Zudem wurden nach 6 h Transfektionszeit 1,5 ml Medium mit TGF-β2 zu den Zellen gegeben, so dass eine TGF-β2 Endkonzentration von 1 ng/ml erreicht wurde. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und anschließend für eine mRNA-Extraktion geerntet.

### **3.3.5.5 Stabile Transfektion des pSiCTGF-Vektors**

Zur Herstellung einer Zelllinie mit einem permanenten Knockdown von CTGF wurden ebenfalls HTM5-Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgebracht. Für jedes Well wurden 2 µg pSiCTGF-Vektor, 2 µl Lipofectamin 2.000 und 500 µl DMEM (+ 10 % (v/v) FKS) gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung für 6 h auf die Zellen gegeben. Danach wurden weitere 1,5 ml Medium zugegeben und nach 24 h weiterer Inkubation 250 µg/ml Hygromycin zur Selektion der transfizierten Zellen dem Medium hinzugefügt. Um ein konfluentes Wachstum zu ermöglichen, wurden die überlebenden, nun als pSiCTGF bezeichneten Zellen, nach einer Woche gesplittet und auf Kulturflaschen neu ausgesät. Die Effizienz des CTGF- Knockdowns wurde durch qPCR und Western Blot überprüft.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Proteinisolation mittels RIPA-Puffer**

Sowohl TWZ als auch HTM5-Zellen wurden aus 6-Well-Platten geerntet, sofern für die einzelnen Versuche nicht anders beschrieben. Die Isolation der zellulären Proteine erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS-Puffer durch direkte Lyse der Zellen in 150 (TWZ) bis 400 µl (HTM5) RIPA-Puffer pro Well. Zur Unterbindung von Proteolyse und Dephosphorylierung wurden dem Puffer 1:1.000 Protease-Inhibitor sowie 1:100 Phosphatase-Inhibitor-Cocktail zugesetzt. Nach Zugabe wurde 10 min auf Eis inkubiert, mit einem Zellschaber eventuell noch adhärierende Zellen abgekratzt und die Suspension anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zellfragmente wurden bei 13.000 Upm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die isolierten Proteine wurden bis zu ihrer Analyse bei -80 °C gelagert.

### 3.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

#### 3.4.2.1 BCA-Assay

Zur Bestimmung des absoluten Proteingehalts der Zellaufschlüsse wurde ein Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid, BCA) Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) in 96-Well-Platten durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Bildung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexen mit den vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, welche eine Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  zur Folge haben. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Mit Hilfe der Bicinchoninsäure, die unter alkalischen Bedingungen violette Komplexe mit Kupfer-(I) bildet und die bei einer Messung der optischen Dichte bei 560 nm nachgewiesen werden kann, wird indirekt das vorhandene Protein sichtbar gemacht (Smith *et al.* 1985). Als Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Eine BSA-Stammlösung (2 mg/ml) wurde hierfür mit RIPA auf folgende Standardkonzentrationen verdünnt: 1000  $\mu\text{g/l}$ , 900  $\mu\text{g/l}$ , 800  $\mu\text{g/l}$ , 700  $\mu\text{g/l}$ , 600  $\mu\text{g/l}$ , 500  $\mu\text{g/l}$ , 400  $\mu\text{g/l}$ , 300  $\mu\text{g/l}$ , 200  $\mu\text{g/l}$ , 100  $\mu\text{g/l}$ . In Doppelansätzen wurden jeweils 10 und 2  $\mu\text{l}$  der Proteinproben und jeweils 10  $\mu\text{l}$  der einzelnen Standardkonzentrationen auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Lösung (Reagenz A : Reagenz B = 50:1) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Proteinbestimmung in einem ELISA-Reader durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Einzelmessungen.

#### 3.4.2.2 Quantitatives Silbergel

Die Konzentration des aufgereinigten rekombinanten CTGF (s. Kap. 3.4.7) wurde mit Hilfe eines quantitativen Silbergels bestimmt. Hierzu wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  einer BSA-Verdünnungsreihe von 150  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 80  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$  in  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Waschpuffer sowie 2  $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  und 10  $\mu\text{l}$  der CTGF-Aufreinigung auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, wie unter 3.4.3.1 beschrieben, aufgetrennt und laut den Angaben unter 0 einer Silberfärbung unterzogen. Das Gel wurde im LAS 3000 digitalisiert, die Banden von BSA und CTGF wurden densitometrisch

vermessen (3.4.3.3) und anhand dessen konnte die Konzentration der CTGF-Aufreinigung berechnet werden.

### **3.4.3 Western Blot**

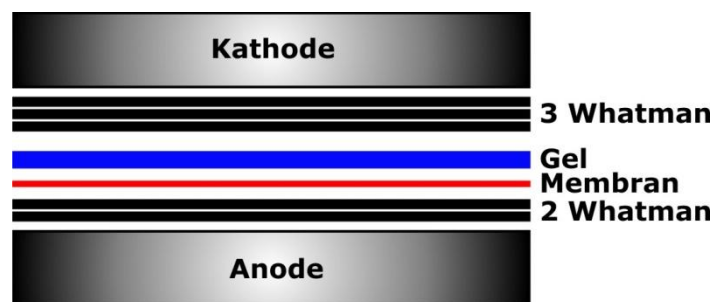
#### **3.4.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer jeweiligen Größe diente die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelelektrophorese sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Zum sogenannten Gießen eines Gels wurde eine Doppelgelsystem-Apparatur nach Anleitung aufgebaut. Danach wurde zuerst das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit ca. 300 µl Isopropanol überschichtet. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich hierbei nach der Größe des zu analysierenden Proteins und reichte von 6 – 15 % (w/v) (Tab. 7, Kap. 3.1.9). Bei Western Blots mit 6 %igen Trenngelen wurde unter dem eigentlichen Trenngel 1 ml eines 15 %igen „Bremsgels“ eingefügt, um ausreichend Proteine für eine anschließende Ladungskontrolle mittels Coomassiefärbung aufzufangen. Auch im Fall des Integrin  $\alpha$ V-Western Blots wurde auf diese Weise verfahren. Nach der Polymerisation wurde der flüssige Überstand abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel (4 %, v/v) gegeben. Im so entstandenen Zwei-Phasen-Gel werden im Sammelgel, auf Grund der zum Trenngel unterschiedlichen Porengröße, des pH-Werts und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen, die Proteine aufkonzentriert. Im Trenngel findet hingegen eine Auftrennung nach Proteingröße statt.

Das fertige Gel wurde nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1 x Elektrodenpuffer aufgefüllt. Gleiche Mengen an Proteinextrakten wurden (Ausnahme: Western Blot für die Integrin-Untereinheit  $\alpha$ V, nicht reduzierend) mit reduzierendem (20 % (v/v) Mercaptoethanol) Lämmli-puffer versetzt, 10 min in kochendem Wasser denaturiert und zusammen mit 3 µl Proteinmolekulargewichtsmarker in die Geltaschen geladen. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für 1 bis 1,5 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen.

### 3.4.3.2 Semidry-Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel mittels Elektroblothing auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Eine Ausnahme bildete hier der Integrin  $\alpha V$  Western Blot. Hier wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Durchgeführt wurde dies in einer Semidry Blotting Apparatur. Die PVDF-Membran wurde dazu auf die Größe des Trenngels gebracht und kurz mit Methanol getränkt. Dieser Schritt entfiel bei Verwendung der Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit Transferpuffer äquilibriert. Die zusätzlich benötigten Whatman-Papiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet. Der Blot wurde wie folgt zusammengebaut:



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau einer Semidry-Western Blot-Apparatur

Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Geblottet wurde für 90 min bei 25 V.

### 3.4.3.3 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Zum Nachweis der spezifischen Proteinbanden wurde ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein verwendet. Der gebildete Antikörper-Antigen-Komplex wurde dann von einem, für den Primärantikörper spezifischen, Sekundärantikörper gebunden. Durch die Koppelung des Sekundärantikörpers mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konnte dieser, bei Zugabe eines HRP Substrats, durch ein Chemilumineszenz-Signal detektiert werden. Dieses Lumineszenzsignal tritt bei Umsetzung Substrats in seine oxidierte Form auf, welche durch die Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird.

Konkret wurden die Membranen nach dem Semidry-Blot zunächst 5 min in TBST-Puffer gewaschen und für 1 h abhängig vom jeweilig verwendeten Antikörper in 5 % (w/v) Magermilch oder 5 % (w/v) BSA in TBST-Puffer blockiert. Die verwendeten Antikörper sowie die jeweiligen Inkubationsbedingungen sind in Tab. 10, Kap. 3.1.9 aufgelistet. Danach wurde mit Primärantikörper ü. N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 4 x 5 min mit TBST gewaschen und die Membran anschließend mit dem HRP konjugierte Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut 4 x 5 min mit TBST gewaschen.

Zur Detektion mittels HRP wurden die Membranen nach dem letzten Waschschrift mit 1 ml HRP Substrat versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem LAS 3000 aufgenommen und digitalisiert. Die Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde mit der Software Aida Image Data Analyzer durchgeführt, um mögliche Änderungen in der Expression der Proteine nachzuweisen.

#### **3.4.3.4 Coomassiefärbung zur Ladungskontrolle**

Mittels Coomassie-Färbung (Maniatis *et al.* 1989) wurden zum einen Proteine zur Ladungskontrolle auf PVDF-Membranen nachgewiesen. Zum anderen diente die Färbung zum Auswerten von Zymogramm-Versuchen. Die Färbung der PVDF-Membranen erfolgte nach dem Nachweis spezifischer Proteinbanden zur Ladungskontrolle. Für die Coomassie-Färbung wurden die Zymogramm-Gele bzw. die PVDF-Membranen in die Coomassie-Färbelösung gegeben und bei RT für mindestens 60 min inkubiert. Darauf folgend wurde die Färbelösung abgegossen und mit Entfärbelösung für 20 bis 30 min unter ständigem Schütteln gewaschen. Die Membranen bzw. Gele wurden anschließend getrocknet und mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box digitalisiert.

Im Falle der Integrinuntereinheit  $\alpha_V$  konnte aufgrund des Transfers auf Nitrozellulose keine Coomassiefärbung durchgeführt werden. Zur Normalisierung diente hier eine anschließende Markierung und Vermessung der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH).



### 3.4.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen wurde nach der Methode von Heukeshoven und Dernick durchgeführt (Heukeshoven und Dernick 1988). Hierfür wurde das Gel einem einstündigen Fixierschritt in Fixierlösung I und Fixierlösung II unterzogen. Nach dreimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O, wurde das Gel für 20 min in Silbernitrat-haltiger Färbelösung inkubiert, wodurch sich die Silberionen an die Proteine anlagerten. Durch die Zugabe von Entwicklungslösung wurden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert, das dabei als brauner Niederschlag ausfiel. Sobald die Färbung intensiv genug war, wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet. Eine abschließende Behandlung mit Konservierungslösung ermöglichte die langfristige Archivierung der Gele.

Zeitlicher Ablauf Silberfärbung	
Fixierlösung I	30 min
Fixierlösung II	30 min
H <sub>2</sub> O	3 x 5 min
Silberlösung	20 min
H <sub>2</sub> O	2 x 1 min
Entwicklungslösung	5-20 min
Stopplösung	10 min
H <sub>2</sub> O	3 x 5 min
Konservierungslösung	30 min - ü. N.

**Tab. 23:** Inkubationszeiten einzelner Puffer in der Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

### 3.4.5 RhoA-Aktivitätsassay

Die Messung der Aktivität der kleinen GTPase RhoA erfolgte mit Hilfe des Rho Activity Assay Kits. Hierbei wird aktiviertes RhoA von Rhotekin RBD-(RhoA-GTP Binding Domain), einer kurzen RhoA-GTP-bindenden Peptidsequenz gebunden. Das Rhotekin RBD ist an Agarosebeads gekoppelt, mit deren Hilfe der sich bildende Komplex aus dem Proteingemisch durch Zentrifugation isoliert werden kann. Die Quantifizieren erfolgt anschließend über eine reguläre Western Blot-Analyse mit einem spezifischen Antikörper gegen RhoA.

Zur Durchführung wurden HTM5- sowie pSiCTGF-Zellen in Kulturflaschen ausgesät und bis zur Konfluenz in serumhaltigem Medium inkubiert. Nach 24 h

Inkubation in serumfreiem Medium wurden die Zellen für 3 h mit 50 ng/ml CTGF behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von jeweils 500 µl 1 x MLB. Nach dem Abspateln wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und Zellfragmente für 10 min bei 10.000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Jeweils 500 µl des Überstands wurden mit 7,5 µl Rhotekin RBD-Agarose versetzt und für 1 h bei 4 °C unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Agarose mit den daran gebundenen Proteinen wurde bei 5.000 Upm und 4 °C für 10 s abzentrifugiert und dreimal mit 1 x MLB gewaschen. Zum Lösen des gebundenen RhoA wurden jeweils 50 µl 2 x Lämmli-Puffer, versetzt mit 0,1 M Dithiothreitol, zugegeben und 10 min in kochendem Wasser inkubiert. Anschließend wurden jeweils 25 µl auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und weiter entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll für Western Blot-Analysen verfahren. Die PVDF-Membranen wurden nach dem Blotvorgang in 5 % (w/v) Magermilch in TBS-Puffer blockiert und ü. N. mit Maus anti RhoA-Antikörper 1:333 verdünnt in Blockierungspuffer inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von HRP-gekoppelten Huhn anti Maus Sekundärantikörpern 1:2.000 verdünnt in Blockierungspuffer. Die densitometrische Auswertung erfolgte wiederum wie oben beschrieben. Zur Kontrolle wurden in einem zweiten Western Blot je Behandlung 25 µl Zelllysate ohne vorherigen Pulldown aufgetragen und auf die gleiche Art und Weise entwickelt.

### 3.4.6 Zymographie

Die Zymographie ist eine einfache Methode zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität von Proteinasen. Im Speziellen wird die Gelatine-Zymographie zur Analyse von Matrix-Metalloproteinasen verwendet. Sie basiert auf der Kollagen-abbauenden enzymatischen Reaktion, die von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) katalysiert wird und innerhalb eines Polyacrylamidgels ablaufen kann.

Hierzu wurden Zellüberstände zu je 10 µl mit nicht reduzierendem Lämmli-Puffer versetzt, bei 37 °C für 15 min inkubiert und auf ein mit 0,1 % (w/v) Gelatine versetztes SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA für 1,5 h bei 4 °C. Das Gel wurde nun für 30 min in 2,5 % (v/v) Triton-X 100 gewaschen und ü. N. bei 37 °C in Aktivierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt und in Coomassie-

Entfärbelösung entfärbt. Die Anwesenheit von aktivierten MMPs wurde durch ungefärbte Banden angezeigt.

### **3.4.7 Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem humanem CTGF**

Für die Produktion von CTGF wurden HEK293-Zellen verwendet. Humane CTGF-cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA<sup>TM</sup>3.1/myc-His (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert, wodurch der codierenden Sequenz des CTGF-Gens am 3'-Ende zusätzlich ein c-myc- und ein 6 x His-Epitop angefügt wurde. HEK293 Zellen wurden nun auf 6-Well-Platten ausgesät und bis 70 % Konfluenz kultiviert. Für die Transfektion wurden pro Well 1 µg pcDNA<sup>TM</sup>3.1/CTGF-myc-His zusammen mit 2 µl Lipofectamin 2.000 (Invitrogen, Karlsruhe) für 15 min in 500 µl DMEM + 10 % (v/v) FKS bei RT inkubiert und dann für 6 h auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden weitere 1,5 ml Medium zugegeben und nach 24 h Inkubation 250 µg/ml G418 zur Selektion der transfizierten Zellen hinzugefügt.

Um die Zelllinie mit der höchsten CTGF-Expression zu ermitteln, wurden die Zellen für 24 h serumfrei inkubiert und anschließend jeweils 30 µl des Mediums mittels Western Blot auf den CTGF-Gehalt überprüft. Die Linie mit der höchsten Expression wurde sowohl in TripleFlasks als auch in FibraStrage-Flaschen kultiviert. Nach jeweils einer Woche Inkubation in DMEM + 10 % (v/v) FKS + 250 µg/ml G418 wurde zweimal mit sterilem PBS gewaschen und in 500 ml serumfreiem Medium für 72 h weiter inkubiert.

Für die Isolation des rekombinanten CTGF wurde das Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) System (Äktaprime) verwendet. Hierbei wird das aufzureinigende Protein unter einem Druck von bis zu 0,5 MPa (5 bar) über eine austauschbare Chromatographiesäule gepumpt, die bestimmte Affinitäten aufweist. Anschließend kann das in der Säule verbliebene Protein durch Veränderung des pH-Wertes, Salzgehaltes oder durch eine verdrängende Substanz eluiert und aufgefangen werden. Der Proteingehalt der eluierten Lösung kann über die Messung der UV-Absorption bei 254 und 280 nm ermittelt werden.

Im konkreten Fall der CTGF-Aufreinigung aus konditioniertem HEK293-Medium wurde wie folgt verfahren. 500 ml Zellüberstand wurden zu je 50 ml in 50ml-Röhren bei 10.000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, um Zellen und andere feste

Bestandteile zu entfernen. Anschließend wurden zusätzlich unter Anlegen einer Wasserstrahlvakuumpumpe durch eine 0,45 µm PVDF-Membran weitere Schwebstoffe abfiltriert. Eine mit Heparin gekoppelte Chromatographiesäule (HiTrap Heparin HP column, 5 ml) wurde in die Äktaprime eingelegt, mit 50 ml Heparin-Waschpuffer äquilibriert und anschließend mit 500 ml Medium bei einer Flussrate von 5 ml/min und 4 °C beladen. Mit Waschpuffer wurde nun nachgespült, bis die UV-Absorption wieder den Nullwert erreicht hatte. Sämtliche gebundene Proteine wurden durch Heparin-Elutionspuffer vollständig eluiert, 1:10 in Waschpuffer verdünnt und nochmals auf die Heparinsäule geladen. Für die zweite Elution wurde diesmal ein Gradient von 0,3 - 2,0 M NaCl angelegt und das Eluat in Fraktionen zu jeweils 1 ml aufgefangen. Diese wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Silberfärbung auf ihren Gehalt an CTGF analysiert. Zur Detektion des CTGF im Western Blot wurden sowohl Antikörper gegen das CTGF-Protein, als auch gegen den c-myc-Tag und den His-Tag (mouse anti penta-His) verwendet. CTGF-positive Fraktionen wurden vereinigt und 1:10 in Nickel-NTA-Waschpuffer verdünnt. Eine mit Nickel-NTA beladene Chromatographiesäule (HiTrap FF crude column, 5 ml) wurde in die Äktaprime eingelegt und mit 50 ml Nickel-NTA-Waschpuffer äquilibriert. Die vereinigten und verdünnten Fraktionen wurden nun mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die Nickel-NTA-Säule geladen. Die Säule wurde anschließend mit Waschpuffer gespült bis die UV-Absorption den Nullwert erreichte. Danach wurden die verbliebenen, an die Säule gebundenen Proteine mit einem Gradient von 0 - 250 mM Imidazol eluiert und zu Fraktionen von je 1 ml aufgefangen. Diese wurden wiederum wie oben beschrieben analysiert und diejenigen Fraktionen, in denen außer CTGF keine weitere Proteinverunreinigung zu detektieren war, wurden vereinigt und in einem SpectraPor6 Dialyseschlauch (25 kDa MWCO) gegen 5 l Nickel-NTA-Waschpuffer mit einem Zusatz von 0,01 % (v/v) Tween 20 ü. N. bei 4 °C dialysiert, um das Imidazol weitestgehend zu entfernen. Die CTGF-Lösung wurde nun mit Hilfe eines 0,45 µm Sterilfilter keimfrei gemacht und zu je 150 µl in sterilen PCR-Cups aliquotiert. Die Konzentration des CTGF wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung bestimmt (s. 0). Die Lagerung des rekombinanten CTGF erfolgte bei -20 °C.

### **3.5 Analyse von Mäusen mit spezifischer CTGF-Überexpression in den Linsenzellen des Auges**

#### **3.5.1 Tierhaltung**

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in Einklang mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Sie wurden alle in demselben Raum unter standardisierten Bedingungen (Temperatur  $23 \pm 2$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %, Futter und Wasser *ad libitum*) bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Zur Zucht wurden jeweils transgene Mäuse, die spezifisch CTGF mit Hilfe des  $\beta$ B1-Crystallin-Promotors in der Linse überexprimieren ( $\beta$ B1-CTGF-Mäuse), mit Wildtyp-Tieren des FVBN-Stamms verpaart. Hierdurch wurde gewährleistet, dass bei der Analyse der transgenen Tiere jeweils Wildtypkontrollen aus dem gleichen Wurf zur Verfügung standen. Neue Würfe wurden drei Wochen nach Geburt geschlechtlich getrennt in neue Käfige überführt und anschließend genotypisiert. Die Tötung der Tiere erfolgte immer zum gleichen Tageszeitpunkt durch Genickbruch. Die Augen wurden sogleich schonend enukleiert.

#### **3.5.2 Genotypisierung von $\beta$ B1-CTGF-Mäusen**

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR mit genomischer DNA aus Mausschwänzen. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, mit einer sterilen Präparationsschere 0,5 cm der Schwanzspitze entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse des Gewebes wurden 200  $\mu$ l Proteinase K Lysepuffer zugegeben und ü. N. im Schüttler bei 1.200 Upm und 55 °C lysiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte anschließend für 15 min bei 95 °C. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10.000 Upm für 10 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Die Genotypisierungs-PCR wurde mit einem spezifischen Primerpaar durchgeführt, welches in der Lage war in der dem Konstrukt eingefügten SV40-Sequenz zu binden. Die PCR verlief nach dem in Tab. 24 angegebenen Protokoll.

<b>Mausschwanz-PCR</b>	
DNA (1:20)	2 µl
10x PCR-Puffer	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6 µl
dNTPs (10mM)	0,3 µl
5 x Glycerol	3 µl
Taq DNA Polymerase	0,3 µl
SV40 fw (1:10)	0,3 µl
SV40 rev (1:10)	0,3 µl
H <sub>2</sub> O	6,7 µl

<b>Mausschwanz-PCR Cyclerprogramm</b>			
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Zyklen</b>
Aufschmelzen	95 °C	10 s	35
Annealing	55 °C	30 s	
Amplifikation	72 °C	60 s	
abschl. Amplifikation	72 °C	10 min	1

**Tab. 24:** Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm zur Genotypisierung von  $\beta$ B1-CTGF-Überexpressionsmäusen

Jeweils 15 µl des PCR-Ansatzes wurden nach dem Lauf mit 3 µl Auftragspuffer versetzt, auf ein 1 %iges Ethidiumbromid-Agarosegel geladen und die PCR-Produkte bei 120 V für 45 min aufgetrennt. Bei einem transgenen Tier waren unter UV-Licht Banden bei einer Höhe von 300 bp zu erkennen.

### 3.5.3 Messung des intraokulären Drucks

Die Messung des IOD bzw. Augeninnendrucks erfolgte mittels Applationstonometrie nach Goldmann (Moses 1958). Bei dieser Untersuchung wird die Kraft gemessen, die notwendig ist, die plane Vorderfläche eines Messstiftes mit definiertem Durchmesser mit der Hornhaut in Kontakt zu bringen und diese abzuplatten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein TonLab Tonometer verwendet. Bei diesem Gerät wird die Kraft des Abpralls des Messstiftes von der Cornea des Auges ermittelt. Der Endwert wird aus 6 Einzelmessungen gemittelt und in mmHg angegeben.

Da der IOD im Laufe des Tages zyklisch schwanken kann, wurden die Messungen jeweils um 13 Uhr durchgeführt, um Verfälschungen der Messergebnisse zu vermeiden. Vor der Messung wurden die Tiere durch intraperitoneale Gabe einer Mischung aus 6 – 8 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 90 – 120 mg/kg Körpergewicht

Ketamin in tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurden je Auge vier Endwertmessungen des Augeninnendrucks durchgeführt und die Mittelwerte aus diesen Messungen in die statistische Auswertung eingebracht.

### **3.5.4 CTGF-Expressionsanalyse**

Die Stärke der CTGF-Expression im Auge der einzelnen Linien wurde durch Analyse der mRNA-Expression in der Linse sowie im restlichen Auge mittels Northern Blot bestimmt. Bei der im Weiteren analysierten Linie 5 wurde zudem der tatsächliche CTGF-Gehalt im KW durch Western Blot-Analyse quantifiziert.

Zur Entnahme des KW wurden die bei Punkt 3.5.3 bereits narkotisierten Tiere verwendet. Mit einer 34-Gauge-Nadel, die über einen dünnen Schlauch mit einer Hamilton-Spritze verbunden war, wurde die vordere Augenkammer punktiert und das KW abgezogen. Anschließend wurden die Tiere durch Genickbruch getötet und die Augen für die Extraktion der RNA wie unter 3.3.1 beschrieben entnommen. Um ausreichend Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zu erhalten wurden KW und Gewebeproben von jeweils vier transgenen, bzw. Wildtyp-Tieren aus einem Wurf vereinigt. Sofern die weitere Verarbeitung nicht sofort erfolgte, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **3.5.5 Herstellung von immunhistochemischen Präparaten**

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die entnommenen Augen für 1 h in PFA-Fixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Augen mit PBS gespült und halbiert. Hierdurch konnte die Linse leicht entfernt werden, welche beim späteren Gefrierschneiden leicht brechen würde. Zur Stabilisierung der Gewebe wurden die Augen jeweils für 4 h bei RT mit aufsteigenden Konzentrationen einer Sucrose-Lösung (10 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer; 20 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer und 30 % (w/v) Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer) behandelt. Anschließend wurden die Augen in Tissue-Tek® eingebettet, direkt im Kryostat eingefroren und bei -20 °C gelagert.

### 3.5.6 Färbungen von Gefrierschnitten

Die Herstellung der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Microm HM 500 OM Kryostats. Diese wurden daraufhin auf Objektträger aufgenommen, kurz bei RT angetrocknet und für 1 - 5 min mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült, wodurch das Einbettmedium entfernt wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift (PapPen) umrandet. Danach wurden sie für 1 h bei RT auf dem Schüttler blockiert. Anschließend wurde die Lösung von den Schnitten entfernt und der Primärantikörper (verdünnt in 1:10 Blockierungslösung in 0,1 M Phosphatpuffer) wurde auf die Schnitte gegeben. Die Negativkontrolle wurde nur mit 1:10 Blockierungslösung inkubiert. Nach der Inkubation ü. N. bei 4 °C wurden die Schnitte für 3 x 5 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurde der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper (verdünnt in 1:10 Blockierungslösung mit 0,1 M Phosphatpuffer) auf die Schnitte pipettiert und 45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift für 3 x 5 min in 0,1 M Phosphatpuffer. Abschließend wurden die Schnitte mit 1:10 DAPI in Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt und bis zur Analyse der Gewebe bei 4 °C gelagert.

### 3.6 Anzahl der Experimente und statistische Auswertung

Alle Zellbehandlungen wurden an Primärkulturen von jeweils drei verschiedenen Spendern sowie an der immortalisierten Zelllinie HTM5 durchgeführt. Northern sowie Western Blot Experimente wurden jeweils mit mindestens drei unabhängigen Probensätzen durchgeführt. qPCR-Versuche wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und mit mindestens drei unabhängigen Probensätzen wiederholt. Zur Statistischen Analyse der Daten wurde der Student'sche T-Test herangezogen.

Die in den Ergebnissen angegebenen Veränderungen der Expressionen, Aktivitäten, Proliferation, Adhäsion, Phosphorylierung sowie des Migrationsverhaltens beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die unbehandelte bzw. nicht transfizierte oder Wildtyp-Kontrolle, deren Wert auf 1 gesetzt wurde.



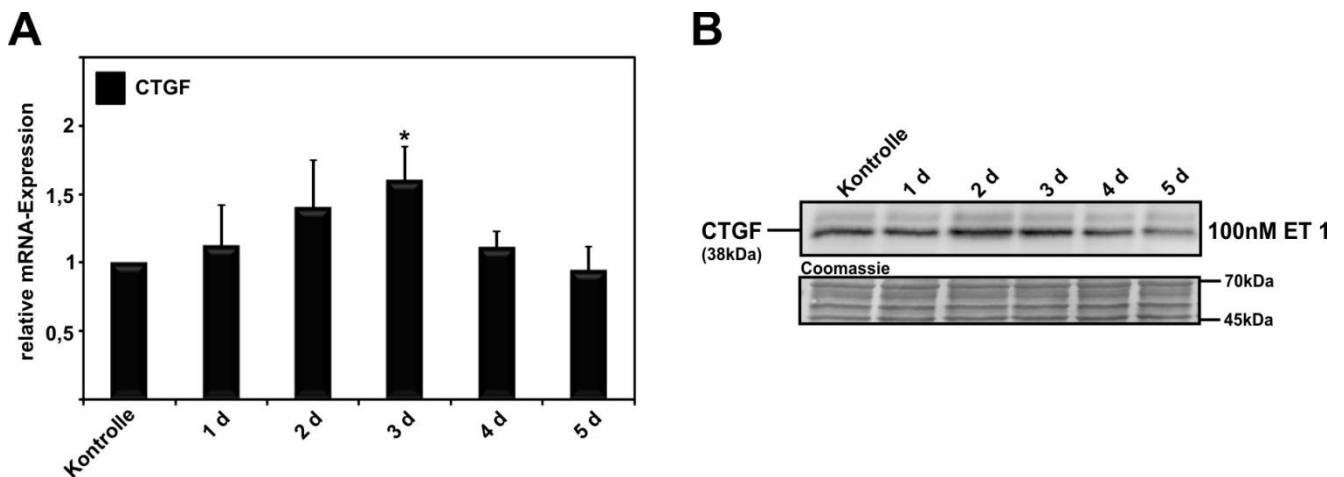
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Induktion der CTGF-Expression im humanen Trabekelwerk

Die CTGF-Expression kann laut Untersuchungen an verschiedenen humanen Zelllinien durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren sowie anderen externen Stimuli induziert werden. In diesem ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Faktoren, die eine Relevanz in Zusammenhang mit dem POWG aufweisen, auch für die Induktion von CTGF im TW relevant sein könnten, da bisher lediglich TGF- $\beta$  und zyklischer mechanischer Stress als potente Aktivatoren der CTGF-Expression im TW galten (Chudgar *et al.* 2006).

In glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass Endothelin-1 die Expression von CTGF zu induzieren vermag, ein Effekt der offenbar über den RhoA/ROCK-Signalweg vermittelt wird (Rodriguez-Vita *et al.* 2005). Ein analoger Effekt in TWZ könnte für das Abflusssystem des KWs sehr relevant sein, da Endothelin-1, im Ziliarkörper gebildet (Eichhorn und Lutjen-Drecoll 1993) und in das KW freigesetzt wird (Lepple-Wienhues *et al.* 1992). Im KW von Glaukompatienten wurden zudem erhöhte Konzentrationen von Endothelin-1 nachgewiesen (Noske *et al.* 1997). In Trabekelzellen bewirkt Endothelin-1 eine Zellkontraktion (Lepple-Wienhues *et al.* 1991) was in direkter Folge den trabekulären Abflusswiderstand erhöhen könnte (Wiederholt *et al.* 2000).

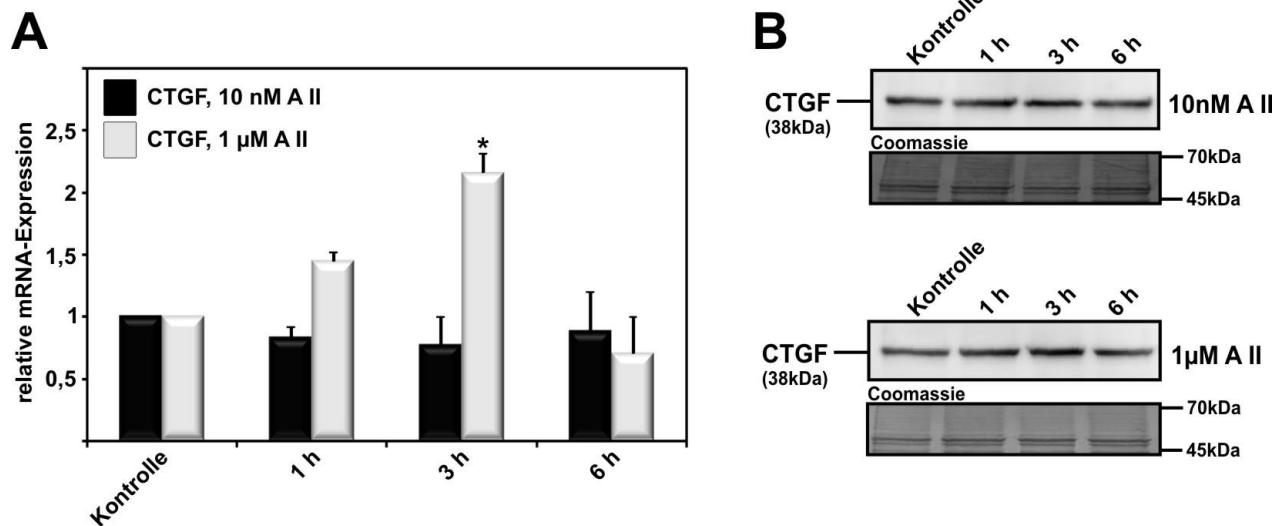
Humane TWZ wurden mit Endothelin-1 für 1 bis 5 d und einer Konzentration von 100 nM behandelt. Die CTGF-Expression wurde mittels qPCR sowie Western Blot analysiert. Die Endothelin-Behandlung zeigte einen nur leichten Effekt auf die CTGF-Produktion. Nach 2 und 3 d Inkubation mit einer Konzentration von 100 nM konnte ein leichter Anstieg der CTGF-mRNA ( $1,6 \pm 0,3$ ; Abb. 6A) festgestellt werden. Dieser Befund konnte auf Proteinebene durch Western Blot-Analysen bestätigt werden ( $1,8 \pm 0,2$ ; Abb. 6B).



**Abb. 6:** Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit 100 nM Endothelin-1 (ET 1). A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) CTGF-Western Blot.

Angiotensin II vermag CTGF in glatten Muskelzellen und in Mesangiumzellen der Niere zu stimulieren. Dieser Effekt, der zu einer verstärkten Bildung von EZM führt (Ruperez *et al.* 2003; Ruperez *et al.* 2003), wird neben dem Rho/ROCK-System zudem durch den MAP-Kinase-Signalweg vermittelt (Iwanciw *et al.* 2003). Daneben induziert Angiotensin II zudem die Expression von TGF- $\beta$ 1 in humanen glatten Muskelzellen (Gibbons *et al.* 1992) sowie in Herzendothelzellen der Ratte (Chua *et al.* 1994). In Muskelzellen konnte TGF- $\beta$ 1 zudem durch Angiotensin II aktiviert werden. Ähnlich wie Endothelin-1 wird auch Angiotensin sowie das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) im Auge gebildet (Osusky *et al.* 1994), weshalb hier *in vitro* die Auswirkungen einer TWZ-Behandlung mit Angiotensin II in Bezug auf die CTGF-Expression untersucht werden sollte.

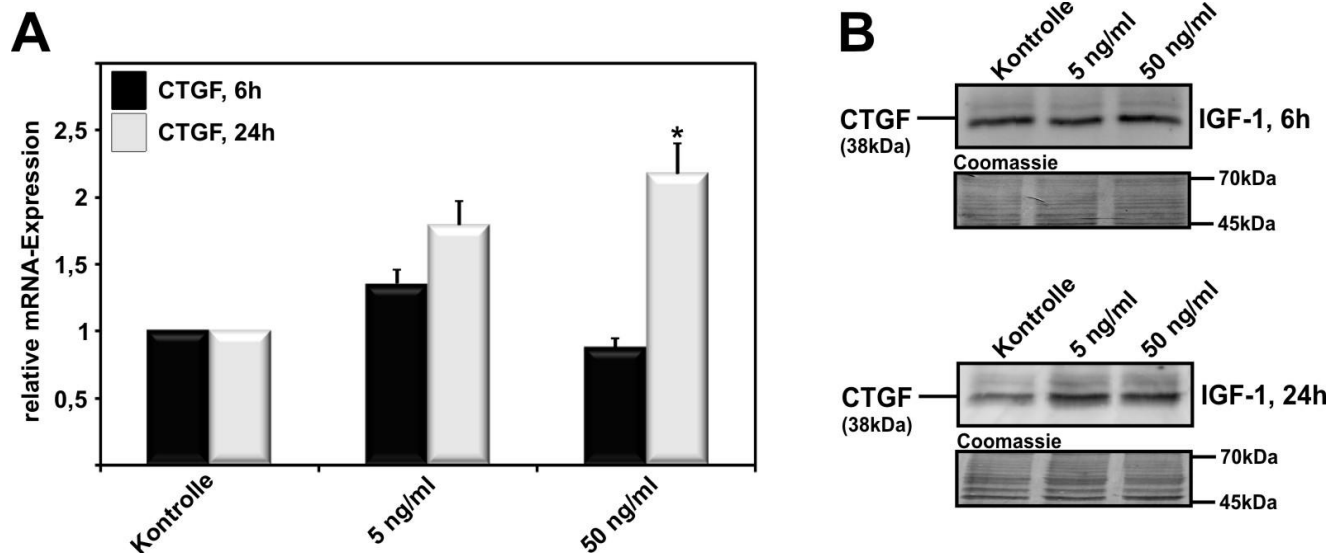
Humane TWZ wurden für 1, 3 und 6 h mit 10 nM bzw. 1  $\mu$ M Angiotensin II behandelt und die CTGF-Expression wie bereits für Endothelin-1 beschrieben analysiert. Bei einer Konzentration von 10 nM konnte im Western Blot nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg von CTGF nach 1 und 3 h detektiert werden (Abb. 7B). Die Expression der mRNA war unverändert (Abb. 7A). Ein signifikanter Anstieg der Expression zeigte sich erst bei der höheren Konzentration von 1  $\mu$ M und einer Behandlungsdauer von 3 h. Hier stieg die Expression der CTGF-mRNA auf das  $2,16 \pm 0,15$ -fache, während sich die Menge an CTGF-Protein auf das  $2,6 \pm 0,6$ -fache erhöhte. Nach einer Behandlungsdauer von 6 h fiel die Expression wieder auf das Niveau der Kontrolle ab (Abb. 7A, B).



**Abb. 7:** Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit 10 nM und 1 μM Angiotensin II (A II). A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) CTGF-Western Blots.

Ein weiterer Faktor, der in der Lage ist, Einfluss auf die CTGF-Expression und damit auf das Risiko der vermehrten Produktion EZM zu nehmen, ist der Insulinartige Wachstumsfaktor 1 (IGF-1). IGF-1 wird zusammen mit dem entsprechenden IGF-Rezeptor auch im menschlichen TW gebildet (Wordinger *et al.* 1998; Cao *et al.* 2002). Der Faktor konnte bereits im KW lokalisiert werden (Koliakos *et al.* 2001). Zudem wurde CTGF aufgrund seiner ILGF-bindenden Domäne den IGF-Binding Proteins (IGFBP-8) zugeordnet (Kim *et al.* 1997) und vermag vermutlich über die Bindung an IGF-1 dessen Funktionalität zu beeinflussen (Zhou *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Effekt von IGF-1 auf die Expression von CTGF in humanen TWZ untersucht werden.

Humane TWZ wurden für 6 und 24 h mit IGF in den Konzentrationen 5 und 50 ng/ml behandelt. Nach 6 h Behandlungsdauer konnte keine Veränderung der CTGF-Expression beobachtet werden (Abb. 8A, B). Bei einer Inkubationszeit von 24 h führte IGF-1 zu einem Anstieg in der Expression. Dabei erreichte diese ihr Maximum für die transkriptionelle Ebene mit dem  $2,2 \pm 0,2$ -fachen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei einer Behandlung mit 50 ng/ml, während sich bei einer Behandlung mit 5 ng/ml eine Erhöhung auf das  $1,8 \pm 0,2$ -fache zeigte (Abb. 8A). Der CTGF-Proteinanteil der Zelle stieg sowohl bei einer IGF-Konzentration von 5 ng/ml als auch von 50 ng/ml auf das  $2,1 \pm 0,3$  bzw.  $2,1 \pm 0,26$ -fache an (Abb. 8B).



**Abb. 8:** Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit IGF-1 für 6 und 24 h. A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) CTGF-Western Blots.

## 4.2 Der Einfluss von CTGF auf die Komponenten der extrazellulären Matrix<sup>1</sup>

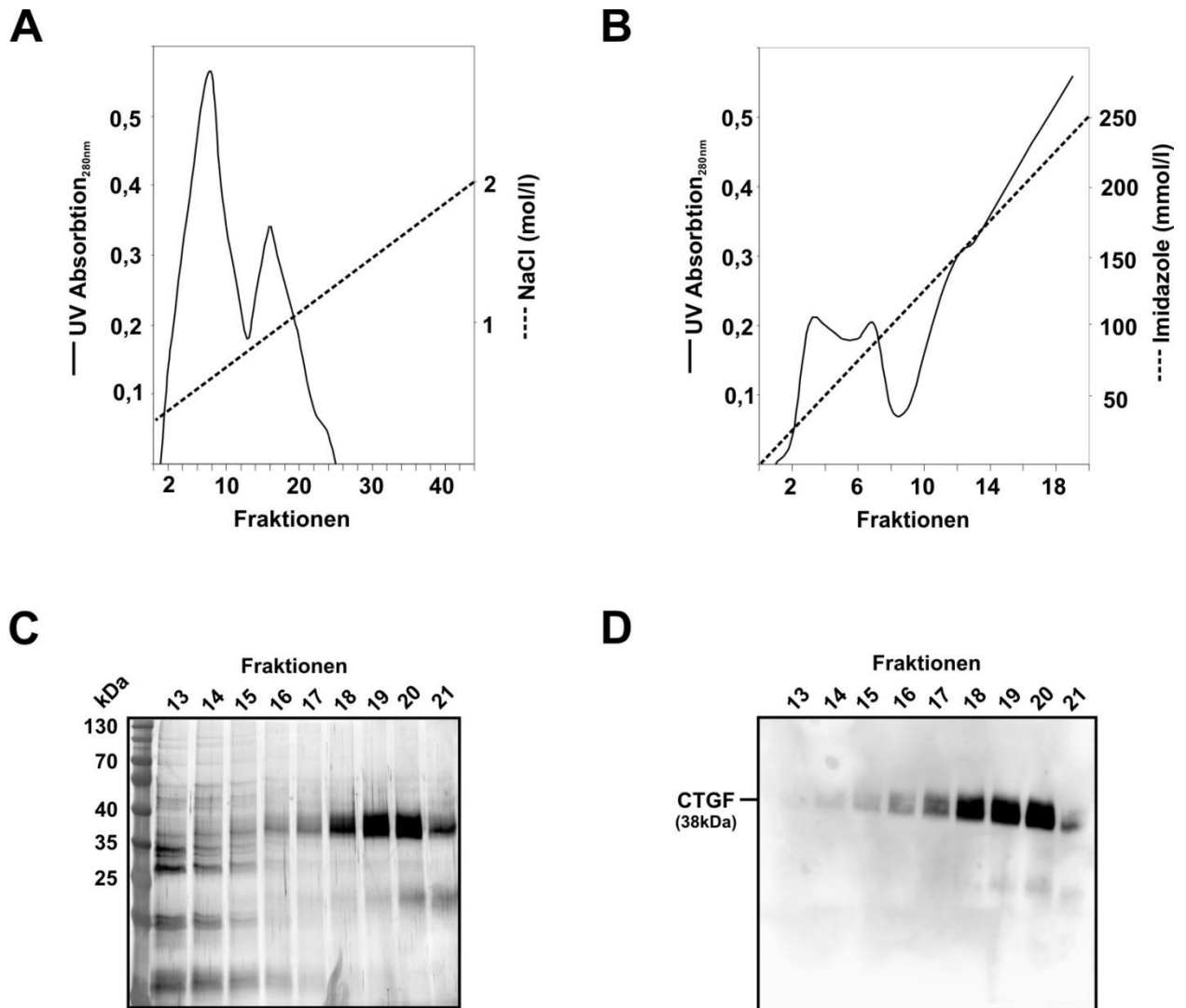
### 4.2.1 Herstellung von rekombinantem CTGF

Die CTGF-überexprimierende Zelllinie (HEK293-pCTGF) war bereits zu Beginn dieser Arbeit etabliert und die Produktion sowie die Sekretion von CTGF in den Zellüberstand nachgewiesen. Das rekombinante CTGF wurde über eine dreistufige Chromatographie aus dem Zellüberstand der HEK293-pCTGF-Zellen aufgereinigt. Diese wurden in TripleFlasks und im FibraStage-Kultursystem kultiviert. In einem ersten Schritt wurden bis zu 2 l des zentrifugierten und filtrierten Mediums auf eine Heparinsäule geladen. Bei dieser Säule wurde die Affinität der C-terminalen Domäne des CTGF zu Heparin bzw. Heparinsulfatproteoglykanen ausgenutzt (Ball *et al.* 2003). Nicht-affine Proteine und Mediumbestandteile wurden anschließend durch Spülen mit Waschpuffer entfernt. Da nicht-kovalente Proteinbindungen empfindlich auf eine Veränderung des pH-Werts sowie der Salzkonzentration reagieren, konnte durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 2 M die Bindung zwischen CTGF

<sup>1</sup> Veröffentlicht in Junglas, B., A. H. Yu, U. Welge-Lussen, E. R. Tamm and R. Fuchshofer (2009). "Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 88(6): 1065-75.

und Heparin aufgehoben werden. Das Eluat wurde im Waschpuffer verdünnt, um wiederum eine physiologische Salzkonzentration herzustellen und erneut auf die Säule geladen. Diesmal erfolgte die Elution des gebundenen CTGF über einen Gradienten von 0,3 bis 2 M NaCl (Abb. 9A), wobei die Analyse der Eluate mittels SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Silberfärbung bzw. Western Blot für das gewünschte Protein einen Elutionsbereich von ca. 0,7 bis 0,9 M NaCl ergab. Da noch weitere, unerwünschte Banden außer der für CTGF typischen Doppelbande bei 38 und 40 kDa (Yang *et al.* 1998; Wahab *et al.* 2001) auf dem Silbergel zu sehen waren, wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt durchgeführt. Nachdem anzunehmen war, dass die verbliebenen Verunreinigungen ebenfalls eine Affinität zu Heparin aufwiesen, wurden im nächsten Schritt die Eigenschaften des dem CTGF angefügten Polyhistidin-Tags genutzt.

Die CTGF-enthaltenden Eluate wurden in Nickel-NTA Waschpuffer verdünnt und auf eine Nickel-NTA-Säule geladen. Die Histidinreste aus dem Polyhistidin-Tag waren in der Lage mit den Nickelionen der Säule einen nicht-kovalenten Komplex zu bilden, wodurch das CTGF an der Säule verblieb, während die restlichen Verunreinigungen durch Spülen mit Waschpuffer entfernt wurden. Die Elution erfolgte hier mit einem Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol (Abb. 9B), welches eine dem Histidinrest ähnliche Struktur aufweist und dadurch das gebundene CTGF von der Nickel-NTA-Säule verdrängen konnte. Die Reinheit wurde wiederum mittels Silberfärbung (Abb. 9C) und Western Blot (Abb. 9D) bestimmt. In den Fraktionen 18-20, eluiert bei Imidazol-Konzentration oberhalb von 170 mM, war allein das CTGF-Protein ohne weitere Verunreinigungen zu detektieren. Diese Fraktionen wurden vereinigt und dialysiert. Die densitometrische Konzentrationsbestimmung ergab für das in TripleFlasks produzierte CTGF ca. 10 µg/ml, während bei der Produktion im FibraStage-Kultursystem Konzentrationen zwischen 60 und 120 µg/ml erreicht werden konnten. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden aus diesem Grunde mit letzteren Aufreinigungen durchgeführt.

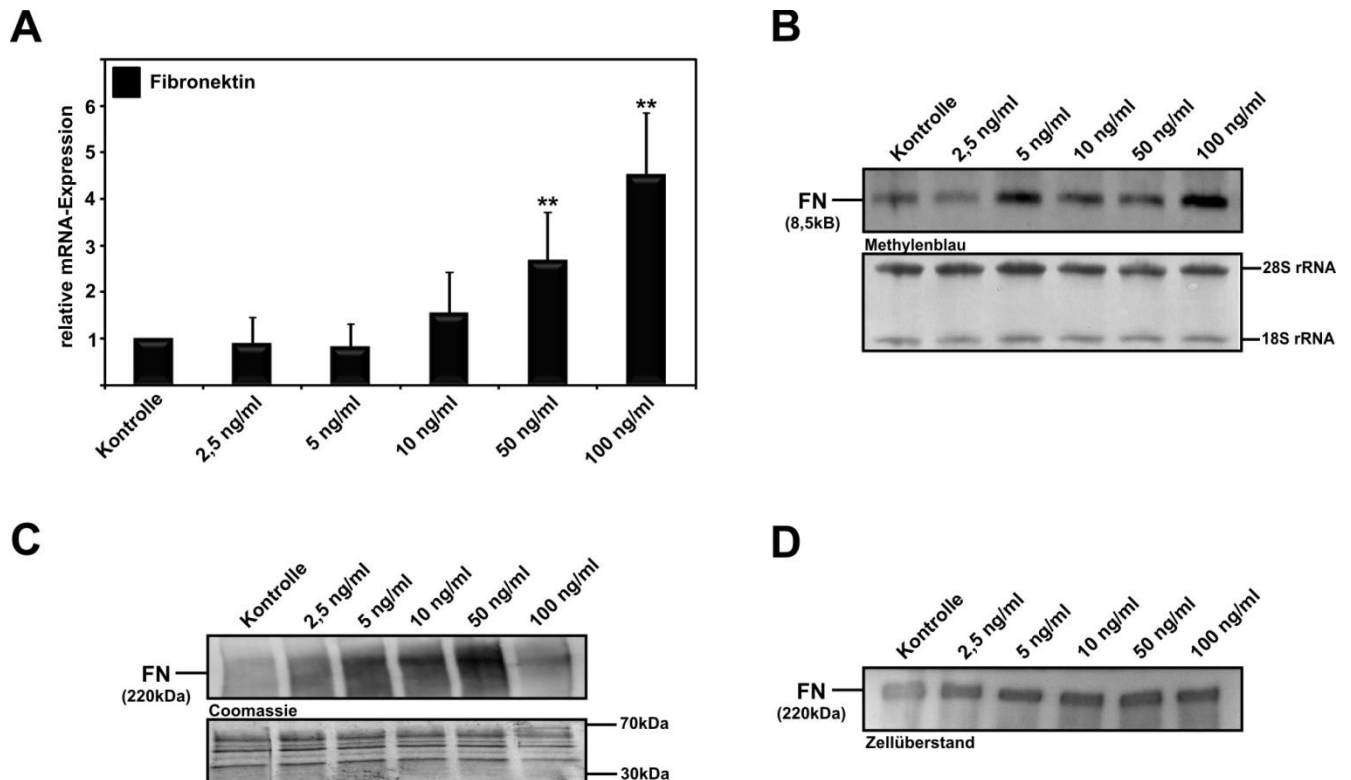


**Abb. 9:** Rekombinantes CTGF wurde mittels einer dreistufigen FPLC aufgereinigt. A) Elutionsdiagramm Heparinsäule; B) Elutionsdiagramm Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule; C) Silbergel der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Elutionsfraktionen 13-21; D) Western Blot der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Elutionsfraktionen 13-21 mit spezifischem Antikörper gegen CTGF (38 kDa).

Um den Einfluss des rekombinant hergestellten CTGF auf die Zellen des TW zu untersuchen, wurden *in vitro* Versuche an isolierten primären Trabekelwerkzellkulturen, sowie an immortalisierten TWZ (HTM5) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach einer 24-stündigen serumfreien Inkubation mit rekombinantem CTGF in Konzentrationen von 2,5 bis 100 ng/ml behandelt. Nach Isolation von RNA, Proteinen, sowie des Zellüberstands erfolgte die Analyse relevanter Veränderungen mittels Immunhistochemie, Western Blot, Northern Blot und qPCR, sowie mit weiteren im folgenden beschriebenen Techniken. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden, soweit nicht anders beschrieben, durch Untersuchungen an primären TWZ gewonnen, konnten aber allesamt für die immortalisierten HTM5-Zellen bestätigt werden.

#### 4.2.2 Der Einfluss von CTGF auf die extrazelluläre Matrix humaner Trabekelwerkzellen

FN stellt *in situ* einen der Hauptbestandteile der EZM in der juxtaanalikulären Region des humanen TW dar (Rodrigues *et al.* 1980; Murphy *et al.* 1987; Babizhayev und Brodskaya 1989). Sowohl die Ergebnisse der qPCR, wie auch bestätigend die des Northern Blots, zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der FN mRNA-Expression in Reaktion auf eine 24-stündige CTGF-Behandlung. Eine hohe statistische Signifikanz des Anstiegs auf das  $2,7 \pm 1,04$ - bzw.  $4,5 \pm 1,33$ -fache zeigte sich nach Behandlungen mit 50 und 100 ng/ml CTGF (Abb. 10A, B). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Western Blot-Untersuchungen. In den Zellextrakten konnte neben dem gerade in den Zellen synthetisierten FN zudem dasjenige nachgewiesen werden, welches von den Zellen in Richtung des Bodens der Kulturschale abgegeben wurde, bzw. welches noch durch Zell-Matrix-Kontakte in Verbindung mit den Zellen stand. Hier erreichte die Expressionssteigerung mit dem  $2,5 \pm 0,8$ -fachen ihr Maximum bei einer Behandlung mit 50 ng/ml (Abb. 10C). In parallelen Experimenten wurde zudem untersucht, wie viel FN von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben wurde. Wie bei den Zellextrakten zeigte sich auch hier ein maximaler Anstieg auf das  $2,2 \pm 1,0$ -fache bei einer CTGF-Konzentration von 50 ng/ml (Abb. 10D).



**Abb. 10:** Änderung der Fibronectinexpression nach Behandlung von TWZ mit CTGF für 24 h. A) qPCR. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\*p < 0,05; \*\*p < 0,02). B) Northern Blot; C) Western Blot mit RIPA-Zellysate; D) Western Blot mit Zellüberstand.

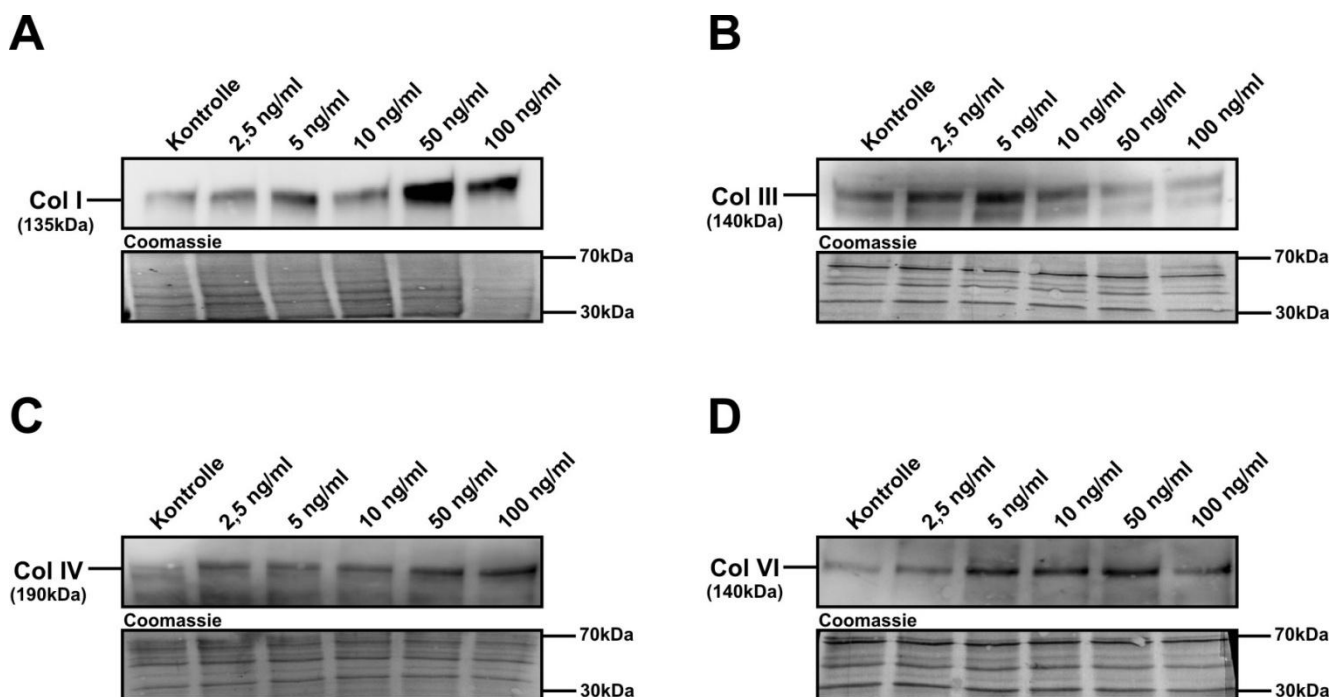
Vergleichbare Daten konnten für die Kollagene des Typs I und III gewonnen werden. Diese Strukturproteine sind hauptsächlich in den gestreiften Kollagenfasern der Bindegewebslamellen des korneoskleralen TW zu finden (Marshall *et al.* 1991). In Western Blot Analysen konnte die für die Kollagenuntereinheit  $1\alpha 1$  typische Bande bei 135 kDa in Zellextrakten detektiert werden (Abb. 11A). Durch Behandlung mit CTGF kam es zu einer Steigerung der Expression auf das  $3,5 \pm 1,4$ -fache. Wie auch bei FN wurde dieses Maximum bei einer CTGF-Konzentration von 50 ng/ml erreicht, wohingegen die Bande der  $\text{Col}3\alpha 1$ -Untereinheit des Kollagens Typ III (140 kDa) die höchste Intensität  $1,6 \pm 0,4$ -fach bei einer Behandlung mit 5 ng/ml aufwies. Bei CTGF-Konzentrationen von 50 und 100 ng/ml konnte keine Steigerung der Expression detektiert werden (Abb. 11B).

Kollagene des Typs IV stellen eine bedeutende Komponente aller Basalmembranen des menschlichen Körpers dar. Im TW finden sich diese netzbildenden EZM-Proteine in der Basalmembran der Bindegewebslamellen und im



filamentösen Material der juxtakanalikulären Region (Rodrigues *et al.* 1980; Murphy *et al.* 1987; Marshall *et al.* 1990). Kollagen Typ IV ist aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, von denen Col4 $\alpha$ 1, sowie Col4 $\alpha$ 2 die bedeutendsten darstellen. In den hier durchgeführten Western Blot Experimenten konnte die für die Kollagenuntereinheit  $\alpha$ 2(IV) spezifische Bande bei einer molekularen Masse von 190 kDa detektiert werden (Abb. 11C). Die Behandlung mit CTGF verursachte einen konzentrations-abhängigen Anstieg der Bandenintensität auf das bis zu  $6,3 \pm 2,3$ -fache bei einer Konzentration von 100 ng/ml.

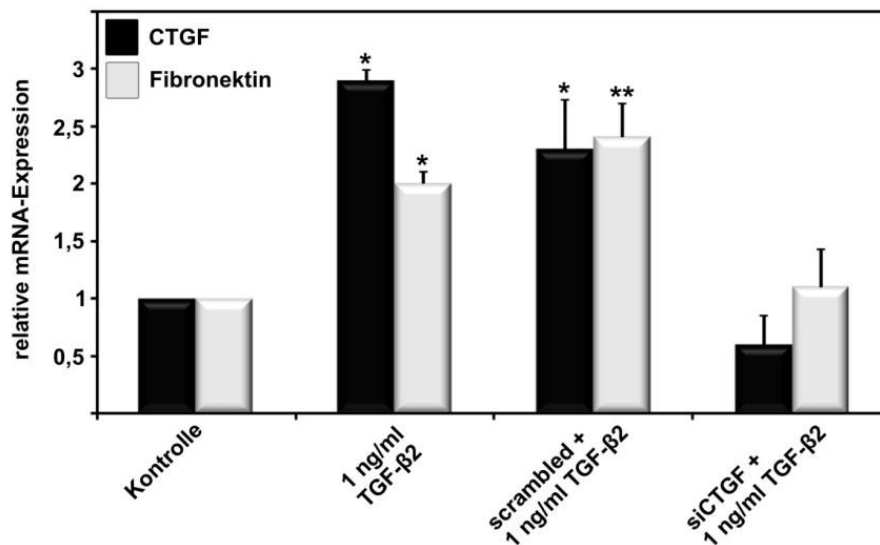
Abschließend konnte auch bei Kollagenen des Typs VI ein Anstieg der Expression nach CTGF-Behandlung aufgezeigt werden. Kollagen Typ VI stellt einen Hauptbestandteil der fibrillären EZM im juxtakanalikulären TW dar (Lütjen-Drecoll *et al.* 1989). Die Expression der Col6 $\alpha$ 2-Untereinheit mit einer Größe von 140 kDa konnte bereits durch Behandlung mit einer CTGF-Konzentration von 5 ng/ml signifikant gesteigert werden. Das Maximum mit einer  $2,0 \pm 0,6$ -fachen Steigerung wurde bei einer Konzentration von 50 ng/ml erreicht, während eine Behandlung mit 100 ng/ml bereits wieder zu einem Abfall der Expression führte (Abb. 11D).



**Abb. 11:** Änderungen der Kollagenexpression nach Behandlung von TWZ mit CTGF für 24 h; Western Blots mit Zellysat. A) Kollagen 1 $\alpha$ 1; B) Kollagen 3 $\alpha$ 1; C) Kollagen 4 $\alpha$ 2; D) Kollagen 6 $\alpha$ 2.

### 4.2.3 CTGF-Silencing

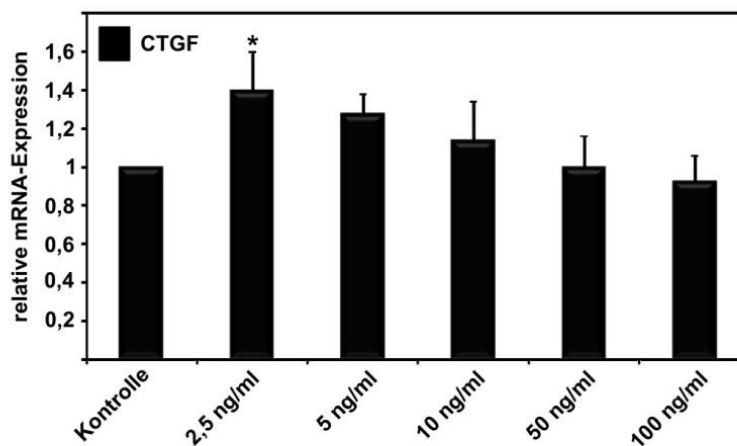
Nachdem bereits für andere Zelltypen, wie etwa den humanen Astrozyten gezeigt werden konnte, dass CTGF ein Mediator der TGF- $\beta$ 2-induzierten EZM-Expression (FN, Col4 $\alpha$ 2) ist (Fuchshofer *et al.* 2005), sollte dies nun mittels siRNA-Experimenten auch für TWZ überprüft werden. TWZ wurden mit 40 nM einer CTGF-spezifischen siRNA transfiziert und zugleich für 24 h mit 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2 behandelt. Als Kontrolle dienten mit einer scrambled-siRNA (siRNA, deren Sequenz mit keiner bekannten mRNA identisch ist) transfizierte sowie untransfizierte Zellen. Die Behandlung mit TGF- $\beta$ 2 verursachte eine Expressionserhöhung sowohl der CTGF- ( $2,9 \pm 0,1$ ) als auch der FN-mRNA ( $2,0 \pm 0,1$ ), was die früheren Untersuchungen bestätigte (Fuchshofer *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu kam es nach Transfektion mit CTGF-spezifischer siRNA zu einer Verminderung des CTGF-mRNA Gehalts auf das  $0,6 \pm 0,25$ -fache in den Zellen. Eine Vermehrung der FN-mRNA konnte nicht mehr festgestellt werden (Abb. 12). Die Kontrollexperimente mit scrambled-siRNA zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Expression von CTGF- bzw. FN-mRNA.



**Abb. 12:** qPCR für CTGF- & Fibronectin-mRNA nach Transfektion mit spezifischer siRNA gegen CTGF und gleichzeitiger 24-stündiger Behandlung mit TGF- $\beta$ 2. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\*p < 0,05; \*\*p < 0,02).

#### 4.2.4 Autoinduktion von CTGF

Nachdem für TGF- $\beta$  bereits ein autoinduktiver Effekt festgestellt werden konnte (Flanders *et al.* 1995), sollte dies nun auch für CTGF überprüft werden. Bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml rekombinantem CTGF zeigte sich nach 24h ein leichter, aber signifikanter Anstieg der CTGF-mRNA auf das  $1,4 \pm 0,2$ -fache. Bei Behandlungen mit höheren Konzentrationen konnte keine signifikante Beeinflussung festgestellt werden (Abb. 13).

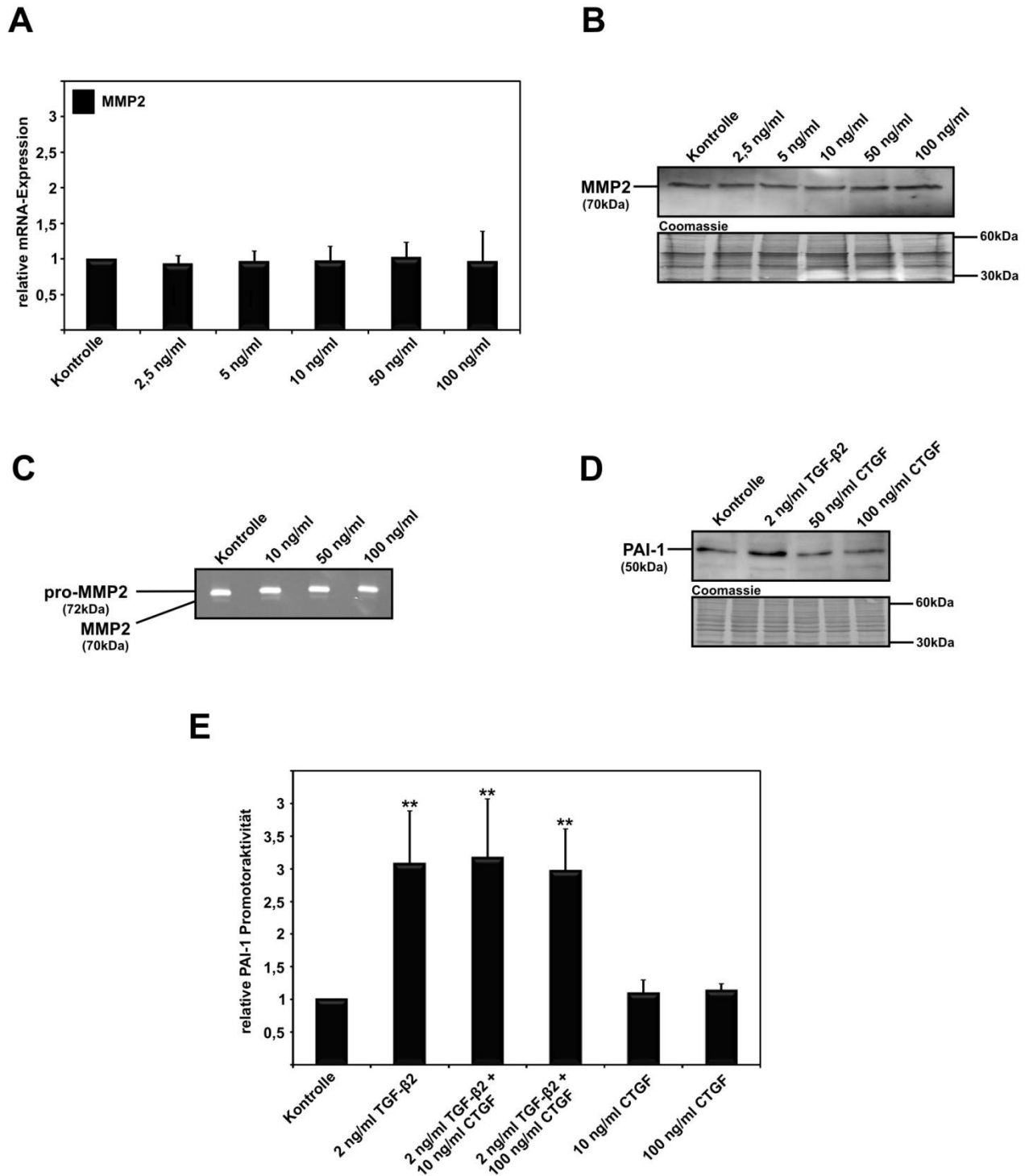


**Abb. 13:** qPCR für CTGF-mRNA nach 24-stündiger Behandlung von TWZ mit CTGF. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ).

#### 4.2.5 Der Einfluss von CTGF auf das extrazelluläre proteolytische System von TWZ

TGF- $\beta$ 2 stimuliert in TWZ nicht nur die Expression von EZM-Molekülen, sondern übt zudem einen starken Einfluss auf das extrazelluläre proteolytische System aus. Aus diesem Grund sollte hier aufgezeigt werden, ob CTGF auch bei dieser Regulation als Downstream-Mediator von TGF- $\beta$ 2 bezeichnet werden kann. Die wichtigsten EZM-degradierenden Enzyme stellen die MMPs dar. Im TW wird vor allem MMP2 konstitutiv als inaktive proMMP2-Form exprimiert, welche durch Plasmin gespalten und damit aktiviert werden kann (Mazzieri *et al.* 1997; Nagase 1997; Monea *et al.* 2002). TGF- $\beta$ 2 ist in der Lage sowohl die Aktivität als auch die

Expression von MMP2 in TWZ zu erhöhen. Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), welcher das Plasminogen/Plasmin-System und damit die Aktivierung der MMPs hemmt, wird von TGF- $\beta$ 2 ebenfalls im TW induziert (Fuchshofer *et al.* 2003). Wie am Ergebnis des Western Blots sowie der qPCR zu sehen war, konnte eine CTGF-Behandlung jedoch keinen Effekt auf die Expression von MMP2, sowie auf die seiner mRNA bewirken (Abb. 14A, B). Mittels Zymographie wurde die Aktivität der MMPs untersucht. Hier konnten Banden bei 72 und 68 kDa detektiert werden. Die stärkere Bande bei 72 kDa wurde von proMMP2 verursacht, die schwächere Bande bei 68 kDa durch das aktive MMP2 (Abb. 14C). Durch CTGF-Behandlung konnte keine Veränderung in der Bandenintensität und damit in der Aktivität vom MMP2 erzielt werden. Sowohl MMP9 als auch die kodierende mRNA konnten weder in den Kontrollkulturen noch nach CTGF-Behandlungen detektiert werden. Dies deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen (Fuchshofer *et al.* 2003).



**Abb. 14:** Einfluss von CTGF auf das extrazelluläre, proteolytische System. A) qPCR für MMP2 nach Behandlung von TWZ für 24 h mit CTGF; B) MMP2-Western Blot mit Zelllysate von für 24 h mit CTGF behandelten TWZ; C) Gelatine-Zymogramm mit Zellüberstand nach 24-stündiger CTGF-Behandlung; D) PAI-1-Western Blot mit Zelllysate nach 24-stündiger Behandlung mit CTGF und TGF-β2; E) PAI-1-Luciferase-Assay nach 24-stündiger Behandlung von MLECs mit CTGF und TGF-β2. A & E) Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\*p < 0,05; \*\*p < 0,02).

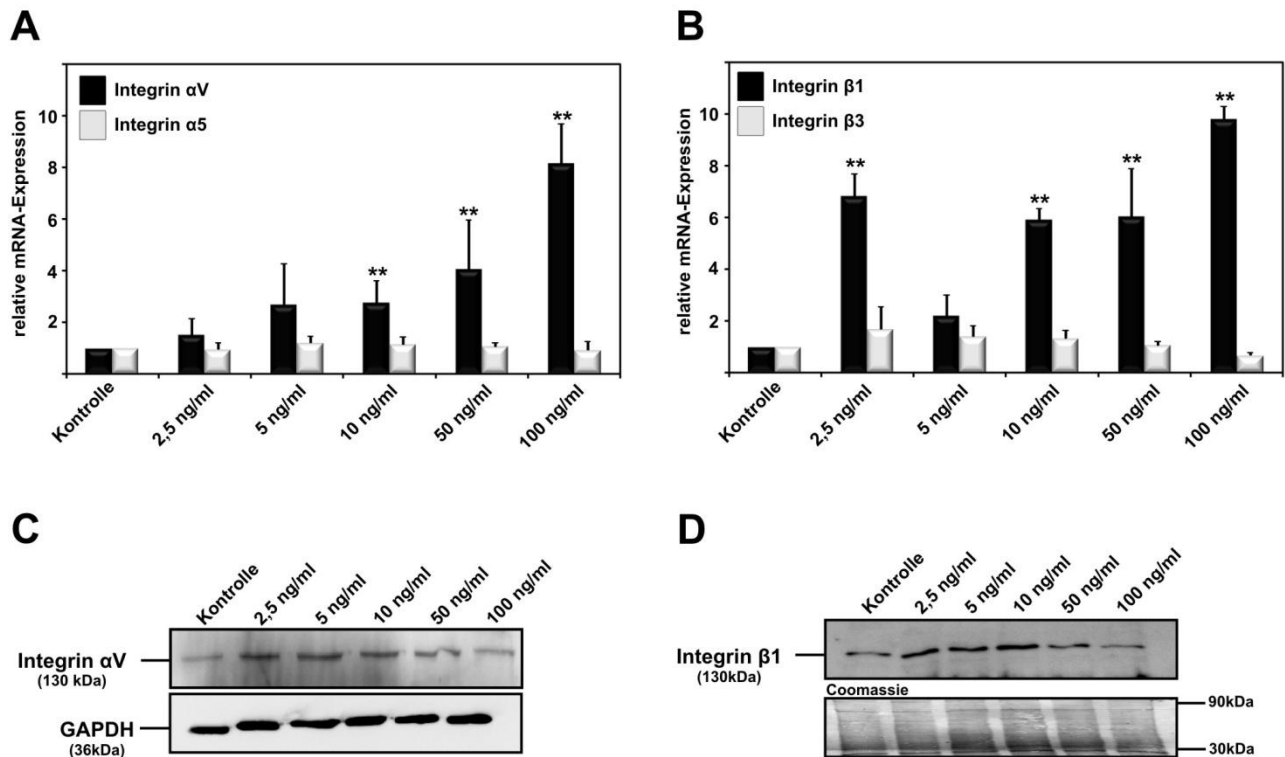
Der Einfluss auf PAI-1 wurde auf zwei Wegen untersucht. Zum einen mittels Western Blot nach Behandlung von TWZ mit CTGF für 24 h, zum anderen mittels Chemilumineszenzmessungen an Lysaten von 24 h CTGF-behandelten MLECs, die mit einem trunkierten PAI-1-Promotor gekoppelt an ein Luciferasereporter gen transfiziert worden waren. Im Western Blot konnte lediglich durch eine Behandlung mit 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2 eine signifikante Steigerung der Bandenintensität (50 kDa) auf das  $2,1 \pm 0,9$ -fache erzielt werden. Eine Behandlung sowohl mit geringer (2,5 ng/ml) als auch mit hoher (100 ng/ml) Konzentration an rekombinantem CTGF hatte keinen Effekt (Abb. 14D). Diese Daten korrelierten mit den aus dem Luciferase-Assay gewonnenen Ergebnissen. Auch hier konnte lediglich nach TGF- $\beta$ 2-Behandlung (2 ng/ml) eine  $3,1 \pm 0,8$ -fache Steigerung der Luciferase-Aktivität detektiert werden. Nachdem durch Abreu et al. berichtet wurde, dass CTGF die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 synergistisch zu steigern vermag (Abreu et al. 2002), wurden zudem Kombinationsbehandlungen mit jeweils 2 ng/ml TGF- $\beta$ 2, sowie 10 und 100 ng/ml CTGF durchgeführt. Doch auch hier konnte kein Effekt durch CTGF erzielt werden (Abb. 14E).

#### **4.2.6 Der Einfluss von CTGF auf die Expression von Integrin-Untereinheiten in TWZ**

Integrine sind heterodimere Transmembranglykoproteine, die sowohl an EZM-Moleküle und Faktoren auf der extrazellulären Seite als auch an diverse zytosolische Proteine binden können. Letztere nehmen wiederum Kontakt mit dem Aktinzytoskelett auf, wodurch eine Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett der Zelle entsteht (Hynes 2002). Integrine bestehen jeweils aus einer  $\alpha$ - sowie einer  $\beta$ -Untereinheit. In Mesangiumzellen der Niere vermittelt CTGF die TGF- $\beta$ -induzierte Ablagerung von EZM durch Induktion der Expression von FN sowie des Integrins  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, ein FN-Ligand, der zudem für dessen Ablagerung verantwortlich ist (Weston et al. 2003). Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit auch der Einfluss von CTGF auf die Expression der Integrinuntereinheiten  $\alpha$ 5 und  $\beta$ 1 untersucht werden. Zudem wurden die Untereinheiten  $\alpha$ V und  $\beta$ 3 betrachtet, da das Dimer Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 als potentieller zellulärer Rezeptor von CTGF gehandelt wird (Gao und

Brigstock 2004). Dass TWZ diese Integrinuntereinheiten exprimieren wurde bereits in früheren Studien aufgezeigt (Tervo *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1999).

Die Expressionsanalyse der Integrinuntereinheiten wurde mit Hilfe der qPCR und des Western Blots durchgeführt. Während die Untereinheiten  $\alpha 5$  und  $\beta 3$  keine Regulation auf mRNA-Ebene zeigten, wurde die Expression der Integrin  $\alpha V$ - sowie  $\beta 1$ -mRNA durch CTGF-Behandlung signifikant erhöht. Die relative mRNA-Menge der  $\alpha V$ -Untereinheit stieg bereits bei einer Behandlung mit 5 ng/ml CTGF auf das  $2,7 \pm 0,8$ -fache, bei 100 ng/ml auf das  $8,1 \pm 1,5$ -fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 15A). Die mRNA der  $\beta 1$ -Untereinheit erfuhr eine Expressionssteigerung auf das  $6,8 \pm 0,8$ -fache nach Behandlung mit 2,5 ng/ml CTGF und auf das  $9,8 \pm 0,5$ -fache bei einer CTGF-Konzentration von 100 ng/ml (Abb. 15B). Die Daten der Western Blot-Analyse bestätigen diese Ergebnisse auch auf der Proteinebene. Die für die Integrinuntereinheit  $\alpha V$  typische Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei 170 kDa (Filardo und Cheresch 1994) zeigte nach einer Behandlung mit 5 ng/ml CTGF eine deutliche Steigerung ihrer Intensität auf das  $2,5 \pm 0,6$ -fache. Diese Steigerung konnte auch bei den höheren Konzentrationen von CTGF beobachtet werden (Abb. 15C). Die Intensität der Bande von Integrinuntereinheit  $\beta 1$ , welche bei einer molekularen Masse von 130 kDa zu finden ist, stieg nach Behandlung mit 5 ng/ml CTGF auf das  $3,0 (\pm 0,9)$ -fache und konnte auch durch höhere Konzentrationen nicht weiter gesteigert werden (Abb. 15D). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der qPCR konnte im Western Blot kein Expressionsanstieg nach Behandlung mit 100 ng/ml CTGF festgestellt werden.



**Abb. 15:** Einfluss einer 24-stündigen CTGF-Behandlung auf die Expression von Integrin-Untereinheiten in TWZ. A) qPCR-Ergebnisse für die Integrin-Untereinheiten  $\alpha V$  und  $\alpha 5$ ; B) qPCR-Ergebnisse für die Integrin-Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 3$ ; A & B) Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). C) Integrin  $\alpha V$ -Western Blot mit anschließender GAPDH-Markierung als Ladungskontrolle; D) Integrin  $\beta 1$ -Western Blot.

### 4.3 Der Einfluss von CTGF auf Bestandteile und Regulationsmechanismen des Aktinzytoskeletts

#### 4.3.1 Einfluss auf die Bestandteile des Aktin-Zytoskeletts

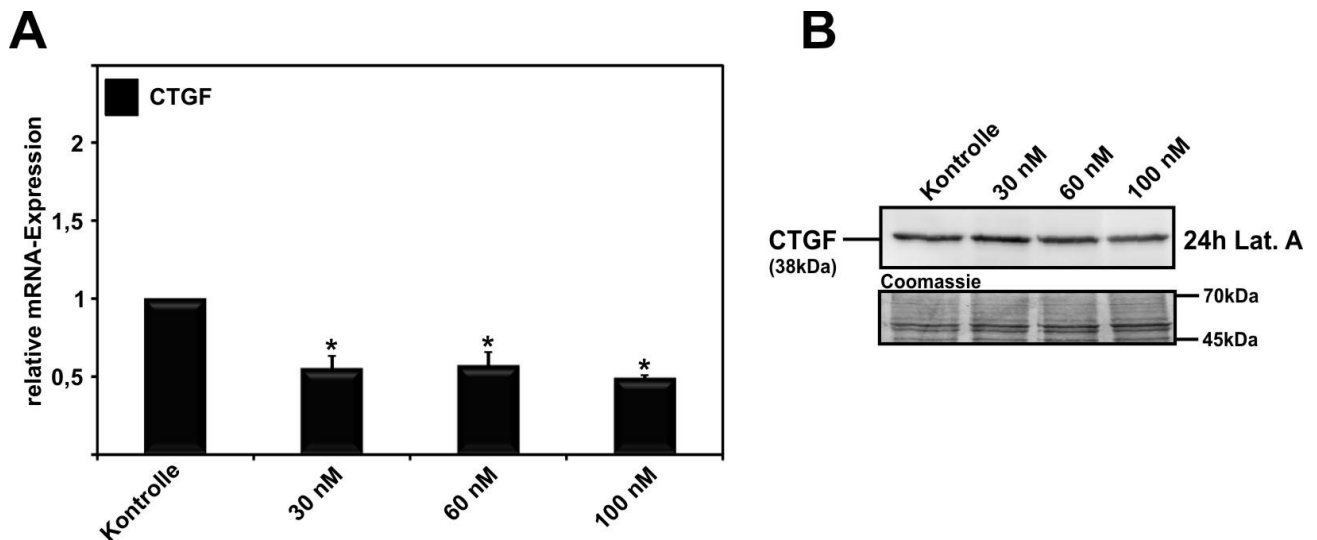
Durch die Ausbildung eines Aktomyosin-Zytoskeletts, welches dem in glatten Muskeln ähnlich ist, besitzen TWZ die Fähigkeit zur Kontraktilität, die bei der Regulation des trabekulären Kammerwasserabflusses mit eine Rolle spielen kann (Tian *et al.* 2009). Die bisherigen Ergebnisse in dieser Arbeit legen eine Beteiligung von CTGF bei der Erhöhung des Abflusswiderstandes und damit an der Entstehung des POWG durch Induktion der Expression von Komponenten der EZM nahe. Nachdem Integrine als Schnittstelle zwischen der EZM und dem Aktinzytoskelett



fungieren deutet die Regulation der Integrinuntereinheiten  $\alpha V$  und  $\beta 1$  darauf hin, dass CTGF zudem auch Einfluss auf das Zytoskelett zu nehmen vermag.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass sich die Kammerwasserabflussrate durch den Einsatz von Latrunculin, einem Produkt des Meeresschwamms der Gattung *Latrunculia*, mittels Desintegration des Aktinzytoskeletts deutlich erhöhen kann (Epstein *et al.* 1999; Cai *et al.* 2000; Peterson *et al.* 2000; Ethier *et al.* 2006). Latrunculin-A und -B binden an monomeres G-Aktin und führen somit zu einem Abbau der Aktinfilamente. Zudem konnte gezeigt werden, dass Latrunculin bei Endothelzellen zu einer Inhibition der CTGF-Expression führen kann, die wie auch die Regulation des Zytoskeletts zum Teil unter dem Einfluss des RhoA/ROCK-Signalwegs steht (Muehlich *et al.* 2007). Auch die Hemmung dieses Signalwegs führte zu einer ausgeprägten Senkung des Abflusswiderstandes (Rao *et al.* 2001).

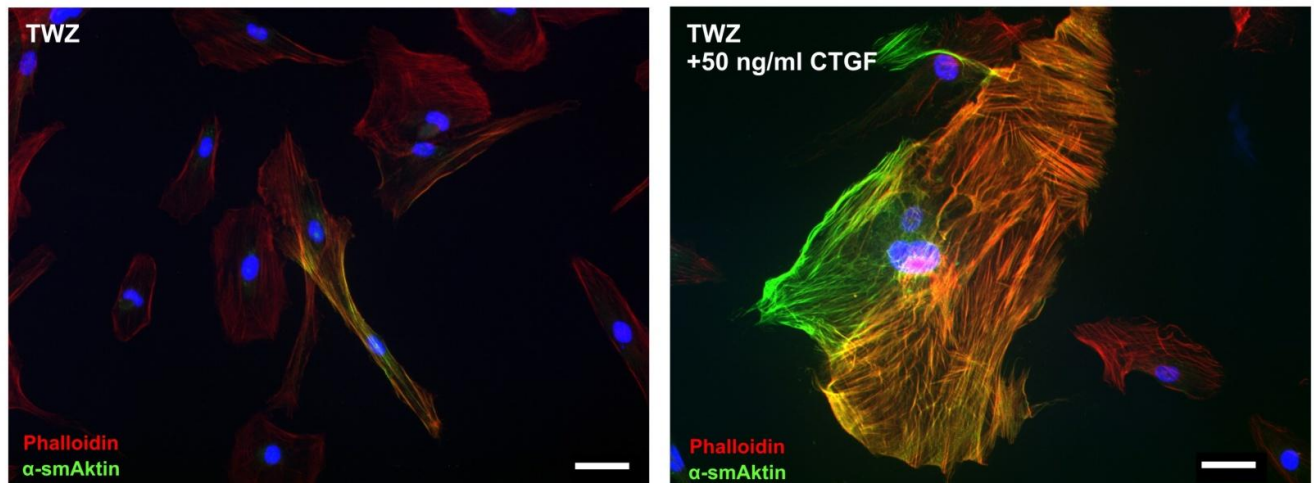
In humanen TWZ zeigte sich nach einer 24-stündigen Behandlung mit Latrunculin-A in Konzentrationen von 30 bis 100 nM eine deutliche Reduktion der CTGF-Expression. Bereits 30 nM reduzierten die CTGF-mRNA auf  $55 \pm 8\%$  des Ausgangswertes (Abb. 16A). Diese Reduktion blieb auch bei höheren Konzentrationen relativ konstant. Auf Proteinebene zeigte die CTGF-Expression bei einer Konzentration von 100 nM eine signifikante Absenkung auf  $67 \pm 9\%$  (Abb. 16B).



**Abb. 16:** Hemmung der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit Latrunculin A (Lat. A) für 24 h. A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) CTGF-Western Blot.

Dieses Ergebnis zeigt eine weitere Verbindung zwischen CTGF und dem Aktinzytoskelett auf. Um einen direkten Zusammenhang zwischen CTGF und dem Aktinzytoskelett nachzuweisen wurden humane TWZ mit dem rekombinanten Protein behandelt und anschließend immunhistologisch und molekularbiologisch untersucht.

Die immunhistologische Färbung humaner TWZ auf Zellkultur-Objektträgern mit Phalloidin-TriTC (rot), mit einem spezifischen Antikörper gegen  $\alpha$ -smooth-muscle ( $\alpha$ -sm)-Aktin (grün) sowie DAPI (blau) zeigt eine deutliche Zunahme an Aktin-Stressfasern nach 24-stündiger Behandlung mit 50 ng/ml CTGF (Abb. 17). Um diese Veränderung auch auf Protein-, als auch mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden Western Blot- sowie qPCR-Analysen für  $\alpha$ -smAktin, sowie für  $\alpha$ -Actinin 1 & 4 durchgeführt.  $\alpha$ -smAktin stellt einen der Hauptbestandteile des Aktomyosinsystems dar. Bei  $\alpha$ -Actinin 1 & 4 handelt es sich nicht-muskuläre Proteine, die unter anderem für die Vernetzung von Aktinfasern untereinander als auch mit Integrinen verantwortlich sind (Pavalko *et al.* 1991; Honda *et al.* 1998; Brakebusch und Fassler 2003).

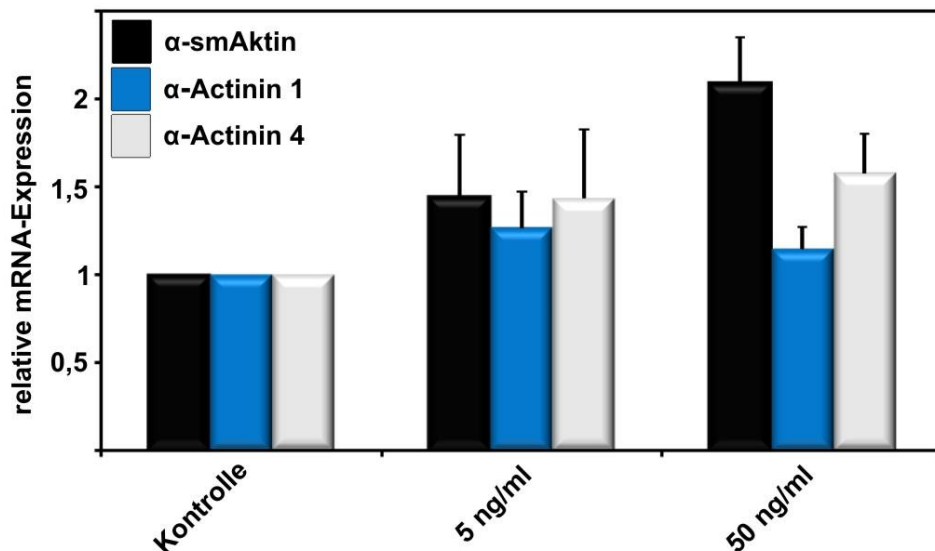


**Abb. 17:** Immunhistologische Färbungen von TWZ mit Phalloidin (rot), DAPI (blau) und einem spezifischen Antikörper gegen  $\alpha$ -smAktin (grün) nach 24-stündiger Behandlung mit 100 ng/ml CTGF bzw. serumfreier Inkubation (Kontrolle). Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m

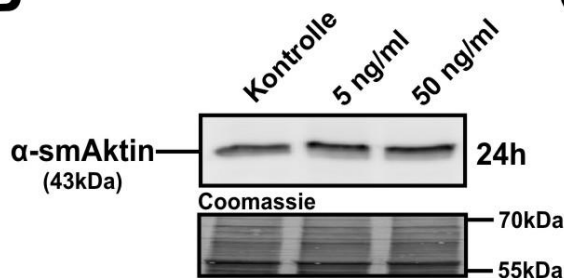
Nach Behandlung mit 50 ng/ml CTGF zeigte sich ein Anstieg der Expression von  $\alpha$ -smAktin mRNA auf das  $2,1 \pm 0,4$ -fache. Die Expression der  $\alpha$ -Actinin 1-mRNA erhöhte sich leicht um den Faktor  $1,6 \pm 0,3$ , während die  $\alpha$ -Actinin 4-mRNA weitestgehend unbeeinflusst blieb (Abb. 18A). Im Western Blot bewirkten 50 ng/ml

CTGF beim  $\alpha$ -smAktin-Protein einen Anstieg auf das  $1,4 \pm 0,2$ -fache (Abb. 18B), während in den Zellen signifikant mehr  $\alpha$ -Actinin vorhanden war ( $2,7 \pm 0,3$ ; Abb. 18C).

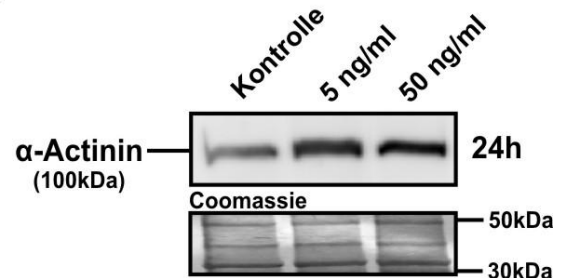
**A**



**B**



**C**

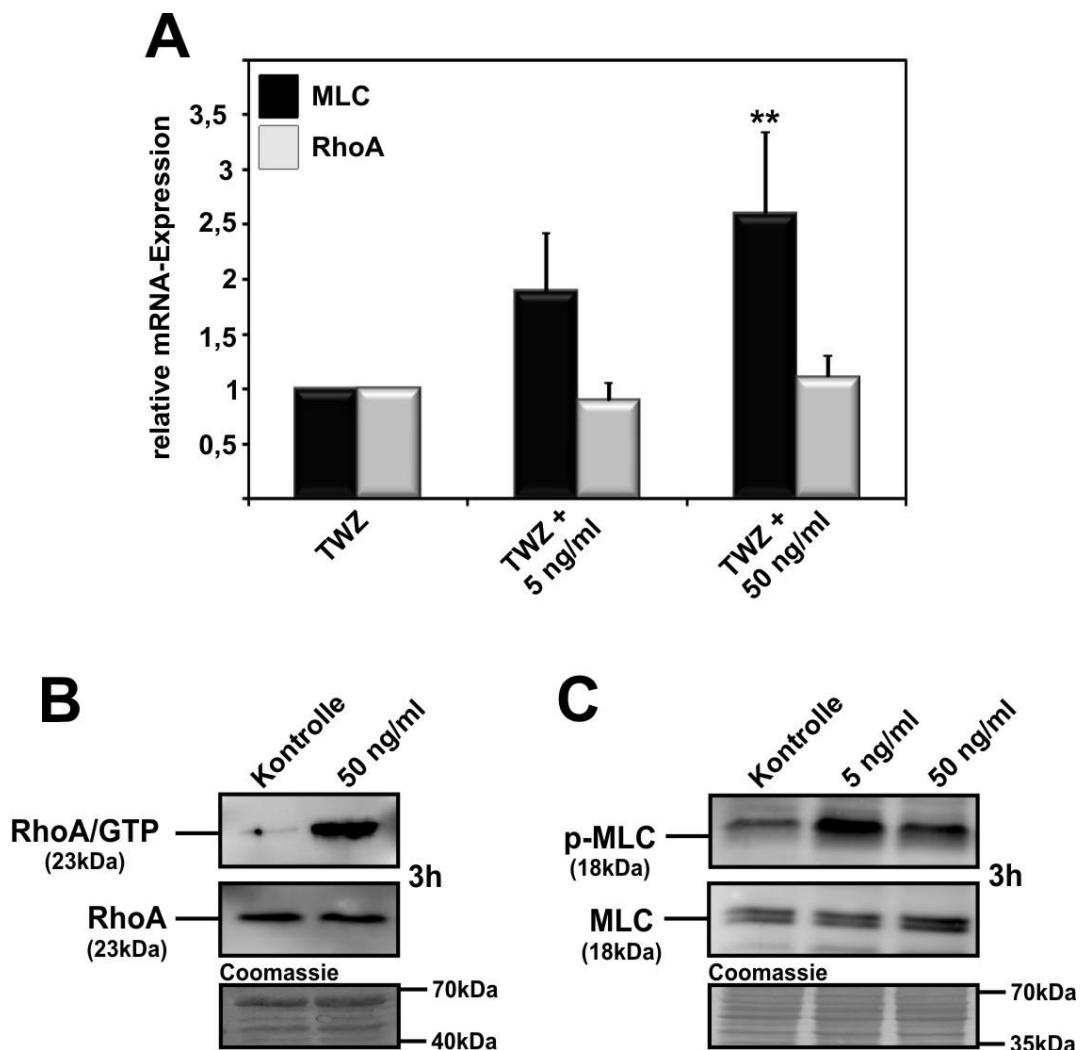


**Abb. 18:** Einfluss einer 24-stündigen CTGF-Behandlung auf die Expression von  $\alpha$ -smAktin,  $\alpha$ -Actinin 1 und 4 in TWZ. A) Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. B)  $\alpha$ -smAktin-Western Blot; C)  $\alpha$ -Actinin-Western Blot

#### 4.3.2 Einfluss auf die Regulationsmechanismen des Aktinzytoskeletts

Einer der wichtigsten Signalwege in der Regulation der Stressfaserdynamik führt über die kleine GTPase RhoA (Ridley und Hall 1992), welche im aktiven Zustand weitere Moleküle wie die ROCK sowie das Formin mDia1 aktivieren und damit zur Ausbildung neuer Aktin-Stressfasern führen kann (Naumanen *et al.* 2008). Untersuchungen mittels qPCR zeigten, dass eine Behandlung mit 50 ng/ml CTGF zu keiner Veränderung in der Expression von RhoA-mRNA führte (Abb. 19A). Auch auf

Proteinebene war mittels Western Blot keine Regulation zu erkennen. Der RhoA-Aktivitätsassay, bei dem der Anteil an RhoA-GTP gemessen wird, zeigte hingegen einen drastischen Anstieg der RhoA-Aktivität. Während bei den unbehandelten Kontrollzellen nur eine sehr schwache Bande zu erkennen war, zeigte sich nach CTGF-Behandlung (50 ng/ml) eine deutliche Bande von hoher Intensität (Abb. 19B). Aufgrund der schwachen Intensität der Kontrollen, die nahe der Nachweisgrenze lag, war eine homogene densitometrische Auswertung nicht möglich. Die Steigerung der Intensität nach CTGF-Behandlung reichte vom 4,2- bis zum 21,6-fachen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

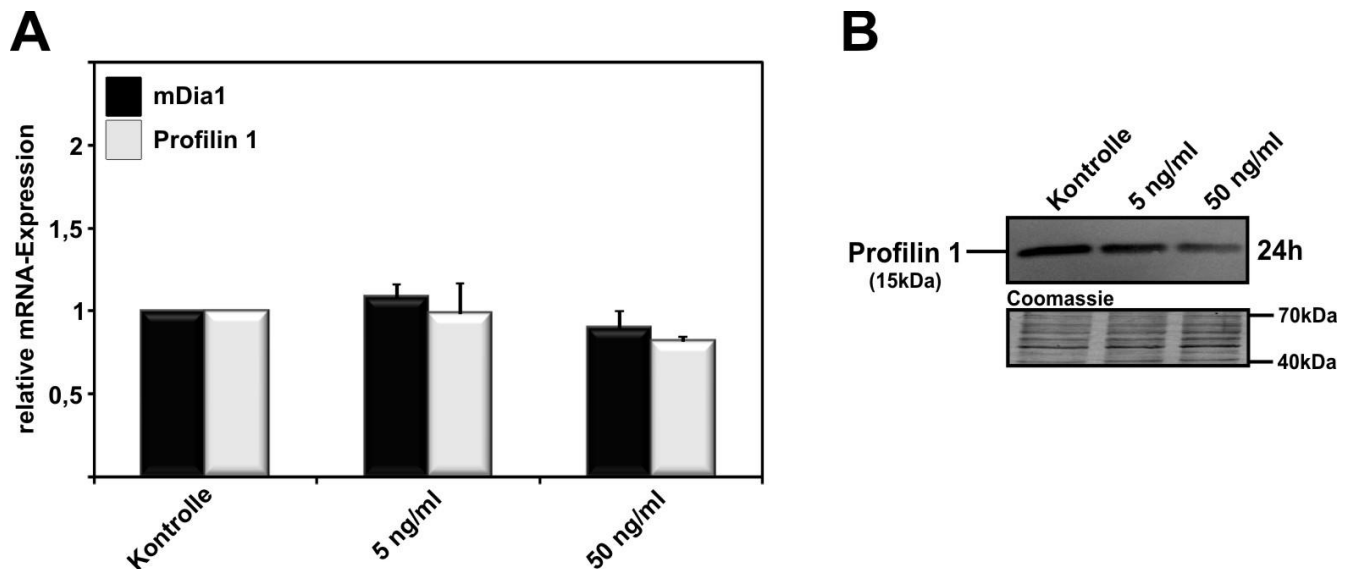


**Abb. 19:** Einfluss einer 3-stündigen Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Expression und Aktivität von Regulatoren des Aktinzytoskeletts. A) qPCR-Ergebnisse für MLC und RhoA; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) RhoA-Aktivitätsassay sowie –Western Blot nach einer 3-stündigen Behandlung mit CTGF; C) MLC-Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die an Thr 18 und Ser 19 phosphorylierte Form sowie gegen das Gesamt-MLC.

Aktives RhoA führt zu einer zur Aktivierung von ROCK, welches wiederum in der Lage ist, die regulatorische Untereinheit von Myosinfilamenten (Myosin Light Chain, MLC) zu phosphorylieren, dadurch zu aktivieren und die Ausbildung von Aktin-Stressfasern zu katalysieren. Zum Anderen vermag aktives ROCK die Myosin-bindende Domäne der MLC-Phosphatase (MLC-P) phosphorylieren, folglich die MLC-P inhibieren und somit obigen Prozess verstärken (Amano *et al.* 1996; Kimura *et al.* 1996). Untersuchungen zur Expression von MLC wurden mittels Western Blot- und qPCR-Analysen durchgeführt. Daneben wurde der Grad der Phosphorylierung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen die an Thr-18 und Ser-19 phosphorylierte Form von MLC bestimmt. Wie in Abb. 19C zu erkennen, führte die Behandlung mit 50 ng/ml CTGF nach 3 h zu einem Anstieg der Phosphorylierung auf  $27 \pm 9\%$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 19C). Nach einer dreistündigen Behandlung erhöhte sich zudem die Expression der MLC-mRNA auf das  $2,6 \pm 0,7$ -fache (Abb. 19A). Dies konnte im Western Blot mit einem Anstieg der Bandenintensität nach CTGF-Behandlung auf das  $2,2 \pm 0,2$ -fache bestätigt werden (Abb. 19C).

Den zweiten wichtigen Effektor RhoAs für die Regulation der Stressfaserbildung bildet das den Forminen angehörende mDia1, welches an der Initiation der Aktinfilamentbildung maßgeblich beteiligt ist (Higashida *et al.* 2004). mDia1 vermag mittels einer FH1-Domäne an Profilin zu binden (Pollard 2007), welches wiederum eine hohe Affinität zu monomerem ATP-Aktin aufweist, sowie den Austausch von ADP zu ATP bei Aktinmonomeren zu katalysieren (Mockrin und Korn 1980; Goldschmidt-Clermont *et al.* 1992). Eine Untersuchung der mDia1-mRNA-Expression mittels qPCR zeigte keinerlei Regulation durch eine 24-stündige CTGF-Behandlung (Abb. 20A). Die Aktivierung von mDia1 konnte mit den vorhandenen Mitteln im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da diese über die direkte Bindung von aktivem RhoA-GTP erfolgt (Narumiya *et al.* 2009). Der Einfluss von CTGF auf die Expression von Profilin wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Hierbei wurde lediglich Profilin-1 betrachtet, da es im Gegensatz zu den anderen Isoformen Profilin-2, -3 und -4 ubiquitär exprimiert wird (Bottcher *et al.* 2009). Nach Behandlung mit CTGF zeigte sich in beiden Fällen eine leichte Reduktion der Profilinexpression. Die Expression der mRNA sank nach Behandlung mit 50 ng/ml CTGF auf  $85 \pm 2\%$  im Vergleich zur unbehandelten

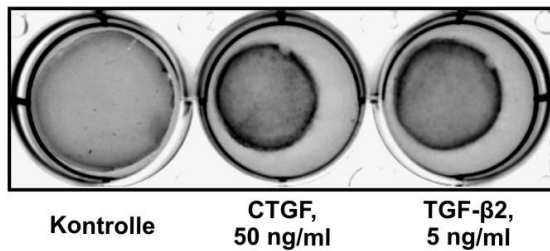
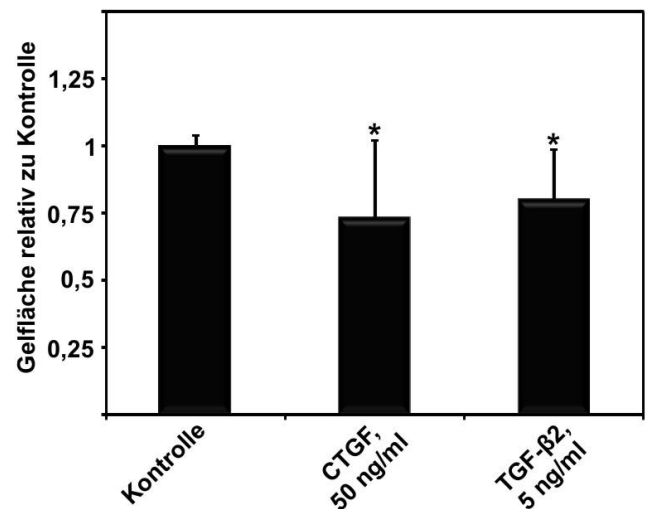
Kontrolle (Abb. 20A), während die Intensität der für Profilin-1 charakteristischen Western Blot-Bande auf  $73 \pm 8\%$  sank (Abb. 20B).



**Abb. 20:** Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Expression von regulatorischen Elementen des Aktinzytoskeletts. A) qPCR-Ergebnisse für mDia1 und Profilin 1; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. B) Profilin 1–Western Blot

Mit Hilfe des Kollagenkontraktionsassays konnte überprüft werden, ob die bisher beobachteten Veränderungen am Aktomyosinsystem durch CTGF-Behandlung auch zu einer verstärkten Kontraktion von TWZ führten. Untersuchungen mit TGF- $\beta$ 1 konnten bereits dessen Einfluss auf die Kontraktilität von TWZ im Kollagenkontraktionsassay aufzeigen (Nakamura *et al.* 2002).

TWZ wurden in einer flottierenden Kollagenmatrix ausgesät und für 24 h mit 50 ng/ml CTGF oder 5 ng/ml TGF- $\beta$ 2 behandelt. Infolge der Behandlung kontrahierten die Zellen die sie umgebende Matrix. Damit verringerten sich die Flächen signifikant nach CTGF-Behandlung auf  $73,4 \pm 28\%$  und nach TGF- $\beta$ 2-Behandlung auf  $80 \pm 19\%$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 21A, B).

**A****B**

**Abb. 21:** Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Kontraktionsfähigkeit von TWZ. A) Digitalisierte Aufnahme eines Kollagen-Kontraktionsassays nach 24 h Behandlung mit 50 ng/ml CTGF und 5 ng/ml TGF-β2. B) Graphische Auswertung der Gelfläche; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ).

#### 4.4 Analyse von CTGF-Überexpressionsmäusen

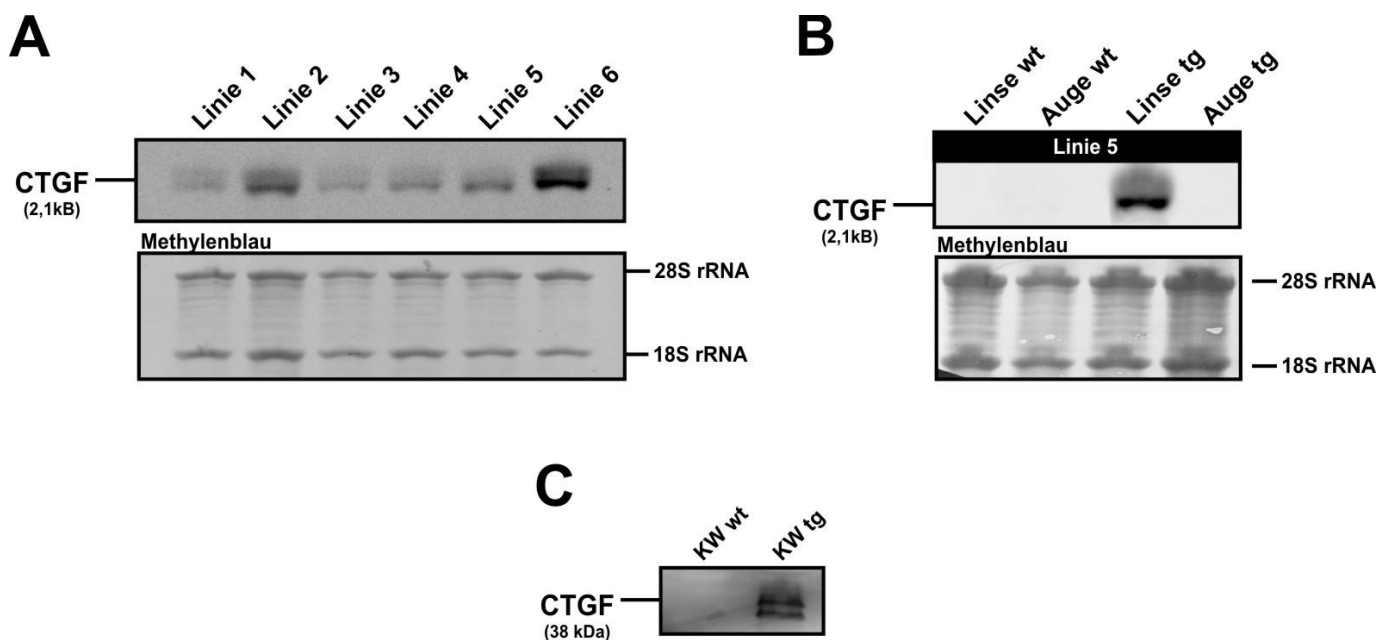
Um die Auswirkungen eines Überangebots an CTGF nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine transgene Mauslinie etabliert, in deren Linse unter dem βB1-Linsenpromotor Maus-CTGF überexprimiert und ins KW abgegeben wurde. Zu Beginn dieser Untersuchungen standen sechs einzelne Linien der βB1-CTGF-Überexpressionsmäuse zur Verfügung.

##### 4.4.1 Bestimmung der CTGF-Expression im Auge der einzelnen Linien

Zur weiteren Analyse sollte eine Linie mit moderater CTGF-Expression ausgewählt werden, deren Augen noch keinen offensichtlichen, sichtbaren Phänotyp aufwiesen. Hierzu wurden in Northern Blots die mRNA-Expressionen in Linsen und den restlichen Augen von transgenen Tieren mit Wildtyptieren verglichen. Die Tiere waren zum Präparationszeitpunkt einen Monat alt.

Der Northern Blot zeigte einen sehr deutlichen Unterschied in der Menge an CTGF-mRNA. Bei Wildtyptieren allgemein und in den restlichen Augen ohne Linse konnte keine CTGF-mRNA detektiert werden. Dagegen wiesen die transgenen Linsen die für CTGF-mRNA typischen Banden bei 2,1 kBp auf (dargestellt an Linie 5; Abb. 22B). Abb. 22A zeigt einen Vergleich der mRNA-Expression der einzelnen Linien. Die höchsten Expressionen erzielten hierbei Linie 2 und 6, gefolgt von Linie 5, während die Linien 1, 3 und 4 die geringste Menge an CTGF-mRNA aufwiesen. Da bei den Linien 2 und 6 bereits in der Augenentwicklung Defekte auftraten, deren Untersuchung nicht Teil dieser Arbeit war, schieden diese für IOD-Messungen und immunhistochemische Färbungen aus. Für die folgenden Analysen wurde Linie 5 ausgewählt. Sie zeigte die höchste CTGF-Expression derer Linien, welche noch keinen sichtbaren Phänotyp in der Augenentwicklung ausbildeten.

Durch Western Blot-Analysen mit jeweils 10 µl vereinigt KW aus transgenen bzw. Wildtyptieren der Linie 5 konnte gezeigt werden, dass die vermehrte mRNA-Expression auch zu einer erhöhten Sezernierung von CTGF in die vordere Augenkammer führte (Abb. 22C).

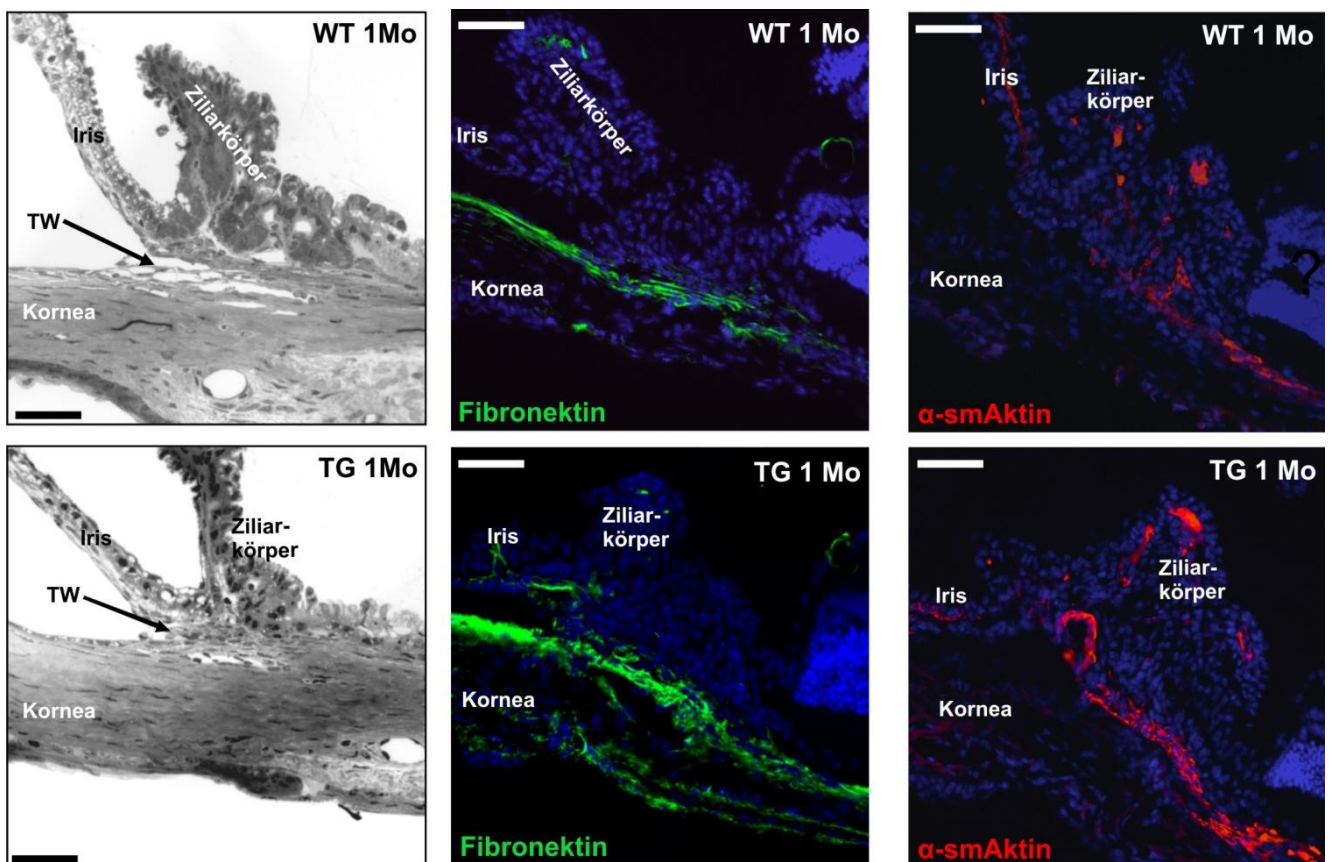


**Abb. 22:** CTGF-Expressionsanalysen von  $\beta$ B1-CTGF-Mäusen. A) Northern Blot-Analyse zum Vergleich der CTGF-mRNA-Expression in den Linsen von transgenen Tieren aus den Linien 1 bis 6. B) Northern Blot-Analyse zum Vergleich der CTGF-mRNA-Expression in Linse und restlichem Auge von Wildtyptieren und transgenen Tieren der Linie 5. C) Western Blot-Analyse zum Vergleich des CTGF-Gehalts im Kammerwasser von Wildtyptieren und transgenen Tieren der Linie 5.



#### 4.4.2 Immunhistochemische Färbungen der vorderen Augenkammer

Nachdem bereits *in vitro* eine deutliche Veränderung der EZM sowie des Aktinzytoskeletts bei TWZ durch CTGF-Behandlung aufgezeigt werden konnte, sollte nun auch im Tiermodell untersucht werden, ob die CTGF-Überexpression zu vermehrter Matrixablagerung und  $\alpha$ -smAktin-Expression in der Region des Kammerwinkels führte. Hierzu wurden histologische Schnitte der vorderen Augenkammern von einem Monat alten transgenen Tieren und Wildtyptieren angefertigt und mit Antikörpern gegen FN und  $\alpha$ -smAktin gefärbt. Sehr deutlich war hier die stärkere Intensität der FN- (grün) wie auch der  $\alpha$ -smAktin-Färbung (rot) bei den transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypkontrollen zu erkennen. Hierbei erfasste der Anstieg der FN-Expression vor allem den Bereich der Kornea und des TWs. Der stärkste Anstieg an  $\alpha$ -smAktin konnte dagegen im TW lokalisiert werden (Abb. 23).

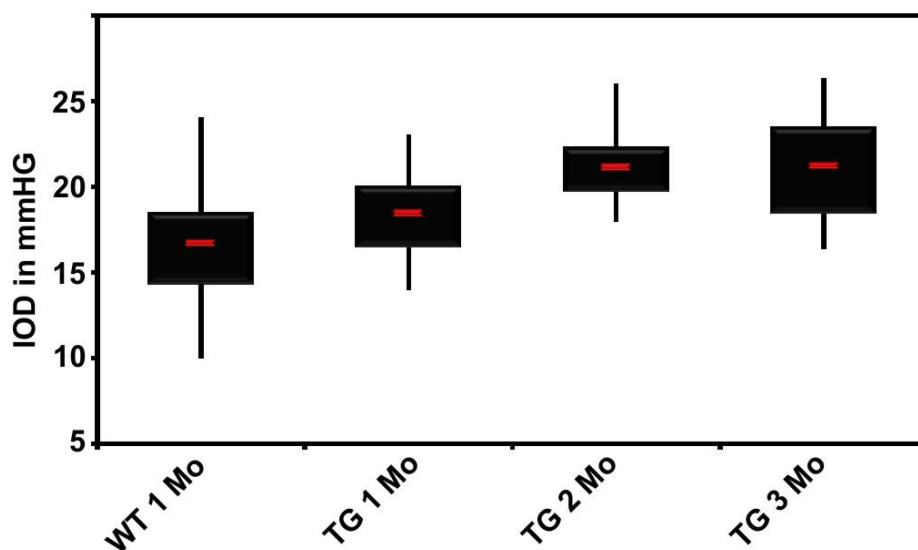


**Abb. 23:** Hellfeldaufnahme sowie Immunhistologische Färbung von Kryopräparaten des Kammerwinkels aus 1 Monat alten Wildtyptieren und transgenen Tieren der Linie 5. Die Färbung wurde durchgeführt mit DAPI (blau) und spezifischen Antikörpern gegen FN (grün) und  $\alpha$ -smAktin (grün). Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Messung des intraokulären Drucks

Nachdem die immunhistologischen Färbungen signifikante Veränderungen im Bereich des TWs zeigten, bestand der nächste Schritt darin zu untersuchen, ob diese Veränderungen auch einen Einfluss auf den IOD ausübten.

Die Messung des IOD erfolgte mittels Applanationstonometrie an ein bis drei Monate alten transgenen Tieren, sowie an deren Wildtyp-Geschwistertieren. Hierbei zeigte sich im ersten Monat nach der Geburt ein Unterschied im Vergleich von transgenen (18,5 mmHg) und Wildtyp-Tieren (16,4 mmHg). Im weiteren Zeitverlauf stieg der IOD bei den transgenen Tieren weiter an, während sich bei den Wildtyp-Tieren keine Veränderung zeigte (der Übersichtlichkeit halber sei hier nur Monat 1 der Wildtypen dargestellt). Im dritten Monat konnte bei transgenen Tieren ein IOD-Maximum von 21,2 mmHG gemessen werden, was einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Wildtypgeschwistern darstellte (Abb. 24).

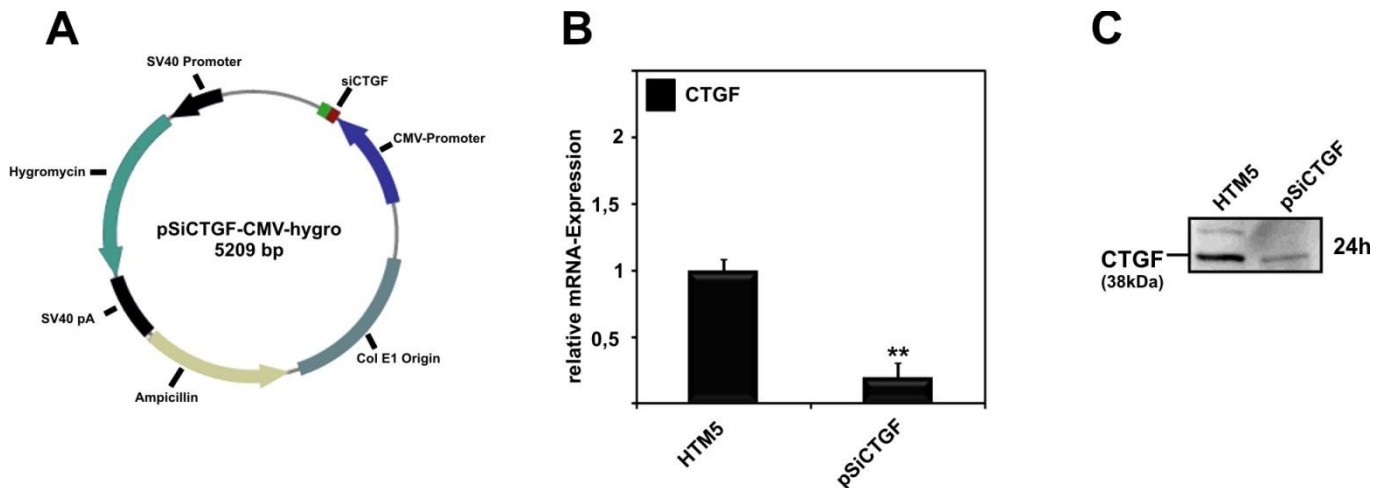


**Abb. 24:** Messung des IOD an Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren der Linie 5 über einen Zeitraum von drei Monate nach der Geburt. Es werden die Mediane (rot) mit Maximum und Minimum (Linien) und dem oberen sowie unteren Quartil (Balken) der Messwerte von sieben Tieren gezeigt.

## 4.5 Hemmung der CTGF-Expression im humanen Trabekelwerk

Im bisherigen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTGF bei humanen TWZ zu erheblichen Veränderungen im Bereich der EZM sowie des Aktinzytoskeletts führt, die mit der Pathogenese des POWG in Verbindung stehen könnten. Zudem wurde die Rolle von CTGF als Downstream-Mediator von TGF- $\beta$ 2 bei dessen fibrogenen Effekten bestätigt. Im folgenden Teil sollte nun untersucht werden, ob durch die Hemmung der CTGF-Expression die fibrotischen Effekte unterbunden werden können und welche weiteren Auswirkungen diese Hemmung insbesondere im Bereich des Zytoskeletts sowie der grundlegenden Zellfunktionen hervorrufen kann.

Zu diesem Zweck wurde die Sequenz für eine spezifische CTGF-siRNA in einen sogenannten pSilencer 4.1 CMV-Vektor eingefügt (Abb. 25A). Dieser wurde kloniert und mittels Lipotransfektion in die immortalisierte Trabekelwerkzelllinie HTM5 eingebracht. Die Sequenz der hierdurch gebildeten siRNA wurde im vorliegenden Fall identisch zur bereits bei 4.2.3 verwendeten siRNA gewählt, so dass die transfizierten HTM5-Zellen konstitutiv eine gegen die CTGF-mRNA gerichtete siRNA herstellten. Diese Technik wurde u. a. bereits von Yuhua et al. bei Ito-Zellen angewendet (Yuhua et al. 2008). Nach der Transfektion sowohl des pSiCTGF-Vektors, wie auch eines Vektors mit unspezifischer Scrambled-siRNA wurden die Zellen mit Hilfe einer dem Vektor zugehörigen Hygromycinresistenz selektioniert und die CTGF-Expression durch qPCR- und Western Blot-Analysen untersucht. Bei einer Kombination aus 2  $\mu$ g des Vektors mit 2  $\mu$ l Lipofectamin zeigte sich der effizienteste Knockdown. Die Expression sank in der qPCR auf  $20 \pm 10\%$  im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abb. 25B). Im Western Blot war nach Transfektion nur noch eine schwache Bande auf Höhe des CTGF-Proteins zu erkennen, deren Intensität für eine densitometrische Vermessung zu gering war (Abb. 25C). Die so erzeugte HTM5-Linie mit permanentem Knockdown von CTGF soll im Weiteren mit pSiCTGF bezeichnet werden. Die Scrambled-Zelllinie zeigte keine Veränderung der CTGF-Expression. Zudem konnte kein Effekt auf die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren beobachtet werden, weshalb sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Ergebnisse auf einen Vergleich mit den untransfizierten HTM5-Zellen beschränken.



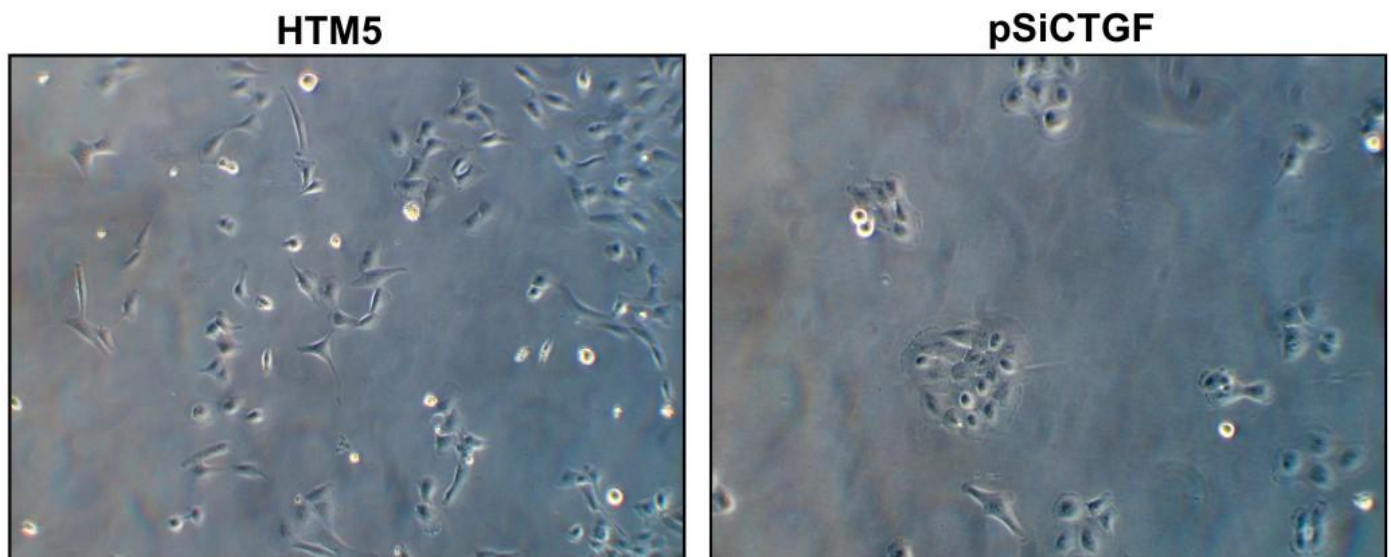
**Abb. 25:** Herstellung der pSiCTGF-Zellen. A) verwendeter Vektor; B) CTGF-qPCR. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). C) CTGF-Western Blot mit Zellüberstand

Die pSiCTGF-Zellen wurden sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene im Vergleich zu HTM5-Zellen untersucht. Für Experimente auf molekularer Ebene wurden die Zellen äquivalent den TWZ auf 6-Well-Platten ausgebracht und für unterschiedliche Zeiten mit CTGF behandelt oder serumfrei inkubiert. Die Veränderungen in der Expression wurden wiederum mittels qPCR und Western Blot analysiert. Als Kontrolle diente, soweit nicht anders beschrieben, der Wert der unbehandelten HTM5-Zellen. Die funktionellen Versuche werden im Einzelnen in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

#### 4.5.1 Allgemeine Beobachtungen

Die pSiCTGF-Zellen zeigten bei einfacher Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop deutliche Unterschiede zu den HTM5-Zellen. In der Mehrzahl überwog eine abgerundete Form. Die Ausbildung von Zellfortsätzen war im Vergleich zu HTM5-Zellen stark reduziert. Durch die Anwendung des Casy-Zellzählers war es daneben möglich den Durchmesser der abgelösten und abgekugelten Zellen zu bestimmen. Hier waren die Knockdownzellen im Durchschnitt mit  $18,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$  größer als die HTM5-Zellen mit nur  $14,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$  Durchmesser. Beim Passagieren der pSiCTGF-Zellen war eine deutlich längere Inkubationszeit mit Trypsin nötig, um die Zellen von

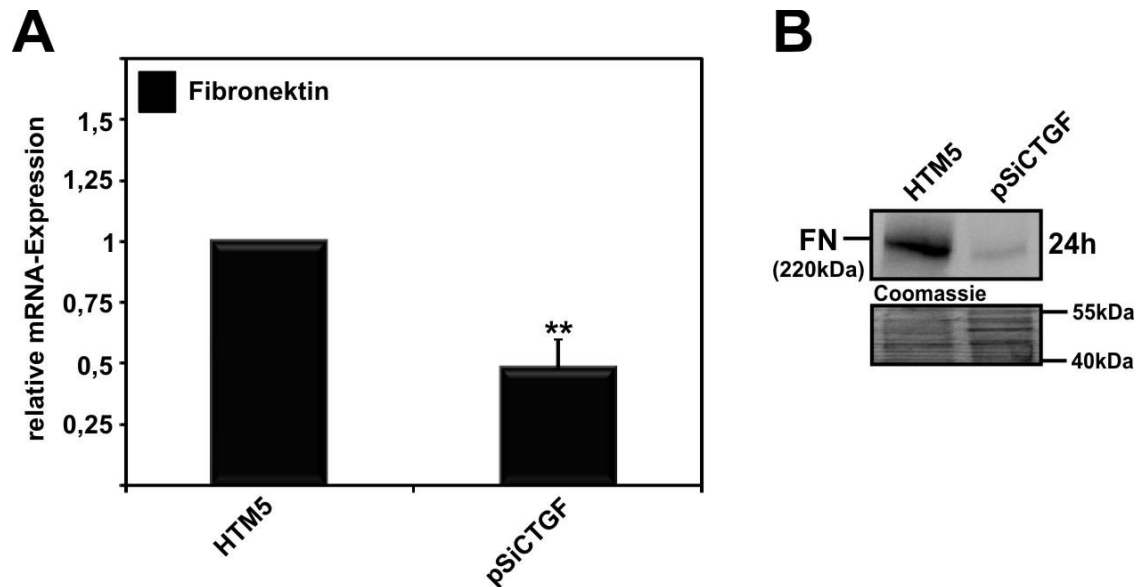
der Oberfläche der Kulturschalen abzulösen und um die Zellen voneinander zu trennen. Aus diesem Grund wurden nach dem Splitten vermehrt Zellaggregate ausgesät als es bei den HTM5-Zellen der Fall war. Dies resultierte in einem gruppierten Wachstum, bei dem die Zellen plattenartige Strukturen bildeten (Abb. 26). Die Wachstumsgeschwindigkeit schien zudem im Vergleich mit HTM5-Zellen merklich reduziert.



**Abb. 26:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von HTM5- und pSiCTGF-Zellen in Kultur bei 20-facher Vergrößerung

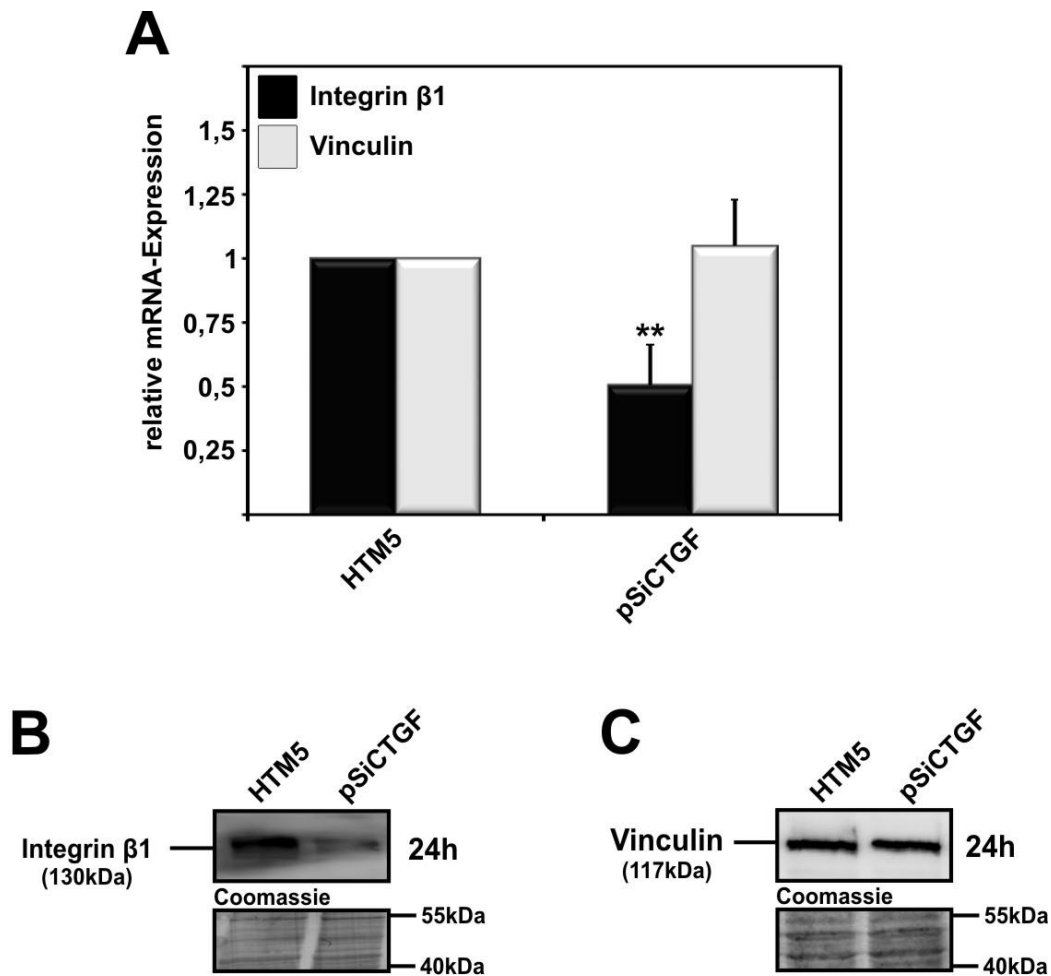
#### 4.5.2 Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf molekularer Ebene

Inwieweit sich die Inhibition der CTGF-Produktion auf die Expression der bereits untersuchten EZM-Komponenten auswirkte, sollte anhand von FN untersucht werden. In der qPCR zeigte sich eine deutliche Reduktion der FN-mRNA-Expression auf  $48 \pm 11\%$  gegenüber den HTM5-Zellen nach 24 h serumfreier Inkubation (Abb. 27A). Dieses Ergebnis konnte auch im Western Blot auf Protein-Ebene bestätigt werden (Abb. 27B). Hier war die Intensität der FN-Bande bei pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen auf  $39 \pm 7\%$  reduziert.



**Abb. 27:** Senkung der FN-Expression in pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen nach 24 h serumfreier Inkubation. A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) CTGF-Western Blot.

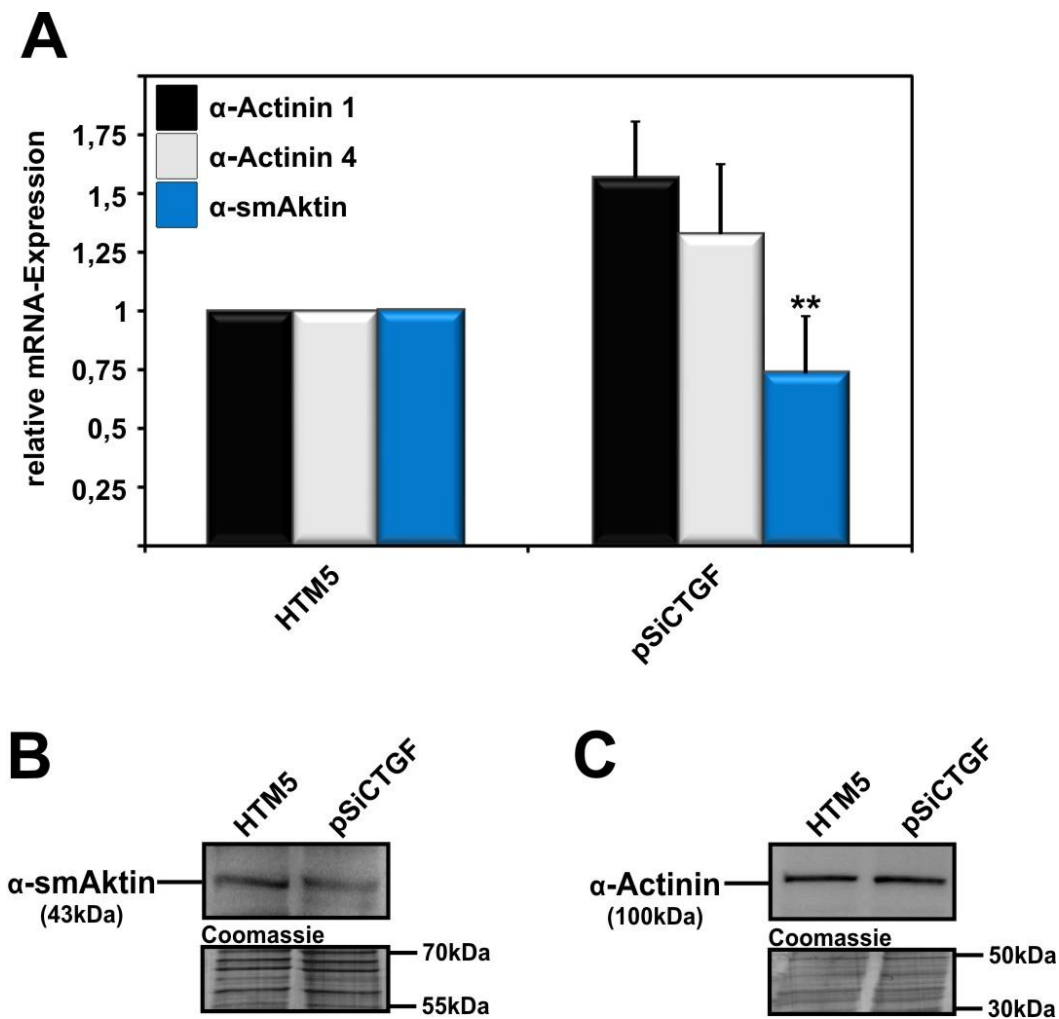
Integrin  $\beta 1$  welches in dieser Arbeit vor allem als Bestandteil eines potentiellen Rezeptors Beachtung fand und dessen Regulation durch CTGF bereits nachgewiesen werden konnte, zeigte eine deutliche Reduktion in seiner Expression. Auf transkriptioneller Ebene konnte eine fast 50%ige Verringerung der Expression von Integrin  $\beta 1$ -mRNA im Vergleich zu HTM5-Zellen ( $51 \pm 16\%$ ; Abb. 28A) und auf translationeller Ebene eine signifikante Reduktion von Integrin  $\beta 1$  auf  $72 \pm 15\%$  (Abb. 28B) festgestellt werden. Integrin  $\beta 1$  ist zudem ein wichtiger Bestandteil von fokalen Kontakten, zu deren Hauptstrukturmolekülen Vinculin zählt. Vinculin dient vor allem als Bindestelle für Proteine des Aktinzytoskeletts wie etwa Aktin (Jockusch *et al.* 1995). Die Untersuchung mittels Western Blot und qPCR zeigte, dass der Vinculinanteil in den Zellen nach dem Knockdown von CTGF konstant blieb (Abb. 28A, C).



**Abb. 28:** Senkung der Integrin  $\beta$ 1-Expression in pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen nach 24 h serumfreier Inkubation. A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) Integrin  $\beta$ 1-Western Blot; C) Vinculin-Western Blot.

In den vorhergehenden Abschnitten konnte bereits gezeigt werden, dass CTGF in der Lage ist, die Expression von  $\alpha$ -smAktin sowie von  $\alpha$ -Actininen zu erhöhen. Die deutliche Reduktion der Expression von FN und Integrin  $\beta$ 1 nach dem Knockdown von CTGF ließen darauf schließen, dass hier ebenfalls die Expression dieser Zytoskelettbestandteile beeinflusst wurde. Eine Untersuchung der Expression mittels qPCR und Western Blot zeigte eine drastische Veränderung im Falle von  $\alpha$ -smAktin. Hier reduzierte sich die mRNA-Menge durch den Knockdown auf  $74 \pm 22\%$ , was im Western Blot mit einem Absinken der  $\alpha$ -smAktin-Expression auf  $57 \pm 18\%$  bestätigt werden konnte (Abb. 29A, B). In der qPCR (Abb. 29A) wie auch im Western Blot (Abb. 29C) zeigten die beiden  $\alpha$ -Actinin-Proteine bei den pSiCTGF-Zellen mit oder ohne Behandlung keinen signifikanten Expressionsunterschied zu den HTM5-Zellen.





**Abb. 29:** Einfluss eines CTGF-Knockdowns auf die Expression von α-smAktin, α-Actinin1 und 4 nach 24-stündiger Behandlung mit CTGF bzw. serumfreier Inkubation. A) qPCR; Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) α-smAktin Western Blot; C) α-Actinin Western Blot.

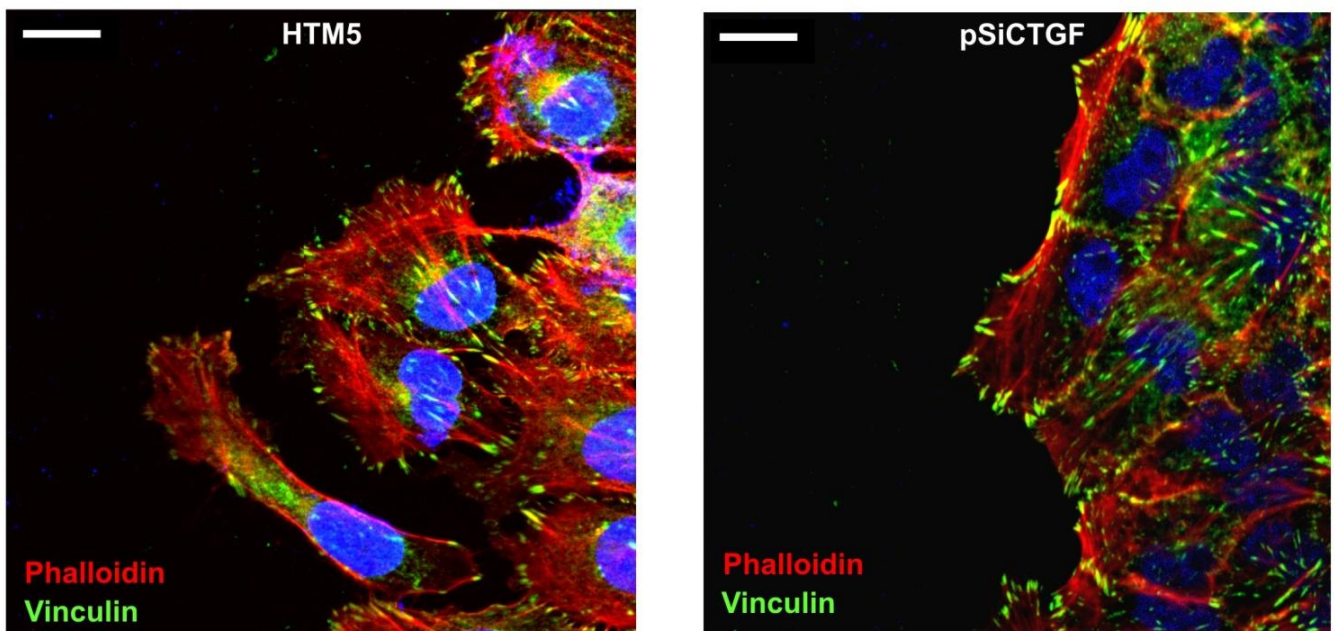
#### 4.5.3 Immunhistologische Färbungen zur Untersuchung der Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf das Aktinzytoskelett

Die veränderte Expression von FN, Integrin  $\beta 1$  und insbesondere von α-smAktin könnte in einer direkten Veränderung des Aktinzytoskeletts resultieren. Aus diesem Grund sollte im weiteren Teil der Arbeit eine Analyse des Zytoskeletts von pSiCTGF-Zellen erfolgen.

HTM5 und pSiCTGF-Zellen wurden auf Zellkultur-Objektträger ausgesät und für 24 h serumfrei inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin-TriTC (rot), DAPI (blau), sowie mit einem spezifischen Antikörper gegen



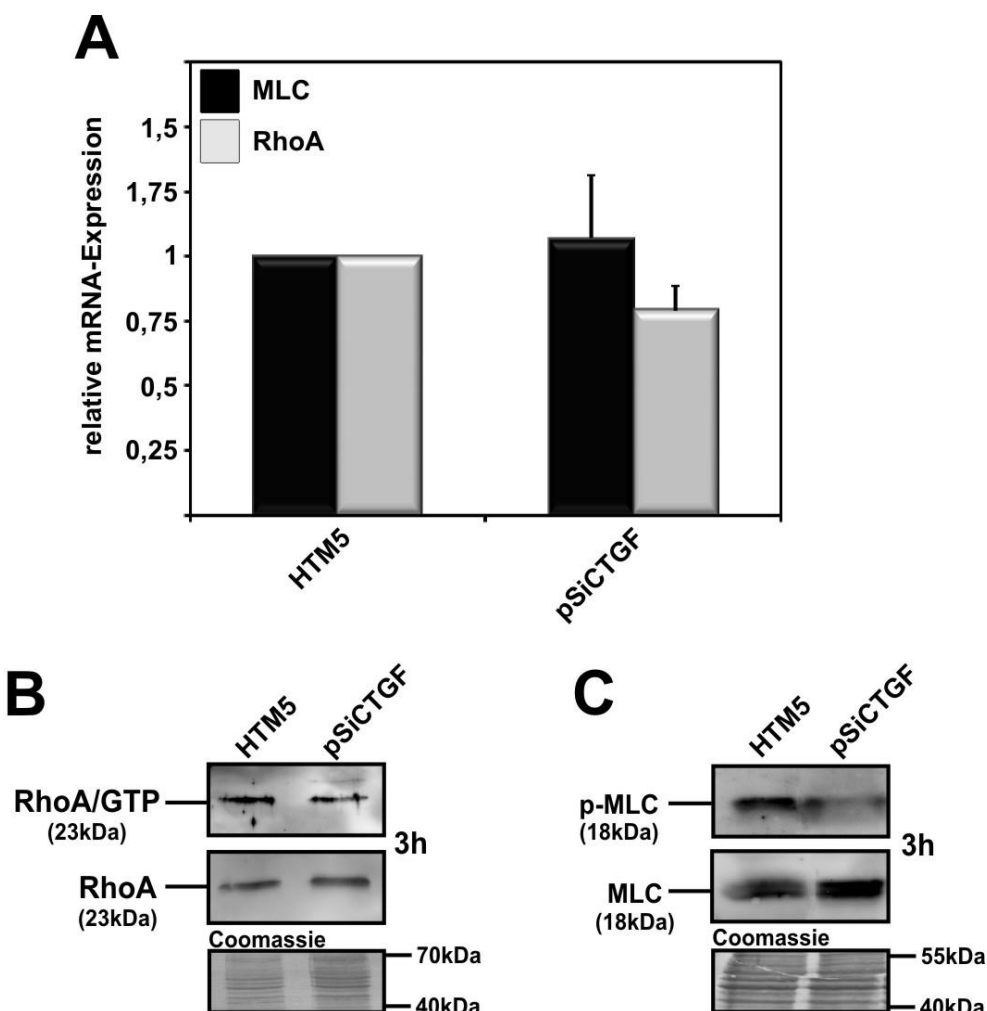
Vinculin (grün) gefärbt. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bestätigten die im Phasenkontrastmikroskop erfassten morphologischen Veränderungen (Abb. 30). pSiCTGF-Zellen zeigten eine deutlich abgerundete Zellmorphologie. Zellfortsätze waren nur bei wenigen Zellen zu erkennen. Die Färbung des Aktinzytoskeletts war von geringerer Intensität im Vergleich zu HTM5-Zellen, zudem waren deutlich weniger Aktin-Stressfasern zu erkennen, die sich hauptsächlich im kortikalen Bereich der Zellen ausbildeten. Daneben fielen die Position, die Form sowie die Anzahl fokaler Kontakte auf. In HTM5-Zellen waren die meist punktförmigen Verbindungspunkte von Zelle und Matrix am Ende der die Zelle durchziehenden Stressfasern bzw. am Ende der Zellfortsätze lokalisiert. Bei pSiCTGF-Zellen waren die Fokalkontakte zum einen kortikal und zum anderen in der Mitte bzw. unterhalb der Zelle lokalisiert. Zudem war die Form der Kontakte weniger als punktförmig, sondern eher als langgezogen, strichartig zu betrachten. Auch die Anzahl der Kontakte variierte zwischen den Zelllinien. So konnten in pSiCTGF-Zellen deutlich mehr Fokalkontakte beobachtet werden als in HTM5-Zellen.



**Abb. 30:** Immunhistologische Färbungen von HTM5- (links) und pSiCTGF-Zellen (rechts), kultiviert auf Zellkultur-Objektträgern, mit Phalloidin (rot), DAPI (blau) und einem spezifischen Antikörper gegen Vinculin (grün) nach 24-stündiger serumfreier Inkubation. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

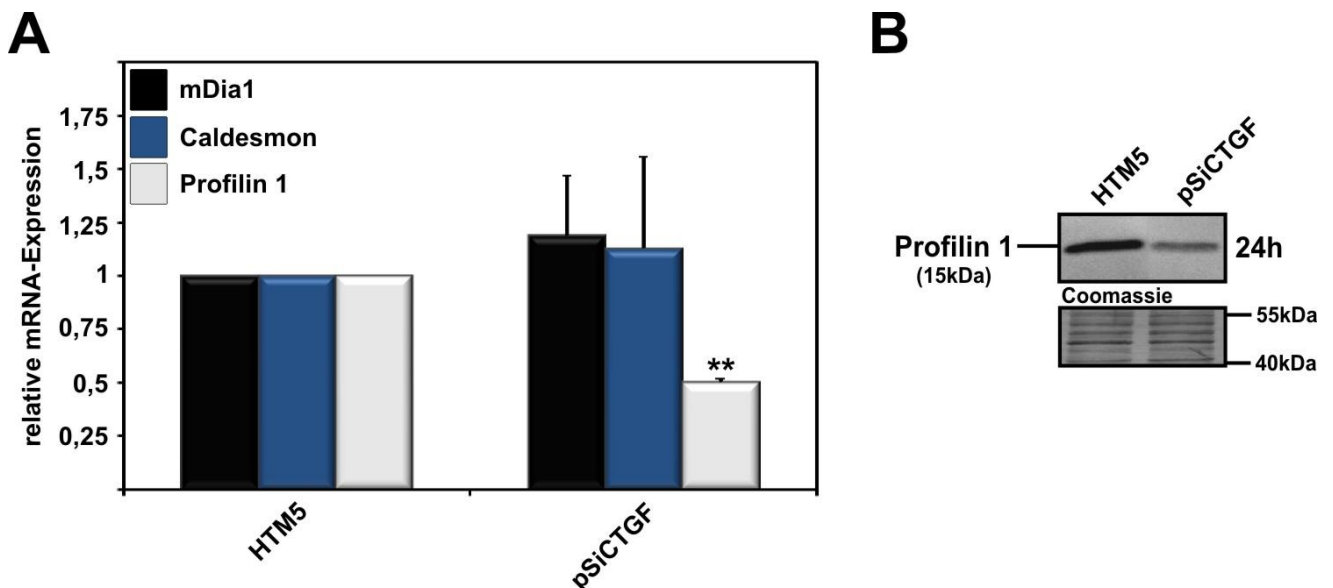
Im nächsten Schritt wurde, wie auch bereits bei der Untersuchung der CTGF-Behandlung von TWZ, der Einfluss des Knockdowns auf die Regulation der Stressfaserbildung untersucht. Die mRNA-Expression des wichtigsten Regulators

RhoA sank nach 3 h serumfreier Inkubation leicht auf  $79 \pm 9\%$  im Vergleich zu HTM5-Zellen (Abb. 31A). Die Intensität der RhoA-Bande im Western Blot zeigte jedoch keine signifikanten Veränderungen (Abb. 31A, B). Bei der Untersuchung der RhoA-Aktivität konnte im Vergleich zu HTM5-Zellen eine auf  $26,3 \pm 4,2\%$  reduzierte Aktivität festgestellt werden (Abb. 31B). Dies resultierte auch in einer erniedrigten Phosphorylierung von MLC ( $80 \pm 13\%$ ) im Vergleich zu HTM5-Zellen (Abb. 31C). Die Expressionsanalyse von MLC mittels Western Blot und qPCR zeigte in diesem Fall voneinander abweichende Ergebnisse. Während die mRNA-Expression noch keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten HTM5-Kontrolle aufwies (Abb. 31A), zeigte sich im Western Blot eine Steigerung der MLC-Bandenintensität auf das  $2,5 \pm 0,2$ -fache im Vergleich zu unbehandelten HTM5-Zellen (Abb. 31C).



**Abb. 31:** Auswirkungen eines CTGF-Knockdowns auf die Expression und Aktivität, bzw. Phosphorylierung von RhoA und MLC. A) qPCR für RhoA- und MLC-mRNA nach einer 3-stündigen serumfreien Inkubation. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) RhoA-Aktivitätsassay sowie –Western Blot nach einer 3-stündigen serumfreien Inkubation. C) Western Blot für das an Thr 18 und Ser 19 phosphorylierte MLC, sowie das Gesamt-MLC nach einer 3-stündigen serumfreien Inkubation.

Das zweite wichtige Effektorprotein von RhoA, mDia1 zeigte äquivalent zu den Ergebnissen nach Behandlung von TWZ mit CTGF in seiner mRNA-Expression keine Reaktion auf den Knockdown (Abb. 32A). Eine Reduktion in seiner Expression zeigte im Gegensatz dazu das „G-Aktin-bereitstellende“ Protein Profilin-1. Hier sank die Expression der codierenden mRNA bei pSiCTGF-Zellen auf  $56 \pm 2\%$  im Vergleich zu unbehandelten HTM5-Zellen. Dieser Wert konnte auch im Western Blot mit einer auf  $30 \pm 18\%$  reduzierten Intensität der Profilin-1-Bande bestätigt werden (Abb. 32B).



**Abb. 32:** Auswirkungen eines CTGF-Knockdowns auf die Expression von mDia1, Profilin1 und Caldesmon. A) qPCR für mDia1-, Profilin1- und Caldesmon-mRNA nach einer 24-stündigen serumfreien Inkubation. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den pSiCTGF-Zellen und HTM5-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) Western Blot für Profilin1 nach 24h serumfreier Inkubation.

Caldesmon ist ein weiteres Protein, welches die Struktur des Aktinzytoskeletts beeinflussen kann. Im nicht-phosphorylierten Zustand bindet Caldesmon an Aktinfasern. Nach Phosphorylierung durch die Extracellular Signal regulated Kinase (ERK)1/2 löst sich Caldesmon von den Aktinfasern, die anschließend dissoziieren können (Hai und Gu 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Caldesmon in humanen TWZ zu einer Reduktion von fokalen Kontakten, sowie zu einer Dissoziation des Aktinzytoskeletts führt, was letztendlich in einer Erhöhung des Kammerwasserabflusses in Organkultur resultierte (Gabelt *et al.* 2006). In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass der Knockdown von CTGF auf die Expression von Caldesmon mRNA keinen Einfluss hatte (Abb. 32A).

Da gegen das phosphorylierte Caldesmon kein hinreichend getesteter und damit verlässlich spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, konnte auch diese Form der Aktivierung im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

#### **4.5.4 Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Adhäsion von Trabekelwerkzellen**

Fokale Kontakte stellen die Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und der EZM her und sorgen für die Anhaftung bzw. Adhäsion von adhären Zellen in der sie umgebenden Matrix *in vivo*. Adhären Zellen *in vitro* bilden ebenfalls fokale Kontakte aus, um sich an Oberflächen der Zellkulturschalen, bzw. an den entsprechenden Beschichtungen wie FN oder Kollagen-IV zu verankern. CTGF wird in der Literatur häufig als Adhäsions-fördernder Faktor beschrieben. Diese Funktion wird abhängig vom untersuchten Zelltyp zum einen über Integrine, zum anderen über Heparinsulfatproteoglykane vermittelt (Gao und Brigstock 2004). Die Veränderungen in Form, Position und Anzahl der fokalen Kontakte, sowie das Absinken der Integrin  $\beta$ 1-Expression lassen darauf schließen, dass auch Unterschiede in der Adhäsion zwischen den HTM5-Zellen und den pSiCTGF-Zellen bestehen.

Die Fähigkeit, in einem bestimmten Zeitraum nach Aussaat auf einer Oberfläche zu adhären, wurde mittels eines Adhäsions-Assays untersucht. Hierzu wurden auf FN- & Kollagen-IV-beschichteten, sowie auf unbeschichteten 96-Well-Platten HTM5- sowie pSiCTGF-Zellen ausgebracht. Als Adhäsionszeit wurde ein Zeitraum von 5 h verwendet.

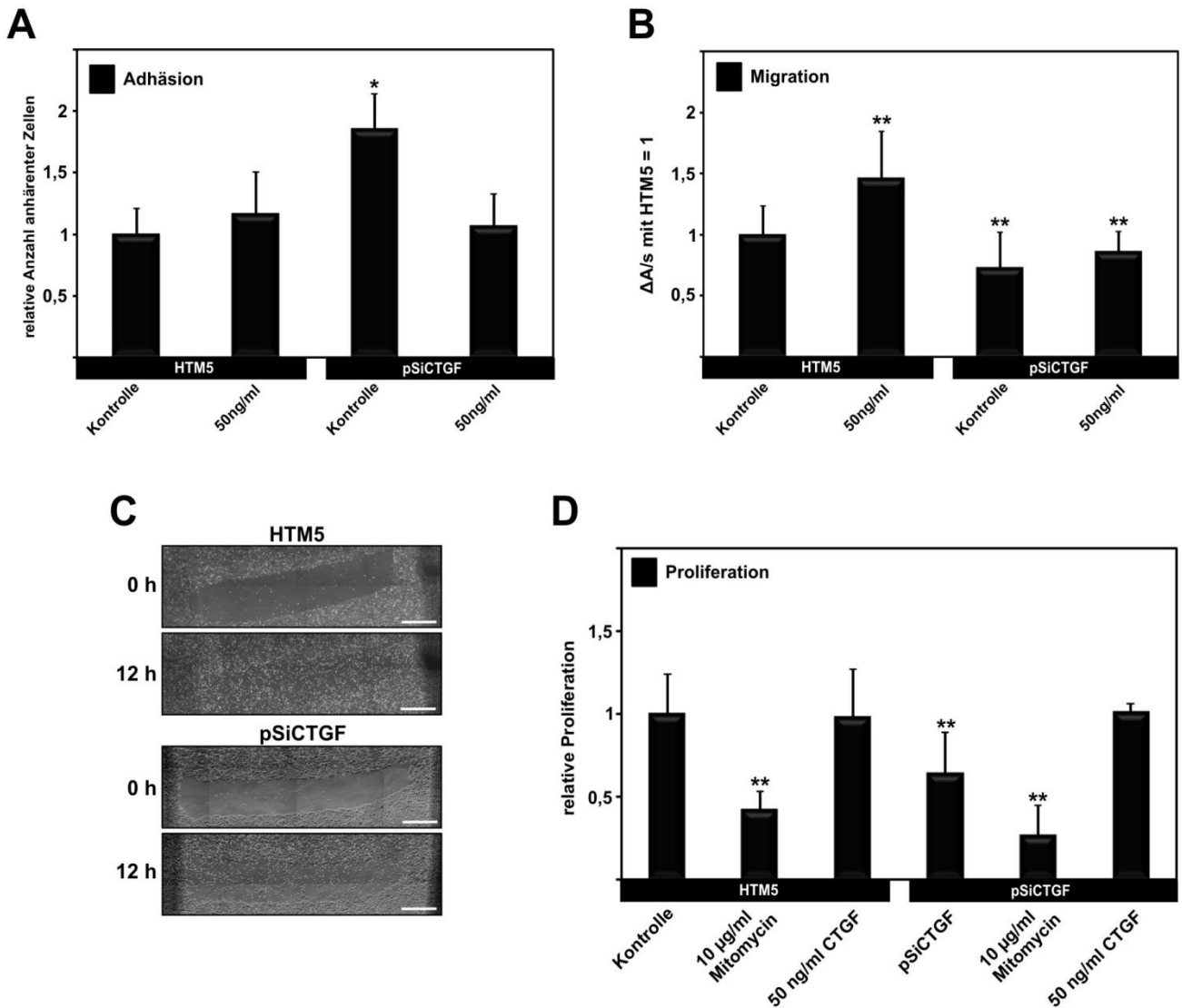
Die Zellen wurden zum einen in serumfreiem Medium, zum anderen in serumfreiem Medium mit Zusatz von 50 ng/ml CTGF inkubiert. Nicht-adhären Zellen wurden im Anschluss an die Adhäsionszeit abgespült und die verbleibenden Zellen wurden fixiert, gefärbt und vermessen. Sowohl bei FN-, Kollagen-IV- als auch bei unbeschichteten Platten waren die Ergebnisse bis auf vernachlässigbare Unterschiede gleichwertig, so dass im Folgenden lediglich das Resultat der FN-beschichteten Platten dargestellt wird (Abb. 33A). Wie schon beim Vorgang des Passagierens beobachtet, zeigten die pSiCTGF-Zellen eine signifikant erhöhte Adhäsion. Im Vergleich zu HTM5-Zellen verblieben nach dem Spülvorgang  $1,9 \pm 0,3$  mal mehr pSiCTGF-Zellen auf der Oberfläche der Kulturschale. Eine gleichzeitige

Behandlung mit CTGF senkte diesen Wert wieder auf das Niveau der HTM5-Zellen. Die Adhäsion von HTM5-Zellen blieb von der CTGF-Behandlung unbeeinflusst.

#### **4.5.5 Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Migrationsfähigkeit von Trabekelwerkzellen**

Die Migration von Zellen auf Oberflächen wird durch Auf- und Abbauprozesse von Fokalkontakten sowie von Aktomyosinfasern verursacht. In Mesangiumzellen wird CTGF als migrationsfördernder Faktor beschrieben (Blom *et al.* 2001). Die bisherigen Beobachtungen könnten auf einen negativen Einfluss des CTGF-Knockdowns auf die Migrationsfähigkeit der Zellen hinweisen. Dies sollte mittels des Scratch- oder Wundheilungsassays (Liang *et al.* 2007) untersucht werden. Hierzu wurden sowohl HTM5- als auch pSiCTGF-Zellen auf Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz ein Kratzer in den Zellrasen eingebracht. Eine Behandlung erfolgte mit 50 und 100 ng/ml CTGF, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Um zu vermeiden, dass Proliferation die Ergebnisse verfälscht, wurden alle Zellen mit 10 µg/ml Mitomycin C behandelt. Die Fläche des Kratzers sowie dessen Länge wurden zu Beginn, sowie nach 3, 6, 12 und 24 h vermessen.

Nach einer Inkubationszeit von 12 h war bereits ohne Vermessung ein Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit zu erkennen (Abb. 33C). Dies wird durch die Auswertung der Messwerte bestätigt. Die pSiCTGF-Zellen zeigen mit  $73 \pm 16\%$  eine signifikant geringere Migrationsrate im Vergleich zu den unbehandelten HTM5-Kontrollzellen. Bei Letzteren führte eine Behandlung mit 50 bzw. 100 ng/ml rekombinantem CTGF zu einem signifikanten Anstieg der Migrationsrate auf  $146 \pm 38\%$ , während die pSiCTGF-Zellen auf eine äquivalente Zugabe des Wachstumsfaktors nur mit einem leichten, im Vergleich zur pSiCTGF-Kontrolle nicht signifikanten Anstieg auf  $86 \pm 28\%$  des HTM5-Kontrollwertes bei 50 ng/ml reagierten (Abb. 33B).



**Abb. 33:** Adhäsion, Migration und Proliferation von pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen. A) relative Adhäsion von HTM5- und pSiCTGF-Zellen auf FN nach 5 h serumfreier Inkubation, sowie nach Behandlung mit 50 ng/ml. B) Änderung der bewachsenen Fläche durch HTM5- und pSiCTGF-Zellen nach 12 h serumfreier Inkubation, sowie nach Behandlung mit 50 ng/ml CTGF; zur Unterdrückung der Proliferation wurden jeweils 10  $\mu$ g/ml Mitomycin zugesetzt. C) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von HTM5- und pSiCTGF-Zellen kurz nach Einbringen des Scratches sowie nach 12 h serumfreier Inkubation. Maßstabsbalken entspricht 300  $\mu$ m D) relative Proliferation von HTM5- und pSiCTGF-Zellen nach 24 h serumfreier Inkubation, Behandlung mit 10  $\mu$ g/ml Mitomycin und 50 ng/ml CTGF. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 16 unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ).

#### **4.5.6 Auswirkungen des CTGF-Knockdowns auf die Proliferationsgeschwindigkeit von Trabekelwerkzellen**

Neben seinen Eigenschaften als Migrations- und Adhäsions-fördernder Faktor werden CTGF auch proliferative Eigenschaften zugesprochen. Eine Behandlung von Ratten-HSCs mit rekombinantem CTGF führte zum Beispiel zu einer gesteigerten Proliferation durch Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges (Gao *et al.* 2004). Ob eine Reduktion von CTGF jedoch zu einer Beeinflussung der Proliferation führt, war bisher noch nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte zur Messung der Proliferation ein BrdU-Assay durchgeführt werden. HTM5- sowie pSiCTGF-Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und mit BrdU-versetztem Medium inkubiert. Um die Auswirkungen einer externen Zugabe von rekombinantem CTGF zu untersuchen wurde jede Zelllinie zudem mit 50 und 100 ng/ml CTGF behandelt. Zur Blockierung der Proliferation, als Negativkontrolle wurde ein Teil der Zellen zudem mit 10 µg/ml Mitomycin C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 24 h.

Im Vergleich zu den unbehandelten HTM5-Zellen zeigten die pSiCTGF-Zellen eine auf  $64 \pm 18\%$  signifikant reduzierte Proliferationsrate, die durch die Inkubation mit Mitomycin C auf  $27 \pm 5\%$  zudem weiter gesenkt wurde als bei den HTM5-Zellen (Reduktion auf  $43 \pm 10\%$ ) (Abb. 33D). Eine Behandlung mit CTGF zeigte bei den HTM5-Zellen keinerlei Auswirkungen, während die Proliferationsrate der Knockdownzellen auf den Wildtypwert anstieg. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Zellen mit 50 oder 100 ng/ml CTGF behandelt wurden.

#### **4.5.7 Einfluss einer Behandlung von pSiCTGF-Zellen mit rekombinantem CTGF auf molekularer Ebene**

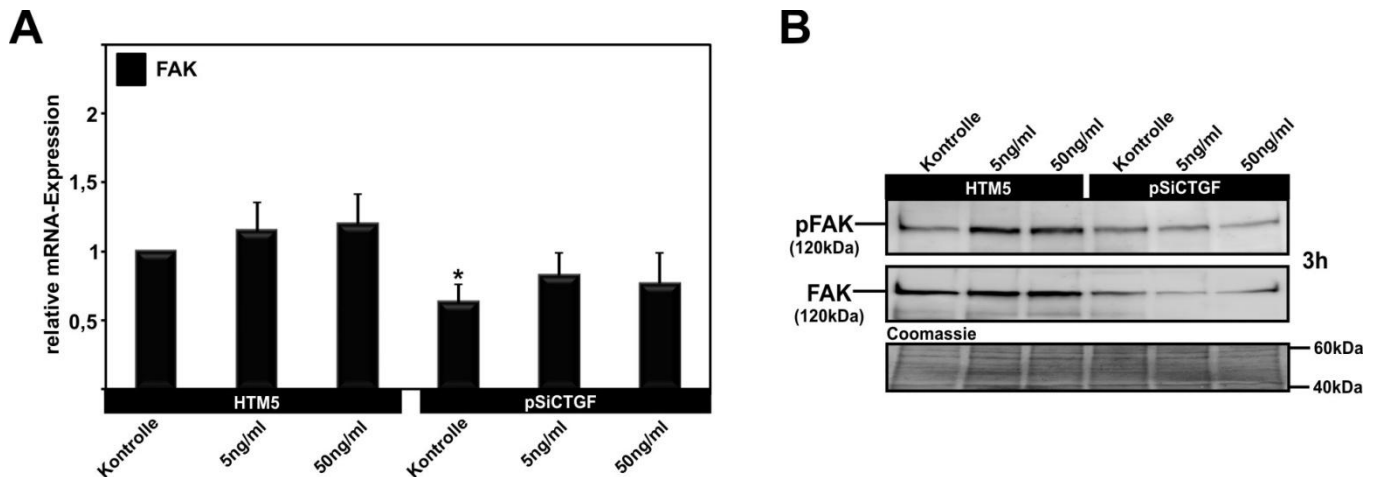
Im folgenden Abschnitt sollte nun die molekulare Ursache für die vorgestellten Ergebnisse der funktionellen Versuche analysiert werden. Besondere Betrachtung lag dabei auf dem bei 4.5.4 und 4.5.6 beobachteten Angleichung an den Wildtyp durch eine Behandlung der pSiCTGF-Zellen mit rekombinantem CTGF.

Zwei kritische Faktoren sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Migration von Zellen sind die Stabilität und der Umsatz an fokalen Kontakten sowie die Aktinzytoskelettdynamik. In Abschnitt 4.5.3 konnte bereits eine Vermehrung der fokalen Kontakte festgestellt werden, wodurch sich die erhöhte Adhäsionsfähigkeit

der Zellen erklären könnte. Da dies nicht mit einem Anstieg der Expression der untersuchten Fokalkontaktbestandteile einherging, wurde im Weiteren die Regulierung von Fokalkontakten untersucht. Eines der bedeutendsten Moleküle in dieser Hinsicht ist die Focal Adhesion Kinase (FAK), die durch Phosphorylierung aktiviert werden kann und für den Umsatz von Fokalkontakten mit verantwortlich ist (Schlaepfer *et al.* 2004). FAK besitzt acht verschiedene Phosphorylierungsstellen. Nach bisherigem Kenntnisstand ist die Phosphorylierung an Tyr-397 durch c-Src oder durch Autophosphorylierung infolge der Interaktion mit dem C-Terminus von Integrin  $\beta 1$  (Kim 2008) ein initialer Schritt in der FAK-Aktivierung. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phosphorylierung an Tyr-397 zu einer Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit von Zellen führt (Schlaepfer *et al.* 2004).

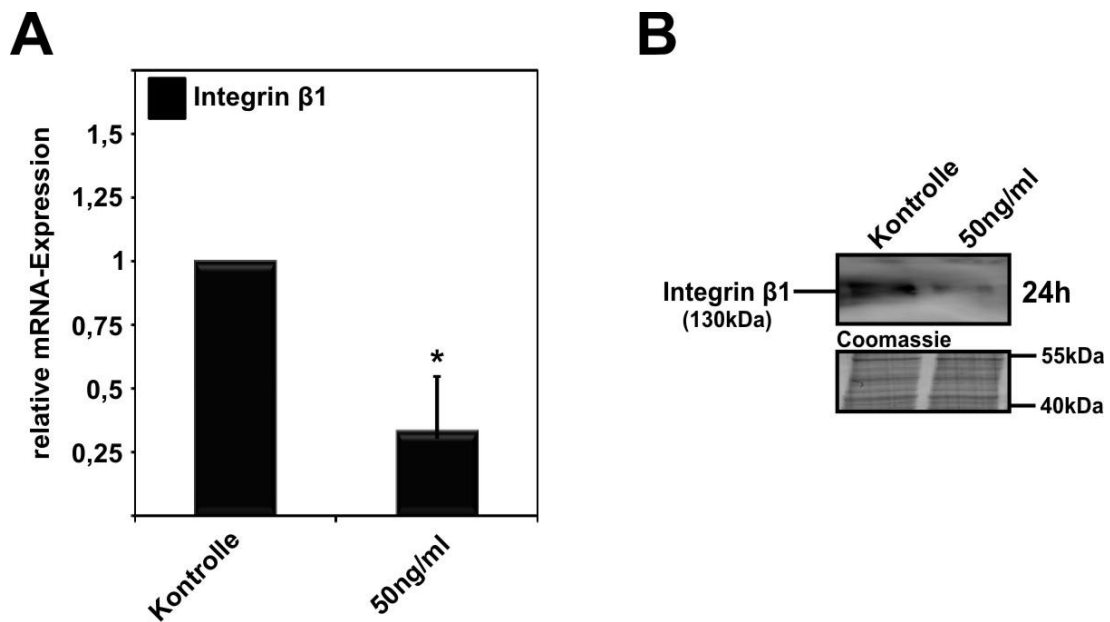
Die Phosphorylierung von FAK an Tyr-397 (pFAK<sup>Tyr397</sup>) wurde im Western Blot mit Hilfe eines gegen diese Stelle spezifischen Antikörpers untersucht und stieg infolge von CTGF-Behandlungen mit 5 und 50 ng/ml bei HTM5- und TW-Zellen innerhalb von 0,5 bis 3 h deutlich an. Ein Maximum vom  $2,8 \pm 0,6$ -fachen der Intensität der unbehandelten HTM5-Kontrolle wurde hierbei nach 3 h Behandlung mit 5 ng/ml erzielt (Abb. 34B). Im Vergleich zu den HTM5-Zellen zeigten die Knockdownzellen eine signifikante Reduktion von pFAK<sup>Tyr397</sup> auf  $53 \pm 12\%$  nach 3 h serumfreier Inkubation. Auch eine Behandlung mit CTGF ergab keine Veränderung in diesem Phosphorylierungsmuster. Die Expression des nicht-phosphorylierten Proteins wurde ebenfalls im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen das Gesamtprotein als auch auf mRNA-Ebene mittels qPCR ermittelt. Hier zeigte sich eine Reduktion der FAK-Expression auf  $57 \pm 14\%$  im Vergleich zu den HTM5-Zellen, welche auch in der qPCR mit  $63 \pm 24\%$  bestätigt werden konnte (Abb. 34A). Die Behandlung mit CTGF resultierte in keinem der untersuchten Fälle in einer Veränderung der FAK-Expression.





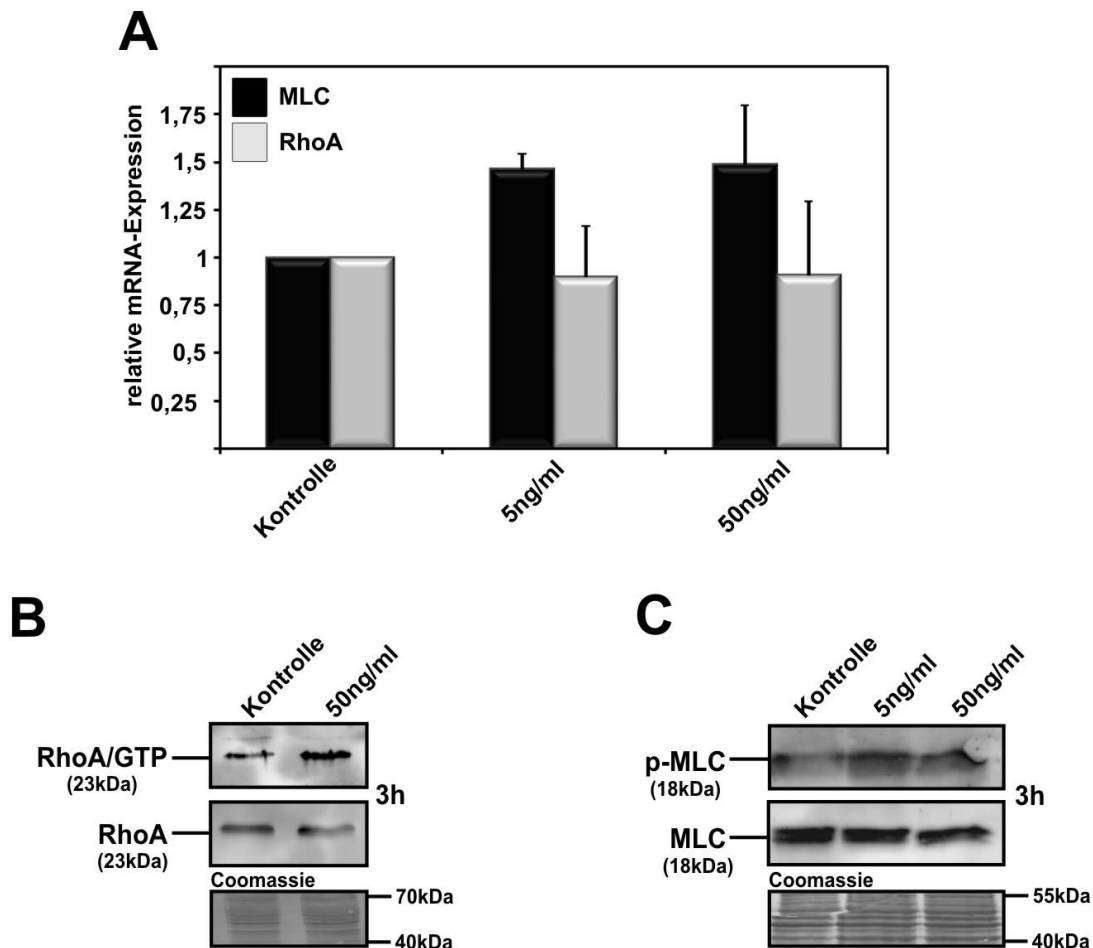
**Abb. 34:** Einfluss einer CTGF-Behandlung, bzw. eines –Knockdowns auf die Phosphorylierung und Expression von FAK. A) qPCR für FAK-mRNA nach einer 3-stündigen Behandlung mit CTGF, bzw. serumfreier Inkubation. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) Western Blot für das an Tyr-397 phosphorylierte FAK, sowie das Gesamt-FAK nach einer 3-stündigen Behandlung mit CTGF, bzw. serumfreier Inkubation.

Nachdem sich Integrin  $\beta 1$  bereits als kritisches Element in der Regulation durch CTGF, sowie nach dessen Knockdown zeigte, sollte nun im Hinblick auf die Bestandteile der fokalen Kontakte auch hier der Einfluss einer CTGF-Behandlung von pSiCTGF-Zellen untersucht werden. Die Behandlung mit 50 ng/ml rekombinantem CTGF über einen Zeitraum von 24 h führte zu keiner Annäherung der Integrin  $\beta 1$ -Expression an den Wildtyp, sondern eher eine weitere Verringerung der Expression. Die mRNA von Integrin  $\beta 1$  reduzierte sich auf  $34 \pm 17\%$  im Vergleich zu unbehandelten pSiCTGF-Zellen (Abb. 35A), was  $17 \pm 10\%$  im Vergleich unbehandelten HTM5-Zellen entsprach. Der entsprechende Proteingehalt im Zelllysatsank auf  $42 \pm 19\%$  des Wertes der unbehandelten pSiCTGF-Kontrolle (Abb. 35B).



**Abb. 35:** Einfluss einer CTGF-Behandlung bei pSiCTGF-Zellen für 24 h auf die Expression von Integrin β1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. A) qPCR für Integrin β1-mRNA nach einer 24-stündigen Behandlung mit CTGF. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) Western Blot für Integrin β1 nach einer 24-stündigen Behandlung mit CTGF.

Um den Einfluss auf den zweiten kritischen Faktor, die Regulation des Aktinzytoskeletts, zu analysieren, wurde wiederum die RhoA-Aktivität, der Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungsgrad von MLC sowie deren Expression auf RNA- und Proteinebene betrachtet. Letztere zeigte sich im Falle von RhoA unbeeinflusst von einer externen CTGF-Zugabe, während die Expression der MLC-mRNA leicht, jedoch nicht signifikant auf das  $1,4 \pm 0,3$ -fache anstieg (Abb. 36A). Im RhoA-Aktivitätsassay stieg die Intensität der RhoA-GTP-Bande nach einer dreistündigen Behandlung mit CTGF auf das  $1,5 \pm 0,2$ -fache im Vergleich zur unbehandelten pSiCTGF-Kontrolle (Abb. 36B). Dieser Anstieg führte zu einer Angleichung an die HTM5-Zellen und konnte somit die Reduktion von RhoA-GTP bei pSiCTGF-Zellen aufheben. Beim Anteil an phosphoryliertem MLC konnte durch CTGF-Behandlung mit einer Konzentration von 50 ng/ml eine Steigerung auf das  $1,8 \pm 0,4$ -fache erreicht werden (Abb. 36C). Dies entsprach umgerechnet dem  $1,4 \pm 0,3$ -fachen verglichen mit den unbehandelten HTM5-Zellen. Der Gesamtproteinanteil an RhoA sowie MLC sank durch die Behandlung mit 50 ng/ml CTGF leicht, aber nicht signifikant ab (Abb. 36B & C).



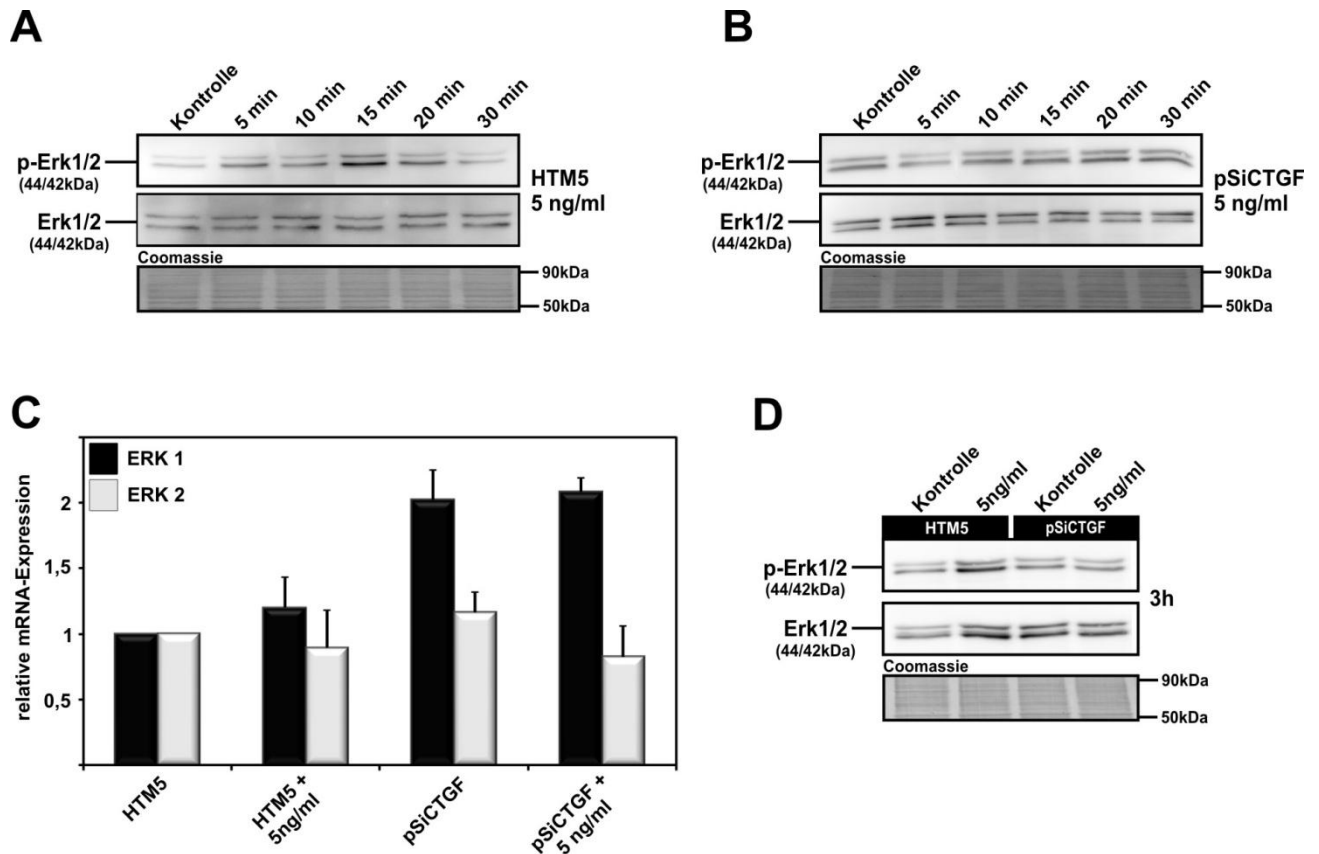
**Abb. 36:** Auswirkungen einer 3-stündigen CTGF-Behandlung von pSiCTGF-Zellen auf die Expression und Aktivität, bzw. Phosphorylierung von RhoA und MLC. A) qPCR für RhoA- und MLC-mRNA nach einer 3-stündigen CTGF-Behandlung von pSiCTGF-Zellen. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen HTM5- und pSiCTGF-Zellen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) RhoA-Aktivitätsassay sowie –Western Blot nach einer 3-stündigen CTGF-Behandlung von pSiCTGF-Zellen. C) Western Blot für das an Thr 18 und Ser 19 phosphorylierte MLC, sowie das Gesamt-MLC nach einer 3-stündigen CTGF-Behandlung von pSiCTGF-Zellen.

Auf die weiteren, im Zusammenhang mit der Regulation des Aktinzytoskeletts sowie der fokalen Kontakte, bereits untersuchten Moleküle mDia, Caldesmon, Profilin-1 sowie Vinculin hatte eine Behandlung der pSiCTGF-Zellen keinen weiteren Einfluss. Neben der Phosphorylierung von Caldesmon zeigt sich ERK1/2, bzw. der durch diese Kinase vertretene MAP-Kinase-Signalweg noch für eine Reihe von weiteren Zellfunktionen mitverantwortlich, wie Migration, Proliferation und Adhäsion (Yao und Seger 2009). In Endothelzellen beispielsweise wird die TGF- $\beta$ -induzierte Bildung von fokalen Kontakten durch den MAP-Kinase-Signalweg vermittelt (Imamichi *et al.* 2005). Zudem konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass dieser Signalweg auch über Integrin-Signale vermittelt wird (Juliano *et al.* 2004) und mit FAK interagieren

kann (Yujiri *et al.* 2003). In dieser Arbeit wurde der MAP-Kinase-Signalweg durch Untersuchung der Expression als auch der Phosphorylierung von ERK1/2 betrachtet.

Da die Phosphorylierung von ERK1/2 nach Signaleingang relativ schnell vonstattengeht, wurden zwei verschiedene Zeiträume untersucht: 5 bis 30 min und 3 h. Im ersten Zeitraum konnte keine signifikante Veränderung der ERK1/2-Expression auf Proteinebene festgestellt werden. Die Phosphorylierungsintensität (pERK1/2) hingegen stieg nach 15 min Behandlung von HTM5/TWZ mit 5 ng/ml CTGF auf das  $7,3 \pm 2,8$ -fache der unbehandelten Kontrolle an und fiel anschließend wieder auf den Wert der Kontrolle zurück (Abb. 37A). Die pSiCTGF-Zellen reagierten bei gleicher Behandlung ebenso nach 15 min, jedoch nur mit einem Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung auf das  $1,3 \pm 0,2$ -fache des Kontrollwertes (Abb. 37B). Die Behandlung mit 50 ng/ml führte zu äquivalenten Reaktionen.

Nach 3 h zeigte sich bei den HTM5-Zellen nach Behandlung mit 5 ng/ml CTGF auf mRNA-Ebene ein leichter Anstieg der ERK 1-Expression auf das  $1,2 \pm 0,2$ -fache, während die ERK 2-mRNA unverändert blieb (Abb. 37A). Bei den pSiCTGF-Zellen wurde die  $2,0 \pm 0,2$ -fache Menge an ERK1 im Vergleich zu unbehandelten HTM5-Zellen exprimiert, die Expression der ERK2-mRNA blieb konstant. Eine Behandlung von pSiCTGF-Zellen mit CTGF hatte keinen weiteren Einfluss auf die Transkription von ERK 1/2 (Abb. 37C). Auf Proteinebene fiel die Erhöhung der ERK1/2-Expression mit einer Verdreifachung der Bandenintensität ( $3,3 \pm 1,4$ ) nach Behandlung von HTM5-Zellen mit 5 ng/ml CTGF deutlich stärker aus, wobei hier ERK1 und 2 äquivalent reguliert waren. Wiederum zeigten die pSiCTGF-Zellen einen  $1,7 \pm 0,4$ -fach erhöhten Gehalt an ERK1/ 2 im Vergleich zu unbehandelten HTM5-Zellen, aber auch hier hatte die Behandlung mit rekombinantem CTGF keine weiteren Einfluss auf die Expression (Abb. 37D). Bei der Betrachtung von pERK1/2 fällt der deutliche Anstieg der Bandenintensität auf das  $2,2 \pm 0,6$ -fache nach Behandlung mit 5 ng/ml bei HTM5-Zellen auf. Das heißt, das vermehrt gebildete ERK1/2 wurde zudem auch fast vollständig phosphoryliert. In der Phosphorylierung von ERK1/2 zeigten die pSiCTGF-Zellen nach 3 h Inkubationszeit zum einen keinen Unterschied zu den unbehandelten HTM5-Zellen, sie zeigten aber auch keine Reaktion auf das dem Medium zugegebene CTGF (Abb. 37D).

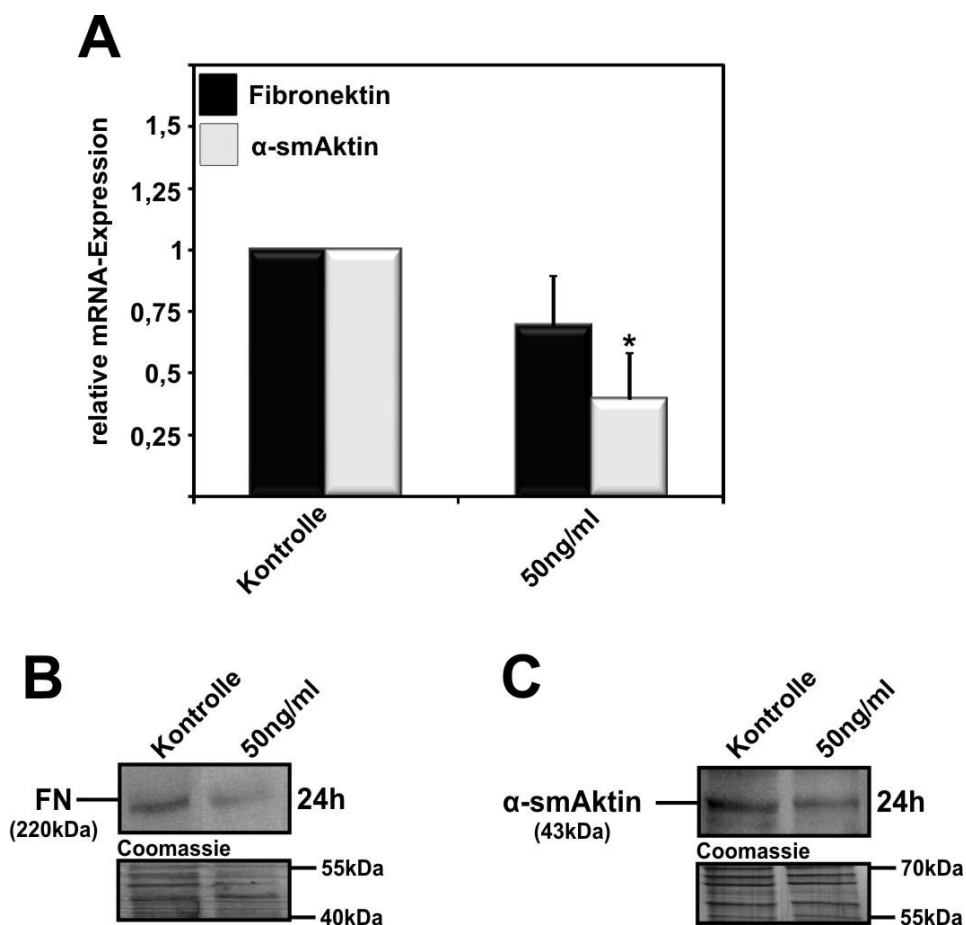


**Abb. 37:** Einfluss einer CTGF-Behandlung, bzw. eines –Knockdowns auf die Phosphorylierung und Expression von ERK1/2. A & B) Western Blot für phosphoryliertes ERK1 und 2, sowie das Gesamt-ERK1 und 2 nach einer 5- bis 30-minütigen Behandlung von HTM5- (A) sowie pSiCTGF-Zellen (B) mit CTGF. C) qPCR für ERK1- und 2-mRNA nach einer 3-stündigen Behandlung mit CTGF, bzw. serumfreier Inkubation. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\*p < 0,05; \*\*p < 0,02). D) Western Blot für phosphoryliertes ERK1 und 2, sowie das Gesamt-ERK1 und 2 nach einer 3-stündigen Behandlung mit CTGF, bzw. serumfreier Inkubation.

Nach dem unerwarteten, aber deutlichen Rückgang der Integrin  $\beta 1$ -Expression bei pSiCTGF-Zellen nach Behandlung mit CTGF sollte als nächstes untersucht werden, inwieweit auch andere durch CTGF regulierte Proteine auf diese Behandlung reagieren. Da es sich bei Integrin  $\beta 1$  um den Bestandteil eines möglichen CTGF-Rezeptors handelt, schien es wahrscheinlich, dass auch andere „Effektorproteine“ von CTGF betroffen waren. Betrachtet wurden FN als Vertreter der EZM-Moleküle und  $\alpha$ -smAktin als der Vertreter der Zytoskelettproteine.

Bei beiden Effektorproteinen konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene ein Rückgang der Expression durch CTGF-Behandlung beobachtet werden. Eine Behandlung mit 50 ng/ml rekombinantem CTGF für 24 h führte in der qPCR zu einem leichten Absinken der FN-Expression auf  $70 \pm 12\%$  im Vergleich zu

unbehandelten pSiCTGF-Zellen ( $34 \pm 13\%$  im Vergleich zu HTM5-Zellen), während die Expression der  $\alpha$ -smAktin-mRNA signifikant auf  $39 \pm 12\%$  absank ( $29 \pm 14\%$  im Vergleich zu HTM5-Zellen; Abb. 38A). Im Western Blot konnten diese Erkenntnisse auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die Produktion von FN-Protein sank nach Behandlung mit 50 ng/ml CTGF auf  $62 \pm 20\%$  im Vergleich zur pSiCTGF-Kontrolle und auf  $24 \pm 11\%$  im Vergleich zu unbehandelten HTM5-Zellen (Abb. 38B). Im Fall von  $\alpha$ -smAktin sank die Proteinexpression auf  $39 \pm 16\%$  im Vergleich zur pSiCTGF-Kontrolle, was im Verhältnis zu HTM5-Kontrollzellen einem Absinken auf  $22 \pm 12\%$  entsprach (Abb. 38C).



**Abb. 38:** Einfluss einer CTGF-Behandlung bei pSiCTGF-Zellen für 24 h auf die Expression von FN und  $\alpha$ -smAktin im Vergleich zur unbehandelten pSiCTGF-Kontrolle. A) qPCR für FN sowie  $\alpha$ -smAktin-mRNA nach einer 24-stündigen Behandlung mit CTGF. Es werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt. \*/\*\* markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,02$ ). B) Western Blot für FN nach einer 24-stündigen Behandlung mit CTGF. C) Western Blot für FN nach einer 24-stündigen Behandlung mit CTGF.

## 5 Diskussion

### 5.1 Induktion von CTGF in humanen TWZ

CTGF gehört zu den am stärksten exprimierten Genen im humanen TW (Tomarev *et al.* 2003). Bevor eine genaue Analyse der Wirkung von CTGF auf das humane TW durchgeführt wurde, sollte zunächst geklärt werden, welche Signalwege die CTGF Expression im TW beeinflussen können. Hierbei wurden diejenigen Signalmoleküle untersucht, die zum einen im KW vorkommen und mit CTGF interagieren können und/oder im KW von POWG-Patienten verändert vorkommen. Bisher waren lediglich TGF- $\beta$ 2, Dexamethason und mechanischer Stress als potentielle Induktoren der CTGF-Expression im TW bekannt (Chudgar *et al.* 2006). An verschiedenen humanen Zelllinien aus anderen Geweben konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren die CTGF-Synthese zu induzieren vermag. Im Zusammenhang mit der Pathogenese des POWG waren die Signalmoleküle Endothelin-1, Angiotensin II sowie IGF-1 von besonderem Interesse. Endothelin-1 und Angiotensin II sind beide in der Lage die CTGF-Expression über den RhoA/ROCK-Signalweg zu steigern (Iwanciw *et al.* 2003; Rodriguez-Vita *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in humanen TWZ durch Endothelin-1 und Angiotensin II eine Induktion der CTGF-Expression erzielt werden kann. In humanen Lungenfibroblasten induzierte Endothelin-1 nicht nur die Expression von CTGF, sondern ebenso die einer Reihe von EZM-Molekülen wie etwa Kollagen Typ IV. Hierbei wurde jedoch nicht geklärt, ob diese Induktion der EZM-Moleküle durch CTGF vermittelt wurde oder eine direkte Wirkung des Endothelin-1 darstellte (Xu *et al.* 2004). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Endothelin-1 bei Myofibroblasten zu einer Kontraktion sowie zu einer Induktion von Zytoskelettbestandteilen wie dem  $\alpha$ -smAktin führen kann (Shi-Wen *et al.* 2004). Dies konnte von der Gruppe um Wiederholt auch für TWZ bestätigt werden (Lepple-Wienhues *et al.* 1991; Wiederholt *et al.* 2000). Angesichts der Tatsache, dass Endothelin-1 vermehrt im KW von Glaukomapatienten beobachtet wurde (Noske *et al.* 1997), könnte es sich um einen durchaus kritischen Faktor in der Pathogenese des POWG zu handeln. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der aufgezeigten CTGF-Expressionssteigerung und den durch Endothelin-1 induzierten Effekten ist zu vermuten, da CTGF ebenfalls zu einer gesteigerten EZM-Synthese und zu Veränderungen im Aktinzytoskelett führen kann.

Bei Angiotensin II ist bisher noch keine Untersuchung bekannt, die auf ein vermehrtes Vorkommen bei POWG-Patienten hinweist, obwohl Angiotensin II grundsätzlich im KW nachgewiesen wurde (Osusky *et al.* 1994). Bereits 1981 konnte durch Kaufman und Bárány gezeigt werden, dass eine Perfusion von Affenvorderkammern mit Angiotensin-II zu einer Verringerung der Kammerwasserabflussrate führte (Kaufman und Barany 1981). Auch später konnten verschiedene Gruppen einen Einfluss von Angiotensin II auf den IOD sowie den uveoskleralen Kammerwasserabfluss aufzeigen (Palm *et al.* 1995; Inoue *et al.* 2001). Das Peptidhormon Angiotensin II wird als Angiotensinogen sezerniert und durch Renin zu Angiotensin I gespalten. Nach Entfernung von zwei weiteren Aminosäuren durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) entsteht Angiotensin II. Dieses ACE konnte ebenfalls bereits im KW detektiert werden (Osusky *et al.* 1994). Untersuchungen mit ACE-Inhibitoren konnten für diese Substanzen einen IOD-senkenden Effekt bei induzierten Modellformen des akuten und chronischen Glaukoms im Kaninchen nachweisen (Shah *et al.* 2000). Angiotensin II bewirkt in glatten Muskelzellen sowie in Nierenzellen einen von CTGF abhängigen Anstieg an FN, was mit der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde (Ruperez *et al.* 2003; Ruperez *et al.* 2003). Ebenso wie im Falle von Endothelin-1 ist es auch bei Angiotensin II durchaus denkbar, dass die im Auge beobachteten Veränderungen durch CTGF vermittelt werden.

Zur Rolle von IGF-1 bei der Pathogenese des POWG existieren bislang nur sehr wenige Informationen. IGF-1 konnte bereits im KW detektiert werden (Koliakos *et al.* 2001) und wird neben seinem Rezeptor auch im TW exprimiert (Wordinger *et al.* 1998; Cao *et al.* 2002). Daneben wurde ein Zusammenhang zwischen Gen-Polymorphismen im IGF-II-Gen und dem Auftreten des POWG beobachtet (Tsai *et al.* 2003). Ein Zusammenhang mit der Expression von CTGF konnte bereits in einer Arbeit mit Nierenfibroblasten gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte in diesem System jedoch eine Inhibition der CTGF-Expression durch IGF-1 (Lam *et al.* 2003) nachgewiesen werden. Für diese unterschiedliche Wirkung auf die CTGF-Expression könnten Zelltyp-spezifische Regulationsmechanismen verantwortlich sein. Ein weiterer Unterschied bei der Regulation von CTGF, der hierfür spricht, ist die Autoinduktion Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Veröffentlichung von Haydont *et al.* konnte eine Autoinduktion von CTGF gezeigt werden (Haydont *et al.* 2008). Bei den



Untersuchungen von Lam *et al.* hingegen inhibierte die CTGF-Behandlung die CTGF-Expression.

Neben der Steigerung der Expression könnte IGF-1 auch die Funktionalität von CTGF im KW beeinflussen. So wurde 2001 von Wang *et al.* eine Erhöhung der CTGF-Aktivität durch IGF-Bindung an die IGFBP-Domäne beschrieben, wodurch die CTGF-induzierte Expressionssteigerung von Kollagen Typ III weiter erhöht wurde (Wang *et al.* 2001). Beides, sowohl der Einfluss auf die Expression als auch auf die fibrogene Wirkung von CTGF weisen auf eine relevante Funktion von IGF-1 im Zusammenhang mit CTGF und der Entstehung des POWG hin.

Die Faktoren Angiotensin II, IGF-1 und Endothelin-1 zeigten eine in dieser Reihenfolge ansteigende Inkubationsdauer bei der Induktion der CTGF-Expression. Ob dies auch *in vivo* von Relevanz ist, kann aus den Zellkulturversuchen nur sehr bedingt abgeleitet werden. Die Konzentration im KW und den umliegenden Geweben wird *in vivo* vermutlich durch eine andauernde Produktion der Signalmoleküle relativ konstant gehalten. Dahingegen nimmt die Konzentration *in vitro* durch zelluläre Prozesse wie auch durch Instabilität der Faktoren mit der Zeit ab.

Der induktive Effekt auf CTGF könnte zudem durch den beobachteten leichten autoinduktiven Effekt verstärkt werden. Dieser Effekt konnte allerdings nur bei den geringeren CTGF-Konzentrationen beobachtet werden und nimmt bei hohen Konzentrationen kontinuierlich ab. Dies deutet darauf hin, dass die Autoinduktion unter normalen Umständen, jedoch vermutlich nicht bei pathologisch erhöhter CTGF-Expression physiologisch relevant ist. Ein autoinduktiver Effekt von CTGF konnte bereits von anderen Autoren in „fibrosis-derived“ Zellen glatter Muskeln beobachtet werden. Hier fiel die Induktion allerdings mit einer fast dreifachen Steigerung deutlich intensiver aus. Sie beschränkte sich dabei nicht auf niedrige CTGF-Konzentrationen, sondern konnte konzentrationsabhängig gesteigert werden (Haydont *et al.* 2008). Diese Unterschiede in Bezug auf die Regulation und die Autoinduktion von CTGF weisen daraufhin, dass hier zellspezifische Mechanismen zur Expression von CTGF vorhanden sind. Aufgrund dieser zellspezifischen Regulation ist es notwendig, auch die Funktion von CTGF in den jeweiligen Geweben zu testen, da weder ein CTGF-spezifischer Rezeptor noch ubiquitäre Regulationsmechanismen bislang bekannt sind.

## 5.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem humanem CTGF

Für weiterführende Untersuchungen zur Rolle von CTGF im TW, bzw. in der Pathogenese des POWG war es notwendig, das Protein in rekombinanter Form verfügbar zu haben und anwenden zu können. Die erfolgreiche Aufreinigung von rekombinantem humanem CTGF aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK293-Zellen ermöglichte diese weiteren Analysen.

CTGF ist zwar kommerziell erhältlich, jedoch nur aus prokaryotischer Herstellung. Als extrazelluläres Signalprotein durchläuft CTGF in humanen Zellen den sekretorischen Weg, bei der die Peptidkette durch Glykosylierungen modifiziert wird (Yang *et al.* 1998). Glykosylierungen tragen unter anderem zur korrekten Faltung, Substratspezifität sowie zur Stabilität von extrazellulären Proteinen bei (Lodish 2008). Diese Voraussetzung ist bei der Produktion in prokaryotischen Systemen nicht gegeben, was die Aussagekraft von Experimenten stark einschränkt. Durch die eigene Herstellung in humanen, eukaryotischen Zellen, welche auch als Wildtypzellen bereits CTGF exprimieren (Ito *et al.* 1998), wurde gewährleistet, dass die Peptidkette zum einen glykosyliert aber auch korrekt gefaltet wurde. Damit steht rekombinantes CTGF zur Verfügung, dass molekular dem Wildtyp CTGF möglichst ähnlich ist.

Die Aufreinigung aus dem konditionierten Medium über die Ausnutzung der Heparin-Affinität der CT-Domäne wurde bereits von Ball *et al.* beschrieben (Ball *et al.* 2003). Viele extrazelluläre Signalmoleküle wie etwa der Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 sind ebenfalls in der Lage an Heparin bzw. Heparinsulfatproteoglykane zu binden (Schönherr und Hausser 2000). So war zu erwarten, dass in den von der Heparinsäule eluierten Fraktionen außer CTGF noch weitere, unerwünschte Proteine vorhanden waren. Dies bestätigte sich auch durch die Analyse dieser Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung, einer Methode, von deren Gebrauch die bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema weitestgehend absahen. Um die Verunreinigung durch andere Proteine und damit die Anwesenheit von weiteren Signalmolekülen auszuschließen, wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels dem an die Peptidkette C-terminal angefügten Histidin-Tag und einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographiesäule durchgeführt (Janknecht *et al.* 1991). Wie in der anschließenden Silbergel- und Western Blot-Analyse zu sehen war, waren außer CTGF und den bioaktiven Abbauprodukten keine weiteren Proteine in detektierbaren

Konzentrationen vorhanden. Aus diesem Grund konnte davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Reaktionen humaner TWZ auch wirklich auf ein bioaktives CTGF zurückzuführen waren.

### 5.3 Der Einfluss von CTGF auf die Synthese der extrazellulären Matrix

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTGF nicht nur die Expression verschiedener Komponenten der EZM zu induzieren vermag, sondern zudem einige dem Faktor TGF- $\beta$ 2 zugeschriebene Effekte vermittelt. Daneben zeigten sich für CTGF weitergehende eigenständige Eigenschaften. Die Vermittlung des TGF- $\beta$ 2-induzierten Anstiegs an FN, untersucht durch spezifische Inhibition der CTGF-Expression mittels siRNA, bestätigte dabei die Rolle von CTGF als Downstream-Mediator von TGF- $\beta$ 2. Diese konnte auch bereits in anderen Zellsystemen wie humanen Astrozyten aufgezeigt werden der *Lamina cribrosa* (Fuchshofer *et al.* 2005). CTGF und TGF- $\beta$ 2 führen beide zu einer Induktion der Expression von Kollagen Typ III, IV und VI in TWZ. Die Expression von Kollagen Typ I, welches zusammen mit Kollagen Typ III hauptsächlich in den gestreiften Kollagenfasern der Bindegewebslamellen des korneoskleralen TWs lokalisiert ist (Marshall *et al.* 1991), wird im Gegensatz dazu lediglich von CTGF induziert und steht nicht unter der Kontrolle von TGF- $\beta$ 2 (Fuchshofer *et al.* 2007). Die gemeinsam regulierten EZM-Komponenten bilden zusammen mit Zelloberflächenmolekülen Zell-Matrix-Kontakte aus. CTGF vermittelt daher offenbar lediglich die Effekte von TGF- $\beta$ 2, die direkt diese Komponenten beeinflussen.

TWZ des uvealen Teils des TWs sitzen einer Basallamina auf, deren Hauptbestandteil Kollagen Typ IV darstellt (Marshall *et al.* 1990; Hann *et al.* 2001). Im juxtakanalikulären TW finden sich Kollagene des Typs IV im amorphen, fibrogranulären Material, das die Zellen umgibt (Hann *et al.* 2001). Fibrillen, bestehend aus FN sowie aus Kollagen Typ VI, fanden sich in den Hüllen der elastischen Fasern im juxtakanalikulären TW, die sowohl mit TWZ als auch mit Endothelzellen des SK über Zell-Matrix-Verbindungen verknüpft sind (Hann *et al.* 2001; Lütjen-Drecoll und Rohen 2001). Vor allem die durch FN gebildeten Zell-Matrix-Verbindungen scheinen für Funktion und Struktur des juxtakanalikulären TW

sowie des SK von grundlegender Bedeutung zu sein. So kommt es nach Perfusionsversuchen mit der Integrin-bindenden Domäne des FN (Heparin-II- bzw. HepII-Domäne) von isolierten humanen Augenvorderkammern zu einem Ablösen des Schlemmkanalendothels vom juxtakanalikulären TW und damit zu einem Anstieg der Kammerwasserabflussrate (Santas *et al.* 2003). Daneben führte die Behandlung mit HepII in Zellkulturversuchen mit humanen TWZ zu einer Abnahme der Kontraktilität. Dieser Vorgang wird durch Integrin  $\alpha 4 \beta 1$  vermittelt (Schwinn *et al.* 2010).

CTGF wird unter anderem durch Hochdruckperfusionsen sowie mechanischen Stress im TW induziert (Chudgar *et al.* 2006). Daher könnte eine grundlegende Funktion von CTGF im TW darin bestehen, Zell-Matrix-Verbindungen in Reaktion auf mechanischen Stress zu verändern und sich den neuen Bedingungen anzupassen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt. CTGF war in der Lage die Expression der Integrin-Untereinheit  $\beta 1$  zu induzieren, welche einen wichtigen Bestandteil von FN- sowie Kollagen Typ IV-bindenden Integrinen darstellt (Humphries *et al.* 2006). Zudem zeigte sich, dass eine Veränderung der Expression von Integrinen sowie von Kollagen Typ III und VI eine nur geringe Menge an CTGF benötigte. Dies lässt darauf schließen, dass CTGF auch *in vivo* unter normalen Bedingungen für die Regulation dieser Moleküle mitverantwortlich ist. Während diese Regulationsmechanismen eine der basalen Funktionen im gesunden TW darstellen könnten, vermag eine pathologisch erhöhte und über längere Zeit anhaltende CTGF-Expression ursächlich für die beobachtete Zunahme der EZM bei vielen Patienten mit POWG verantwortlich zu sein.

Die Untersuchungen zur Expression von EZM-Molekülen konnten bereits aufzeigen, dass CTGF nicht nur als Downstream-Mediator von TGF- $\beta$  zu sehen ist, sondern weiterhin auch eigenständige Regulationen zu vermitteln mag. Auch umgekehrt wurden einige von TGF- $\beta$  vermittelte Funktionen nicht durch CTGF beeinflusst. So stellt TGF- $\beta 2$  einen potenten Effektor des extrazellulären proteolytischen Systems in humanen TWZ dar (Fuchshofer *et al.* 2003). CTGF hingegen hatte weder einen Einfluss auf die Expression, noch auf die Aktivität der untersuchten Komponenten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl potentielle Inhibitoren der Aktivierung von MMPs als auch die MMPs direkt untersucht.

PAI-1 ist ein direkter Inhibitor des Plasminogen-Plasmin Systems und wirkt somit als indirekter Inhibitor der MMP-Aktivierung. Dadurch kann PAI-1 experimentell

als Reportergen von TGF- $\beta$  genutzt werden (Abe *et al.* 1994). Aus der Literatur ergeben sich im Bezug auf die Regulation von PAI-1 durch CTGF widersprüchliche Befunde. Während Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2007) durch einen CTGF spezifischen Antisense Konstrukt die TGF- $\beta$  induzierte Synthese von PAI-1 in Zellen aus Nierengewebe blockieren konnte, war es nicht möglich in Astrozyten des *N. optikus* eine Korrelation zwischen CTGF und der Expression von PAI-1 herzustellen (Neumann *et al.* 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von CTGF auf die Expression von PAI-1 festgestellt werden. Der in diesem Zusammenhang durchgeführte Luciferase-Assay mit TGF- $\beta$ -sensitivem PAI-1-Promotor konnte zudem keine Modulation des TGF- $\beta$ -Signals durch CTGF aufzeigen. Weiterhin zeigte Abreu *et al.* eine verstärkte Rezeptorbindung von TGF- $\beta$  bei gleichzeitiger Anwesenheit von CTGF, sowie eine Verstärkung der TGF- $\beta$ -vermittelten Effekte durch eine transiente Überexpression von CTGF (Abreu *et al.* 2002). Diese Wirkung wurde durch die Bindung von TGF- $\beta$  an die VWC-Domäne erklärt. Die Versuche von Abreu *et al.* wurden jedoch in *Xenopus*-Embryos mit den entsprechenden homologen Proteinen durchgeführt und müssen aus diesem Grund nicht auf das humane System übertragbar sein. Dies schließt jedoch nicht aus, dass CTGF über Bindung an extrazelluläre Signalmoleküle deren Effekte auf Zellen zu modulieren vermag.

Bis heute ist kein eindeutiger Rezeptor bekannt, der das CTGF-Signal in das Zellinnere vermitteln könnte. So ist CTGF in der Lage an die Integrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Babic *et al.* 1999),  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Gao und Brigstock 2005) und  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 (Heng *et al.* 2006), den Korezeptor des Wnt-Signalweges Lipoprotein receptor related protein 6 (LRP6) (Mercurio *et al.* 2004), den Neurotrophic Tyrosin Kinase Rezeptor (TrkA/NTKR) (Wahab *et al.* 2005) sowie an das Low density lipoprotein receptor related protein (LRP) (Segarini *et al.* 2001) zu binden. Somit könnte CTGF Einfluss auf die verschiedensten intrazellulären Signalwege nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit fielen mit den Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ V und  $\beta$ 1 zwei mögliche Bestandteile eines Rezeptors durch ihre deutliche Expressionssteigerung nach CTGF-Behandlung auf. Dies verweist auf einen erhöhten Anteil an Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 1 in der Membran der TWZ. Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 1 kann in alveolar-epithelialen Krebszellen den „small latent TGF- $\beta$ “-Komplex binden und damit den Anteil an latentem TGF- $\beta$  auf der Zelloberfläche erhöhen (Munger *et al.* 1998). Weiterhin ist FN für die Anhäufung des „latent TGF- $\beta$

binding protein 1“ (LTBP1) in der EZM notwendig (Dallas *et al.* 2005). LTBP1 bindet an das latente TGF- $\beta$  und vermittelt den Transport zum Ort seiner Aktivierung (Oklu und Hesketh 2000). Somit kann es als wahrscheinlich angesehen werden, dass CTGF durch die Modulierung der FN- sowie Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 1-Synthese zudem den Anteil an latentem TGF- $\beta$  im TW erhöhen kann. Dieses könnte nach seiner Aktivierung zu einem Anstieg der TGF- $\beta$ -induzierten Veränderungen führen.

Desweiteren könnte die veränderte Integrin-Expression eine direkte Auswirkung auf das Aktinzytoskelett hervorrufen, ein Aspekt der für das POWG von großer Bedeutung sein könnte.

#### **5.4 Der Einfluss von CTGF auf das Aktomyosinsystem humaner TWZ**

Nicht alle Patienten mit POWG und einem erhöhten IOD zeigen eine Akkumulation von extrazellulärem Material im Bereich des TWs (Lütjen-Drecoll *et al.* 1986; Rohen *et al.* 1993). Zusätzlich weisen morphometrisch basierte Berechnungen darauf hin, dass die Vermehrung an EZM allein nicht ausreicht um einen erhöhten Abflusswiderstand zu erklären (Overby *et al.* 2009). Aus diesem Grund wurde im weiteren Teil der Arbeit die Kontraktilität von TWZ und deren Zusammenhang mit CTGF untersucht.

Es ist aus zahlreichen Publikationen bekannt, dass eine Veränderung des Zytoskeletts in verschiedenen Zelltypen zu einer veränderten Expression von CTGF führt. Besonders in den Arbeiten an Endothelzellen der Arbeitsgruppe von Frau Goppelt-Strübe zeigte sich, dass eine hohe CTGF-Expression von einem intakten Aktinzytoskelett bzw. genauer von einem niedrigen G-Aktin-Level abhängig ist (Ott *et al.* 2003). So konnte die CTGF-Expression durch Behandlungen mit Jasplakinoliden, die zu einer Stressfaserbildung, also Aktin-Polymerisation führen, erhöht werden. Latrunculin hingegen bindet an G-Aktin und verhindert so die Polymerisation, was infolge der Aktinfaserdynamik zu einem Abbau des Zytoskeletts und zu einem Einbruch der CTGF-Expression führte. Dies konnte auch in dieser Arbeit durch die Behandlung von humanen TWZ mit Latrunculin bestätigt werden. Die Untersuchungen an Endothelzellen ergaben, dass die Erhöhung und Senkung der CTGF-Expression mittels Aktinzytoskelett-beeinflussenden Substanzen von RhoA-abhängig

waren (Muehlich *et al.* 2007). Humane TWZ reagierten sowohl auf Endothelin-1, Angiotensin II als auch auf Latrunculin ähnlich zu anderen Systemen. Somit kann angenommen werden, dass auch hier RhoA bei der Regulation der Expression eine Rolle spielt. Neben den Untersuchungen bzgl. der Wirkung auf die CTGF-Expression wurden von mehreren Arbeitsgruppen Behandlungen an isolierten TWZ und Augenvorderkammern in Perfusionskultur durchgeführt. So wurde nachgewiesen, dass Latrunculin in der Lage ist, den Abflusswiderstand des KWs im TW bzw. im Endothel des SK zu senken. Dadurch erhöhte sich die Abflussrate und der IOD sank (Peterson *et al.* 2000; Okka *et al.* 2004; Ethier *et al.* 2006). In all diesen Studien wurden diese Effekte der Depolymerisation des Aktinzytoskeletts und der damit verlorenen Kontraktionsfähigkeit der Zellen zugeschrieben. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnet sich jedoch eine weitere Erklärungsmöglichkeit. Diese würde insbesondere der stärkeren Verringerung des IOD nach wiederholter Gabe von Latrunculin durch Okka *et al.* Rechnung tragen. Einer anhaltenden Reduktion der CTGF-Expression würde dabei auch ein Absinken der EZM-Synthese folgen. Dies könnte bei einem weiter konstanten Abbau durch extrazelluläre Proteasen zu einer Verringerung an extrazellulärem Material im Bereich des Kammerwasserabflusses führen.

Umgekehrt zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CTGF in der Lage ist, das Aktinzytoskelett zu modifizieren und darüber hinaus eine Kontraktion der TWZ zu induzieren. CTGF erhöhte die Expression von  $\alpha$ -smAktin, der Hauptkomponente des Aktinzytoskeletts, sowie die der Aktin-quervernetzenden  $\alpha$ -Actinine. Zusammen mit der Aktivierung von RhoA und der daraus resultierenden Phosphorylierung der regulatorischen MLC führte CTGF zu einem Anstieg der Anzahl von Aktin-Stressfasern und einer erhöhten Kontraktilität der TWZ. Das leichte Absinken der Profilin-1-Expression nahm offenbar darauf keinen signifikanten Einfluss.

Durch diese Resultate ist die vorliegende Arbeit die erste Studie, die ein solches Potential von CTGF in Bezug auf die Regulation des Aktinzytoskeletts aufzeigen konnte. So wurde bereits an tubulären Zellen der Niere eine Induktion von  $\alpha$ -smAktin durch CTGF beobachtet (Burns *et al.* 2006). Auch konnte in „fibrosis-derived“ Zellen glatter Muskeln durch CTGF RhoA aktiviert werden (Haydont *et al.* 2008). Dass CTGF jedoch in der Lage ist das Aktinzytoskelett angefangen bei der Expression seiner Komponenten, über die Induktion der Stressfaserbildung bis zur

Kontraktion der gesamten Zelle zu beeinflussen, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Für TGF- $\beta$  hingegen konnten diese Wirkungen bereits nachgewiesen werden. TGF- $\beta$ 1 ist in der Lage die Expression von  $\alpha$ -smAktin in TWZ zu stimulieren (Tamm *et al.* 1996). Die Induktion von  $\alpha$ -Actinin (Yang und Glass 2008) durch TGF- $\beta$  wurde für glomeruläre Mesangiumzellen und die Stimulierung einer Zellkontraktion über eine Aktivierung von RhoA für TWZ (Nakamura *et al.* 2002) gezeigt. Desweiteren können auch Endothelin-1 und Angiotensin II das Aktinzytoskelett beeinflussen. Endothelin-1 bewirkte in Studien mit bovinen TWZ eine Kontraktion über einen RhoA-abhängigen Mechanismus (Renieri *et al.* 2008). Angiotensin II war *in vitro* in der Lage über die Aktivierung des RhoA-Signalwegs eine Phosphorylierung von MLC in TWZ zu bewirken (Rao *et al.* 2005).

Anhand dieser Befunde liegt es nahe darüber zu spekulieren, ob CTGF die beschriebenen Effekte seiner Induktoren vermittelt. Dafür spräche die Gemeinsamkeit der drei Faktoren und CTGF das Zytoskelett über den RhoA/ROCK-Signalweg zu beeinflussen und eine Kontraktion der Zellen hervorzurufen. Jedoch zeigten Versuche mit ROCK-Inhibitoren in Studien an vaskulären glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Mesangiumzellen eine deutliche Inhibition der Endothelin-1-, Angiotensin II- und eine Reduktion der TGF- $\beta$ -induzierten CTGF-Expression (Goppelt-Strube *et al.* 2001; Iwanciw *et al.* 2003; Rodriguez-Vita *et al.* 2005). Dies lässt die Vermittlung durch CTGF unwahrscheinlich erscheinen und deutet viel mehr darauf hin, dass CTGF die Wirkung von Endothelin-1, Angiotensin II und TGF- $\beta$  durch eine zusätzliche Aktivierung von RhoA verstärken kann. Weitere Versuche mit blockierter oder reduzierter CTGF-Expression, Behandlungen mit obigen Faktoren und anschließender Analyse der Veränderungen des Aktomyosinsystems könnten die Rolle von CTGF in dieser Hinsicht weiter aufklären helfen.

Neben der Induktion von EZM-Proteinen und den Integrinen, den Verbindungsproteinen zum Aktinzytoskelett, konnte nun auch gezeigt werden, dass CTGF einen starken Einfluss auf das Aktomyosinsystem ausüben vermag. Dies bekräftigt die bereits formulierte Hypothese, dass CTGF im gesunden TW unter anderem dafür verantwortlich sein könnte, Zellen durch eine Verstärkung der Zell-Matrix-Verbindungen sowie der Rigidität des Aktinzytoskeletts vor mechanischem Stress zu



schützen. Im KW von Patienten mit POWG jedoch sind die CTGF-induzierenden Faktoren TGF- $\beta$ 2 und Endothelin-1 vermehrt vorhanden (Noske *et al.* 1997; Inatani *et al.* 2001), was zu einer vermehrten CTGF-Expression im Kammerwinkel führen kann. Diese Beobachtungen weisen weiter darauf hin, dass CTGF einen wichtigen Risikofaktor in der Pathogenese des POWG darstellen könnte.

## 5.5 CTGF-Überexpressionsmäuse

Die *in vitro*-Experimente lassen auf eine grundlegende Rolle von CTGF in der Pathogenese des POWG schließen. Ob diese Befunde auch in einem *in vivo*-Modell zu einer pathologischen Veränderung in den Augen führen können, wurde an CTGF-Überexpressionsmäusen untersucht.

Um einen direkten Effekt von CTGF im Bereich der vorderen Augenkammer zu erzielen, wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die Expression von CTGF unter der Kontrolle eines Promoterfragments von  $\beta$ B1-Crystallin des Huhns steht. Dieses Promoterfragment wurde bereits in zahlreichen Studien zur linsenspezifischen Überexpression von Genen im Auge verwendet (Flugel-Koch *et al.* 2002; Ohlmann *et al.* 2005; Zillig *et al.* 2005). Da dieser Promoter ab dem Embryonalstadium 12.5 aktiv ist, musste bei der Analyse der Mäuse beachtet werden, dass die zu beobachtenden Veränderungen nicht auf Grund eines Entwicklungsfehlers im Auge entstanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression in allen sechs generierten Linien vorhanden war. Veränderungen in der Augenentwicklung wurden allerdings nur bei Linie 2 und 6 festgestellt, weshalb diese Linien von der Analyse in dieser Arbeit ausgeschlossen wurden. Die Linien 1, 3 und 4 hatten eine schwache Überexpression von CTGF und zeigten in dem untersuchten Zeitraum keine offensichtlichen morphologischen oder funktionellen Unterschiede. Deswegen wurde für die weitere Analyse Linie 5 verwendet, da diese eine moderate CTGF Überexpression, jedoch keine entwicklungsbedingten Veränderungen aufwies. Die Analyse des KWs dieser Linie zeigte, dass nicht nur vermehrt mRNA für CTGF gebildet wurde, sondern auch vermehrt CTGF ins KW sezerniert wurde und damit auch in den Kammerwinkel gelangen konnte.

Die histologische Analyse der transgenen Mauslinie offenbarte verglichen mit Wildtyptieren eine deutlich kompaktere Struktur im Bereich des Kammerwinkels,

besonders im TW. Die immunhistologische Analyse der EZM zeigte, dass das FN-Signal bei den transgenen Mäusen im Bereich des Kammerwinkels signifikant erhöht war. Zusätzlich war ein deutlich verstärktes Signal für  $\alpha$ -smAktin im Bereich des TWs zu erkennen. Beide Befunde konnten somit die Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen bestätigen.

Die wichtigste Frage war nun, ob diese Veränderungen auch tatsächlich zu einer Veränderung des Kammerwasserabflusses und somit zu einer Druckänderung beitragen konnten. Durch die nicht invasive Messung des IOD an Mäusen war es möglich die Druckentwicklung über einen längeren Zeitraum zu betrachten. Neben den beobachteten Reaktionen auf die Überexpression von CTGF konnte tatsächlich auch ein Anstieg des IOD im Vergleich zu Wildtypmäusen aufgezeigt werden. Nachdem ein erhöhter IOD einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des POWG ist (1998; 1998; TheAGISInvestigators 2000; Gordon *et al.* 2002; Leske *et al.* 2003), könnte mit dieser Maus zum ersten Mal ein Modell des Offenwinkelglaukoms bei der Maus entwickelt worden sein. Hierbei ist allerdings noch zu zeigen, dass die Erhöhung des Augeninnendrucks bei den Tieren zu einem Schaden der Axone des Sehnervens führt. Bisher stand für diesen Zweck hauptsächlich die sogenannte DBA/2J-Maus zur Verfügung (John *et al.* 1998). Bei dieser Maus kam es aufgrund einer zufälligen Mutation zu einem kompletten Verschluss des Kammerwinkels und damit des trabekulären Abflussweges, wodurch es sich hierbei um ein Modell für ein sekundäres Engwinkelglaukom handelt. Mit diesem Mausmodell konnte zwar bisher der Effekt eines erhöhten IODs, jedoch nicht die grundlegenden Ursachen eines solchen, sowie dessen Auswirkungen auf das TW selbst untersucht werden. Weitere Modellsysteme beinhalten ebenfalls den kompletten Verschluss des trabekulären Abflusses beispielsweise durch Laser-Ablation von episkleralen Venen (Holcombe *et al.* 2008). Ob der erhöhte IOD der  $\beta$ B1-CTGF-Maus auch in einem Verlust an Axonen im Optikuskopf resultiert, wird Bestandteil von weiteren Studien sein.

## 5.6 Analyse der Signalwege an HTM5 und pSiCTGF-Zellen

Die bisherigen in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen eine Beteiligung von CTGF bei der Pathogenese des POWG sehr nahe. Ein therapeutischer Ansatz könnte nun darin bestehen, die Funktionen von CTGF oder seine Expression insgesamt zu blockieren. TGF- $\beta$  ist aufgrund seiner besonderen Rolle im Auge als

Zielgen eher weniger geeignet. Das Auge zählt zu den sogenannten immunprivilegierten Organen. Einer der wichtigsten Faktoren, der die hierfür erforderliche Immunsuppression gewährleistet, ist TGF- $\beta$  (Ohta *et al.* 2000; He *et al.* 2008). Somit kommen für therapeutische Blockierungen der Expression nur Faktoren in Frage, die im Signalweg unterhalb von TGF- $\beta$  stehen. Ähnliche Ansätze wurden bereits für andere, meist fibrotische Erkrankungen beschrieben. Hierzu zählt beispielsweise die Hemmung der TGF- $\beta$ -induzierten Fibrosierungen der Haut durch gleichzeitige Gabe eines CTGF-blockierenden Antikörpers (Ikawa *et al.* 2008). Bevor jedoch ein weiteres Vorgehen in dieser Richtung in Betracht gezogen werden konnten, mussten zuerst die Auswirkungen eines dauerhaften Ausbleibens des CTGF-Signals auf TWZ untersucht werden. Dass CTGF einen wichtigen Faktor für die normale Entwicklung darstellt, wurde durch die Letalität eines kompletten CTGF-Knockouts in der Maus bereits sehr deutlich gezeigt (Ivkovic *et al.* 2003). Um einen dauerhaften Knockdown in TWZ zu erzielen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren angewendet, das bereits bei Ito Zellen aus der Leber *in vitro* die Expression von Kollagenen mit Hilfe einer sogenannten short-hairpin-(sh)-RNA gegen CTGF senken konnte (Yuhua *et al.* 2008).

In dieser Arbeit wurde auf die bereits beim transienten Knockdown bewährte siRNA-Sequenz zurückgegriffen, was zu einer dauerhaften signifikanten Erniedrigung der CTGF-Expression in HTM5-Zellen führte. Die Wahl fiel auf diese transformierte Zelllinie, da primäre humane TWZ ein nur sehr langsames Wachstum zeigen, was insbesondere eine Selektion der Zellen nahezu unmöglich machte. Andererseits reagierte die HTM5-Linie in allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten analog zu den primären TWZ, was eine Übertragbarkeit der Daten weitgehend sicherstellte. Die pSiCTGF -Zellen zeigten in den durchgeführten Untersuchungen eine Senkung der FN-, Integrin  $\beta$ 1 und  $\alpha$ -smAktin-Expression. Somit wurden die in dieser Arbeit identifizierten bedeutendsten, von CTGF regulierten Gene durch dessen Knockdown beeinflusst. Lediglich die  $\alpha$ -Actinine sowie ihre mRNA zeigten keine Reaktion. Dies lässt darauf schließen, dass diese beiden Proteine möglicherweise auch durch andere Faktoren reguliert werden oder dass CTGF für deren basale Expression nicht notwendig ist. Weiterhin war eine Reduktion der Aktin- Aktin-Stressfasern zu beobachten. Auf molekularer Ebene könnten mehrere Beobachtungen zur Klärung dieser Beobachtung beitragen. Zum einen war nach einem Absinken der  $\alpha$ -smAktin-Expression und dessen

Gesamtproteinmenge der Hauptbestandteil von Aktinfibrillen in vermutlich nicht mehr ausreichender Menge vorhanden. Daneben kam es zu einer signifikanten Reduktion von Profilin-1. Hierbei handelt es sich um ein G-Aktin-bindendes Protein, das den Austausch von ADP zu ATP bei Aktinmonomeren katalysiert (Mockrin und Korn 1980; Goldschmidt-Clermont *et al.* 1992) und zur Polymerisation von Aktinfibrillen führt. Parallel kam es durch den Rückgang von aktiviertem RhoA zu einer verminderten MLC-Phosphorylierung. Diese stellt jedoch ein notwendiges Signal für die Bildung von Aktin-Stressfasern dar (Ridley und Hall 1992). Obwohl die Expression von mDia unbeeinflusst blieb, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass dessen Aktivität als RhoA-Effektor sank und sich damit die Bindung an Profilin-1 reduzierte.

Neben diesen Effekten war die erhöhte Anzahl und Größe der Fokalkontakte überraschend. Nach dem Expressionseinbruch von Integrin  $\beta 1$  war ein wichtiger Faktor für die Adhäsion auf FN nur noch in geringen Mengen vorhanden. Vinculin als Marker für fokale Kontakte hingegen zeigte keine Reaktion auf den CTGF-Knockdown. Die Auswirkungen der vermehrt vorhandenen fokalen Kontakte zeigten sich in den zellphysiologischen Untersuchungen. Die Fähigkeit zur Adhäsion der pSiCTGF-Zellen an eine Oberfläche war im Vergleich zu HTM5-Zellen signifikant erhöht, die Migration signifikant vermindert. Eine CTGF-Behandlung hatte in Bezug auf die Adhäsion keinerlei Auswirkungen bei HTM5-Zellen, während es bei pSiCTGF-Zellen zu einer Angleichung an den Wildtyp kam. Umgekehrt zeigte sich eine Behandlung von HTM5-Zellen als migrationsfördernd, während die selbige nur eine leichte Reaktion bei den pSiCTGF-Zellen hervorrief. Um diese Vorgänge auf molekularer Ebene zu erklären mussten vor allem drei Faktoren betrachtet werden: die Aktinzytoskelettdynamik sowie die Stabilität und der Umsatz von fokalen Kontakten. Die bedeutendsten Regulationswege dieser beiden Faktoren werden von der kleinen GTPase RhoA, von FAK und von ERK vermittelt.

### 5.6.1 RhoA

Die Aktinzytoskelettdynamik wird hauptsächlich über den RhoA-Signalweg reguliert (Takaishi *et al.* 1993). pSiCTGF-Zellen zeigten eine stark reduzierte RhoA-Aktivität. Die Behandlung mit CTGF führte zu einer Vermehrung von RhoA-GTP sowie einer Phosphorylierung von MLC. Beides fiel jedoch im Vergleich zu HTM5-Zellen deutlich geringer aus. Die verminderte RhoA-Aktivität kann zu der geringeren Migration bei

den pSiCTGF-Zellen führen. Die leicht verbesserte Migration nach CTGF-Behandlung dieser Zellen könnte analog mit der leichten Erhöhung der RhoA - Aktivität übereinstimmen. Hierfür spricht zudem die signifikante Erhöhung der Migration von HTM5-Zellen nach CTGF-Behandlung, die parallel mit einer verstärkten Aktivierung von RhoA durch CTGF läuft. Damit wird die Beschreibung von CTGF als migrationsfördernder Faktor auch für humane TWZ bestätigt (Leask und Abraham 2006).

### 5.6.2 Focal Adhesion Kinase (FAK)

Eines der bedeutendsten Moleküle in der Regulation von fokalen Kontakten ist FAK (Schlaepfer *et al.* 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte die Phosphorylierung von FAK durch CTGF in HTM5-Zellen gesteigert werden. pSiCTGF-Zellen hingegen zeigten zum einen keine Phosphorylierungsreaktion auf CTGF und zum anderen war der Gehalt an FAK insgesamt signifikant verringert. Die verstärkte Phosphorylierung könnte in den HTM5-Zellen für einen erhöhten Umsatz an Fokalkontakten und damit neben der RhoA-Aktivierung für die erhöhte Migrationsleistung verantwortlich sein. Die verringerte FAK-Expression in pSiCTGF-Zellen und die verlorene Fähigkeit FAK zu phosphorylieren, mögen hingegen einen Stillstand im Umsatz fokaler Kontakte bewirkt haben. Dies führte zu einer erhöhten Adhäsion sowie einer verminderten Migration. Diese Ergebnisse deckten sich mit Studien an Fibroblasten aus FAK-defizienten Mäusen, die neben einer erhöhten Stabilität der Fokalkontakte auch eine verminderte Migrationsfähigkeit aufwiesen (Ilic *et al.* 1995). Daneben konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phosphorylierung an Tyr-397 zu einer Beeinträchtigung der Migrationsfähigkeit von Zellen führt (Schlaepfer *et al.* 2004). Die von FAK verwendeten Signalwege und Wirkungen scheinen jedoch stark zelltypabhängig zu sein. In einer Studie von Schober *et al.* zeigten FAK-defiziente Keratinozyten ebenfalls eine Stabilisierung der Fokalkontakte, jedoch unterdrückte hier FAK die Aktivierung von RhoA, was nach dem FAK-Knockout zu einer starken Aktivierung von RhoA mit den damit verbundenen Folgen, wie erhöhter Stressfaserbildung, führte (Schober *et al.* 2007). Umgekehrt konnte kürzlich über Inhibitionsversuche gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von FAK sowie in direkter Folge die Aktivierung von ERK1/2 von einem aktiven RhoA abhängig ist (Hong *et al.* 2010).

### 5.6.3 Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK) 1/2

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CTGF prinzipiell in der Lage ist, eine Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl als transiente Reaktion, wie auch über längere Zeit, verbunden mit einer erhöhten ERK1/2-Expression, zu bewirken. Betrachtet man obige Erkenntnisse, wäre die verringerte oder komplett fehlende Phosphorylierung von ERK1/2 nach einem Knockdown von CTGF die direkte Folge des fehlenden FAK-Signals. Dies hätte damit seinen Ursprung zum einen in der verringerten RhoA-Aktivität sowie in der schwächeren FAK-Expression. Der durch ERK1/2 vertretene MAP-Kinase-Signalweg ist für eine Reihe von zellphysiologischen Reaktionen verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass ERK1/2 mit am Umsatz von Fokalkontakten beteiligt ist (Vomastek *et al.* 2007; Yao und Seger 2009). In der Studie von Vomastek *et al.* resultierte eine verminderte ERK1/2-Aktivierung sowohl in einer reduzierten Migration als auch in einem verringerten Umsatz an fokalen Kontakten. Wie auch in dieser Arbeit beobachtet, wiesen die fokalen Kontakte in den pSiCTGF-Zellen eher ein strich- als punktförmiges Erscheinungsbild auf. Daneben wird unter anderem auch die Proliferation durch den ERK-Signalweg beeinflusst (Marshall 1995). Hier ist es jedoch notwendig, die transiente Aktivierung von der länger andauernden Aktivierung zu differenzieren. So hatte in PC-12-Zellen die transiente Phosphorylierung vor allem Auswirkungen auf die Proliferation. Dies könnte eventuell das Ergebnis des Proliferations-Assays erklären: Durch die fehlenden Signale über RhoA und FAK kommt es unter serumfreien Bedingungen zu einer Reduzierung der ERK1/2-Aktivität. Eine CTGF-Behandlung führte möglicherweise über ein RhoA- und FAK-unabhängiges Signal, wie etwa durch direkte Interaktion von Integrinen mit dem ERK-Signalweg (Assoian und Schwartz 2001), zu einer leichten, transienten Aktivierung von ERK1/2, was die Proliferation der pSiCTGF-Zellen beschleunigen konnte.

Zeigte sich allein durch den CTGF-Knockdown ein Einbruch der Integrin  $\beta 1$ -Expression, so wurde diese durch eine Behandlung mit CTGF noch deutlicher gesenkt. Dieses Ergebnis könnte eine Erklärung für die verringerte Adhäsion nach CTGF-Behandlung darstellen. Konnten die pSiCTGF-Zellen bisher die Reduktion an Integrin  $\beta 1$  bei der Ausbildung ihrer fokalen Kontakte kompensieren, so führte ein weiterer Abfall in der Expression möglicherweise zu einem Abbau der Kontakte. So konnte eine Studie an Ito-Zellen zeigen, dass die CTGF-vermittelte Adhäsion

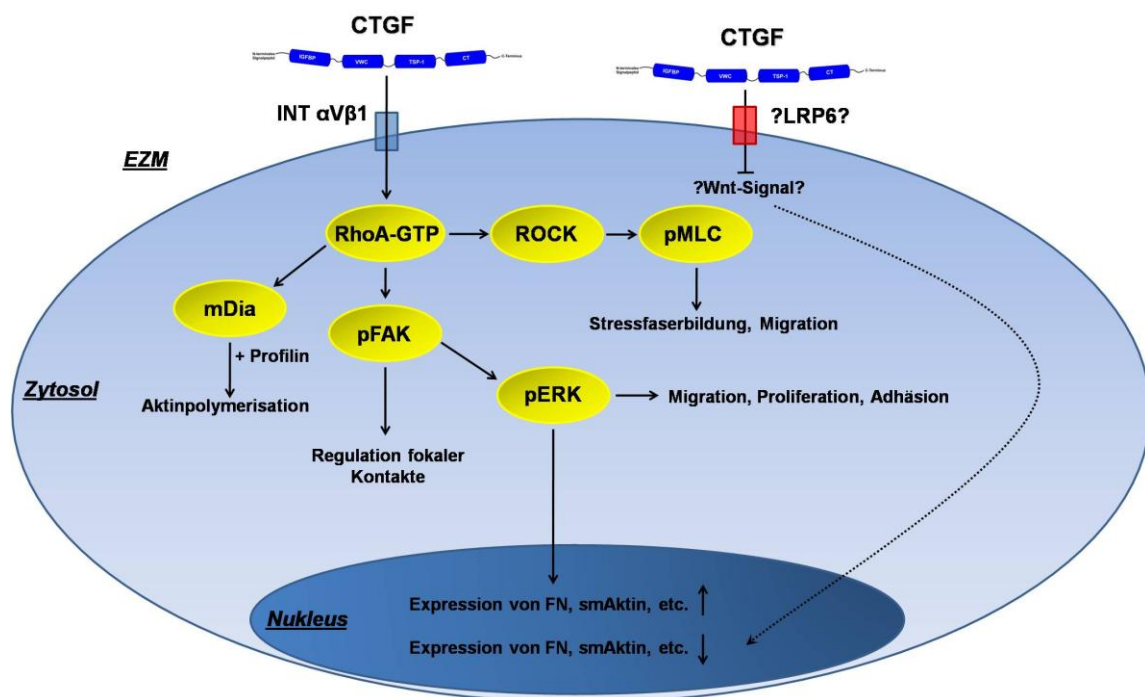
unter anderem von Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  abhängig ist (Huang und Brigstock 2010). Daneben muss die Bindung von CTGF an sich berücksichtigt werden. So brachte es der Versuchsansatz mit sich, dass die Zellen gleichzeitig mit CTGF-versetztem Kulturmedium auf die Kulturoberfläche ausgebracht wurden. CTGF bindet nicht nur an Integrine mit der Untereinheit  $\beta 1$ , sondern auch an weitere Integrine wie etwa  $\alpha V \beta 3$  (Babic *et al.* 1999) oder  $\alpha_{Ib} \beta 3$  (Jedsadayanmata *et al.* 1999). Hierdurch könnten die Integrine in ihrer Rolle als Adhäsionsmoleküle (Hynes 2002) bereits beim Aussäen kompetitiv gehemmt gewesen sein. Ein umgekehrter Effekt wurde bereits für Fibroblasten mit inhibierter MMP-2-Expression beschrieben. Hier blockierten akkumulierte FN-Moleküle die Bindung von CTGF an die entsprechenden Integrin-rezeptoren (Droppelmann *et al.* 2009).

Um Hinweise für die Ursache des weiteren Absinkens der Integrin  $\beta 1$ -Expression nach Behandlung von pSiCTGF-Zellen zu finden, wurden weitere, durch CTGF regulierte und nach dem Knockdown in ihrer Expression reduzierte Proteine untersucht. Bei FN und  $\alpha$ -smAktin zeigte sich dabei ein ähnliches Phänomen. In dieser Arbeit ergaben sich mehrere Hinweise, die für die Integrin-Untereinheit  $\beta 1$  als Bestandteils eines CTGF-Rezeptors im TW sprachen. Somit schien es wahrscheinlich, dass das beobachtete Phänomen in der bereits reduzierten Expression von Integrin  $\beta 1$  begründet war. Ein ähnliches Ergebnis beobachtete die Arbeitsgruppe um Enrique Brandan an Fibroblasten von mdx-Mäusen, sowie an Fibroblasten mit deaktiviertem MMP-2. Eine Erklärung für diese Beobachtung war unter anderem eine erhöhte FN-Produktion bei unbehandelten Zellen. Dies sollte zu einer Übersättigung der Integrin-Rezeptoren und damit zu einer Blockierung des CTGF-Signals führen (Mezzano *et al.* 2007; Droppelmann *et al.* 2009).

Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich ein möglicher Signalweg für die in dieser Arbeit beschriebenen CTGF-Wirkungen ableiten (Abb. 39). CTGF bindet an ein Integrin-Heterodimer, welches neben der  $\beta 1$ - womöglich die  $\alpha V$ -Untereinheit umfasst. Von hier aus wird das Signal über GTP-Exchange-Factors (GEFs) an RhoA weitergeleitet, welches durch Beladung mit GTP aktiviert wird (Schoenwaelder und Burridge 1999). Darauf folgt die Phosphorylierung von FAK und MLC, was zu einer vermehrten Bildung von Aktin-Stressfasern, einem erhöhtem Umsatz an fokalen Kontakten und der Phosphorylierung von ERK1/2 führt. Neben den Effekten auf

Migration, Proliferation und Adhäsion vermag pERK1/2 zudem in den Nukleus zu translozieren und dort die Transkription von Zielgenen zu regulieren. Ein Zusammenhang zwischen CTGF, dem MAP-Kinase-Signalweg und der Induktion von EZM-Molekülen wie etwa Kollagen Typ I wurde bereits aufgezeigt (Ponticos *et al.* 2009) und bietet somit auch einen Signalweg für die Induktion von EZM-Molekülen im TW. Um diese Hypothesen zu bestätigen sind weitere Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren gegen die einzelnen Signalwege notwendig, welche zukünftigen Studien vorbehalten sind.

Daneben scheint ein zweiter Signalweg vorhanden zu sein, der für die negative Regulation des CTGF-Signals verantwortlich ist. So vermag CTGF neben den Integrinen auch an weitere potentielle Rezeptoren wie etwa LRP6 (Mercurio *et al.* 2004) zu binden. Somit könnte durch das Absinken der Integrin  $\beta 1$ -Expression bei pSiCTGF-Zellen das FN-induzierende Signal von CTGF an Intensität verlieren und vermehrt CTGF an den LRP6-Rezeptor binden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die FN-Expression in Fibroblasten durch den Wnt-Signalweg induziert werden konnte (Gradl *et al.* 1999). CTGF jedoch blockierte den Wnt-Signalweg in Studien an *Xenopus*-Embryonen (Mercurio *et al.* 2004) und Maus-Osteoblasten (Smerdel-Ramoya *et al.* 2008). Dieser Weg würde damit eine Erklärung für den starken Abfall der FN-Expression nach Behandlung von pSiCTGF-Zellen bieten.



**Abb. 39:** Mögliche Signalwege für CTGF zur Regulation der EZM-Expression sowie zur Regulation des Aktinzytoskeletts.



Durch die Untersuchung der pSiCTGF-Zellen konnte ein möglicher Signalweg für das CTGF-Signal gefunden werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass durch den stabilen Knockdown von CTGF die CTGF-spezifischen Effektorproteine reduziert werden, was für einen möglichen therapeutischen Ansatz von großem Interesse sein könnte. Jedoch konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass CTGF für die korrekte Ausbildung des Zytoskeletts in TWZ wichtig ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnte ein kompletter Knockdown von CTGF ebenfalls negative Reaktionen für die Gesamtstruktur des TW hervorrufen. Inwieweit diese *in vitro* Daten auch auf ein *in vivo* Modell übertragbar sind, wird in logischer Konsequenz in anschließenden Studien *in vivo* untersucht werden müssen.

Insgesamt legen die Ergebnisse dieser Arbeit sehr nahe, dass CTGF eine wichtige Rolle als Signalmolekül in der Pathogenese des POWG spielen könnte. So konnte der Einfluss von CTGF auf EZM und Aktinzytoskelett im TW aufgezeigt werden. Ob eine direkte Inhibition der CTGF-Expression als therapeutischer Ansatz für die Behandlung des POWG in Frage kommt, muss noch weiter geklärt werden, wobei die Befunde dieser Arbeit eher dagegen sprechen. Allerdings könnte eine pharmakologische Beeinflussung von Komponenten des CTGF-Signalwegs einen Ansatzpunkt zu einer neuen Therapie des Offenwinkelglaukoms darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF) ist ein sezerniertes Glykoprotein aus der Familie der CCN-Proteine. CTGF ist aufgrund seiner Multidomänenstruktur in der Lage an verschiedenste Transmembran-, extrazelluläre Matrix (EZM)- sowie Signalproteine zu binden und deren Funktion zu beeinflussen. So stimuliert oder vermittelt CTGF die Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen und ist als Wachstumsfaktor essentiell für die Entwicklung bestimmter Gewebe. Besondere Beachtung findet CTGF allerdings im Zusammenhang mit der Pathogenese fibrotischer Erkrankungen. In diesen Fällen wird CTGF oftmals als Downstream-Mediator des pro-fibrotischen Faktors Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  gehandelt. TGF- $\beta$ 2 wird mit der Pathogenese des primären Offenwinkelglukoms (POWG) in Zusammenhang gebracht, was auch eine Rolle von CTGF bei der Pathogenese dieser Krankheit nahelegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Funktionen von CTGF im Trabekelwerk des Auges zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst Signalmoleküle identifiziert werden, die CTGF im Trabekelwerk induzieren. Anschließend sollte CTGF in einem eukaryotischen System rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden, um über *in vitro* Versuche den Einfluss von CTGF auf humane Trabekelwerkzellen zu analysieren. Diese Ergebnisse sollten *in vivo* über die Entwicklung von transgenen Mäusen mit einer CTGF-Überexpression überprüft werden. Um die physiologische Funktion von CTGF in humanen Trabekelwerkzellen zu untersuchen, sollte ein stabiler Knockdown von CTGF durchgeführt werden.

Neben TGF- $\beta$  waren die im KW vorhandenen Faktoren Endothelin-1, Angiotensin II und IGF-1 in der Lage die Expression von CTGF in humanen TWZ zu erhöhen. Rekombinantes CTGF konnte nach Anfügen eines His-Tags an den C-Terminus durch Ausnutzung seiner Affinität zu Heparin sowie zu  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA aufgereinigt werden. Die biologische Funktionalität konnte nach Behandlung von TWZ bestätigt werden. CTGF induzierte die Expressionen wichtiger EZM-Proteine wie FN und mehrerer Kollagene, sowie die der Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ V und  $\beta$ 1. und vermittelte die Effekte von TGF- $\beta$  auf die Expression dieser Proteine. Die Effekte von TGF- $\beta$  auf das extrazelluläre proteolytische Systeme zeigten sich nicht durch CTGF vermittelt.

Neben den Veränderungen an EZM und Integrinen konnten auch Effekte auf das Aktinzytoskelett beobachtet werden. CTGF erhöhte zum einen die Expression bedeutender Komponenten wie etwa  $\alpha$ -smAktin. Zum anderen führte die Behandlung zur Beeinflussung von intrazellulären Signalmolekülen, die für die Regulation des Aktinzytoskeletts verantwortlich sind. CTGF konnte die Aktivität der kleinen GTPase RhoA, der Myosin Light Chain, der Focal Adhesion Kinase sowie der Extracellular Signal Regulated Kinase erhöhen. Dies führte unter anderem zu einer Zunahme an Aktin-Stressfasern in den Zellen und zu einer erhöhten Kontraktilität. In einem *in vivo*-Mausmodell mit einer Augen-spezifischen CTGF-Überexpression konnte ebenso eine Vermehrung von FN und  $\alpha$ -smAktin im TW nachgewiesen werden. Zudem wiesen die transgenen Mäuse einen Anstieg des IOD auf.

Ein stabiler Knockdown von CTGF konnte in immortalisierten TWZ mit Hilfe eines pSilencer-Vektors erreicht werden. Dies führte zu einer verminderten Expression einiger Effektorproteine von CTGF und zu einer reduzierten oder vollständig blockierten Aktivität derjenigen Signalmoleküle, die in Wildtypzellen durch CTGF aktiviert wurden. In zellphysiologischen Untersuchungen konnte weiterhin eine reduzierte migratorische und proliferative Aktivität aufgezeigt werden. Die Adhäsion an Oberflächen hingegen wurde durch den CTGF-Knockdown verstärkt. Eine Behandlung mit rekombinantem CTGF konnte im Falle der Proliferation sowie der Adhäsion eine Angleichung an den Wildtyp herstellen, führte aber zu einem weiteren Absinken der Expression von CTGF Effektorproteinen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CTGF nicht nur in der Lage ist, die EZM sondern auch die Kontraktilität des TW zu beeinflussen. Diese Veränderungen können zu einem Anstieg des intraokulären Drucks und damit zu einem erhöhten Risiko für die Erkrankung des POWG führen. Somit kann CTGF als ein kritischer Faktor in der Pathogenese des POWG angesehen werden.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

- (1998). "Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group." *Am J Ophthalmol* 126(4): 487-97.
- (1998). "The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group." *Am J Ophthalmol* 126(4): 498-505.
- Abe, M., J. G. Harpel, C. N. Metz, I. Nunes, D. J. Loskutoff and D. B. Rifkin (1994). "An assay for transforming growth factor-beta using cells transfected with a plasminogen activator inhibitor-1 promoter-luciferase construct." *Anal Biochem* 216(2): 276-84.
- Abreu, J. G., N. I. Ketpura, B. Reversade and E. M. De Robertis (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." *Nat Cell Biol* 4(8): 599-604.
- Almendral, J. M., D. Sommer, H. Macdonald-Bravo, J. Burckhardt, J. Perera and R. Bravo (1988). "Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts." *Mol Cell Biol* 8(5): 2140-8.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura and K. Kaibuchi (1996). "Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *J Biol Chem* 271(34): 20246-9.
- Assoian, R. K. and M. A. Schwartz (2001). "Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression." *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 48-53.
- Babic, A. M., C. C. Chen and L. F. Lau (1999). "Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo." *Mol Cell Biol* 19(4): 2958-66.
- Babizhayev, M. A. and M. W. Brodskaya (1989). "Fibronectin detection in drainage outflow system of human eyes in ageing and progression of open-angle glaucoma." *Mech Ageing Dev* 47(2): 145-57.
- Bahler, C. K., C. R. Hann, M. P. Fautsch and D. H. Johnson (2004). "Pharmacologic disruption of Schlemm's canal cells and outflow facility in anterior segments of human eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7): 2246-54.
- Ball, D. K., E. E. Moussad, M. A. Rageh, S. A. Kemper and D. R. Brigstock (2003). "Establishment of a recombinant expression system for connective tissue growth factor (CTGF) that models CTGF processing in utero." *Reproduction* 125(2): 271-84.
- Ball, D. K., A. W. Rachfal, S. A. Kemper and D. R. Brigstock (2003). "The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion." *J Endocrinol* 176(2): R1-7.

- Ball, D. K., G. A. Surveyor, J. R. Diehl, C. L. Steffen, M. Uzumcu, M. A. Mirando and D. R. Brigstock (1998). "Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings." *Biol Reprod* 59(4): 828-35.
- Bartholin, L., L. L. Wessner, J. M. Chirgwin and T. A. Guise (2007). "The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells." *Cancer Lett* 246(1-2): 230-6.
- Bell, E., B. Ivarsson and C. Merrill (1979). "Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(3): 1274-8.
- Blom, I. E., A. J. van Dijk, L. Wieten, K. Duran, Y. Ito, L. Kleij, M. deNichilo, T. J. Rabelink, J. J. Weening, J. Aten and R. Goldschmeding (2001). "In vitro evidence for differential involvement of CTGF, TGFbeta, and PDGF-BB in mesangial response to injury." *Nephrol Dial Transplant* 16(6): 1139-48.
- Bork, P. (1993). "The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor." *FEBS Lett* 327(2): 125-30.
- Bottcher, R. T., S. Wiesner, A. Braun, R. Wimmer, A. Berna, N. Elad, O. Medalia, A. Pfeifer, A. Aszodi, M. Costell and R. Fassler (2009). "Profilin 1 is required for abscission during late cytokinesis of chondrocytes." *EMBO J* 28(8): 1157-69.
- Bradham, D. M., A. Igarashi, R. L. Potter and G. R. Grotendorst (1991). "Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10." *J Cell Biol* 114(6): 1285-94.
- Bradley, J. M., J. Vranka, C. M. Colvis, D. M. Conger, J. P. Alexander, A. S. Fisk, J. R. Samples and T. S. Acott (1998). "Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(13): 2649-58.
- Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." *EMBO J* 22(10): 2324-33.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* 296(5567): 550-3.
- Brunner, A., J. Chinn, M. Neubauer and A. F. Purchio (1991). "Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta." *DNA Cell Biol* 10(4): 293-300.
- Burgess, M. L., W. E. Carver, L. Terracio, S. P. Wilson, M. A. Wilson and T. K. Borg (1994). "Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts. Effects of angiotensin II." *Circ Res* 74(2): 291-8.
- Burns, W. C., S. M. Twigg, J. M. Forbes, J. Pete, C. Tikellis, V. Thallas-Bonke, M. C. Thomas, M. E. Cooper and P. Kantharidis (2006). "Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease." *J Am Soc Nephrol* 17(9): 2484-94.
- Cai, S., X. Liu, A. Glasser, T. Volberg, M. Filla, B. Geiger, J. R. Polansky and P. L. Kaufman (2000). "Effect of latrunculin-A on morphology and actin-associated adhesions of cultured human trabecular meshwork cells." *Mol Vis* 6: 132-43.

- Campbell, T. N. and F. Y. Choy (2005). "RNA interference: past, present and future." *Curr Issues Mol Biol* 7(1): 1-6.
- Cao, Y., M. W. Pfaffl, B. Da and H. Wei (2002). "[Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mRNA and IGF-1 protein. Expression in cells of the trabecular meshwork of the bovine eye]." *Ophthalmologie* 99(7): 555-8.
- Chaqour, B., R. Yang and Q. Sha (2006). "Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation." *J Biol Chem* 281(29): 20608-22.
- Chen, Y., D. J. Abraham, X. Shi-Wen, J. D. Pearson, C. M. Black, K. M. Lyons and A. Leask (2004). "CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin." *Mol Biol Cell* 15(12): 5635-46.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.
- Chua, C. C., C. A. Diglio, B. B. Siu and B. H. Chua (1994). "Angiotensin II induces TGF-beta 1 production in rat heart endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* 1223(1): 141-7.
- Chudgar, S. M., P. Deng, R. Maddala, D. L. Epstein and P. V. Rao (2006). "Regulation of connective tissue growth factor expression in the aqueous humor outflow pathway." *Mol Vis* 12: 1117-26.
- Cicha, I., A. Yilmaz, M. Klein, D. Raithel, D. R. Brigstock, W. G. Daniel, M. Goppelt-Struebe and C. D. Garlachs (2005). "Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5): 1008-13.
- Dallas, S. L., P. Sivakumar, C. J. Jones, Q. Chen, D. M. Peters, D. F. Mosher, M. J. Humphries and C. M. Kielty (2005). "Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1." *J Biol Chem* 280(19): 18871-80.
- di Mola, F. F., P. Di Sebastiano, A. Gardini, P. Innocenti, A. Zimmermann, M. W. Büchler and H. Friess (2004). "Differential Expression of Connective Tissue Growth Factor in Inflammatory Bowel Disease." *Digestion* 69(4): 245.
- Droppelmann, C. A., J. Gutierrez, C. Vial and E. Brandan (2009). "Matrix metalloproteinase-2-deficient fibroblasts exhibit an alteration in the fibrotic response to connective tissue growth factor/CCN2 because of an increase in the levels of endogenous fibronectin." *J Biol Chem* 284(20): 13551-61.
- Eichhorn, M. and E. Lutjen-Drecoll (1993). "Distribution of endothelin-like immunoreactivity in the human ciliary epithelium." *Curr Eye Res* 12(8): 753-7.
- Epstein, D. L., L. L. Rowlette and B. C. Roberts (1999). "Acto-myosin drug effects and aqueous outflow function." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(1): 74-81.
- Ethier, C. R. (2002). "The inner wall of Schlemm's canal." *Exp Eye Res* 74(2): 161-72.
- Ethier, C. R., A. T. Read and D. W. Chan (2006). "Effects of latrunculin-B on outflow facility and trabecular meshwork structure in human eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(5): 1991-8.

- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* 132(1): 6-13.
- Filardo, E. J. and D. A. Cheresh (1994). "A beta turn in the cytoplasmic tail of the integrin alpha v subunit influences conformation and ligand binding of alpha v beta 3." *J Biol Chem* 269(6): 4641-7.
- Flanders, K. C., M. G. Holder and T. S. Winokur (1995). "Autoinduction of mRNA and protein expression for transforming growth factor-[beta]s in cultured cardiac cells." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27(2): 805.
- Flugel-Koch, C., A. Ohlmann, J. Piatigorsky and E. R. Tamm (2002). "Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice." *Dev Dyn* 225(2): 111-25.
- Foster, P. J., R. Buhrmann, H. A. Quigley and G. J. Johnson (2002). "The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys." *Br J Ophthalmol* 86(2): 238-42.
- Frazier, K., S. Williams, D. Kothapalli, H. Klapper and G. R. Grotendorst (1996). "Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor." *J Invest Dermatol* 107(3): 404-11.
- Fuchshofer, R., M. Birke, U. Welge-Lussen, D. Kook and E. Lutjen-Drecoll (2005). "Transforming Growth Factor-{beta}2 Modulated Extracellular Matrix Component Expression in Cultured Human Optic Nerve Head Astrocytes." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(2): 568-578.
- Fuchshofer, R., U. Welge-Lussen and E. Lutjen-Drecoll (2003). "The effect of TGF-beta2 on human trabecular meshwork extracellular proteolytic system." *Exp Eye Res* 77(6): 757-65.
- Fuchshofer, R., A. H. L. Yu, U. Welge-Lussen and E. R. Tamm (2007). "Bone Morphogenetic Protein-7 Is an Antagonist of Transforming Growth Factor-{beta}2 in Human Trabecular Meshwork Cells." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48(2): 715-726.
- Fuchshofer, R., A. L. Yu, H. H. Teng, R. Strauss, A. Kampik and U. Welge-Lussen (2009). "Hypoxia/reoxygenation induces CTGF and PAI-1 in cultured human retinal pigment epithelium cells." *Exp Eye Res* 88(5): 889-99.
- Gabelt, B. T., Y. Hu, J. L. Vittitow, C. R. Rasmussen, I. Grosheva, A. D. Bershadsky, B. Geiger, T. Borrás and P. L. Kaufman (2006). "Caldesmon transgene expression disrupts focal adhesions in HTM cells and increases outflow facility in organ-cultured human and monkey anterior segments." *Exp Eye Res* 82(6): 935-44.
- Gao, R., D. K. Ball, B. Perbal and D. R. Brigstock (2004). "Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells." *J Hepatol* 40(3): 431-8.
- Gao, R. and D. R. Brigstock (2004). "Connective Tissue Growth Factor (CCN2) Induces Adhesion of Rat Activated Hepatic Stellate Cells by Binding of Its C-terminal Domain to Integrin {alpha}v{beta}3 and Heparan Sulfate Proteoglycan." *J. Biol. Chem.* 279(10): 8848-8855.

- Gao, R. and D. R. Brigstock (2005). "Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin  $\alpha 5 \beta 1$  as a novel CCN2 receptor." *Gastroenterology* 129(3): 1019-30.
- Gibbons, G. H., R. E. Pratt and V. J. Dzau (1992). "Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II." *J Clin Invest* 90(2): 456-61.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., M. I. Furman, D. Wachsstock, D. Safer, V. T. Nachmias and T. D. Pollard (1992). "The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells." *Mol Biol Cell* 3(9): 1015-24.
- Gong, H., R. C. Tripathi and B. J. Tripathi (1996). "Morphology of the aqueous outflow pathway." *Microsc Res Tech* 33(4): 336-67.
- Goppelt-Struebe, M., A. Hahn, D. Iwanciw, M. Rehm and B. Banas (2001). "Regulation of connective tissue growth factor (*ccn2*; *ctgf*) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins)." *Mol Pathol* 54(3): 176-9.
- Gordon, M. O., J. A. Beiser, J. D. Brandt, D. K. Heuer, E. J. Higginbotham, C. A. Johnson, J. L. Keltner, J. P. Miller, R. K. Parrish, 2nd, M. R. Wilson and M. A. Kass (2002). "The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma." *Arch Ophthalmol* 120(6): 714-20; discussion 829-30.
- Gottanka, J., D. H. Johnson, P. Martus and E. Lutjen-Drecoll (1997). "Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork." *J Glaucoma* 6(2): 123-32.
- Gradl, D., M. Kuhl and D. Wedlich (1999). "The Wnt/Wg signal transducer beta-catenin controls fibronectin expression." *Mol Cell Biol* 19(8): 5576-87.
- Grehn, F. (2008). *Augenheilkunde : mit 20 Tabellen ; [jetzt neu mit Fallquiz]*. Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.
- Grotendorst, G. R. (1997). "Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(3): 171-9.
- Hai, C. M. and Z. Gu (2006). "Caldesmon phosphorylation in actin cytoskeletal remodeling." *Eur J Cell Biol* 85(3-4): 305-9.
- Hann, C. R., M. J. Springett, X. Wang and D. H. Johnson (2001). "Ultrastructural localization of collagen IV, fibronectin, and laminin in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes." *Ophthalmic Res* 33(6): 314-24.
- Harris, A. K., D. Stopak and P. Wild (1981). "Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis." *Nature* 290(5803): 249-51.
- Haydont, V., B. L. Riser, J. Aigueperse and M. C. Vozenin-Brotons (2008). "Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1." *Am J Physiol Cell Physiol* 294(6): C1332-41.



- He, H., P. Yang, L. Jiang, J. Zhang, C. Zhao, L. Chen, X. Lin, H. Zhou and A. Kijlstra (2008). "Upregulation of CD94 on CD8+T cells in anterior chamber-associated immune deviation." *BMC Immunol* 9: 53.
- Heng, E. C., Y. Huang, S. A. Black, Jr. and P. C. Trackman (2006). "CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins." *J Cell Biochem* 98(2): 409-20.
- Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* 9(1): 28-32.
- Heusinger-Ribeiro, J., M. Eberlein, N. A. Wahab and M. Goppelt-Struebe (2001). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP." *J Am Soc Nephrol* 12(9): 1853-61.
- Higashida, C., T. Miyoshi, A. Fujita, F. Ocegüera-Yanez, J. Monypenny, Y. Andou, S. Narumiya and N. Watanabe (2004). "Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells." *Science* 303(5666): 2007-10.
- Higgins, D. F., M. P. Biju, Y. Akai, A. Wutz, R. S. Johnson and V. H. Haase (2004). "Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1." *Am J Physiol Renal Physiol* 287(6): F1223-32.
- Ho, S. L., G. F. Dogar, J. Wang, J. Crean, Q. D. Wu, N. Oliver, S. Weitz, A. Murray, P. E. Cleary and C. O'Brien (2005). "Elevated aqueous humour tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and connective tissue growth factor in pseudoexfoliation syndrome." *Br J Ophthalmol* 89(2): 169-173.
- Holcombe, D. J., N. Lengefeld, G. A. Gole and N. L. Barnett (2008). "Selective inner retinal dysfunction precedes ganglion cell loss in a mouse glaucoma model." *Br J Ophthalmol* 92(5): 683-8.
- Holmes, A., D. J. Abraham, S. Sa, X. Shiwen, C. M. Black and A. Leask (2001). "CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling." *J Biol Chem* 276(14): 10594-601.
- Honda, K., T. Yamada, R. Endo, Y. Ino, M. Gotoh, H. Tsuda, Y. Yamada, H. Chiba and S. Hirohashi (1998). "Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion." *J Cell Biol* 140(6): 1383-93.
- Hong, S. Y., Y. M. Jeon, H. J. Lee, J. G. Kim, J. A. Baek and J. C. Lee (2010). "Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts." *Mol Cell Biochem* 335(1-2): 263-72.
- Hu, Y., B. T. Gabelt and P. L. Kaufman (2006). "Monkey organ-cultured anterior segments: technique and response to H-7." *Exp Eye Res* 82(6): 1100-8.
- Huang, G. and D. R. Brigstock (2010). "Integrin expression and function in the response of primary culture hepatic stellate cells to connective tissue growth factor (CCN2)." *J Cell Mol Med*.
- Humphries, J. D., A. Byron and M. J. Humphries (2006). "Integrin ligands at a glance." *J Cell Sci* 119(Pt 19): 3901-3.

- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines." *Cell* 110(6): 673.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673-87.
- Igarashi, A., H. Okochi, D. M. Bradham and G. R. Grotendorst (1993). "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair." *Mol Biol Cell* 4(6): 637-45.
- Ihn, H. (2002). "Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF." *Curr Opin Rheumatol* 14(6): 681-5.
- Ikawa, Y., P. S. Ng, K. Endo, M. Kondo, S. Chujo, W. Ishida, F. Shirasaki, M. Fujimoto and K. Takehara (2008). "Neutralizing monoclonal antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-beta-induced mouse fibrosis." *J Cell Physiol* 216(3): 680-7.
- Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada and T. Yamamoto (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." *Nature* 377(6549): 539-44.
- Imamichi, Y., O. Waidmann, R. Hein, P. Eleftheriou, K. Giehl and A. Menke (2005). "TGF beta-induced focal complex formation in epithelial cells is mediated by activated ERK and JNK MAP kinases and is independent of Smad4." *Biol Chem* 386(3): 225-36.
- Inatani, M., H. Tanihara, H. Katsuta, M. Honjo, N. Kido and Y. Honda (2001). "Transforming growth factor-beta 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(2): 109-13.
- Inoue, T., T. Yokoyama and H. Koike (2001). "The effect of angiotensin II on uveoscleral outflow in rabbits." *Curr Eye Res* 23(2): 139-43.
- Ito, Y., J. Aten, R. J. Bende, B. S. Oemar, T. J. Rabelink, J. J. Weening and R. Goldschmeding (1998). "Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis." *Kidney Int* 53(4): 853-61.
- Ivkovic, S., B. S. Yoon, S. N. Popoff, F. F. Safadi, D. E. Libuda, R. C. Stephenson, A. Daluiski and K. M. Lyons (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." *Development* 130(12): 2779-91.
- Iwamoto, Y. and M. Tamura (1988). "Immunocytochemical study of intermediate filaments in cultured human trabecular cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(2): 244-50.
- Iwanciw, D., M. Rehm, M. Porst and M. Goppelt-Struebe (2003). "Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(10): 1782-7.
- Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipkind, A. Nordheim and H. G. Stunnenberg (1991). "Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 8972-6.
- Jedsadayanmata, A., C. C. Chen, M. L. Kireeva, L. F. Lau and S. C. Lam (1999). "Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective

- tissue growth factor is mediated through integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3)." *J Biol Chem* 274(34): 24321-7.
- Jockusch, B. M., P. Bubeck, K. Giehl, M. Kroemker, J. Moschner, M. Rothkegel, M. Rudiger, K. Schluter, G. Stanke and J. Winkler (1995). "The molecular architecture of focal adhesions." *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 379-416.
- John, S. W., R. S. Smith, O. V. Savinova, N. L. Hawes, B. Chang, D. Turnbull, M. Davisson, T. H. Roderick and J. R. Heckenlively (1998). "Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6): 951-62.
- Johnson, M. (2006). "What controls aqueous humour outflow resistance?." *Exp Eye Res* 82(4): 545-57.
- Juliano, R. L., P. Reddig, S. Alahari, M. Edin, A. Howe and A. Aplin (2004). "Integrin regulation of cell signalling and motility." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 443-6.
- Junglas, B., A. H. Yu, U. Welge-Lussen, E. R. Tamm and R. Fuchshofer (2009). "Connective tissue growth factor induces extracellular matrix deposition in human trabecular meshwork cells." *Exp Eye Res* 88(6): 1065-75.
- Kanski, J. J. and A. Burk (2008). *Klinische Ophthalmologie : Lehrbuch und Atlas*. München {[u.a.]}, Elsevier, Urban & Fischer.
- Kaufman, P. L. and E. H. Barany (1981). "Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20(5): 644-51.
- Kim, H. S., S. R. Nagalla, Y. Oh, E. Wilson, C. T. Roberts, Jr. and R. G. Rosenfeld (1997). "Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12981-6.
- Kim, S. H. (2008). "Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell." *Cell Biochem Funct* 26(5): 539-47.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *Science* 273(5272): 245-8.
- Kireeva, M. L., B. V. Latinkic, T. V. Kolesnikova, C. C. Chen, G. P. Yang, A. S. Abler and L. F. Lau (1997). "Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development." *Exp Cell Res* 233(1): 63-77.
- Koliakos, G. G., U. Schlotzer-Schrehardt, A. G. Konstas, T. Bufidis, N. Georgiadis and A. Dimitriadou (2001). "Transforming and insulin-like growth factors in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(7): 482-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lam, S., R. N. van der Geest, N. A. Verhagen, F. A. van Nieuwenhoven, I. E. Blom, J. Aten, R. Goldschmeding, M. R. Daha and C. van Kooten (2003). "Connective tissue growth

- factor and igf-I are produced by human renal fibroblasts and cooperate in the induction of collagen production by high glucose." *Diabetes* 52(12): 2975-83.
- Leask, A. and D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." *Faseb J* 18(7): 816-27.
- Leask, A. and D. J. Abraham (2006). "All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker." *J Cell Sci* 119(Pt 23): 4803-10.
- Lepple-Wienhues, A., M. Becker, F. Stahl, S. Berweck, J. Hensen, W. Noske, M. Eichhorn and M. Wiederholt (1992). "Endothelin-like immunoreactivity in the aqueous humour and in conditioned medium from cultured ciliary epithelial cells." *Curr Eye Res* 11(11): 1041-6.
- Lepple-Wienhues, A., F. Stahl, U. Willner, R. Schafer and M. Wiederholt (1991). "Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel." *Curr Eye Res* 10(10): 983-9.
- Leske, M. C., A. Heijl, M. Hussein, B. Bengtsson, L. Hyman and E. Komaroff (2003). "Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial." *Arch Ophthalmol* 121(1): 48-56.
- Liang, C. C., A. Y. Park and J. L. Guan (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nat Protoc* 2(2): 329-33.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-8.
- Lodish, H. F. (2008). *Molecular cell biology*. New York, W.H. Freeman.
- Lütjen-Drecoll, E., M. Rittig, J. Rauterberg, R. Jander and J. Mollenhauer (1989). "Immunomicroscopical study of type VI collagen in the trabecular meshwork of normal and glaucomatous eyes." *Exp Eye Res* 48(1): 139-47.
- Lütjen-Drecoll, E. and J. Rohen (2001). *Functional morphology of the trabecular meshwork*. Philadelphia, Pa, JB Lippincott Co.
- Lütjen-Drecoll, E., T. Shimizu, M. Rohrbach and J. W. Rohen (1986). "Quantitative analysis of 'plaque material' in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal- and glaucomatous eyes." *Exp Eye Res* 42(5): 443-55.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marshall, C. J. (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell* 80(2): 179-85.
- Marshall, G. E., A. G. Konstas and W. R. Lee (1990). "Immunogold localization of type IV collagen and laminin in the aging human outflow system." *Exp Eye Res* 51(6): 691-9.
- Marshall, G. E., A. G. Konstas and W. R. Lee (1991). "Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system." *Ophthalmology* 98(5): 692-700.

- Mazzei, R., L. Masiero, L. Zanetta, S. Monea, M. Onisto, S. Garbisa and P. Mignatti (1997). "Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants." *EMBO J* 16(9): 2319-32.
- Mercurio, S., B. Latinkic, N. Itasaki, R. Krumlauf and J. C. Smith (2004). "Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex." *Development* 131(9): 2137-47.
- Mezzano, V., D. Cabrera, C. Vial and E. Brandan (2007). "Constitutively activated dystrophic muscle fibroblasts show a paradoxical response to TGF-beta and CTGF/CCN2." *J Cell Commun Signal* 1(3-4): 205-17.
- Mockrin, S. C. and E. D. Korn (1980). "Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate." *Biochemistry* 19(23): 5359-62.
- Monea, S., K. Lehti, J. Keski-Oja and P. Mignatti (2002). "Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism." *J Cell Physiol* 192(2): 160-70.
- Moses, R. A. (1958). "The Goldmann applanation tonometer." *Am J Ophthalmol* 46(6): 865-9.
- Muehlich, S., I. Cicha, C. D. Garlachs, B. Krueger, G. Posern and M. Goppelt-Strube (2007). "Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5): C1732-8.
- Munger, J. S., J. G. Harpel, F. G. Giancotti and D. B. Rifkin (1998). "Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1." *Mol Biol Cell* 9(9): 2627-38.
- Murohara, T., B. Witzensbichler, I. Spyridopoulos, T. Asahara, B. Ding, A. Sullivan, D. W. Losordo and J. M. Isner (1999). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(5): 1156-61.
- Murphy, C. G., A. J. Yun, D. A. Newsome and J. A. Alvarado (1987). "Localization of extracellular proteins of the human trabecular meshwork by indirect immunofluorescence." *Am J Ophthalmol* 104(1): 33-43.
- Nagase, H. (1997). "Activation mechanisms of matrix metalloproteinases." *Biol Chem* 378(3-4): 151-60.
- Nakamura, Y., S. Hirano, K. Suzuki, K. Seki, T. Sagara and T. Nishida (2002). "Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11): 3465-72.
- Narumiya, S., M. Tanji and T. Ishizaki (2009). "Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion." *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2): 65-76.
- Naumanen, P., P. Lappalainen and P. Hotulainen (2008). "Mechanisms of actin stress fibre assembly." *J Microsc* 231(3): 446-54.
- Neumann, C., A. Yu, U. Welge-Lüssen, E. Lutjen-Drecoll and M. Birke (2008). "The effect of TGF-beta2 on elastin, type VI collagen, and components of the proteolytic degradation system in human optic nerve astrocytes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(4): 1464-72.

- Noske, W., J. Hensen and M. Wiederholt (1997). "Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(9): 551-2.
- Ohlmann, A., M. Scholz, A. Goldwich, B. K. Chauhan, K. Hudl, A. V. Ohlmann, E. Zrenner, W. Berger, A. Cvekl, M. W. Seeliger and E. R. Tamm (2005). "Ectopic norrin induces growth of ocular capillaries and restores normal retinal angiogenesis in Norrie disease mutant mice." *J Neurosci* 25(7): 1701-10.
- Ohta, K., S. Yamagami, A. W. Taylor and J. W. Streilein (2000). "IL-6 antagonizes TGF-beta and abolishes immune privilege in eyes with endotoxin-induced uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(9): 2591-9.
- Okka, M., B. Tian and P. L. Kaufman (2004). "Effects of latrunculin B on outflow facility, intraocular pressure, corneal thickness, and miotic and accommodative responses to pilocarpine in monkeys." *Trans Am Ophthalmol Soc* 102: 251-7; discussion 257-9.
- Oklu, R. and R. Hesketh (2000). "The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family." *Biochem J* 352 Pt 3: 601-10.
- Osusky, R., J. Nussberger, C. Amstutz, J. Flammer and H. R. Brunner (1994). "Individual measurements of angiotensin II concentrations in aqueous humor of the eye." *Eur J Ophthalmol* 4(4): 228-33.
- Ott, C., D. Iwanciw, A. Graness, K. Giehl and M. Goppelt-Struebe (2003). "Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton." *J Biol Chem* 278(45): 44305-11.
- Overby, D. R., W. D. Stamer and M. Johnson (2009). "The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium." *Exp Eye Res* 88(4): 656-70.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, E. Bernstein, G. J. Hannon and D. S. Conklin (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." *Genes Dev* 16(8): 948-58.
- Palm, D. E., S. G. Shue, L. C. Keil, C. D. Balaban and W. B. Severs (1995). "Effects of angiotensin, vasopressin and atrial natriuretic peptide on intraocular pressure in anesthetized rats." *Neuropeptides* 29(4): 193-203.
- Park, S. K., J. Kim, Y. Seomun, J. Choi, D. H. Kim, I. O. Han, E. H. Lee, S. K. Chung and C. K. Joo (2001). "Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor." *Biochem Biophys Res Commun* 284(4): 966-71.
- Pavalko, F. M., C. A. Otey, K. O. Simon and K. Burridge (1991). "Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins." *Biochem Soc Trans* 19(4): 1065-9.
- Pennica, D., T. A. Swanson, J. W. Welsh, M. A. Roy, D. A. Lawrence, J. Lee, J. Brush, L. A. Taneyhill, B. Deuel, M. Lew, C. Watanabe, R. L. Cohen, M. F. Melhem, G. G. Finley, P. Quirke, A. D. Goddard, K. J. Hillan, A. L. Gurney, D. Botstein and A. J. Levine (1998). "WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14717-22.
- Peterson, J. A., B. Tian, B. Geiger and P. L. Kaufman (2000). "Effect of latrunculin-B on outflow facility in monkeys." *Exp Eye Res* 70(3): 307-13.

- Picht, G., U. Welge-Luessen, F. Grehn and E. Lutjen-Drecoll (2001). "Transforming growth factor beta 2 levels in the aqueous humor in different types of glaucoma and the relation to filtering bleb development." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(3): 199-207.
- Pollard, T. D. (2007). "Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36: 451-77.
- Ponticos, M., A. M. Holmes, X. Shi-wen, P. Leoni, K. Khan, V. S. Rajkumar, R. K. Hoyles, G. Bou-Gharios, C. M. Black, C. P. Denton, D. J. Abraham, A. Leask and G. E. Lindahl (2009). "Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen." *Arthritis Rheum* 60(7): 2142-55.
- Quigley, H. A. (1996). "Number of people with glaucoma worldwide." *Br J Ophthalmol* 80(5): 389-93.
- Ramos, R. F., G. M. Sumida and W. D. Stamer (2009). "Cyclic mechanical stress and trabecular meshwork cell contractility." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(8): 3826-32.
- Rao, P. V., P. Deng, Y. Sasaki and D. L. Epstein (2005). "Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humour outflow facility." *Exp Eye Res* 80(2): 197-206.
- Rao, P. V., P. F. Deng, J. Kumar and D. L. Epstein (2001). "Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(5): 1029-37.
- Renieri, G., L. Choritz, R. Rosenthal, S. Meissner, N. Pfeiffer and H. Thieme (2008). "Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246(8): 1107-15.
- Ridley, A. J. and A. Hall (1992). "The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors." *Cell* 70(3): 389-99.
- Rodrigues, M. M., S. I. Katz, J. M. Foidart and G. L. Spaeth (1980). "Collagen, factor VIII antigen, and immunoglobulins in the human aqueous drainage channels." *Ophthalmology* 87(4): 337-45.
- Rodriguez-Vita, J., M. Ruiz-Ortega, M. Ruperez, V. Esteban, E. Sanchez-Lopez, J. J. Plaza and J. Egido (2005). "Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 97(2): 125-34.
- Rohen, J. W., E. Lutjen-Drecoll, C. Flugel, M. Meyer and I. Grierson (1993). "Ultrastructure of the trabecular meshwork in untreated cases of primary open-angle glaucoma (POAG)." *Exp Eye Res* 56(6): 683-92.
- Ruperez, M., O. Lorenzo, L. M. Blanco-Colio, V. Esteban, J. Egido and M. Ruiz-Ortega (2003). "Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis." *Circulation* 108(12): 1499-505.

- Ruperez, M., M. Ruiz-Ortega, V. Esteban, O. Lorenzo, S. Mezzano, J. J. Plaza and J. Egido (2003). "Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney." *Am J Pathol* 163(5): 1937-47.
- Santas, A. J., C. Bahler, J. A. Peterson, M. S. Filla, P. L. Kaufman, E. R. Tamm, D. H. Johnson and D. M. Peters (2003). "Effect of heparin II domain of fibronectin on aqueous outflow in cultured anterior segments of human eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(11): 4796-804.
- Sato, S., T. Nagaoka, M. Hasegawa, T. Tamatani, T. Nakanishi, M. Takigawa and K. Takehara (2000). "Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis." *J Rheumatol* 27(1): 149-54.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Mitra and D. Ilic (2004). "Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase." *Biochim Biophys Acta* 1692(2-3): 77-102.
- Schober, M., S. Raghavan, M. Nikolova, L. Polak, H. A. Pasolli, H. E. Beggs, L. F. Reichardt and E. Fuchs (2007). "Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics." *J Cell Biol* 176(5): 667-80.
- Schoenwaelder, S. M. and K. Burridge (1999). "Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 274-86.
- Schönherr, E. and H. J. Hausser (2000). "Extracellular matrix and cytokines: a functional unit." *Dev Immunol* 7(2-4): 89-101.
- Schwinn, M. K., J. M. Gonzalez, Jr., B. T. Gabelt, N. Sheibani, P. L. Kaufman and D. M. Peters (2010). "Heparin II domain of fibronectin mediates contractility through an  $\alpha 4 \beta 1$  co-signaling pathway." *Exp Cell Res*.
- Segarini, P. R., J. E. Nesbitt, D. Li, L. G. Hays, J. R. Yates, III and D. F. Carmichael (2001). "The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein/ $\alpha 2$ -Macroglobulin Receptor Is a Receptor for Connective Tissue Growth Factor." *J. Biol. Chem.* 276(44): 40659-40667.
- Shah, G. B., S. Sharma, A. A. Mehta and R. K. Goyal (2000). "Oculohypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in acute and chronic models of glaucoma." *J Cardiovasc Pharmacol* 36(2): 169-75.
- Shi-Wen, X., Y. Chen, C. P. Denton, M. Eastwood, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, J. D. Pearson, M. Dashwood, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask and D. J. Abraham (2004). "Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts." *Mol Biol Cell* 15(6): 2707-19.
- Smerdel-Ramoya, A., S. Zanotti, L. Stadmeier, D. Durant and E. Canalis (2008). "Skeletal overexpression of connective tissue growth factor impairs bone formation and causes osteopenia." *Endocrinology* 149(9): 4374-81.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.



- Takaishi, K., A. Kikuchi, S. Kuroda, K. Kotani, T. Sasaki and Y. Takai (1993). "Involvement of rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility." *Mol Cell Biol* 13(1): 72-9.
- Tamm, E. R., A. Siegner, A. Baur and E. Lutjen-Drecoll (1996). "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle-actin expression in cultured human and monkey trabecular meshwork." *Exp Eye Res* 62(4): 389-97.
- Tervo, K., T. Paallysaho, I. Virtanen and T. Tervo (1995). "Integrins in human anterior chamber angle." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 233(5): 291-5.
- TheAGISInvestigators (2000). "The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators." *Am J Ophthalmol* 130(4): 429-40.
- Tian, B., B. T. Gabelt, B. Geiger and P. L. Kaufman (2009). "The role of the actomyosin system in regulating trabecular fluid outflow." *Exp Eye Res* 88(4): 713-7.
- Tian, B., B. T. Gabelt, J. A. Peterson, J. A. Kiland and P. L. Kaufman (1999). "H-7 increases trabecular facility and facility after ciliary muscle disinsertion in monkeys." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(1): 239-42.
- Tomarev, S. I., G. Wistow, V. Raymond, S. Dubois and I. Malyukova (2003). "Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6): 2588-96.
- Tripathi, R. C., J. Li, W. F. Chan and B. J. Tripathi (1994). "Aqueous humor in glaucomatous eyes contains an increased level of TGF-beta 2." *Exp Eye Res* 59(6): 723-7.
- Tsai, F. J., H. J. Lin, W. C. Chen, H. Y. Chen and S. S. Fan (2003). "Insulin-like growth factor-II gene polymorphism is associated with primary open angle glaucoma." *J Clin Lab Anal* 17(6): 259-63.
- Tuck, M. W. and R. P. Crick (1998). "The age distribution of primary open angle glaucoma." *Ophthalmic Epidemiol* 5(4): 173-83.
- van Setten, G. B., T. D. Blalock, G. Grotendorst and G. S. Schultz (2002). "Detection of Connective Tissue Growth Factor in Human Aqueous Humor." *Ophthalmic Research* 34(5): 306.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Vomastek, T., M. P. Iwanicki, H. J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, J. T. Parsons and M. J. Weber (2007). "RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility." *Mol Cell Biol* 27(23): 8296-305.
- Wahab, N. A., H. Brinkman and R. M. Mason (2001). "Uptake and intracellular transport of the connective tissue growth factor: a potential mode of action." *Biochem J* 359(Pt 1): 89-97.

- Wahab, N. A., B. S. Weston and R. M. Mason (2005). "Connective Tissue Growth Factor CCN2 Interacts with and Activates the Tyrosine Kinase Receptor TrkA." *J Am Soc Nephrol* 16(2): 340-351.
- Wang, S., M. Denichilo, C. Brubaker and R. Hirschberg (2001). "Connective tissue growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy." *Kidney Int* 60(1): 96-105.
- Welge-Lüssen, U., C. A. May and E. Lutjen-Drecoll (2000). "Induction of tissue transglutaminase in the trabecular meshwork by TGF-beta1 and TGF-beta2." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8): 2229-38.
- Weston, B. S., N. A. Wahab and R. M. Mason (2003). "CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells." *J Am Soc Nephrol* 14(3): 601-10.
- Wiederholt, M. (1998). "Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow." *Curr Opin Ophthalmol* 9(2): 46-9.
- Wiederholt, M., S. Bielka, F. Schweig, E. Lutjen-Drecoll and A. Lepple-Wienhues (1995). "Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye." *Exp Eye Res* 61(2): 223-34.
- Wiederholt, M., H. Thieme and F. Stumpff (2000). "The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility." *Prog Retin Eye Res* 19(3): 271-95.
- Wordinger, R. J., A. F. Clark, R. Agarwal, W. Lambert, L. McNatt, S. E. Wilson, Z. Qu and B. K. Fung (1998). "Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(9): 1575-89.
- Xu, S. W., S. L. Howat, E. A. Renzoni, A. Holmes, J. D. Pearson, M. R. Dashwood, G. Bou-Gharios, C. P. Denton, R. M. du Bois, C. M. Black, A. Leask and D. J. Abraham (2004). "Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK." *J Biol Chem* 279(22): 23098-103.
- Yamamoto, T., Y. Sawada, I. Katayama and K. Nishioka (2005). "Nodular Scleroderma: Increased Expression of Connective Tissue Growth Factor." *Dermatology* 211(3): 218.
- Yang, C. and W. F. Glass, 2nd (2008). "Expression of alpha-actinin-1 in human glomerular mesangial cells in vivo and in vitro." *Exp Biol Med (Maywood)* 233(6): 689-93.
- Yang, D. H., H. S. Kim, E. M. Wilson, R. G. Rosenfeld and Y. Oh (1998). "Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 83(7): 2593-6.
- Yao, Z. and R. Seger (2009). "The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments." *Biofactors* 35(5): 407-16.
- Yuhua, Z., R. Wanhua, S. Chenggang, S. Jun, W. Yanjun and Z. Chunqing (2008). "Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA inhibits collagen synthesis and extracellular matrix secretion in hepatic stellate cells." *Liver Int* 28(5): 632-9.

- Yujiri, T., R. Nawata, T. Takahashi, Y. Sato, Y. Tanizawa, T. Kitamura and Y. Oka (2003). "MEK kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression." *J Biol Chem* 278(6): 3846-51.
- Zhang, C., X. Meng, Z. Zhu, X. Yang and A. Deng (2004). "Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro." *Life Sci* 75(3): 367-79.
- Zhang, C., Z. Zhu, J. Liu, X. Yang, L. Fu and A. Deng (2007). "Role of connective tissue growth factor in extracellular matrix degradation in renal tubular epithelial cells." *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27(1): 44-7.
- Zhou, L., I. Maruyama, Y. Li, E. L. Cheng and B. Y. Yue (1999). "Expression of integrin receptors in the human trabecular meshwork." *Curr Eye Res* 19(5): 395-402.
- Zhou, Y., A. V. Capuco and H. Jiang (2008). "Involvement of connective tissue growth factor (CTGF) in insulin-like growth factor-I (IGF1) stimulation of proliferation of a bovine mammary epithelial cell line." *Domest Anim Endocrinol* 35(2): 180-9.
- Zillig, M., A. Wurm, F. J. Grehn, P. Russell and E. R. Tamm (2005). "Overexpression and properties of wild-type and Tyr437His mutated myocilin in the eyes of transgenic mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1): 223-34.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad	zu
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridine
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary)
CTGF	connective tissue growth factor
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppel-Strang
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
et al.	et alia (und andere)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FN	Fibronektin
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	Einfach destilliertes Wasser
HEK	Human Embryonic Kidney
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HTM5	Human Trabecular Meshwork (transformierte TWZ)
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IOD	Intraokulärer Druck
k	kilo (10 <sup>3</sup> )
KW	Kammerwasser
l	Liter
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar
min	Minute
mind.	Mindestens
MLC	Myosin Light Chain
MLEC	Mink Lung Epithelial Cells
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	nano (10 <sup>-9</sup> )

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
qPCR	quantitative real-time reverse transcription PCR
RGC	retinale Ganglienzellen
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
siRNA	small interfering RNA
SK	Schlemmkanal
Tab.	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N-N'-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TW	Trabekelwerk
TWZ	Trabekelwerkzellen
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
v/w	Volumen pro Gewicht (Masse)
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des TW und des Kammerwasserabflusssystems des menschlichen Auges.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Innenwand des Schlemm Kanals (SK) und der angrenzenden kribriformen Region.....	3
Abb. 3: Schematische Darstellung des kribriformen elastischen Netzes und seiner Veränderung beim POWG .....	6
Abb. 4: Schema der CTGF Domänen.....	8
Abb. 5: Schematischer Aufbau einer Semidry-Western Blot-Apparatur.....	48
Abb. 6: Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit Endothelin-1.....	59
Abb. 7: Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit Angiotensin II .....	60
Abb. 8: Induktion der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit IGF.....	61
Abb. 9: Rekombinantes CTGF wurde mittels einer dreistufigen FPLC aufgereinigt .....	63
Abb. 10: Änderung der Fibronektinexpression nach Behandlung von TWZ mit CTGF .....	65
Abb. 11: Änderungen der Kollagenexpression nach Behandlung von TWZ mit CTGF .....	66
Abb. 12: qPCR für CTGF- & Fibronektin-mRNA nach Transfektion mit spezifischer siRNA gegen CTGF und gleichzeitiger Behandlung mit TGF- $\beta$ 2 .....	67
Abb. 13: qPCR für CTGF-mRNA nach Behandlung von TWZ mit CTGF.....	68
Abb. 14: Einfluss von CTGF auf das extrazelluläre, proteolytische System .....	70
Abb. 15: Einfluss einer CTGF-Behandlung auf die Expression von Integrin-Untereinheiten in TWZ.....	73
Abb. 16: Hemmung der CTGF-Expression in TWZ durch Behandlung mit Latrunculin A .....	74
Abb. 17: Immunhistologische Färbungen von TWZ Behandlung mit CTGF .....	75
Abb. 18: Einfluss einer CTGF-Behandlung auf die Expression von $\alpha$ -smAktin, $\alpha$ -Actinin 1 und 4 in TWZ .....	76
Abb. 19: Einfluss einer Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Expression und Aktivität von Regulatoren des Aktinzytoskeletts. ....	77
Abb. 20: Einfluss einer Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Expression von regulatorischen Elementen des Aktinzytoskeletts.....	79
Abb. 21: Einfluss einer 24-stündigen Behandlung von TWZ mit CTGF auf die Kontraktionsfähigkeit von TWZ .....	80
Abb. 22: CTGF-Expressionsanalysen von $\beta$ B1-CTGF-Mäusen .....	81
Abb. 23: Hellfeldaufnahme sowie Immunhistologische Färbung von Kryopräparaten des Kammerwinkels aus 1 Monat alten Wildtyptieren und transgenen Tieren der Linie 5.....	82
Abb. 24: Messung des IOD an Wildtyptieren und transgenen Tieren der Linie 5.....	83
Abb. 25: Herstellung der pSiCTGF-Zellen .....	85
Abb. 26: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von HTM5- und pSiCTGF-Zellen .....	86
Abb. 27: Senkung der FN-Expression in pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen .....	87
Abb. 28: Senkung der Integrin $\beta$ 1-Expression in pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen.....	88
Abb. 29: Einfluss eines CTGF-Knockdowns auf die Expression von $\alpha$ -smAktin, $\alpha$ -Actinin1 und 4.....	89
Abb. 30: Immunhistologische Färbungen von HTM5- und pSiCTGF-Zellen.....	90
Abb. 31: Auswirkungen eines CTGF-Knockdowns auf die Expression und Aktivität, bzw. Phosphorylierung von RhoA und MLC .....	91

Abb. 32: Auswirkungen eines CTGF–Knockdowns auf die Expression von mDia1, Profilin1 und Caldesmon.....	92
Abb. 33: Adhäsion, Migration und Proliferation von pSiCTGF-Zellen im Vergleich zu HTM5-Zellen.....	95
Abb. 34: Einfluss einer CTGF-Behandlung, bzw. eines –Knockdowns auf die Phosphorylierung und Expression von FAK .....	98
Abb. 35: Einfluss einer CTGF-Behandlung bei pSiCTGF-Zellen für 24 h auf die Expression von Integrin $\beta$ 1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle .....	99
Abb. 36: Auswirkungen einer 3-stündigen CTGF–Behandlung von pSiCTGF-Zellen auf die Expression und Aktivität, bzw. Phosphorylierung von RhoA und MLC .....	100
Abb. 37: Einfluss einer CTGF-Behandlung, bzw. eines –Knockdowns auf die Phosphorylierung und Expression von ERK1/2.....	102
Abb. 38: Einfluss einer CTGF-Behandlung bei pSiCTGF-Zellen für 24 h auf die Expression von FN und $\alpha$ -smAktin im Vergleich zur unbehandelten pSiCTGF-Kontrolle. ....	103
Abb. 39: Mögliche Signalwege für CTGF zur Regulation der EZM-Expression sowie zur Regulation des Aktinzytoskeletts.....	121

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Reagenzien.....	14
Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	14
Tab. 3: Liste der verwendeten Geräte.....	16
Tab. 4: Liste der verwendeten Kits.....	16
Tab. 5: Liste der allgemein verwendeten Puffer und Lösungen.....	19
Tab. 6: Liste von Puffern und Lösungen für spezifische Anwendungen.....	22
Tab. 7: Rezepte für die Herstellung verschieden dichter Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE in Bezug auf die Größe der aufzutrennenden Proteine.....	23
Tab. 8: Liste der verwendeten qPCR- und PCR-Oligonukleotidprimer .....	24
Tab. 9: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung CTGF-spezifischer siRNA und des pSiCTGF-Vektors .....	25
Tab. 10: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot und Immunhistochemische Färbungen.....	26
Tab. 11: Liste der verwendeten Zelllinien .....	26
Tab. 12: Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA aus RNA.....	36
Tab. 13: Programm für Thermocycler zur Herstellung von cDNA aus RNA .....	36
Tab. 14: Reaktionsansatz für eine qPCR .....	37
Tab. 15: Programm für eine qPCR.....	37
Tab. 16: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für eine PCR zur Herstellung von Northern-Sonden-Templates.....	39
Tab. 17: Reaktionsansatz zur Herstellung von RNA-Northern-Sonden aus DNA-Templates.....	39
Tab. 18: Reaktionsansatz zur Herstellung doppelsträngiger DNA-Templates für CTGF-siRNAs .....	41
Tab. 19: Reaktionsansatz zur Herstellung doppelsträngiger CTGF-siRNAs mit 5'-Überhängen .....	42
Tab. 20: Reaktionsansatz zum Verdau von 5'-Überhängen an doppelsträngigen CTGF-siRNAs .....	42
Tab. 21: Reaktionsansätze zur Herstellung eines pSilencer 4.1-CMV-Vektors mit CTGF-siRNA-Template .....	43
Tab. 22: Testverdau zur Überprüfung des korrekten Einbaus des CTGF-siRNA-Templates in den pSilencer 4.1 CMV-Vektor.....	44
Tab. 23: Inkubationszeiten einzelner Puffer in der Silberfärbung von Polyacrylamidgelen .....	50
Tab. 24: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm zur Genotypisierung von $\beta$ B1-CTGF-Überexpressionsmäusen.....	55



## 7.5 Danksagung

Ich möchte mich bei all jenen bedanken, die durch ihre tatkräftige Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle **Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm** für die Vergabe dieses spannenden Themas, für die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für die Unterstützung meiner Arbeit.

**Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff** danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Unterstützung bei der Durchführung des Kollagenkontraktionsassays.

Im Besonderen möchte ich mich bei **PD Dr. Rudolf Fuchshofer** für meine umfassende Betreuung bedanken. Er wusste eigentlich immer, was zu tun war, wenn es einmal nicht weiter ging, half durch schwierige Zeiten und war auch in den guten immer zur Stelle. Neben einem tollen Chef habe ich in ihm mittlerweile auch einen guten Freund gefunden.

Danke an **Dr. Alice Yu**, **Prof. Dr. Ulrich Welge-Lüssen**, **Dr. Iok-Hou Pang**, **Dr. Louis DeSantis** und **Prof. Dr. Ralph Witzgall** für die zur Verfügung Stellung von Trabekelwerk-, HTM5- und HEK293-Zellen.

Weiterhin möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen danken, die sowohl direkt als auch indirekt durch die Schaffung einer so tollen Atmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich **Tina Schiereis** für ihre unersetzliche Hilfe in allen molekularbiologischen Aufgaben, **Angelika Pach**, **Katharina Fizia** und **Jana Berger** für die Versorgung meiner Zellen, **Amin Abdou Selim**, für den es bei der Arbeit mit Mäusen weder Wochenende noch Nachtruhe zu geben schien, sowie **Sabrina Ullmann** und **Sabrina Kessel** für die vielen Korrekturvorschläge.

Ein besonderer Dank gilt hier auch **Roswitha Seitz** und **Walter Paper**, ohne die ich mich vor allem in den ersten Monaten an diesem Lehrstuhl nicht so wohl gefühlt hätte, wie ich tat und auch noch heute tue.

Danke an **Tobias Struller**, **Katrin Herrmann**, **Matti Baumann** und alle weiteren, die sich als Bachelorstudenten, medizinische Doktoranden oder Praktikanten tatkräftig mit in das CTGF-Projekt einbrachten.

Für ihre liebevolle Unterstützung möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken. Sie gaben mir in meinen Vorhaben immer den nötigen Rückhalt, unterstützten mich in jeglicher Hinsicht und ohne sie würde ich heute nicht dort stehen, wo ich bin.

Meiner Freundin, Verlobten und baldigen Frau **Katrin Pfeilschifter** möchte ich danken für ihre grenzenlose Liebe, die vielen Stunden, die sie für die Korrektur dieser Arbeit geopfert hat und ihr Verständnis für meine momentanen geistigen Scheuklappen. Sie gab mir einen Tritt in den Hintern, wenn ich faul wurde, verordnete mir Ruhe, wenn ich sie brauchte, gab mir Essen und war einfach immer für mich da, wenn ich sie brauchte.

## **7.6 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe.

Regensburg, den 18. Mai 2010

Benjamin Junglas