

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Universität Münster

**Funktionelle Promotorstudie des humanen Biglykan  
Genpromotors**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Christina Rüßmann

aus Duisburg

-2010-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

---

**Dekan:**

Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

**Erster Berichterstatter:**

Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand

**Zweiter Berichterstatter:**

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

**Tag der mündlichen Prüfung:**

21.04.2010

Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung  
an der Universität Münster

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Stefan-Martin Brand

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Funktionelle Promotorstudie des humanen Biglykan Genpromotors

Christina Rüßmann

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) stellen die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar. Ihre Ätiologie ist multifaktoriell und wird zum einen durch Umweltfaktoren, zum anderen durch hereditäre Faktoren bestimmt. Eine Vielzahl von Genen kodiert hier für ein komplexes Netzwerk verschiedener Regelsysteme.

Biglykan (BGN), ein kleines Leucin-reiches Proteoglykan, nimmt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Verlauf CVD ein. Es organisiert die Assemblierung der extrazellulären Matrix, beeinflusst die Thrombozytenadhäsion und fördert die Lipid-Aggregation in der subendothelialen Gefäßmatrix.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Promotorbereich des humanen BGN-Gens von 96 Teilnehmern der ECTIM-Studie, einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie, analysiert. Es konnten 4 *Single-Nucleotide-Polymorphisms* (SNPs) in der 5'-regulatorischen Region (BGN-849G/A, BGN-578G/A, BGN-501C/A, BGN-151G/A) und einer in der 5'-untranslatierten Region (BGN+94G/T) identifiziert werden. Die funktionelle Analyse vier dieser SNPs erfolgte als transiente Transfektion in HEK293T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die Bereiche um die SNPs zeigten in unterschiedlichem Maße eine stimulations- und/oder allel-abhängige transkriptionelle Aktivität. Der Einfluss des Basenaustauschs an Position +94 auf Protein-DNA-Interaktionen wurde mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) untersucht. Das G-Allel zeigte hier eine höhere Protein-Bindungsaffinität als das T-Allel. Ein möglicher Bindungspartner ist SP1 und die *Insilico*-Analyse ergab eine zusätzliche potentielle SP1-Bindungsstelle für das G-Allel. Zudem wurde SP1 in nukleären Zellextrakten der HEK293T-Zellen nachgewiesen.

CVD gehören, wie der Typ 2 Diabetes mellitus und die essentielle Hypertonie, zu den komplex genetisch (polygen) determinierten Erkrankungen. Genetische Einflussfaktoren zu identifizieren ist ein wichtiger Schritt für die Entwicklung präventiver Therapiestrategien (Guttmacher AE, Collins FS, 2005; Roses AD, 2000).

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2010

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.</b>	<b>Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) .....</b>	<b>4</b>
1.1.1.	Risikofaktoren .....	4
1.1.1.1.	Hypertonie .....	5
1.1.1.1.1.	Epidemiologie/Phänomenologie .....	5
1.1.1.1.2.	Stratifizierung des kardiovaskulären Risikos .....	7
1.1.2.	Arteriosklerose .....	8
1.1.2.1.	Pathogenese .....	8
1.1.3.	Relevanz genetischer Faktoren für die CVD-Entwicklung .....	10
<b>1.2.</b>	<b>Genetische Studien .....</b>	<b>11</b>
1.2.1.	Assoziationsstudien .....	12
1.2.1.1.	Kandidatengen-Approach .....	12
1.2.1.2.	Genomweite Assoziationsstudien (GWA-Studien) .....	13
<b>1.3.</b>	<b>Genregulation .....</b>	<b>15</b>
1.3.1.	Kontrollebenen der eukaryontischen Genexpression .....	16
1.3.2.	Eukaryote Promotorbereiche .....	16
1.3.2.1.	Distale Regulationselemente .....	17
<b>1.4.</b>	<b>Biglykan (BGN) .....</b>	<b>18</b>
1.4.1.	Extrazelluläre Matrix (EZM) .....	18
1.4.2.	Kardiales Remodeling .....	20
1.4.3.	BGN als Kandidatengen für die Arterioskleroseentstehung .....	21
1.4.3.1.	Kollagenfibrillogenese und Assemblierung der EZM .....	21
1.4.3.2.	Lipideinlagerung in die subendotheliale Gefäßmatrix .....	21
1.4.3.3.	Myokardiale BGN-Expression nach Myokardinfarkt (MI) .....	21
1.4.4.	Proteinstruktur .....	22
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materialliste und Bezugsquellen .....</b>	<b>23</b>
2.1.1.	Chemikalien .....	23
2.1.2.	Gele .....	24
2.1.3.	Puffer .....	25
2.1.4.	Zellkulturbedarf .....	25
2.1.4.1.	Zelllinien .....	25
2.1.4.2.	Seren und Medien .....	26
2.1.4.3.	Antibiotika und Enzyme .....	26

2.1.4.4.	Zellkulturbedarf.....	26
2.1.5.	Bakterien .....	26
2.1.6.	Enzyme.....	27
2.1.7.	Molekularbiologische Kits .....	27
2.1.8.	Plasmidvektoren .....	28
2.1.9.	Geräte.....	29
2.1.10.	Antikörper .....	31
2.1.11.	Weiterer Laborbedarf.....	31
<b>2.2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.2.1.	ECTIM Studie .....	32
2.2.2.	DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut.....	32
2.2.3.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	33
2.2.3.1.	Primer-Design.....	33
2.2.3.2.	Primer und PCR-Bedingungen für BGN.....	34
2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.2.5.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	35
2.2.6.	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP) Analyse.....	36
2.2.6.1.	Silbernitratfärbung von SSCP-Gelen.....	36
2.2.6.2.	PCR-Ansatz für die SSCP-Analyse.....	37
2.2.7.	DNA-Sequenzierung.....	37
2.2.8.	Konstruktion der Reportergenplasmide.....	37
2.2.8.1.	PCR .....	38
2.2.8.2.	Verdau und Ligation .....	38
2.2.8.3.	Herstellung der molekularen Haplotyp-Konstrukte.....	41
2.2.9.	Identifizierung der Plasmide .....	42
2.2.10.	Gezielte Mutagenese.....	44
2.2.11.	Prokaryontische Zellkultur .....	44
2.2.11.1.	Transformation von E.coli Bakterien .....	44
2.2.11.2.	Plasmidpräparation mit dem QIAspin <sup>®</sup> Maxiprep Kit.....	44
2.2.12.	Eukaryontische Zellkultur .....	45
2.2.12.1.	cDNA-Synthese und Kontrolle endogener <i>BGN</i> -Expression .....	45
2.2.12.2.	Transiente Transfektion.....	46
2.2.12.3.	Kontrolle der Transfektionseffizienz .....	47
2.2.13.	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) .....	47
2.2.13.1.	Biotinylierung und Detektion.....	49
2.2.13.2.	Präparation von Kernproteinen .....	50
2.2.13.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	51
2.2.14.	<i>Insilico</i> -Analyse.....	51

2.2.15.	Western-Blot.....	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1.	Identifikation genetischer Varianten im <i>BGN</i> -Promotorbereich .....	53
3.2.	Allelfrequenzen.....	56
3.3.	Endogene <i>BGN</i> -Expression .....	59
3.4.	Herstellung der Reportergenkonstrukte .....	60
3.5.	Reportergenanalyse.....	61
3.5.1.	Transiente Transfektionen von pProm <i>BGN</i> -G+94t in HEK293T.....	61
3.5.2.	Transiente Transfektionen von pProm <i>BGN</i> -G-151a in HEK293T .....	65
3.5.3.	Transiente Transfektionen von pProm <i>BGN</i> -G-578a in HEK293T .....	68
3.5.4.	Transiente Transfektionen von pProm <i>BGN</i> -G-849a in HEK293T .....	71
3.6.	Reportergenanalyse der molekularen Haplotypen (MolHaps) .....	74
3.7.	Änderung der Protein-Bindungsaffinität durch genetische Varianten .....	77
3.7.1.	<i>Insilico</i> Analyse.....	77
3.7.2.	EMSA.....	79
3.7.3.	Western-Blot-Analyse - HEK293T-Zellen exprimieren SP1 .....	83
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
4.1.	BGN und kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) .....	84
4.2.	Identifikation genetischer Varianten im <i>BGN</i> -Promotor .....	85
4.3.	<i>BGN</i> -Promotor-SNPs beeinflussen Protein-DNA-Interaktionen .....	92
<b>5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>108</b>

## Abkürzungen

Acc#	<i>Accession number</i>	EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
AS	Antisense		
As	Aminosäure	engl.	englisch
BGN	Biglykan	ESC/ESH	European Society of Cardiology / European Society of Hypertension
BMI	<i>Body Mass Index</i>		
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	etc	et cetera
bp	Basenpaare	EZM	Extrazelluläre Matrix
ca.	circa	GF	Genetische Faktoren
CCR2	Chemokin-Rezeptor 2 (engl. <i>Chemokine Receptor 2</i> )	GFP	<i>Green-Fluorescence-Protein</i>
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>	GWA	Genomweite Assoziationsstudie (engl. <i>Genomewide Association Study</i> )
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen (engl. <i>Cardiovascular Disease</i> )	HapMap	<i>Haplotype Map</i>
d.h.	das heißt	HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen (engl. <i>Human Embryonic Kidney Cells</i> )
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser	HLP	Hyperlipoproteinämie
DPE	<i>Downstream Promoter Element</i>	HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> )
DM	Diabetes mellitus	HTN	Hypertonie
DM 2	Typ 2 Diabetes mellitus	IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Inr	Initiatorelement (engl. <i>Initiator Element</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ISH	Isolierte Systolische Hypertonie
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat	KHK	Koronare Herzkrankheit
ds	Doppelstrang	LD	Kopplungsungleichgewicht, (engl. <i>Linkage Disequilibrium</i> )
ECTIM	<i>Etude Cas-Témoins de l'Infarctus du Myocarde</i>		
EDD	Enddiastolischer Druck		
EF	Ejektionsfraktion		

LDL	Lipoprotein niederer Dichte (engl. <i>Low Density Lipoprotein</i> )	OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
MCP-1	Monozyten-anlockendes Protein-1 (engl. <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> )	ox-LDL	oxidiertes LDL
M-CSF	Makrophagen Koloniestimulierender Faktor (engl. <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
MI	Myokardinfarkt	PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9	PG-I	Proteoglykan-I
MolHap	Molekularer Haplotyp	PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (engl. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
MONICA	<i>MONitoring Trends and determinants In Cardiovascular disease</i>	RE	Restriktionsenzym
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	RLU	<i>Relative Light Units</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>	RP27	Ribosomales Protein 27 (engl. <i>Ribosomal Protein 27</i> )
NF-1	<i>Nuklear factor 1</i>	RR	Relatives Risiko
NF-KB	Nukleärer Transkriptionsfaktor K (engl. <i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> )	RT	Raumtemperatur (engl. <i>Room Temperature</i> )
NGFN	Nationales Genomforschungszentrum (engl. <i>National Genome Research Network</i> )	SaOs-2	Osteosarkom-Zellen (engl. <i>osteosarcoma cells</i> )
NO	Stickstoffmonoxid	SD	Standardabweichung
n.s.	nicht signifikant	SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium DodecylSulfate</i> )
OD	Optische Dichte (engl. <i>Optical Density</i> )	SLRP	kleine leucinreiche Proteoglykane (engl. <i>Small Leucine Rich Proteoglycans</i> )
		SMC	glatte Muskelzelle (engl. <i>Smooth Muscle Cell</i> )
		SNP	Einzelbasenaustausch (engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )

SP1	<i>Specificity Protein 1</i>	VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (engl. <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> )
ss	Einzelstrang		
SS	Supersense		
SSCP	DNA-Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (engl. <i>Single-Strand Conformation Polymorphism analysis</i> )	VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen (engl. <i>Vascular SMC</i> )
TBP	TATA-Box bindendes Protein ( <i>TATA-box Binding Protein</i> )	WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> )
TGF- $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor (engl. <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )	wt	Wildtyp (engl. <i>wild type</i> )
TF	Transkriptionsfaktor (engl. <i>Transcription Factor</i> )	z.B.	zum Beispiel
TFBS	TF-Bindestelle (engl. <i>Transcription Factor Binding Site</i> )		
Tm	Schmelztemperatur (engl. <i>melting Temperature</i> )		
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (engl. <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> )		
TNFR	Tumornekrosefaktor Rezeptor (engl. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> )		
TSS	Transkriptionsstartstelle (engl. <i>Transcription Start Site</i> )		
u.a.	unter anderem		
UK	<i>United Kingdom</i>		
usw.	und so weiter		
UTR	untranslatierte Region		

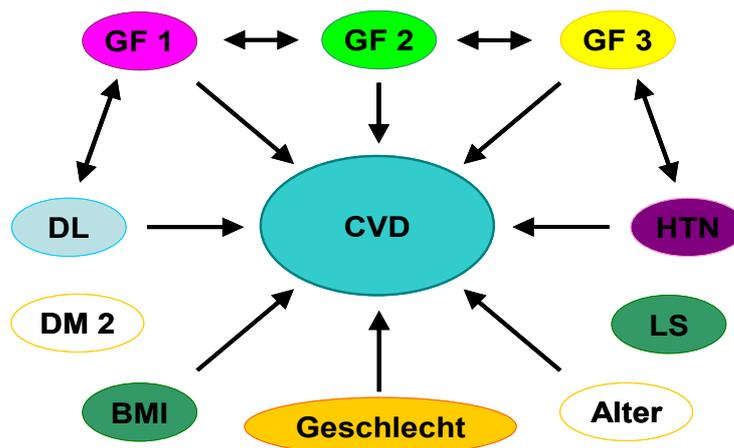
# 1. Einleitung

Arteriosklerose und ihre Manifestationen wie die Koronare Herzkrankheit (KHK), Herz- und Niereninsuffizienz, Hypertonie, ischämische Insulte und vaskuläre Demenz beeinflussen in großem Maße die Morbiditäts- und Mortalitätsraten in Deutschland und weltweit (50, 55). Nach Daten des Statistischen Bundesamtes waren Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems im Jahr 2007 für 43,4% der Todesfälle (358 684 Verstorbene) in der Bundesrepublik verantwortlich und damit die häufigste Todesursache (79). An kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) starben demnach mehr Menschen als an bösartigen Neubildungen, Erkrankungen des Atmungssystems und des Verdauungssystems zusammen.

## 1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD)

### 1.1.1. Risikofaktoren

Die Ätiologie der CVD ist multifaktoriell und wird sowohl durch Umwelt- als auch hereditäre Faktoren bestimmt. Zu den Risikofaktoren zählen neben den unbeeinflussbaren Faktoren wie Alter und Geschlecht auch Hypertonie, Adipositas (genauer "waist to hip"-Ratio und *Body Mass Index* (BMI)), Dyslipidämie, Lifestylefaktoren, z.B. Nikotinkonsum, psychischer Stress, berufliche Belastung (82), Ernährung (22) und besonders genetische Faktoren.



**Abbildung 1** Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD). (GF: Genetische Faktoren, HTN: Hypertonie, LS: Lifestyle, DM 2: Typ 2 Diabetes mellitus, DL: Dyslipidämie).

### 1.1.1.1. Hypertonie

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems (Arteriosklerose, hypertensive Kardiomyopathie), des Gehirns (Apoplex, vaskuläre Demenz) und der Nieren (hypertensive Nephropathie/Nephrosklerose) zeigen eine starke Assoziation zu erhöhten Blutdruckwerten.

#### 1.1.1.1.1. Epidemiologie/Phänomenologie

Von Hypertonie spricht man bei einer dauerhaften Erhöhung des Blutdrucks im arteriellen System auf Werte von >140 mmHg systolisch und >90 mmHg diastolisch. Abbildung 2 zeigt die Festlegung der Blutdrucknormwerte nach den Richtlinien der European Society of Cardiology und der European Society of Hypertension 2007 (ESC/ESH) (27).

Kategorie	Systolisch		Diastolisch
Optimal	<120	und	<80
Normal	120-129	und/oder	80-84
Hoch-normal	130-139	und/oder	85-89
Hypertonie Grad 1	140-159	und/oder	90-99
Hypertonie Grad 2	160-179	und/oder	100-109
Hypertonie Grad 3	$\geq 180$	und/oder	$\geq 110$
Isolierte systolische Hypertonie (ISH)	$\geq 140$	und	<90

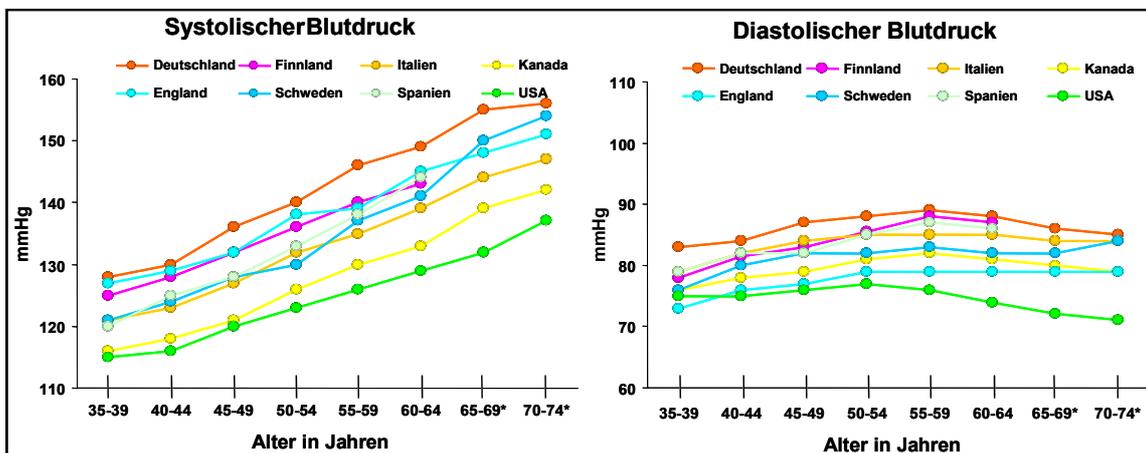
**Abbildung 2 Blutdrucknormwerte** [in mmHg] nach den Richtlinien der *European Society of Cardiology* und der *European Society of Hypertension 2007* (ESC/ESH).

In Deutschland findet sich alters- und geschlechtsadaptiert die höchste Hypertonie-Prävalenz in Europa. Nach Wolf-Maier lag sie 2003 mit 55% deutlich über dem Durchschnittswert der untersuchten europäischen Länder (44.2%) und ist doppelt so hoch wie in Nordamerika (27.6%) (102).

Land	Verbreitung, %			Hypertensive Personen unter Medikation, %	BMI
	Alle	Männer	Frauen		
Nordamerika	27.6	30.4	24.8	44.4	27.1
USA	27.8	29.8	25.8	52.5	27.4
Kanada	27.4	31.0	23.8	36.3	26.8
Europa	44.2	49.7	38.6	26.8	26.9
Italien	37.7	44.8	30.6	32.0	26.4
Schweden	38.4	44.8	32.0	26.2	26.5
England	41.7	46.9	36.5	24.8	27.1
Spanien	46.8	49.0	44.6	26.8	27.4
Finnland	48.7	55.7	41.6	25.0	27.1
Deutschland	55.3	60.2	50.3	26.0	27.3

**Abbildung 3** Hypertonieprävalenz in Europa und Nordamerika modifiziert nach Wolf-Maier et al. (102).

Länderübergreifend zeigte sich ein Anstieg der Prävalenz mit zunehmendem Alter. Dabei nahm auch der Anteil der isoliert systolischen Hypertonie (ISH) zu (71). Die durchschnittlichen systolischen Werte in den europäischen Ländern lagen in der Altersgruppe zwischen 35 und 39 Jahren bei ca. 125 mmHg, in der Gruppe der 65 bis 69 Jährigen bei ca. 150 mmHg (Abbildung 4).



**Abbildung 4** Änderung des Blutdrucks mit dem Alter. Mit zunehmendem Alter nimmt die Höhe des systolischen Blutdrucks zu, wohingegen der diastolische Druck nahezu konstant bleibt. Aus Wolf-Maier et al. (102).

Aufgrund therapeutischer Konsequenzen teilt man Bluthochdruck nach Ätiologie in primären und sekundären Bluthochdruck ein. Der traditionelle Begriff der essentiellen Hypertonie (=Ursache unbekannt) wurde durch die Aufklärung pathogenetischer Mechanismen dieser Hypertonieform zugunsten der Bezeichnung "primäre Hypertonie" verlassen (59). Sekundäre Formen (=singuläre Ursache) machen nur ca. 10% aller Hypertoniefälle aus und können meistens kausal behandelt werden.

Bei ca. 90% der Hypertoniepatienten handelt es sich jedoch um primäre Hypertonie, d.h. weithin ohne bekannte, singuläre Ursache. Ihr liegt vielmehr eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde, an der Interaktionen genetischer Faktoren, Umweltfaktoren und der Lebensstil des Patienten beteiligt sind.

#### **1.1.1.1.2. Stratifizierung des kardiovaskulären Risikos**

Sowohl die Erhöhung der systolischen als auch der diastolischen Blutdruckwerte führt zu einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos für Schlaganfall und KHK. Da das Risiko nahezu linear mit der Höhe des Blutdrucks ansteigt, gibt es keine Schwellenwerte und die Festlegung der Normwerte ist als willkürlich anzusehen. Verschiedene prospektive Studien (u.a. die Framingham-Studie) haben gezeigt, dass die Einteilung in normotensiv und hypertensiv, obwohl klinisch sinnvoll, nicht ausreichend für die Risikostratifizierung ist. So werden ca. 40% der Individuen mit hochnormalen Blutdruckwerten im 2-Jahresverlauf und 63% im 4-Jahresverlauf eine Progression zu primärer, behandlungsbedürftiger Hypertonie erleben (6, 51, 95).

Die Stratifizierung des kardiovaskulären Gesamtrisikos erfolgt anhand der Richtlinien der WHO/ISH (*World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension*) von 1999 (29), diese wurden jedoch um das zusätzliche Risiko bei Patienten mit normalem und hoch-normalem Blutdruck erweitert (18). Die Gruppierungen in niedriges, moderates, hohes oder sehr hohes Risiko werden verwendet, um ein absolutes Risiko für CVD über die folgenden 10 Jahre von <15%, 15-20%, 20-30% bzw. >30% (Kriterien der Framingham-Studie) (3) oder ein absolutes Risiko für eine tödliche CVD von <4%, 4-5%, 5-8% bzw. >8% (*Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE)-Projekt) abzuschätzen (14).

### 1.1.2. Arteriosklerose

Unter CVD versteht man im Allgemeinen Erkrankungen, die das Herz und die Blutgefäße betreffen - im engeren Sinne Erkrankungen, deren gemeinsame Hauptursache die Arteriosklerose darstellt. Unser Verständnis über die molekulare Pathogenese der Arteriosklerose hat sich in den vergangenen Dekaden grundsätzlich verändert. Traditionell basiert es auf der Hypercholesterinämie-Hypothese (*Lipoprotein-induced-atherosclerosis-hypothesis*, Joseph Leonard Goldstein): demnach führen erhöhte Blutcholesterinwerte zu Lipidablagerungen in den Arterienwänden. Chemisch modifizierte LDLs werden durch Makrophagen aufgenommen, die sich daraufhin in Schaumzellen umwandeln. In der oxidativen Modifizierung von LDL (ox-LDL) wird die eigentliche Ursache für die Initiierung des arteriosklerotischen Geschehens gesehen, die Verletzung der Endothelzellen hingegen nur als ein Teilschritt betrachtet.

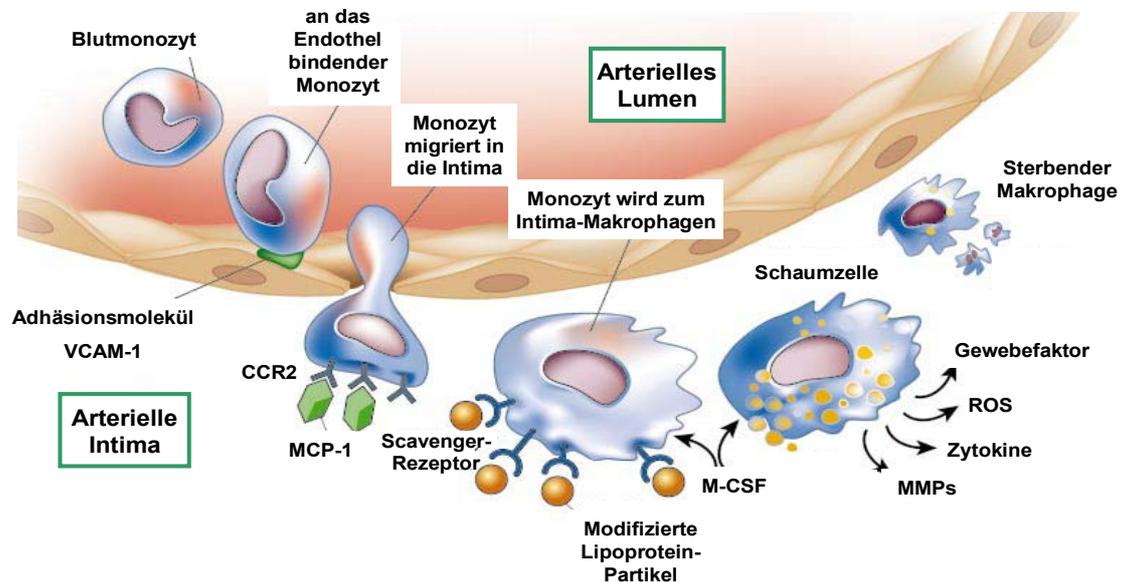
Durch intensive Forschung in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden zahlreiche neue Erkenntnisse über den Metabolismus des Cholesterins sowie der Lipoproteine gewonnen. Jedoch erleiden viele Patienten ein akutes kardiovaskuläres Ereignis, ohne erhöhte Cholesterinwerte im Sinne der vom *National Cholesterol Education Program* (NCEP) empfohlenen Grenzwerte aufzuweisen (200 mg/dl für Gesamtcholesterin und 130 mg/dl für LDL-Cholesterin) (65).

#### 1.1.2.1. Pathogenese

Man geht heute davon aus, dass die Arterioskleroseentstehung ein chronisch entzündlicher Prozess ist und viele Risikofaktoren über die inflammatorische Antwort des Körpers zur Arterioskleroseentstehung führen. Einen frühen Schritt stellen z.B. die Expression inflammatorischer Zytokine und die Leukozytenanlagerung an das Endothel dar.

Unter physiologischen Bedingungen ist das Endothel über seine atheroprotektiven Funktionen (z.B. Sekretion von Stickstoffmonoxid, NO) in der Lage, sich gegenüber dieser Adhäsion zu schützen. Eine Voraussetzung ist daher die Schädigung des Endothels mit der daraus folgenden endothelialen Dysfunktion (75). Entzündliche Stimuli, wie beispielsweise die gesteigerte Aufnahme gesättigter Fettsäuren (52), Hypercholesterinämie, Adipositas, Hyperglykämie, Insulin-Resistenz, Hypertonie und Nikotinabusus lösen die vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle aus. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) ist ein bedeutender Faktor in diesen

frühen Stadien der Arterioskleroseentstehung. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass VCAM-1 auf der Endothelzelloberfläche bei cholesterinreicher Diät bereits vor Adhäsion von Leukozyten exprimiert wird (15, 52). Modifizierte Lipoproteine, die sich bei atherogener Nahrung in die arterielle Intima einlagern, können über IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und schließlich über NF-KB zur erhöhten Expression von VCAM-1 führen (13). Die Expression ist dabei in den Bereichen verstärkt nachweisbar, die zur Arterioskleroseentstehung neigen (Aufzweigungen im Gefäßbaum bei turbulenter Strömung) (45). Zudem bindet VCAM-1 besonders jene Leukozyten, welche in entstehenden atheromatösen Plaques gefunden werden: Monozyten und T-Lymphozyten (53).



**Abbildung 5** Mononukleäre Phagozyten bei der Arterioskleroseentstehung. Schematische Darstellung der Rolle mononukleärer Phagozyten bei der Arterioskleroseentstehung (von links nach rechts). Monozyten treten über Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1) mit dem Gefäßendothel in Kontakt. Über Chemokine (z.B. Monocyte *Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) werden die an das aktivierte Endothel gebundenen Monozyten in die Gefäßintima rekrutiert. Die Chemoattraktion erfolgt über Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) auf den Monozyten. Unter dem Einfluss von M-CSF reifen die Monozyten zu Makrophagen und erhöhen die Expression von Scavenger-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Über diese nehmen sie modifizierte (insbesondere oxidierte, oxLDL) Lipoproteine auf und speichern sie in Vakuolen. Es entstehen Schaumzellen, die proinflammatorische Zytokine exprimieren, welche die Inflammation weiter unterhalten. Modifiziert nach P. Libby, *Inflammation in Atherosclerosis*, Nature 2002 (53).

Treten Monozyten in direkten Kontakt mit dem Endothel, wird unter anderem die Expression von Monozyten Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) um ein Vielfaches gesteigert und erlaubt die Einwanderung der Leukozyten in die Gefäßwand (2). Durch Chemokine (wie MCP-1 und seinen Rezeptor CCR2) werden die adhätierenden Zellen in die arterielle Intima rekrutiert (7). Hier reifen sie unter Einfluss von M-CSF zu Makrophagen. Gleichzeitig erhöhen sie die Expression des Scavenger-Rezeptors, *Cluster of Differentiation 36* (CD36), und nehmen über rezeptorvermittelte Endozytose modifizierte Lipoproteine, z.B. ox-LDL, auf, die intrazellulär in Vakuolen gespeichert werden; Sie entwickeln sich zu Schaumzellen. Einlagerungen von Schaumzellen in der arteriellen Intima werden auch als *“Fatty streaks“* bezeichnet und stellen die ersten makroskopisch sichtbaren, noch reversiblen Veränderungen dar. Im weiteren Verlauf erfolgen die Lipidablagerungen nicht mehr nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär.

Schaumzellen sezernieren in der Folge Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und PDGF. Dadurch verstärken sie nicht nur die Entzündungsreaktion und führen zur weiteren Infiltration der Intima mit Leukozyten, sondern bewirken im Verlauf auch eine Proliferation glatter Muskelzellen. Diese wandern von der Tunica media in die Intima, wo sie sich vermehren und unter Stimulation durch z.B. TGF- $\beta$  und PDGF Komponenten der extrazellulären Matrix sezernieren. Aus der lipidreichen Läsion entsteht eine fibrotische Läsion. Durch progressive Einengung des Lumens z.B. der Koronarien kann sich die Läsion klinisch in Form einer Angina pectoris (stabil/instabil) manifestieren.

### **1.1.3. Relevanz genetischer Faktoren für die CVD-Entwicklung**

Dass die CVD-Entwicklung stark genetisch determiniert ist, wurde in epidemiologischen Studien bereits gezeigt (60). Am besten konnte der Einfluss genetischer Faktoren durch eine schwedische Zwillingsstudie mit über 20.000 Individuen dokumentiert werden (35, 56). Marenberg et al zeigten hier, dass das relative Risiko (RR) an einem Myokardinfarkt (MI) zu versterben, wenn der eine Zwilling bereits an einem MI verstorben war, für monozygote Zwillinge zweifach höher lag als für dizygote Zwillinge.

CVD gehören, wie der Typ 2 Diabetes mellitus und die essentielle Hypertonie, zu den komplex genetisch (polygen) determinierten Erkrankungen. Ihr Auftreten lässt sich nicht durch eine einfache (monogene) Genotyp-Phänotyp-Korrelation erklären,

vielmehr kodiert eine Vielzahl von Kandidatengenen für ein komplexes Netzwerk verschiedener Regelsysteme (36).

Variationen in diesen Systemen, gekoppelt mit dem Einfluss äußerer Umweltfaktoren, führen zur kardiovaskulären Krankheitsentstehung. Dabei bedingt jede genetische Variante als einzelne betrachtet nur eine moderate Erhöhung des Risikos, in Kombination können funktionelle Varianten jedoch zur signifikanten Risikoerhöhung führen. Genetische Einflussfaktoren zu identifizieren, ist daher ein wichtiger Schritt für die Entwicklung präventiver Therapiestrategien (30, 74).

## 1.2. Genetische Studien

Die menschliche Erbinformation ist in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) in 46 Chromosomen gespeichert. Als Genom bezeichnet man die Gesamtheit der vererbaren Informationen einer Zelle. Abseits epigenetischer Phänomene beruht die interindividuelle genetische Variabilität auf dem Vorhandensein genetischer, vererbbarer Varianten. Je nach Häufigkeit dieser Varianten spricht man von Mutationen (<1% der Population) oder Polymorphismen (>1% der Population). Die häufigste Form ist der Einzelbasenaustausch (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Polymorphismen sind im Genom etwa alle 200-500 Basenpaare (bp) zu finden (je nach Genregion auch häufiger) (10), so dass sich Individuen in ca. 3-4 Mio SNPs unterscheiden (0,1% des Genoms) (siehe auch *US department of Energy Office of Science, Human Genome project information*, <https://genomics.energy.gov>). SNPs bestimmen nicht nur Unterschiede in der Haut- oder Haarfarbe, sondern sind auch die molekulare Grundlage der Suszeptibilität gegenüber Erkrankungen. Nahezu 12 Millionen einzelne SNPs sind bislang im *National Center for Biotechnology Information's dbSNP database* erfasst und mit Referenznummern versehen (siehe auch <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Entscheidende Grundlage für die Erfassung von SNPs war die Sequenzierung des menschlichen Erbmaterials (*Human Genome Project*) im Jahr 2001 (41, 49, 96). Zusammen mit den Ergebnissen des internationalen HapMap-Projektes (23, 42) (siehe auch <http://www.hapmap.org>) standen den Forschern nun weitere Instrumente zur Verfügung, den genetischen Beitrag zur Krankheitsentstehung zu untersuchen.

### **1.2.1. Assoziationsstudien**

Ziel einer Assoziationsstudie ist es, durch Vergleich einer Patienten- mit einer Kontrollstichprobe ein mit der Erkrankung assoziiertes genetisches Merkmal zu detektieren (9). Als Studiendesign werden Fall-Kontroll-Studien (retrospektiv) oder Kohortenstudien (prospektiv) gewählt.

#### **Fall-Kontroll-Studien**

Bei diesem Studiendesign handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung zweier Stichproben. Dabei setzt sich die eine aus erkrankten (Fällen), die andere aus gesunden (Kontrollen) Probanden zusammen. Bestanden in der Vergangenheit Unterschiede in der Exposition gegenüber bestimmten Risikofaktoren (z.B. genetische Polymorphismen) zwischen Fällen und Kontrollen, weist dies auf eine Assoziation zwischen Risikofaktor und Erkrankung hin. Auf genetischer Ebene untersucht man das gesamte Genom (genomweite Assoziationsstudie) bzw. ein Gen (Kandidatengen) auf SNPs, die bei den Fällen signifikant häufiger auftreten, als bei den Kontrollen.

#### **Kohortenstudie**

Unter einer Kohorte versteht man eine Gruppe von Personen, in deren Leben ein Ereignis zum selben Zeitpunkt eingetreten ist (z.B. Geburtsjahrgänge). Man teilt die Probanden in Bezug auf einen Risikofaktor (z.B. Nikotinkonsum, genetische Polymorphismen) in Exponierte und Nicht-Exponierte ein und beobachtet die Gruppen über einen festgelegten Zeitraum. Am Ende des Untersuchungszeitraums wird aus den Unterschieden der Krankheitsprävalenz zwischen Exponierten und Nicht-Exponierten das relative Risiko für die Krankheitsentstehung durch Exposition gegenüber einem Risikofaktor bestimmt.

Zur Untersuchung komplex genetisch determinierter Erkrankungen stehen, vereinfacht dargestellt, zwei Methoden zur Verfügung: Der Kandidatengen-Approach und genomweite Assoziationsstudien.

##### **1.2.1.1. Kandidatengen-Approach**

Ein häufig verwendeter Ansatz, genetische Risikofaktoren für komplex determinierte Erkrankungen zu identifizieren, ist der Kandidatengen-Approach. Als Kandidatengene bezeichnet man Gene, deren Produkte physiologisch an Prozessen beteiligt sind, die

für die Ätiologie der untersuchten Erkrankung relevant sind. Dieser Ansatz basiert auf unserem bisherigen Wissen über die Pathogenese der Erkrankung (9). Dem Screening auf Polymorphismen geht somit eine Hypothese voraus. Beispiele von Kandidatengen für CVD sind u.a. Zelladhäsionsmoleküle, pro-inflammatorische Proteine, Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Thrombozytenadhäsionsmoleküle und - wie in dieser Arbeit - Bestandteile der Extrazellulären Matrix (EZM) (10, 36).

### 1.2.1.2. Genomweite Assoziationsstudien (GWA-Studien)

Eine der modernsten zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden ist die genomweite Analyse mit SNP-Markern. Genomweite Forschungsansätze basieren darauf, dass unser Genom aus Haplotypblöcken aufgebaut ist und benachbarte Allele häufig gemeinsam und nicht zufällig vererbt werden. Sie stehen zueinander im Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*, LD). In einem Bereich des Genoms (Locus) muss daher häufig nur ein Marker bestimmt werden, der mit den anderen Markern assoziiert ist. Ziel des Internationalen HapMap-Projektes war es, spezielle Markierungs-SNPs (engl. *tag-SNPs*) zu identifizieren, mit denen ein Großteil der genetischen Variationsmuster bestimmt werden kann. Man geht davon aus, dass nicht ein einzelner SNP zu Erkrankung führt, sondern mehrere SNPs in unterschiedlichen Genen und auch auf unterschiedlichen Chromosomen in Zusammenarbeit mit Umwelteinflüssen die Ausprägung einer Eigenschaft bestimmen. Bei den heute verwendeten GWA-Studien werden 100.000 bis 1.200.000 genetische Marker typisiert.

Mit Hilfe computergestützter Datenbanken und neuen Technologien zur effizienten und kostengünstigeren Genotypisierung (Illumina, Affymetrix) ist es nun möglich, das gesamte Genom einer großen Zahl von Individuen zu typisieren. Das am häufigsten angewandte Studiendesign ist dabei das der Fall-Kontroll-Studie (67), gefolgt von großen prospektiven Analysen.

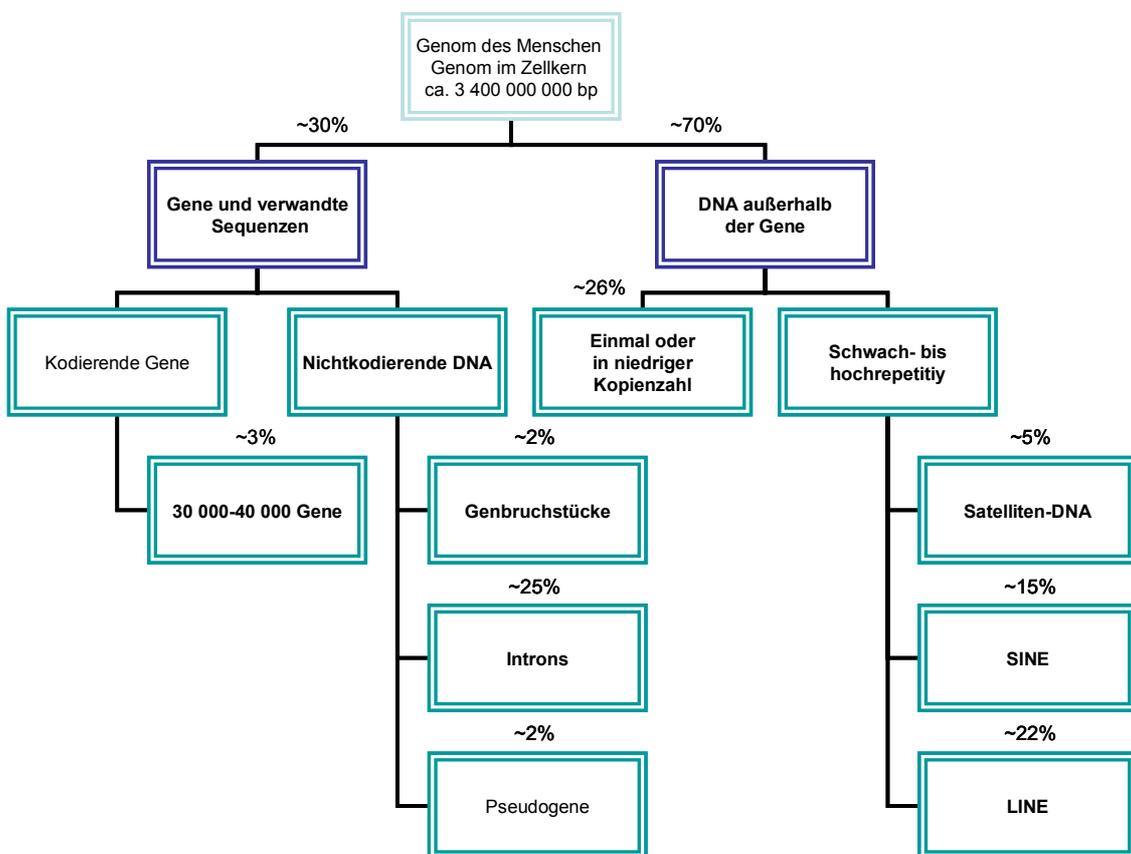
Anders als der Kandidatengen-Approach arbeiten GWA-Studien ohne zugrundeliegende Hypothese und selektieren die zu untersuchenden genomischen Bereiche nicht – wie etwa durch Beschränkung auf eine limitierte Zahl von Kandidatengen des heutigen Wissensstands. Ein sich deutlich dabei herausbildender Erkenntnisgewinn ist, dass genomische, hoch signifikant assoziierte Varianten häufig keiner bisher bekannten molekularen Funktion zugeordnet werden können. Ein assoziierter SNP dient zunächst somit nur als Hinweis, welche Loci des

Genoms an der Krankheitsentstehung beteiligt sein könnten. Dabei kann es sich auch um Bereiche handeln, die keine bekannten Gene enthalten, oder um intergene Regionen (54). Tag-SNPs sind gewöhnlich nicht selbst kausal an der Pathogenese beteiligt, sondern stehen mit dem krankheits-verursachenden SNP im LD. Um Aufschluss über pathogenetische Zusammenhänge zwischen SNP und Erkrankung zu bekommen, müssen sich funktionelle Untersuchungen anschließen. Eine umfassende molekularbiologische Charakterisierung genomischer Funktionen ist somit eine unabdingbare, komplementäre Forderung, die in unserem Labor progressiv durchgeführt wird (<http://www.lifa-muenster.de/Department-Molekulare-Genetik.242.0.html>).

GWAs haben Assoziationen zwischen genetischen Variationen und Erkrankungen (z.B. Typ 2 Diabetes mellitus (87), Morbus Crohn, altersabhängige Makuladegeneration) zeigen können. Sie stellen einen effektiven Ansatz zur Erforschung der Pathogenese weit verbreiteter Erkrankungen dar (97). Nachteilig sind jedoch die benötigte große Zahl an Probanden, die Häufigkeit an falsch-positiven Ergebnissen und die Anfälligkeit gegenüber Zuordnungs-Bias.

### 1.3. Genregulation

Das menschliche Genom besteht, vereinfacht dargestellt, aus Genbereichen und DNA, die außerhalb dieser Gene liegt. Die Gene und ihre verwandten Sequenzen machen dabei ca. 30% des Genoms aus, 70% sind intergene Bereiche. Von den Genbereichen entfallen wiederum 90% auf nichtkodierende und nur 10% auf exonische Abschnitte. Der eigentlich in mRNA transkribierte Bereich macht also nur 2-3% des gesamten Genoms aus. Abbildung 6 zeigt die Ratiostruktur des menschlichen Genoms nach von Haeseler (31).

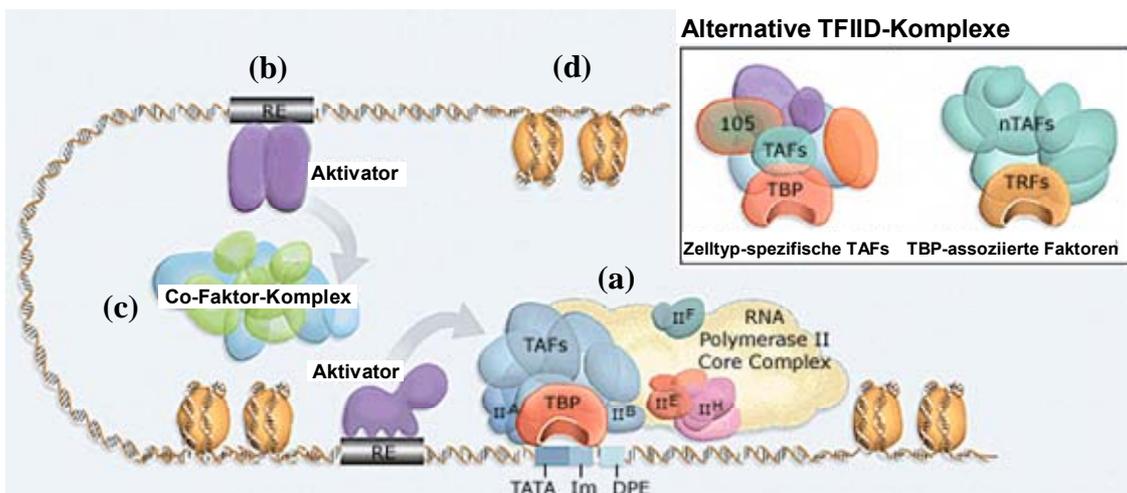


**Abbildung 6 Ratiostruktur des menschlichen Genoms:** Nur 2-3% des menschlichen Genoms kodiert für Proteine. Die übrigen 97-98% bestehen aus intergener DNA oder Intronbereichen. SINE: *short interspersed repetitive elements*, LINE: *long interspersed repetitive elements*). Aus "Molekulare Evolution" Arndt von Haeseler, Dorit Liebers, Fischer Taschenbuchverlag 2003, Seite 11 (31).

Die nicht protein-kodierende DNA übernimmt wichtige regulatorische Aufgaben, die eine örtlich und zeitlich differenzierte Genexpression möglich machen (57, 85). Welche Bedeutung die präzise und koordinierte Genexpression für die komplexen Abläufe biochemischer Prozesse in einer Zelle hat, wird an Erkrankungen deutlich, bei denen diese Regulation gestört ist (z.B. bcr-abl-Transfusionsgen bei chronisch myeloischer Leukämie, Burkitt-Lymphom).

### 1.3.1. Kontrollebenen der eukaryontischen Genexpression

Die Transkriptionsregulation in Eukaryonten besteht aus vier Kontrollebenen (Abbildung 7): (a) Der Assemblierung des Transkriptionsstart-Komplexes an spezifische Bereiche des Promotors (TATA-Box, oder an Elemente wie den Initiator (Inr) oder *Downstream Promoter Elements* (DPE) in TATA-Box-losen Promotoren), (b) Bindung *trans*-aktiver Faktoren an *cis*-aktive DNA-Bereiche, (c) co-aktivierende Proteine und *bridging proteins*, (d) sekundäre und epigenetische Aktivierung oder Inaktivierung von DNA-Bereichen.



**Abbildung 7 Kontrollebenen der eukaryontischen Transkription.** TF: Transkriptionsfaktor, RE: Regulatorische Elemente, TBP: TATA bindende Proteine, TAFs: TBP assoziierte Faktoren, TRFs: TBP Related Factors, (modifiziert nach R.Tjian, Howard Hughes Medical Institute homepage [<http://www.hhmi.org/research/investigators/tjian>]).

### 1.3.2. Eukaryote Promotorbereiche

Eine der Kernfunktionen des Promotors ist die Initiation der Transkription nach Bindung des Transkriptionsstart-Komplexes. Es lassen sich der Kernpromotor (*core-Promoter*) und der proximale Promotor unterscheiden. Der Kernpromotor

definiert die Transkriptionsstartstelle (TSS: *Transcription Start Site*), ist Bindungsstelle des Transkriptionsstart-Komplexes und ist der minimal notwendige Bereich, um die Transkriptionsmaschinerie basal starten zu können. In 3/4 der Kernpromotor-Sequenzen werden Sequenzmotive gefunden. Zu diesen zählen beispielsweise TATA-Boxen, Erkennungssequenzen für TFIIB (engl.: *Transcription Factor IIB*), DPE oder der Initiator. Fast alle bisher identifizierten Kernpromotor-Elemente interagieren mit TFIID.

Der proximale Promotor befindet sich stromaufwärts des Kernpromotors und beinhaltet typischerweise Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (TFBS: *Transcription Factor Binding Sites*) wie beispielsweise SP1, aber auch charakteristische Elemente wie eine CAAT-Box und GC-Boxen. Nicht jeder Promotor muss all diese Elemente zugleich enthalten. Vielmehr bestehen die unterschiedlichen Promotoren aus einer Kombination verschiedener Elemente, die modulartig zusammenwirken (28).

Zusammen mit den weiter stromaufwärts (*upstream*) liegenden Regulationsbereichen (*Enhancer, Silencer, Locus-control regions, insulators*) beinhaltet der Promotor die Gesamtheit der *cis*-aktiven Elemente eines Gens. Die an die DNA bindenden Faktoren wie TF werden als *trans*-aktive Faktoren bezeichnet.

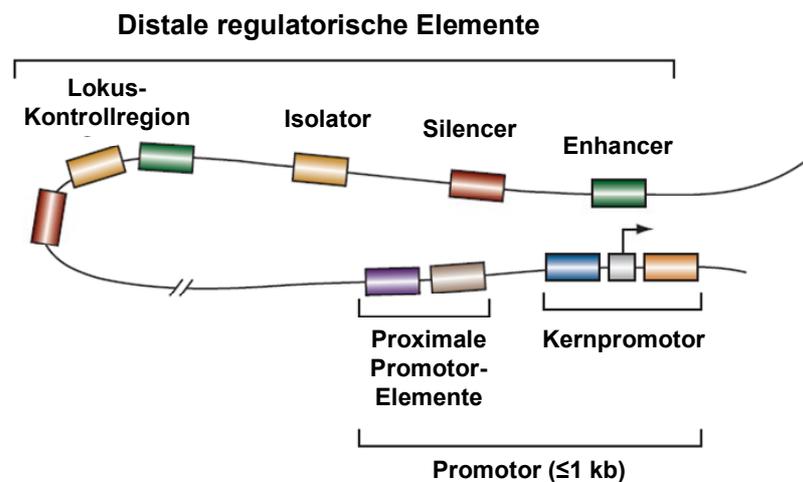
### 1.3.2.1. Distale Regulationselemente

Zu den distalen Regulationselementen zählen *Enhancer, Silencer*, Isolatoren und Lokuskontroll-Regionen. *Enhancer* und *Silencer* regulieren die transkriptionelle Aktivität eines Gens, wobei *Enhancer* die Aktivität durch Bindung von „positiven“ Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) erhöhen, während *Silencer* sie durch Bindung von „negativen“ Transkriptionsfaktoren (Repressoren) vermindern. Da die Transkriptionsfaktoren entweder ubiquitär, zelltyp-spezifisch oder situationsabhängig vorkommen, wird auf diese Weise das spatiotemporale Transkriptionsmuster einer Zelle kontrolliert (57). *Enhancer* und *Silencer* sind richtungs- und positionsunabhängig, d.h. sie agieren bi-direktional, zum Teil auch über große Distanzen. Große Distanzen zwischen Promotor und diesen distalen Regulationselementen können über Loopbildung der DNA überwunden werden. Andere Modelle legen der Distanzüberwindung das sogenannte *Tracking* und *Spreading* zugrunde.

Isolatoren schützen Gene vor dem Einfluss der Regulationselemente benachbarter Gene. Isolatoren haben zwei Eigenschaften: (a) Sie blockieren die Interaktion zwischen *Enhancer* und Promotor, wenn sie zwischen diesen liegen, (b) sie verhindern

den Aufbau einer repressiven Chromatinstruktur. Sie sind sowohl positions- als auch distanzabhängig.

Lokuskontroll-Regionen sind DNA-Sequenzen, welche die Expression eines Genclusters kontrollieren. Sie bestehen aus einer Vielzahl *cis*-aktiver Elemente, die zelltyp-spezifisch die physiologische Expression verwandter Gene regulieren. Ihre Aktivität ist abhängig von der Kopienzahl und unabhängig von ihrer Position. Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau eines eukaryonten Promotors.



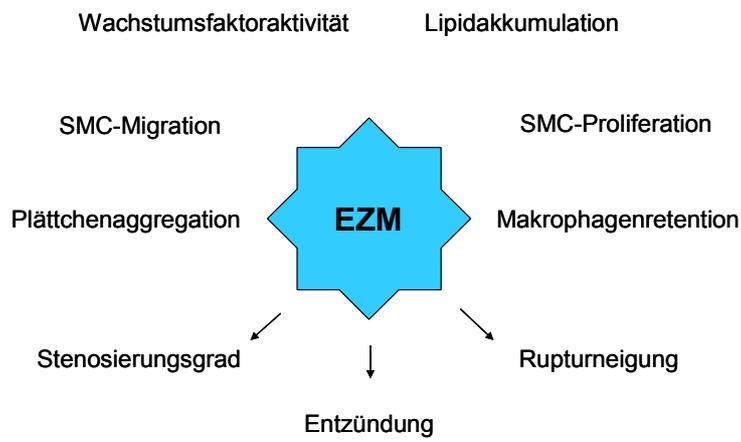
**Abbildung 8** Schematische Darstellung einer genregulatorischen Region. Der Promotor umfasst meist weniger als 1 kb und besteht aus Kernpromotor und proximalem Promotor. Der Kernpromotor kann neben den Bindungsstellen des Transkriptionsinitiations-Komplexes verschiedene Motive, wie z.B. eine TATA-Box enthalten. Er legt die Transkriptionsstartstelle fest. Zu den distal gelegenen regulatorischen Elementen zählen *Enhancer*, *Silencer*, Isolatoren (engl. *Insulator*) und Lokus-Kontrollregionen (LCR: *Locus control Regions*). Sie können bis zu 1 Mb vom Promotor entfernt liegen und durch Schleifenbildung der DNA mit diesem in Wechselwirkung treten. Aus: *Transcriptional regulatory elements in the human genome*. Maston GA, Evans SK, Green MR. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2006.7:29–59 (57).

## 1.4. Biglykan (BGN)

### 1.4.1. Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM stellt nach heutiger Definition die Gesamtheit der Makromoleküle dar, die sich außerhalb der zellulären Plasmamembranen in Geweben und Organen befinden. Sie

setzt sich aus diversen Komponenten zusammen, die grob in zwei Gruppen eingeteilt werden können: (1.) die Fasern und (2.) die Grundsubstanz (ungeformter Teil der EZM). Die EZM übernimmt wichtige Aufgaben der Zellkommunikation, Gewebsformation und Differenzierung. Nach Prof. JW Fischer (Universitätsklinikum Düsseldorf) besitzen nahezu alle Zellen (wie z.B. Fibroblasten, glatte Muskelzellen etc.) Rezeptoren, über die sie mit der EZM in Kontakt treten. Zunehmend wird auch die Bedeutung der EZM in der Entwicklung der Arteriosklerose erkannt. Abbildung 9 zeigt die Schlüsselstellung der EZM in der Pathogenese der Arteriosklerose.



**Abbildung 9** EZM und Arteriosklerose. SMC: *Smooth Muscle Cells*, modifiziert nach JW Fischer (19).

Zu den Bestandteilen der EZM gehören unter anderem Proteoglykane, Kollagene, elastische Fasern und Adhäsionsmoleküle. Das Verhältnis der biochemischen Bestandteile zueinander differiert je nach Gewebetyp stark. Im Verlauf der Arterioskleroseentstehung verändert die EZM ihre Zusammensetzung, und damit den Phänotyp und die Funktion der relevanten Gewebs- und Zelltypen (19).

Ein Beispiel ist hier die Gefäßwand: In einer gesunden Arterienwand hält die EZM glatte Muskelzellen (*Smooth Muscle Cells*, SMC) in einem kontraktilen, differenzierten Phänotyp. In arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden unterstützt sie jedoch die Proliferation der SMCs und die Einwanderung von Entzündungszellen (25, 61). Proteoglykane der EZM tragen zudem dazu bei, dass modifizierte LDL-Partikel in die Intima eingelagert („*Lipoprotein Retention*“) und von Makrophagen aufgenommen werden (11, 38, 39, 101).

### 1.4.2. Kardiales Remodeling

Im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienzentwicklung durch Arteriosklerose und nach myokardialer Ischämie kommt es zu komplexen Umwandlungen im Herzen. Von dieser Entwicklung sind neben dem kontraktilem Apparat der EZM und den Signaltransduktionswegen auch verschiedene Ionenkanäle und der Zellmetabolismus betroffen. Die Summe dieser Veränderungen wird als kardiales Remodeling bezeichnet (12).

Von den histopathologischen und strukturellen Veränderungen sind sowohl die Kardiomyozyten (Hypertrophie, Kontraktilitätsverlust, Apoptose, Nekrose) als auch die Komponenten der EZM (Kollagenabbau und Fibrose unter dem Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen [MMPs]) betroffen (70). In klinischen und experimentellen Studien konnte kardiales Remodeling durch erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression verstärkt werden (8). Dabei induziert TNF- $\alpha$  EZM-abbauende MMPs.

Bei der Entwicklung der chronischen Herzinsuffizienz kann initial die verminderte Pumpfähigkeit des Herzens durch Ausschöpfung kardialer Funktionsreserven (Frank-Starling-Mechanismus, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, erhöhter Sympathikotonus) kompensiert werden. Langfristig trägt eine dauerhafte Aktivierung dieser Mechanismen jedoch wesentlich zur Progression der Herzinsuffizienz bei. Folgen sind Dilatation der Herzhöhlen und damit Vergrößerung des intrakardialen Volumens bei gleichzeitiger Abnahme der Kontraktilität. Die Ejektionsfraktion (EF) sinkt und der enddiastolische Druck (EDD) steigt.

### 1.4.3. BGN als Kandidatengen für die Arterioskleroseentstehung

BGN (Proteoglycan-I, Pg-I; OMIM 301870) gehört zur Familie der kleinen Leucinreichen Proteoglykane (*Small Leucine Rich Proteoglycans* [SLRP]) und ist unter anderem Bestandteil der EZM. Seine Rolle bei der Assemblierung der Kollagenfasern (Kollagenfibrillogenese) nach MI und sein Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion machen es zu einem Kandidatengen der Arterioskleroseentstehung (12, 98).

#### 1.4.3.1. Kollagenfibrillogenese und Assemblierung der EZM

Eine wichtige Aufgabe von BGN ist die Organisation der Assemblierung der EZM. Sein Core-Protein tritt mit Typ-I Kollagenen in Verbindung und steuert die Kollagenfibrillogenese (83, 100).

#### 1.4.3.2. Lipideinlagerung in die subendotheliale Gefäßmatrix

BGN bindet LDL über ionische Interaktionen und führt so zur Lipid-Aggregation in der Arterienwand (63). Die Retention von Lipoproteinen in der subendothelialen Gefäßmatrix durch Proteoglykane stellt einen frühen Schritt in der Arterioskleroseentstehung dar.

#### 1.4.3.3. Myokardiale BGN-Expression nach Myokardinfarkt (MI)

RT-PCR- und Northern-Blot-Analysen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fischer (Uniklinikum Düsseldorf) haben gezeigt, dass nach einem MI nicht nur vermehrt Kollagen, sondern auch die Proteoglykane Decorin und BGN gebildet werden (91, 98, 103). Die Induktion der Expression erfolgt unter anderem durch neurohumorale Aktivierung (Angiotensin II) und kann durch AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten vermindert werden (1). In neonatalen kardialen Fibroblasten wird BGN über den Angiotensin II AT<sub>1</sub>-Rezeptor durch autokrine Freisetzung von TGF- $\beta$  induziert (91).

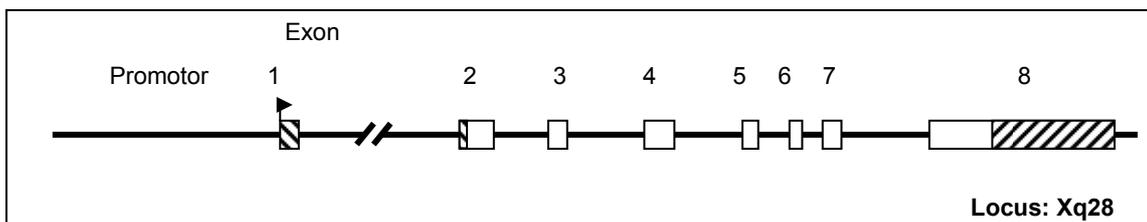
Im Tiermodell zeigten BGN<sup>-/-</sup>-Knock-out-Mäuse nach Infarkt eine erhöhte Mortalität und ungeordnete Kollagenfasergeflechte im Narbenbereich (12). Es kam häufiger zu Myokardrupturen. Eine Erklärung hierfür ist, dass BGN nicht nur die Kollagenfibrillogenese steuert, sondern zudem fibrilläres Typ-I Kollagen durch nicht-kovalente Bindung vor der Spaltung durch MMP-1 und MMP-13 schützt. BGN

spielt also eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer stabilen Infarkt Narbe und der Aufrechterhaltung der hämodynamischen Funktion des Ventrikels nach MI.

#### 1.4.4. Proteinstruktur

BGN wird nahezu ubiquitär als unmodifizierte Vorstufe mit einer Länge von 368 Aminosäuren (As) exprimiert (Prepro-BGN) und anschließend durch Entfernung zweier aminoterminaler Peptidfraktionen (As 1-37) zum reifen Core-Protein prozessiert. Die As 1-19 dienen dabei als potentiell Signalpeptid, As 20-37 sind Bestandteil des Propeptids. Das reife BGN besteht aus einem Core-Protein mit 12 zentral lokalisierten *leucine-rich repeats* und zwei Chondroitin-/Dermatan-Sulfatketten, die am N-terminalen Ende befestigt sind (As 5 und 10) (20, 48) (siehe auch: <http://www.expasy.org>).

Das Gen liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq-28) und enthält mit einer Länge von 6 kb acht Exons und sieben Introns (21, 58). Das erste Exon besteht vollständig aus der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) (Abbildung 10).



**Abbildung 10 Aufbau des BGN-Gens.** BGN ist auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert und besteht aus acht Exons (weiße Boxen) und sieben Introns (Striche). Untranslatierte Regionen (schraffierte Boxen), Haupttranskriptionsstartstelle (Pfeil).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialliste und Bezugsquellen

#### 2.1.1. Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
1 kb <i>GeneRuler</i> <sup>TM</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
50 bp <i>DNA ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp <i>DNA ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb <i>DNA ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto <sup>TM</sup> Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto <sup>TM</sup> Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto <sup>TM</sup> Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bisacrylamid, 2% (BAA)	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
3',5'-cyclisches 8-Bromadenosin- Monophosphat (8-Br-cAMP)	Biolog, Bremen
Chloroform	Fluka Riedel-de Haën, Seelze
<i>Coomassie</i> <sup>TM</sup> <i>Brilliant Blue R-250</i>	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega, Mannheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)	
-N,N,N',N'tetraessigsäure (EGTA)	Roth Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Ficoll	Fluka Riedel-de Haën, Seelze
Glycin	Merck, Darmstadt
Hepes	Merck, Darmstadt
IGEPAL 630C (Nonidet P-40)	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Kasein	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phorbol12-myristat13-Acetat (PMA)	Fluka Riedel-de Haën, Seelze
Poly(dl•dC)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Ponceau S Färbung	Sigma, Steinheim
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> ohne EDTA ("Complete")	Roche Diagnostics, Mannheim
Salpetersäure (HNO <sub>3</sub> ) 65%	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
N', N', N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Tween-20	Roth, Karlsruhe

### **2.1.2. Gele**

<b>1% Agarosegel</b>	100 mL 1 x TBE 1 g Bacto™ Agar 2,5 µL Ethidiumbromid
----------------------	--

**SSCP-Gel**

245 mL 40% Acrylamid  
 100 mL Bisacrylamid  
 50 mL 10 x TBE  
 605 mL ddH<sub>2</sub>O  
 1 mL TEMED

**6% Acrylamid/Bisacrylamidgel**

2 mL AA/BA, 30%  
 1 mL 5x TBE  
 83.7 µL APS, 10%  
 3.7 µL TEMED  
 ad ddH<sub>2</sub>O to 10 mL

### 2.1.3. Puffer

**10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (pH 8,3 - 8,5)**

1,0 M Tris  
 0,9 M Borsäure  
 0,01 M EDTA (pH 8,0)

**10 x Tango™ Puffer** Fermentas, St. Leon-Rot  
**10 x AccuTaq Puffer** Sigma, Steinheim  
**10 x Taq-Polymerase Puffer** Fermentas, St. Leon-Rot  
**10 x T4-DNA-Ligase Puffer** Fermentas, St. Leon-Rot

**1x SDS Laufpuffer**

5 mM Tris  
 192 mM Glycin  
 1% (w/v) SDS

### 2.1.4. Zellkulturbedarf

#### 2.1.4.1. Zelllinien

*Human embryonic kidney cells* (HEK293T)

DMSZ Acc# 305

*Human hepatoma cells* (HepG2)

DMSZ Acc# 180

*Human osteosarcoma cells (SaOs-2)*

DMSZ Acc# 243

#### 2.1.4.2. Seren und Medien

Fötale Kälberserum

(FCS, Eisen-supplementiert)

Cell Concepts, Umkirch

konditioniertes FCS

PAA, Pasching

*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

(DMEM)

Sigma, Steinheim

*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

(PBS)

Sigma, Steinheim

#### 2.1.4.3. Antibiotika und Enzyme

Penicillin/Streptomycin

Sigma, Steinheim

Ampicillin

Roth, Karlsruhe

Trypsin-EDTA (0.05%)

Invitrogen, Karlsruhe

#### 2.1.4.4. Zellkulturbedarf

12-Loch-Platten

Nunc, Wiesbaden

24-Loch-Platten

Nunc, Wiesbaden

Zellkulturflaschen (25 und 50 mL)

Nunc, Wiesbaden

15 ml/50 ml Gefäße

Greiner, Kremsmünster

Nunc, Wiesbaden

Petrischalen

Sarstedt, Nürnberg

Zellkulturgefäße

Greiner, Kremsmünster

#### 2.1.5. Bakterien

***Escherichia coli, E. coli (DH5 $\alpha$ )***

Invitrogen, Karlsruhe

Genotyp:

F-  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)

U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+)

*phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ -

**LB-Agar-Platten (pH 7,5)**

(engl. *lysogeny broth*)

5 g Bacto™ Hefeextrakt  
 10 g Bacto™ Tryptone  
 10 g NaCl  
 15 g Bacto™ Agar  
 ad 1 L ddH<sub>2</sub>O

**LB-Medium (pH 7,5)**

5 g Bacto™ Hefeextrakt  
 10 g Bacto™ Tryptone  
 10 g NaCl  
 ad 1 L ddH<sub>2</sub>O

**2.1.6. Enzyme**

**Restriktionsenzyme**

<i>SacI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NheI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SmaI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot

**DNA-Polymerasen**

AccuTaq™	Sigma, Steinheim
Taq-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
RedTaq® Polymerase	Sigma, Steinheim

**Weitere Enzyme**

T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
---------------	-------------------------

**2.1.7. Molekularbiologische Kits**

**Molekularbiologisches Kit**

	<b>Hersteller</b>
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	ThermoFisher, Bonn
<i>Biotin 3' End labeling Kit</i>	ThermoFisher, Bonn
<i>Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module</i>	ThermoFisher, Bonn
CL-XPosure™ Film	ThermoFisher, Bonn

**Molekularbiologisches Kit**

*First Strand cDNA Synthesis Kit*  
*High Pure PCR Product Purification Kit*  
*Immobilon-P Transfer Membrane (PVDF)*  
*LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit*  
*Lipofectamine™ 2000*  
*Luciferase Assay System*  
*Passive Lysis Buffer (5x)*  
*PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit*  
*QIAamp® DNA Blood Mini Kit*  
*QIAprep® Spin Maxiprep Kit*  
*QIAprep® Spin Midiprep Kit*  
*QIAprep® Spin Miniprep Kit*  
*QIAquick® Gel Extraction Kit*  
*QIAquick® PCR Purification Kit*  
*QuickChange® site-directed mutagenesis Kit*

*RNeasy® Extraction Kit*  
*SuperSignal® West Pico Chemiluminescent System*

**Hersteller**

Fermentas, St. Leon-Rot  
 Roche Diagnostics, Mannheim  
 Millipore, Bedford, USA  
 ThermoFisher, Bonn  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Promega, Mannheim  
 Promega, Mannheim  
 Invitrogen, Karlsruhe  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Qiagen, Hilden  
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande  
 Qiagen, Hilden  
 ThermoFisher, Bonn

**2.1.8. Plasmidvektoren**

**Vektorname**

pGL3-basic®  
 pGL3-promoter®  
 pGL3-control®  
 pGEM®11zf(-)  
 pmaxFP®-Green

**Hersteller**

Promega, Mannheim  
 Promega, Mannheim  
 Promega, Mannheim  
 Promega, Mannheim  
 Amaxa, Köln

**Hergestellte Plasmide**

pGEM-BGN(+94G)-luc  
 pGEM-BGN(+94T)-luc  
 pGEM-BGN(-151A)-luc

**Vektor**

pGEM11zf(-)  
 pGEM11zf(-)  
 pGEM11zf(-)

**Länge des Inserts**

158 bp  
 158 bp  
 188 bp

<b>Hergestellte Plasmide</b>	<b>Vektor</b>	<b>Länge des Inserts</b>
pGEM-BGN(-151G)-luc	pGEM11zf(-)	188 bp
pGEM-BGN(-578A)-luc	pGEM11zf(-)	187 bp
pGEM-BGN(-578G)-luc	pGEM11zf(-)	187 bp
pGEM-BGN(-849A)-luc	pGEM11zf(-)	177 bp
pGEM-BGN(-849G)-luc	pGEM11zf(-)	177bp
pPromBGN+94G	pGL3-promoter	158 bp
pPromBGN+94T	pGL3-promoter	158 bp
pPromBGN-151A	pGL3-promoter	188 bp
pPromBGN-151G	pGL3-promoter	188 bp
pPromBGN-578A	pGL3-promoter	187 bp
pPromBGN-578G	pGL3-promoter	187 bp
pPromBGN-849A	pGL3-promoter	177 bp
pPromBGN-849G	pGL3-promoter	177 bp
pBasicBGNHap1	pGL3-basic	1025 bp
pBasicBGNHap2	pGL3-basic	1025 bp
pBasicBGNHap3	pGL3-basic	1025 bp

### 2.1.9. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	FVS-2	Fedegari, Albuzzano, Italien
	System VX-75	System, Wettenberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator (eukaryontische Zellen)	MCO-18AIC	Sanyo, München
Entwickler	Optimax	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135	Zeiss, Jena
Gelelektrophorese- kammer (Acrylamid)	Mini PROTEAN® NuPage Novex MiniCell	BioRad, München Invitrogen, Karlsruhe
Gelelektrophorese- kammer (Agarose)	StarPhoresis	Starlab, Ahrensburg

<b>Gerät</b>	<b>Typenbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Gel Imaging	<i>AlphamagerEC</i>	Alpha Innotech Corp, San Leandro, USA
Inkubator	B 6120	Heraeus, Hanau
Luminometer	Sirius V12	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
pH-Meter	Calimatic 766	Knick, Dülmen
Photometer	Nanophotometer	Implen, München
Schüttler	GFL 3006	GFL, Großburgwedel
Schüttler (Bakterien)	<i>Incubator Shaker</i> Series 25	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Spannungsquelle	<i>PowerPackBasic</i>	BioRad, München
Tank Blot Kammer	<i>Mini Trans-Blot® Cell</i>	BioRad, München
Thermocycler	PTC-225, PTC-240 DNA Engine Tetrad (2)	MJ Research, Miami, USA
Thermomixer	<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	Transilluminator	Intas, Göttingen
Vortexer	VortexGenie2  BioVortex V1	Bender&Hobein, Zürich, Schweiz Kisker, Steinfurt
Waage	Sartorius excellence	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL 1083	GFL, Großburgwedel
sterile Werkbank (Bakterien)	BSD4	Gelaire, Sydney, Australia
Sterile Werkbank (eukaryontische Zellen)	HS 12	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zellzähler	Casy® Model TT	Innovatis, Bielefeld

### 2.1.10. Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-SP1, IgG (Klon 3D2, MAB 10126)	Kaninchen	Upstate (Millipore), Schwalbach
<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Hersteller</b>
anti-rabbit IgG, (#7074)	Ziege	Cell Signaling, Frankfurt

Sekundäre Antikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert.

### 2.1.11. Weiterer Laborbedarf

Pipettenspitzen 0.1 µL-1000 µL	Sarstedt, Nürnberg
	Starlab, Ahrensburg
Reaktionsgefäße 0.2 mL-2 mL	Eppendorf, Hamburg
	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR Platten, Mikrotiterplatten	Abgene, Hamburg
Whatman® Paper 3MM Chr	Biometra, Göttingen

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. ECTIM Studie

Die ECTIM Studie (*Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde*) ist eine retrospektive Fall-Kontrollstudie, die erstmals 1992 von Parra und Cambien beschrieben wurde (66). Im Jahre 1999 wurde die Studienpopulation durch Individuen aus Belfast und Glasgow erweitert (47). Sie nutzt Daten von Myokardinfarktpatienten (MI-Patienten) und Kontrollen aus Regionen, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Rahmen der MONICA-Studie (*MONitoring trends and determinants In Cardiovascular disease*) registriert und überwacht werden. Die hier verwendeten Daten stammen von den Studienteilnehmern aus Strasburg (Frankreich), Belfast (Nord Irland) und Glasgow (Schottland).

Die zwei Zentren in Großbritannien untersuchten sowohl Männer als auch Frauen, wohingegen man in Frankreich nur Männer untersuchte. Insgesamt wurden 1110 Fälle 3 bis 9 Monate (2 Jahre bei den Frauen in Belfast) nach dem Index-Infarkt untersucht. Davon waren 27,47% Frauen im Alter zwischen 25 und 69 Jahren und 72,52% Männer im Alter zwischen 25 und 64 Jahren. Das mittlere Alter der Männer betrug 54,5 Jahre, das der Frauen 60,13 Jahre. Kontrollen vergleichbaren Alters und gleichen Geschlechtes ohne klinische Zeichen koronarer Herzerkrankung (n=1259) wurden in Großbritannien aus den Karteien von Allgemeinärzten aus der gleichen Region ausgesucht. In Frankreich erfolgte die Auswahl der Kontrollen aus Wählerlisten (47, 66).

Neben der ausführlichen Anamnese (kardiovaskuläre Risikofaktoren, Medikamentenanamnese, usw.) und körperlichen Untersuchung, erfolgte die Gewinnung einer Blutprobe zur Bestimmung biochemischer Marker, wie Triglyceride, Cholesterin, Apolipoproteine, Lipoproteinfraktionen usw..

### 2.2.2. DNA-Präparation aus EDTA-Vollblut

Zehn mL venöses EDTA-Vollblut der Probanden der ECTIM Studie bzw. einer weiblichen Vergleichsperson wurden mit 30 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt und 20min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5min bei 2000 U/min) wurde das entstandene Pellet mit Kalzium- und Magnesium-freiem PBS (*phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen, mit 1 mL Glycerollösung versetzt und bei -70°C eingefroren. Die DNA-Präparation erfolgte aus 200 µL des

Leukozytenkonzentrates mit Hilfe des *QIAmp® DNA Blood Mini Kits* nach Protokoll des Herstellers.

### 2.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) können definierte doppelsträngige DNA-Abschnitte in einer Aufeinanderfolge von je drei Reaktionsschritten amplifiziert werden: Denaturierung (Strangtrennung), Annealing (Anlagerung sequenzspezifischer DNA-Oligonukleotide, Primer) und Elongation (DNA-Polymerase-Reaktion).

Die Spezifität der Reaktion, sowie die korrekte Annealing-Temperatur werden von der Sequenz der Primer bestimmt. Die Reaktionstemperatur ist enzyspezifisch und liegt für die meisten kommerziellen Polymerasen bei 68-72°C. Einen typischen Polymerasezyklus zeigt die folgende Tabelle:

Initiale Denaturierung:	5min	95°C	Denaturierung
Zyklus (29 x):	1min	95°C	Denaturierung
	1min	$T_m - 2^\circ\text{C}$	Annealing
	1,5min	68-72°C	Elongation
terminale Elongation:	10min	68-72°C	Elongation

**Tabelle 1 Standard-PCR-Programm.** Durch Erhitzen auf 95°C werden die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt (Denaturierung). Die Absenkung der Temperatur führt zur Anlagerung der Primer. Bei 68-72°C verlängert die Polymerase in Anwesenheit von dNTPs die Primer in 5'-3'-Richtung entsprechend der komplementären Basen der Template-DNA. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ist abhängig von der Primersequenz.

#### 2.2.3.1. Primer-Design

Folgende Punkte wurden beim Primer-Design beachtet:

- Primerlänge: 18-25 bp,
- Schmelztemperatur ( $T_m$ ) >55°C, Wallace-Regel:  $T_m = (AT * 2) + (GC * 4)$ ,
- $\Delta T_m$  von Sense- und Antisense-Primer nicht größer als 4°C,
- ausgewogenes Verhältnis zwischen Purin- und Pyrimidinbasen,
- keine inter- oder intramolekular komplementären Sequenzen,
- wenn möglich, endeten die Primer mit G oder C am 3'-Ende, um eine möglichst starke Bindung dieses Bereichs zur Matrize zu gewährleisten.

Die Primer legen mit ihrer Sequenz den zu amplifizierenden Bereich fest. Jeder Primer wurde mit dem Programm *Oligonucleotides-properties calculator* ([www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)) analysiert. Dieses Programm untersucht durch Vergleich mit NCBI-BLAST-Dateien (*National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool*), ob die Oligo-Sequenz spezifisch genug ist und ob es zu einem Selbstannealing kommen kann.

### 2.2.3.2. Primer und PCR-Bedingungen für BGN

Auf Grundlage der Sequenz des humanen BGN (Acc# X83526.1, M65151.1) wurden nach den oben genannten Kriterien folgende Primer designed und bei der Firma Proligo/Genset bestellt. Die Optimierung der Primerpaare brachte folgende Ergebnisse:

Primer		Sequenz 5'→3'	X83526.1	Länge [bp]	MgCl <sub>2</sub> -Konz. [mM]	A.-Temp
BGN_prom1	SS	5' ACG ATC CTC CCT GGC CTG 3'	14-31	200	2 mM	60°C
	AS	5' AGA GTG CGG AAG ACC AAA AGA G 3'	214-193		2 mM	60°C
BGN_prom2	SS	5' GCA CTC TTG GCC CCC AG 3'	208-224	200	2 mM	65°C
	AS	5' CAC CAA GAC TCA GCC GCT TC 3'	408-389		2 mM	65°C
BGN_prom3	SS	5' CAC TGG AGG AAC TGG ACT CAT TT 3'	356-378	200	2 mM	65°C
	AS	5' AAC TGA TTC AGA GAC GAA GGA TCC 3'	556-533		2 mM	65°C
BGN_prom4	SS	5' ACA GAG TGG TTC TCA TGT CCG AG 3'	473-495	205	2 mM	65°C
	AS	5' ATG TAG GCT CCT GGC GCC 3'	678-661		2 mM	65°C
BGN_prom5	SS	5' CGC CAG GAG CCT ACA TGA AG 3'	663-682	300	2 mM	60°C
	AS	5' CAG ACA GCA AAG GAA CGG ACA 3'	963-943		2 mM	60°C
BGN_prom6	SS	5' GTC CTG GCG AGA TGC CAG 3'	851-868	205	4 mM	55°C
	AS	5' CTT CAA AGG GAG CAA TTT TCT TG 3'	1056-1034		4 mM	55°C
BGN_prom7	SS	5' AGC TAG TCC AGC CGT CTA CA 3'	1016-1035	271	2 mM	60°C
	AS	5' AGT TTG TGG AGA GAG GGA GA 3'	1232-1213*		2 mM	60°C
BGN1.1	SS	5' CCC GGA AGC CTG CCC CCT CCT 3'	1069-1089	416	2 mM	60°C
	AS	5' CAG AGA GCA CCG GGG AAA TCT GTG "	770-747 **		2 mM	60°C

**Tabelle 2** Primer und PCR-Bedingungen für den **BGN-Promotor**. \*Acc# X83626,

\*\*Acc# M65151, A.-Temp: Annealing Temperature

#### 2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein einfaches Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Reaktionsgemische - z.B. nach PCR – werden auf das Agarosegel aufgetragen und eine Spannung angelegt. Gemäß ihrer elektrischen Ladung laufen die Moleküle vom Minuspol (Kathode) zum Pluspol (Anode) des elektrischen Feldes. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Moleküls ist unter anderem abhängig von

- seiner Ladung,
- seinem Stoke's-Radius,
- der Stärke des elektrischen Feldes,
- der Porengröße des Gels.

Das dem Gel zugefügte Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Helix und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Während das Emissionsspektrum nahezu unverändert bleibt, nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50-100 zu. Da es etwa alle 10 bp zur Einlagerung von Ethidiumbromid in die Nukleinsäure kommt, kann aus der Lichtintensität auf die Länge und Konzentration der Nukleinsäurefragmente geschlossen werden. Ein DNA-Größenstandard erlaubt, die Länge der detektierten DNA-Fragmente abzuschätzen.

#### 2.2.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Eine PAGE dient zur Auftrennung von Molekülen, insbesondere Proteinen und Nukleinsäuren. Für die Elektrophorese wird das Gel durch radikalische Polymerisation aus den Stoffen Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Verhältnis 37,5:1) hergestellt. Das Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Zunächst wird das Trenngel mit dem Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und dem Polymerisationskatalysator Tetramethylethylen-diamin (TEMED) versetzt und gegossen. Das Sammelgel wird als dünne Schicht über das Trenngel pipettiert.

Bei der nativen PAGE geht es darum, native - also gefaltete - Proteine im elektrischen Feld aufzutrennen. Bei der SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) hingegen werden die Proteine denaturiert und ihre elektrische Ladung wird durch Natriumdodecylsulfat überdeckt (Abschnitt 2.2.15).

### **2.2.6. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse**

Das SSCP-Verfahren (engl.: *Single-Strand Conformation Polymorphismen analysis*) erlaubt das Screening genomischer DNA-Abschnitte auf das Vorhandensein genetischer Varianten durch Identifizierung von Migrationsvarianten.

DNA liegt als Doppelstrang in einer Doppelhelixstruktur vor. Diese hat konstante physikochemische Eigenschaften, wie z.B. die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Durch Erhitzen können die beiden Stränge der DNA voneinander getrennt werden. Während des Abkühlens bilden die Einzelstränge aufgrund intramolekularer Basenpaarungen spezifische Sekundärstrukturen. Schon einzelne Basenaustausche können zu einer Konformationsänderung und damit einer Veränderung des Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld führen. Hieraus ergibt sich der Hinweis auf eine genetische Variante. In nativen Acrylamid-Bisacrylamid-Gelen können die Amplikons getrennt, durch Silberfärbung sichtbar gemacht und auf Mobilitätsveränderungen hin untersucht werden. Zur Erhöhung der Detektionsgenauigkeit erfolgte die PAGE bei Raumtemperatur (RT) und bei 4°C.

#### **2.2.6.1. Silbernitratfärbung von SSCP-Gelen**

1. Fixierung in Ethanol (5min),
2. 1%ige Salpetersäure (2min),
3. Silbernitratlösung (30min),
4. 3 x Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (jeweils 2min),
5. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Formaldehyd-Lösung (600 mL/300 µL, Entwicklerlösung) 2 x, dann bis zur ausreichenden Färbung der Banden,
6. mit Essigsäure fixieren (10min).

Die Gele wurden in Saran-Folie verpackt, ausgewertet und archiviert.

### 2.2.6.2. PCR-Ansatz für die SSCP-Analyse

DNA	20 ng
MgCl <sub>2</sub>	2.0-4.0 mM
dNTPs	200 µM
Sense-Primer	25 pmol
Antisense-Primer	25 pmol
Taq polymerase	2.0 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

### 2.2.7. DNA-Sequenzierung

Sequenzierung dient der Analyse der genauen Basenabfolge eines DNA-Stranges. Alle Fragmente mit unterschiedlichem Migrationsverhalten in der SSCP-Analyse wurden sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchprinzip bzw. der Didesoxymethode nach Sanger (78).

Für die Sequenzierung mit BigDye<sup>®</sup> (ABI Prism 3730; PE Applied Biosystems) wurde das aufgereinigte Produkt entweder mit Sense- oder Antisense-Primer, ddH<sub>2</sub>O und BigDye<sup>®</sup> versetzt. In vier Ansätzen wurde jeweils eines der vier zugefügten Desoxynukleotide teilweise durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide ersetzt. Es erfolgte eine Amplifikation, bei der es durch den zufälligen Einbau der Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch kam, da die 3'-OH-Gruppe zur weiteren Kettenverlängerung fehlte.

Die Sequenzierung der entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge erfolgte mittels Polyacrylamid-Kappillarelektrophorese durch direkte automatische Sequenzierung (ABI PRISM 3730, Applied Biosystems).

### 2.2.8. Konstruktion der Reportergenplasmide

Mittels PCR wurden unter Verwendung der *proof-reading* AccuTaq DNA-Polymerase (Sigma-Aldrich, Steinheim) Promotorkonstrukte aus genomischer DNA einer weiblichen Vergleichsperson hergestellt. Als Primer wurden so genannte Ankerprimer eingesetzt, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme SacI (Sense-Primer) oder XhoI (Antisense-Primer) enthielten. Restriktionsendonukleasen erkennen

spezifische palindromisch aufgebaute DNA-Sequenzen und schneiden die DNA an diesen Stellen. Tabelle 3 zeigt die Primer zur Amplifizierung der *BGN*-Fragmente.

Primer	Sequenz	RE	Position in X83526.1
BGN-849 SS	5' TT <u>GAG CTC</u> GGA CAC TAC GGG ACA GG 3'	<i>SacI</i>	bp 305 - 321
BGN-849 AS	5' TT <u>CTC GAG</u> ACC ACT CTG TGG GTG GC 3'	<i>XhoI</i>	bp 482 - 466
BGN-578 SS	5' TT <u>GAG CTC</u> TCG CTG GAT CCT TCG TCT C 3'	<i>SacI</i>	bp 528 - 546
BGN-578 AS	5' TT <u>CTC GAG</u> CAG AGA GGT AGC TGT TGT GG 3'	<i>XhoI</i>	bp 715 - 696
BGN-151 SS	5' TT <u>GAG CTC</u> TGA GTG CGA GTG TGT CCG TTC C 3'	<i>SacI</i>	bp 931 - 952
BGN-151 AS	5' TT <u>CTC GAG</u> GGC TGG TGG GGC GGA GAG G 3'	<i>XhoI</i>	bp 1119 - 1100
BGN+94 SS	5' TT <u>GAG CTC</u> TGC CCA GCC TTT AGC CTC CC 3'	<i>SacI</i>	bp 1178 - 1198
BGN+94 AS	5' TT <u>CTC GAG</u> CAG GCG CAG GCT GAC TAG TTG 3'	<i>XhoI</i>	bp 1334 - 1314
BGNMoIHap SS	5' AA <u>GCT AGC</u> CAG TGT CGT ACT AAG GAC CT 3'	<i>NheI</i>	bp 326 – 345
BGNMoIHap AS	5' AA <u>CCC GGG</u> TGG AGA GGG GAG GCG CCA 3'	<i>SmaI</i>	bp 636 – 619 in Acc# M65151

**Tabelle 3** Ankerprimer zur Amplifizierung der DNA-Fragmente. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (RE) sind unterstrichen.

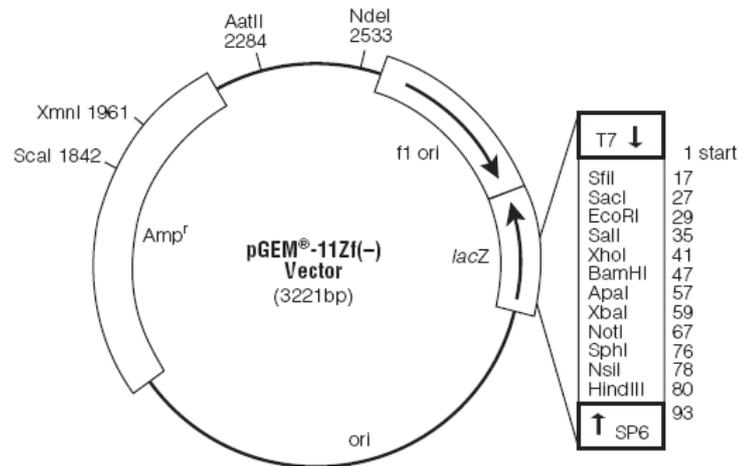
### 2.2.8.1. PCR

Sense Primer (25 µM)	0,5 µL
Antisense Primer (25 µM)	0,5 µL
dNTPs	0,5 µL
AccuTaq Polymerase (5 U/µL)	1 U
Template DNA	50 ng
10 fach AccuTaq Puffer	2,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

### 2.2.8.2. Verdau und Ligation

Die amplifizierten DNA-Fragmente (ausgenommen der Fragmente für die Haplotypenanalyse, siehe hierzu Absatz 2.2.8.3) und der Vektor pGEM11zf(-)

(Promega) (Abbildung 11) wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme *SacI/XhoI* (Fermentas) verdaut.



**Abbildung 11 pGEM11zf(-)-Vektor.** Der Vektor wurde zunächst durch Verdau mit *SacI* und *XhoI* linearisiert. Anschließend wurden die ebenfalls mit *SacI* und *XhoI* verdauten Fragmente inkloniert.

**1. Verdau**

Template DNA	400 ng
<i>SacI</i>	2 µL
Tango-Puffer	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

**2. Verdau**

Template DNA	400 ng
<i>XhoI</i>	1 µL
Tango-Puffer	2,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Alle Verdaue wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (2h bei 37°C). Inserts und geschnittener Vektor wurden im Verhältnis von 3:1 in einem Volumen von 25 µL zwei Stunden bei Raumtemperatur und anschließend bei 12°C über Nacht ligiert (T4-DNA-Ligase).

**Ligation**

pGEM11zf(-)Vektor	50 ng
T4-DNA-Ligase	1 µL
10 x Ligationspuffer	2 µL
PCR-Produkt	150 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

Dabei entstanden die Vektoren: pGEM-BGN(-849G)-luc, pGEM-BGN(-578G)-luc, pGEM-BGN(-151G)-luc, und pGEM-BGN(+94G)-luc.

Durch automatisierte Sequenzierung (ABI PRISM 3730, Applied Biosystems) wurden die Amplikons, ihre fehlerfreie Sequenz und korrekte Orientierung im Vektor nachgewiesen.

Nach Einbringen der zu untersuchenden SNPs durch gezielte Mutagenese (*Site directed mutagenesis*) (siehe 2.2.10) wurden die Fragment mit *SacI* und *XhoI* aus dem pGEM-Vektor herausgeschnitten und in richtiger Orientierung an den entsprechenden Stellen des Luciferase Reporter-Gen-Vektors pGL3-promoter (Abbildung 12) wieder eingefügt und ligiert. Die Kontrolle der entstandenen Vektoren (pPromBGN+94G/T, pPromBGN-151G/A, pProm-501C/A, pPromBGN-578A/G, pPromBGN-849G/A) erfolgte wieder durch direkte automatisierte Sequenzierung.

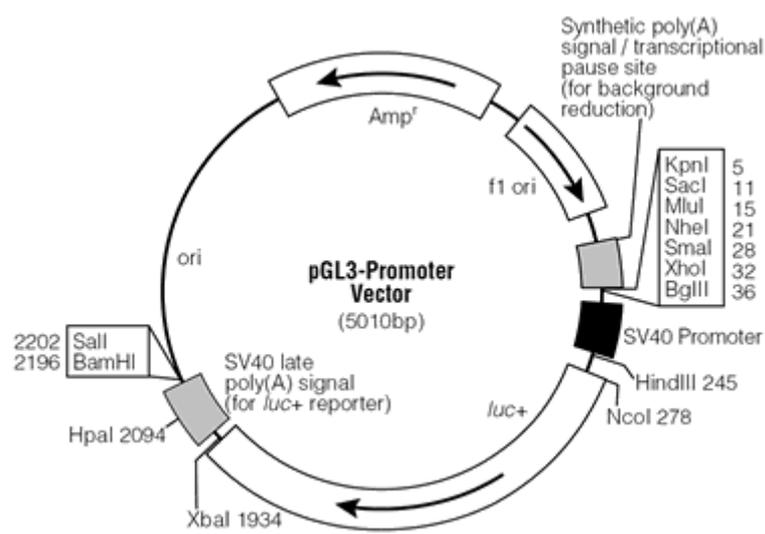


Abbildung 12 pGL3-promoter Vektor.

### 2.2.8.3. Herstellung der molekularen Haplotyp-Konstrukte

Zur Herstellung der Haplotyp-Konstrukte wurden die Primer BGNMolHap SS und AS kombiniert. Als Template-DNA diente die DNA von 3 Patienten, bei denen mittels SSCP und anschließender Sequenzierung eindeutig der Haplotyp (bezogen auf die Positionen BGN-578, BGN-151 und BGN+94) bestimmt worden war. Die Haplotypen wurden wie folgt benannt: MolHap1 G/G/G, MolHap2 G/A/T, MolHap3 A/G/G. Die entstandenen Fragmente (1025 bp, von -891 bis +132) wurden mit *NheI*/*SmaI* verdaut und in die ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen verdaute Vektoren pGL3-basic einkloniert. Dabei entstanden die Vektoren pBasicBGNHap1, pBasicBGNHap2 und pBasicBGNHap3. Die Kontrolle der entstandenen Plasmide erfolgte mittels diagnostischem Verdau und Sequenzierung.

#### 1. Verdau

Template DNA	400 ng
<i>NheI</i>	1 µL
Tango-Puffer	1 µL
ddH <sub>2</sub> O 2h bei 37°C	ad 20 µL

#### 2. Verdau

Template DNA	400 ng
<i>SmaI</i>	1 µL
Tango-Puffer	1 µL
ddH <sub>2</sub> O 2h bei 30°C	ad 20 µL

Alle Verdau wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (2h bei 37°C). Inserts und geschnittener Vektor wurden im Verhältnis von 3:1 in einem Volumen von 25 µL 2h bei Raumtemperatur und anschließend bei 12°C über Nacht ligiert (T4-DNA-Ligase).

**Ligation**

pGL3-basic	50 ng
T4-DNA-Ligase	1 µL
10 x Ligationspuffer	2 µL
PCR-Produkt	150 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µL

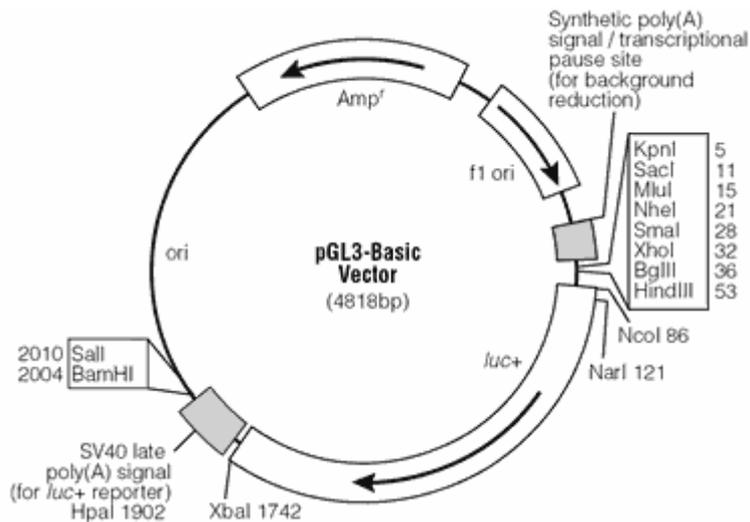
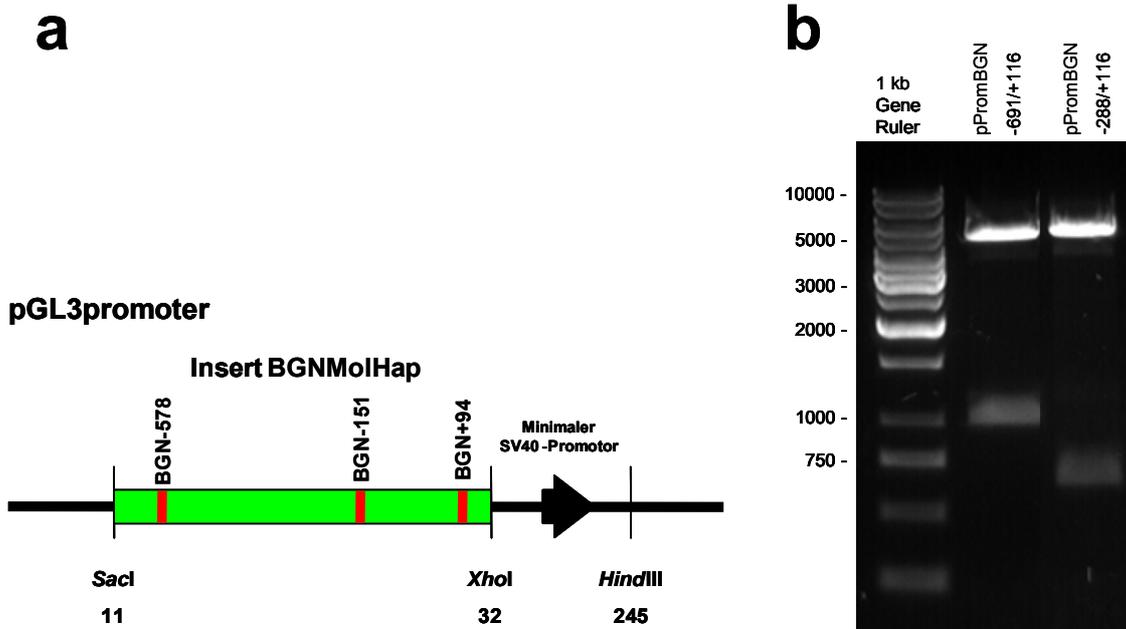


Abbildung 13 pGL3-Basic Vektor.

**2.2.9. Identifizierung der Plasmide**

Die Plasmide wurden mittels Restriktionsenzymen verdaut und durch Auftrennung der entstandenen Fragmente über ein Agarosegel kontrolliert. Hierfür wurden die Restriktionsenzyme/Schnittstellen (*SacI*, *XhoI*, *HindIII*) so gewählt, dass aus der Länge der entstandenen Fragmente die Identität und richtige Orientierung des Inserts im Plasmid geschlossen werden konnte. Zur weiteren Analyse der adäquat in das Plasmid eingebauten DNA-Sequenzen wurden diese und die angrenzenden Bereiche des Plasmids sequenziert. Abbildung 14 zeigt beispielhaft den diagnostischen Verdau zweier Plasmide. Die erste Spalte enthielt den DNA-Längenstandard 1 kb GeneRuler™ von Fermentas, die zweite Spalte ein *BGN*-Insert von Basenpaar -691 bis +116 (Länge 807 bp) in pGL3-promoter (einkloniert mit *SacI/XhoI*) nach diagnostischem Verdau mit *SacI* und *HindIII*. Die dritte Spalte enthielt ein *BGN*-Insert von Basenpaar -288 bis +116 (Länge 404 bp) in pGL3-promoter ebenfalls nach Verdau

mit *SacI* und *HindIII*. Die *HindIII*-Schnittstelle liegt im pGL3-promoter ca. 250 bp in 3'-Richtung bezogen auf den Beginn der MCS. Nach Verdau entstanden Fragmente mit einer Länge von 1020 bp für Spalte 2 und 617 bp für Spalte 3. Die hier beschriebenen Plasmide wurden weiter zur molekularen Haplotypanalyse verwendet.



**Abbildung 14** Diagnostischer Verdau zur Identifikation der Inserts. (a) schematische Darstellung eines Haplotypkonstruktes im pGL3-promoter-Vektor (entspricht pPromBGN-691/+116 auf der linken Seite). Das Insert (grüner Balken) enthält 807bp der regulatorischen Region des BGN-Gens und die SNPs an den Positionen -578, -151 und +94 (rote Balken). An den Schnittstellen *SacI* und *XhoI* (schwarze Striche) der MCS des pGL3-promoter-Vektors wurde es einkloniert. Die Zahlen unter den Schnittstellen der Restriktionsenzyme geben die Entfernung zum Beginn der MCS in bp an. Wie in der Abbildung dargestellt, liegt die Schnittstelle für *HindIII* an Position 245, also 213 bp von der *XhoI*-Schnittstelle entfernt. Da das Fragment 807 bp lang war, entstand nach Verdau mit *SacI* und *HindIII* ein 1020 bp (807 bp + 213 bp) langes Fragment. (b) entstandene Fragmente nach Auftrennung auf dem Agerosegel. Das Plasmid in der zweiten Spalte einthielt ein 202 bp langes Insert, nach Verdau entstand dementsprechend ein 617 pb langes Fragment. Die pGL3-promoter-Vektoren waren ca. 5000 bp lang.

## 2.2.10. Gezielte Mutagenese

Der Nukleotidaustausch an den Positionen -849(G/A), -578(A/G), -151(G/A) und +94(G/T) wurde durch gezielte, ortsspezifische Mutagenese (engl. *site-directed mutagenesis*) herbeigeführt. Dazu verwendeten wir das auf PCR basierende *Quick change Site directed mutagenesis* Kit (Stratagene) und stellten die Vektoren pGEM-BGN(-849a)-luc, pGEM-BGN(-578g)-luc, pGEM-BGN(-151a)-luc, und pGEM-BGN(+94t)-luc her. Die Identität der eingefügten Fragmente, ihre Sequenz und die Sequenz der angrenzenden Bereiche wurden mittels automatischer Sequenzierung (ABI Prism 3730, Applied Biosystems) kontrolliert.

## 2.2.11. Prokaryontische Zellkultur

### 2.2.11.1. Transformation von E.coli Bakterien

Kompetente E.coli Bakterien DH5 $\alpha$  wurden bei -80°C aufbewahrt. In 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurden 50  $\mu$ L der auftauenden Bakterien mit 20  $\mu$ L des Ligationsansatzes versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45s. Nach Zugabe von 900  $\mu$ L LB-Medium wurden die Zellen 1h bei 37°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Dann wurden 300  $\mu$ L der Suspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Der Zusatz von 100  $\mu$ g/mL Ampicillin zum LB-Medium führte dazu, dass nur die Bakterien wachsen konnten, die durch Aufnahme eines Plasmids eine Ampicillin-Resistenz erworben hatten.

Fünf Kolonien jeder Transformation wurden in 5 mL flüssiges LB-Medium überführt und bei 37°C im Schüttler über Nacht inkubiert. Zwei mL dieser Bakteriensuspension wurden abgenommen und bei 9000xg zentrifugiert. Aus dem Bakterien-Pellet wurden gemäß den Angaben des Herstellers die Plasmide mittels *QIAspin<sup>®</sup> Miniprep*-Kit isoliert (Modifiziertes Protokoll der von Birnboim und Doly beschriebenen Plasmidextraktion aus Bakterienzellen, 1979) (5).

### 2.2.11.2. Plasmidpräparation mit dem *QIAspin<sup>®</sup> Maxiprep* Kit

Für eine größervolumige Plasmidpräparation wurden 2 mL der entsprechenden Starterkultur in einer Großkultur mit 100 mL LB-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. Die Plasmide wurden am Folgetag gemäß dem Herstellerprotokoll

(QIAspin<sup>®</sup> Maxiprep) isoliert, diagnostisch verdaut (siehe Abschnitt 2.2.9) und UV-spektrometrisch quantifiziert.

## 2.2.12. Eukaryontische Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (mit 2 mM L-Glutamin, 100 Units/mL Penicillin, 100 ng/mL Streptomycin, 10% Eisen-supplementiertem FCS (477 µg/100 mL), Cellconcepts, Umkirch) in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C kultiviert. Konfluente Zellkulturen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%) abgelöst und im Verhältnis 1:5 neu ausplattiert. Die Abschätzung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzähler (Casy, Innovatis, Bielefeld).

Zu stimulierende und unstimulierte Zellen wurden zunächst für 6h in dem Transfektionsansatz belassen, bevor das Medium entweder durch frisches Medium ohne weitere Zusätze, oder Medium mit 3',5'-cyclisches 8-Bromadensosin-Monophosphat (8-Br-cAMP) bzw. 10<sup>-8</sup> M Phorbol12-myristat13-Acetat (PMA) ersetzt wurde.

### 2.2.12.1. cDNA-Synthese und Kontrolle endogener BGN-Expression

Von den verwendeten Zelllinien wurde zunächst mittels eines kommerziellen Kits (*RNeasy<sup>®</sup> extraction kit*, Qiagen) die Gesamt-RNA extrahiert und durch ein cDNA-Synthese-Kit (*First Strand cDNA Synthesis Kit*, Fermentas) in stabile, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Integrität der cDNA wurde überprüft, indem routinemäßig der Nachweis von cDNA des ribosomalen Protein 27 als Kontrolle erfolgte (RP27, Sense-Primer: 5' CCA GGA TAA GGA AGG AAT TCC TCC TG 3', Antisense-Primer: 5' CCA GCA CCA CAT TCA TCA GAA GG 3').

Mit Hilfe einer semi-quantitativen Hot Start-PCR mit RedTaq Polymerase der Firma Sigma wurde die Expressionsrate der zugrundeliegenden mRNA dargestellt. Als Primer dienten Sequenzen im Bereich des zweiten (Sense-primer, BGNexon2ss: 5' TGA CAC CTC GGG CGT CCT GG 3') und vierten Exons (Antisense-Primer, BGNexon4as: 5' GA GCT GGG TAG GTT GGG CGG 3'). Die Annealing-Zyklen starteten 10°C oberhalb der berechneten Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) der Primer und wurden sukzessiv in jedem zweiten Zyklus gesenkt. Anschließend wurden 25

Amplifikationszyklen bei  $T_m-2^\circ\text{C}$  durchgeführt (genaue Angaben auf Anfrage erhältlich).

### 2.2.12.2. Transiente Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen proteinfreier DNA in eukaryontische Zellen. Die Reporter-Gen-Konstrukte wurden mittels Lipofectamine 2000 (LFA) (Invitrogen) in HEK293T-Zellen transfiziert. Dabei dienten die Vektoren pGL3-control und pGL3-promoter (Promega) als Baselinekontrollen. pGL3-control enthält einen voll funktionsfähigen viralen Promotor plus *Enhancer*-Bereich des Simian Virus 40 (SV40), pGL3-promoter einen minimalen Promotor des SV40, der die Assemblierung des Transkriptionsstart-Komplexes erlaubt, ohne *Enhancer*. Beide Vektoren enthalten zudem das Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase-Gen, welches die Quantifizierung der Promotoraktivität anhand der Luciferaseaktivität ermöglicht.

Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten (Nunc) so ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, dass am Folgetag konfluentes Wachstum erreicht wurde.

#### DNA-Verdünnungsansatz:

0,8  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA

50  $\mu\text{L}$  DMEM

Inkubation bei RT für 5min

#### Lipofectamine-Ansatz:

2  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 2000

50  $\mu\text{L}$  DMEM

Inkubation bei RT für 5min

Die am Vortag ausgesäten Zellen in den 24-Well-Platten wurden zunächst mit PBS gewaschen. Für die Transfektion wurden pro Reaktionsansatz 0,8  $\mu\text{g}$  des Plasmids und 2  $\mu\text{L}$  LFA jeweils mit 50  $\mu\text{L}$  DMEM verdünnt und bei RT für 5min inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Verdünnungsansatz tropfenweise in den Lipofectamine-Ansatz pipettiert. Danach wurde der Ansatz erneut für 20min bei RT inkubiert. Die Beendigung der Transfektion erfolgte durch Mediumwechsel 6h nach Transfektion. Mit dem Mediumwechsel erfolgte ggf. die Stimulation der Zellen mit cAMP (0,5 mM) oder PMA ( $10^{-8}$  M) für 24h. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  *Passive Lysis Buffer* (Promega) für 20min bei RT unter leichtem Schwenken lysiert. Für die Reporter-Gen-Analyse wurden 10  $\mu\text{L}$  des zellulären Extraktes mit 100  $\mu\text{L}$  des *Luciferase Assay Substrates* (Promega) gemischt

und die Lumineszenz in einem Röhrenluminometer ("Sirius", Berthold Detektion Systems) gemessen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels zweiseitigem T-Test. Statistische Signifikanz wurde als  $p < 0,05$  definiert. Alle Transfektionen wurden in Triplikaten durchgeführt und mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

### **2.2.12.3. Kontrolle der Transfektionseffizienz**

Das genaue Transfektionsprotokoll wurde zunächst durch die Transfektion mit einem Green-Fluorescence-Protein- (GFP) tragenden Vektor (pmaxFP, Amaxa, Köln) ermittelt. Hierzu wurden verschiedene DNA:LFA-Verhältnisse und Inkubationszeiträume gewählt und der Anteil transfizierter Zellen mittels eines Zeiss Axiovert 135 Fluoreszenzmikroskops ausgezählt. Die verwendete Methode hatte eine Effizienz von ~85% transfizierter Zellen.

### **2.2.13. *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)***

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) dient zum Nachweis der spezifischen Interaktion nukleärer Proteine mit einer spezifischen DNA-Sonde. Es ist ein Experiment in zwei Schritten: zunächst eine Protein-DNA-Interaktion gefolgt von einer nativen PAGE.

Oligonukleotid	Sequenz
BGN-849G SS	5' AGC CAC TGG AGG AAC TGG <u>G</u> ACT CAT TTG GGC CCT CAG 3'
BGN-849G AS	5' CTG AGG GCC CAA ATG AGT <u>C</u> CA GTT CCT CCA GTG GCT 3'
BGN-849A SS	5' AGC CAC TGG AGG AAC TGA <u>A</u> ACT CAT TTG GGC CCT CAG 3'
BGN-849A AS	5' CTG AGG GCC CAA ATG AGT <u>T</u> CA GTT CCT CCA GTG GCT 3'
BGN-578A SS	5' AGG GAA GAA AGT CTG <u>A</u> AG TGG AAG GGA GGG CAC AGG 3'
BGN-578A AS	5' CCT GTG CCC TCC CTT CCA CT <u>I</u> CAG ACT TTC TTC CCT 3'
BGN-578G SS	5' AGG GAA GAA AGT CTG <u>G</u> AG TGG AAG GGA GGG CAC AGG 3'
BGN-578G AS	5' CCT GTG CCC TCC CTT CCA CT <u>C</u> CAG ACT TTC TTC CCT 3'
BGN-151G SS	5' GCT GCC AGG GGG <u>G</u> CC GGG AAG CCT GCC CCC T 3'
BGN-151G AS	5' A GGG GGC AGG CTT CCC <u>G</u> G <u>C</u> CCC CCT GGC AGC 3'
BGN-151A SS	5' GCT GCC AGG GGG <u>A</u> CC GGG AAG CCT GCC CCC T 3'
BGN-151A AS	5' A GGG GGC AGG CTT CCC <u>G</u> G <u>T</u> CCC CCT GGC AGC 3'
BGN+94G SS	5' GCC CAC CAC CCC AGC <u>C</u> C <u>G</u> CCA ACT AGT CAG CCT 3'
BGN+94G AS	5' AGG CTG CAT AGT TGG <u>C</u> GG GCT GGG GTG GTG GGC 3'
BGN+94T SS	5' GCC CAC CAC CCC AGC <u>C</u> C <u>T</u> CCA ACT AGT CAG CCT 3'
BGN+94T AS	5' AGG CTG ACT AGT TGG <u>A</u> GG GCT GGG GTG GTG GGC 3'

**Tabelle 4** Oligonukleotidesequenzen für die EMSAs. Das jeweilige Allel ist unterstrichen und fett geschrieben.

Die EMSAs wurden mit einem *LightShift® Chemiluminescent EMSA Kit* (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Isolierung der Kernproteine einer Zelllinie wurden diese mit einer markierten DNA-Sonde aus dem regulatorischen Bereich des Gens inkubiert. Eine 200-fach höhere molare Menge unmarkierter Oligonukleotide wurde als spezifischer Kompetitor hinzugegeben. Nach 20min Inkubation bei RT wurden die Proben auf einem nativen Polyacrylamidgel (6%) in 0,5 x TBE bei 100 V für 60min bei RT der Größe nach aufgetrennt. Freie, ungebundene DNA wanderte dabei schneller als Protein-gebundene DNA.

	"Free Oligo"		compA	compB
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL	ad 20 µL	ad 20 µL	ad 20 µL
10x <i>Binding Buffer</i>	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
poly dIdC (50 ng/µL)	0	50 ng	50 ng	50 ng
<i>unlabeled Oligo</i>	0	72 pmol	72 pmol	72 pmol
<i>Protein Extract</i>	0	7 µg	7 µg	7 µg
5min RT				
<i>labeled DNA</i>	40 fmol	40 fmol	40 fmol	40 fmol
20min RT				
<i>5x Running Buffer</i>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

**Tabelle 5** Pipettierschema für die EMSAs.

Der Transfer der Protein-DNA-Komplexe von dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid- (PDVF) Membran (Immobilon P, Millipore) erfolgte mittels Tank-Blot-Apparatur der Firma Roth im Nassverfahren. Nach dem Blot erfolgte der *UV-Crosslink* für 15min bei 460 nm zum Fixieren der DNA-Sonden an die Membran. Anschließend wurden die Banden gemäß der Angaben des Herstellers visualisiert (*LightShift Chemiluminescent EMSA Kit*, Pierce).

- 1) 15min *Blocking-Buffer*,
- 2) 15min *Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate* und *Blocking Buffer* im Verhältnis 1:300,
- 3) 4 x 5min *Washing-Buffer*,
- 4) 5min *Substrate Equilibrium Buffer*,
- 5) 5min *Enhancer Solution* plus *Stable peroxide Solution*,
- 6) Belichtung des Röntgenfilms.

### 2.2.13.1. Biotinylierung und Detektion

Die Oligonukleotide wurden mit biotinylierten dUTPs am 3'-Ende mit terminaler Deoxytransferase (TdT) gelabelt. Dazu wurde das *Biotin 3'-End DNA Labeling Kit* von Pierce nach Angaben des Herstellers angewendet. Das Annealing der Sense- und Antisense-Oligonukleotide erfolgte durch Inkubation equimolarer Mengen beider Oligonukleotide in 150 mM NaCl bei 95°C für 5min. Die Effektivität des Labelings wurde durch eine proteinfreie PAGE kontrolliert.

### 2.2.13.2. Präparation von Kernproteinen

Die Extraktion der Kernproteine erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schreiber et al (84). Hierzu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mechanisch geerntet, zentrifugiert und in Niedrigsalz-Puffer (*“low salt buffer“*) resuspendiert. Nach Zugabe des Detergenz NP40 (Nonidet<sup>®</sup>-40) wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen wurde entfernt, das Pellet in *“high salt buffer“* resuspendiert und für 30min inkubiert. Die verbliebenen Zellreste wurden herunterzentrifugiert und die nukleären Proteine aliquotiert und eingefroren (-70°C).

#### Niedrigsalz-Puffer

10 mM HEPES, pH 7.9

10 mM KCl

1 mM DTT

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

*Protease Inhibitor Cocktail*

(*“Complete“*)

#### Hochsalz-Puffer

20 mM HEPES, pH 7.9

0.2 mM EDTA

1 mM DTT

420 mM NaCl

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 mM PMSF

25% (v/v) Glycerol

*Protease Inhibitor Cocktail*

(*“Complete“*, w/o EDTA)

Um die Intaktheit der nukleären Extrakte zu testen wurden diese über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Degradierete oder unscharf definierte Proteinextraktionen wurden verworfen.

#### Coomassie Brilliant Blue Lösung

0.25% (w/v) Coomassie<sup>™</sup> Brilliant Blue R250

45% (v/v) Methanol

10% (v/v) Acetat

#### Entfärberlösung I (30')

45% (v/v) Methanol

10% (v/v) Acetat

#### Entfärberlösung II (30')

5% (v/v) Methanol

5% (v/v) Acetat

### 2.2.13.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt der nukleären Extrakte wurde mittels dem *BCA™ Protein Assay Kit* von ThermoFischer bestimmt. Eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA, *Bovine Serum Albumin*) bekannter Konzentration wurde als Standardkurve verwendet. Die Proteinkonzentration der Proben wurde photometrisch mit Hilfe dieser Standardkurve gemessen.

### 2.2.14. *Insilico*-Analyse

Die Vorhersage möglicher TFBS wurden mittels Alibaba 2.1 ([www.genregulation.com](http://www.genregulation.com); Niels Grabe (26)) und der Transkriptionsfaktordatenbank Transfac 7.0 durchgeführt.

### 2.2.15. Western-Blot

Kernproteine wurden aus den Zelllinien wie oben beschrieben isoliert (Absatz 2.2.13.2) und 1-2 ng/μL in einem Überschuss an Ladepuffer zum Ausgleich der hohen Salzkonzentration für 5min auf 95°C erhitzt. Für die SDS-PAGE wurde ein nach Rittenhouse und Marcus (72) modifiziertes Gelsystem verwendet, bei welchem die Hälfte des Tris-Puffers im Sammelgel durch eine equimolare Menge Imidazol ersetzt wurde. Auf einer 10%igen-SDS-PAGE wurden ~10 μg Protein pro Spur aufgetragen.

#### Sammelgel

675 μL 0.5 M Tris  
 675 μL 0.5 M Imidazol  
 560 μL 30% AA/BAA [4% final conc.]  
  
 75 μL 10% SDS  
 5 μL TEMED  
 40 μL 10% APS  
 2.175 mL ddH<sub>2</sub>O

#### Trenngel

1.9 mL 1.5 x Tris pH 8.8  
 75 μL 10% SDS  
 2.5 mL 30% AA/BAA [10% *final conc.*]  
 25 μL 10% APS  
 5 μL TEMED  
 3.0 mL ddH<sub>2</sub>O

#### Transfer-Puffer

20% (v/v) Methanol  
 25 mM Ethanolamin  
 33 mM Ethanolamin

#### 1x SDS Laufpuffer

25 mM Tris  
 192 mM Glycin  
 1% (w/v) SDS

**4x SDS Ladepuffer**

200 mM Tris-HCl pH 6,8

8% (w/v) SDS

0,4% Bromphenolblau

40% Glycerol

vor Gebrauch frisch mit  $\beta$ -Mercaptoethanol

im Verhältnis 1:10 versetzt.

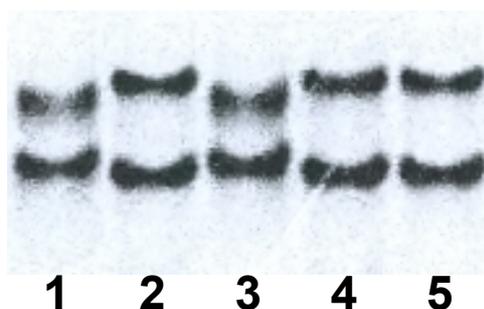
Der Western-Tank-Blot erfolgte in kaltem Transfer-Puffer auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore). Die Effizienz des Blots wurde mit Ponceau S-Färbung (Sigma) vor Blockung mit *Blotto* (5% Trockenmilchpulver in PBS) gesichert.

Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C. Der sekundäre Antikörper wurde für 1h bei RT auf dem Blot belassen. Die Detektion wurde mit dem *SuperSignal West Pico Chemiluminescent System* von ThermoFisher durchgeführt.

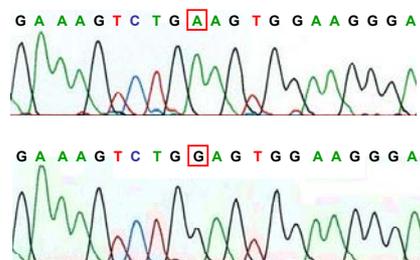
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Identifikation genetischer Varianten im *BGN*-Promotorbereich

Die DNA von 96 Hochrisikopatienten der ECTIM-Studie (siehe Material und Methoden) wurde auf genetische Varianten (z.B. *Single nucleotide polymorphisms* [SNPs]) im Promotorbereich des *BGN*-Gens untersucht. Dazu wurde genomische DNA mit Hilfe von *QIAmp® DNA Mini Kits* aus peripheren Blutlymphozyten gewonnen. Basierend auf publizierten Sequenzen des *BGN*-Gens (X83526.1, M65151) wurden Primerpaare für acht überlappende Amplikons designed, die 1815 bp der 5'-flankierenden Region und der 5'-untranslatierten Region des ersten Exons abdeckten, wobei die Amplikons eine Länge zwischen 200 und 416 bp besaßen. Unterschiedliches Laufverhalten der DNA-Produkte in der SSCP-Analyse wurde weiter mittels automatischer Sequenzierung untersucht.



**Abbildung 15 Exemplarische Darstellung einer SSCP-Analyse** von 5 Patienten nach Silbernitratfärbung (*BGN\_prom 4*). Spalte 1 und 3: homozygote Träger des G-Allels (*BGN-578G*). Spalte 2,4 und 5: homozygote Träger des A-Allels (*BGN-578A*). Unterschiede im Migrationsverhalten wurden durch automatische Sequenzierung analysiert (Abbildung 16).



**Abbildung 16 Sequenzierung *BGN\_prom 4***, Sense Primer. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Sequenzanalyse zweier Patienten, deren DNA in der SSCP-Analyse ein unterschiedliches Laufverhalten gezeigt hatten (siehe Abbildung 15 Spalte 1 und 2). Der obere

Teil der Abbildung zeigt die Sequenzierung der DNA eines Individuums mit A-Allel, der untere Teil die Sequenzierung der DNA eines Individuums mit einem G-Allel an Position -578 bezogen auf den Transkriptionsstart.

Die gescreenten und anschließend sequenzierten DNA-Proben wiesen vier SNPs in der 5'-regulatorischen Region (G-849a, A-578g, C-501a, G-151a) und einen in der 5'UTR (G+94t) auf.

	Bezeichnung	Sequenz	Genbereich	rs-Nummer
1	BGN-G-849a	5'-AGC CAC TGG AGG AAC TG[G/A] ACT CAT TTG GGC CCT CAG-3'	Promotor	rs56134709
2	BGN-A-578g	5'-AGG GAA GAA AGT CTG [A/G]AG TGG AAG GGA GGG AGG-3'	Promotor	rs11796997
3	BGN-C-501a	5'-AAC AGC TAC CTC TCT GAT [C/A]CT GGA GAA ACC ACC TCC-3'	Promotor	neu
4	BGN-G-151a	5'-TTG AAG CTG CCA GGG GG[G/A] CCG GGA AGC CTG CCC CCT-3'	Promotor	neu
5	BGN-G+94t	5'-GCC CAC CAC CCC AGC CC[G/T] CCA ACT AGT CAG CCT-3'	5'UTR	rs5945197

**Tabelle 6** Bezeichnungen, Sequenzen, Lage und zugehörige rs-Nummern der identifizierten SNPs.

### Acc# X83526

```

1 gagctcccct gggacgatcc tcctggcct gggacctccc agaccccacc ccccggttga
61 gtgatggcac tgccaggggt tgaagacct cagccctcga cgttgctctc tctccattgg
121 atgccgctc tctctagcca cccctctctc cctctctgcc ccttcgagct tttctctca
181 atatgcaatt ttctcttttg gtcttccgca ctcttgccc ccagttctat tgcagatctg
241 tttctcactc catctaaact cttaccctg tgtctcagga gctgctctg ctgaggggaag
301 aaggggacac tacgggacag gggggcagtg tcgtactaag gacctgggct ctagccactg
361 gaggaactgc actcatttgg gcctcagga agcggctgag tcttggtggg gtaaccgggt G-849a
421 tagccccctg aagtgaccag cacagggctg agcccagagg aagtggccac ccacagagtg
481 gttctcatgt ccgaggggac ctgcagggat tgagcaagaa gactgactcg ctggatcctt
541 cgtctctgaa tcagttcagg gcaggcaagc tggggagccc cctgccccgt cctgccacca
601 ccagccggat cgggccctct ttttaaggga agaaagtctg aagtggaagg gagggcacag A-578g
661 ggcgccagga gcctacatga agtccttcca gaaatccaca acagctacct ctctgatcct C-501a
721 ggagaaacca cctccttgct taggccaag caggttctg gcaggetcag gaccaaattc
781 cagggggcac tcatgggct agcagcccaa ggccgctcc cctcgtctt tcttccatct
841 ctctttctc gtctggcga gatgccagcc agcacctcag tgtccccatc tgggcagtgg
901 aaagtgtgac tctctgggtc cttgtttgag tgagtgcgag tgtgtccgtt ctttgctgt
961 ctgccccagg cgggggaggg ggggggaggt ggtggggcg agggggcggg ggctcagcta
1021 gtccagccgt ctacaagaaa attgctcct ttgaagctgc caggggggccc gggaagcctg G-151a
1081 cccctctctg ctgcccgc cctcgcgcc caccagcccc ctccctcctt tctcctctc
1141 ccgcccctc ccgctgtcc cctcccctg ggcccgcctg ccagccttt agcctcccg
1201 ccgcccctc tgtctccc

```

**Acc# M65151 (Version M65151.1)**

```

1 gatcctggag aaaccacctc cttgcttagg cccaagcagg ttcttggcag gctcaggacc C-501a
61 aaattccagg ggccactcat ggcctagca gcccaaggcc gcctccccct cgtctttctt
121 ccatctctct ttctcgtcc tggcgagatg ccagccagca cctcagtgtc ccatctggg entspricht
181 cagtggaaag tttgactctc tgggtccttg tttgagtgag tgcgagtgtg tccgttctt X83526
241 tgctgtctgc cccaggcggg ggaggggggg ggaggtggtg gggcgaggg ggcgggggct
301 cagctagtcc agccgtctac aagaaaattg ctccctttga agctgccagg gggccggga G-151a
361 agcctgcccc ctctgctcg ccgcccctct ccgccccacc agccccctcc ctctttctt
421 cctccccgc cctctccccg ctgtcccctc ccgctggcc cgctgcca gcctttagcc
481 tcccgccgc cgctctgtc tcccctctc cacaaactgc ccaggagtga gtagctgctt Exon1
541 teggccgcc ggacacaccg gacagataga cgtgcggacg gccaccacc ccagcccgcc G+94t
601 aactagtcag cctgcgctg gcgctcccc tctccaggta gggctggctt caagctgcct
661 cctcagcaac ccagagatgc cctggctct gctgcctccg ctgtccaag cctggctct
721 gctgtccca gtgccggag ggtgtccaca gatttccccg gtgctctctg taggctgctg
781 atccacgcc ctcatcgcc acctgcggc cccttggtc cctgtcaggc ttctgctgt
841 ctgcgcgcc tcaggcacc ttcccctcac cccttctct ccctctgac ctgctctgc
901 ttcacccacc tctgtctct ctgcctcca ctcggggtcc gtcttcttg ctaccacct
961 agagcgtggc tgggtgactg gtaccccagc tttgccaatg gcctgtttc atcattgcaa
1021 gtcccaggcg catgctccac tcctcagcc tcgctctgcc caggcgctc cttgctccag
1081 gcttgccgcc tggcccgggt tgggtcggat cggggaggac cgcccagcgc ccaccgagct
1141 c

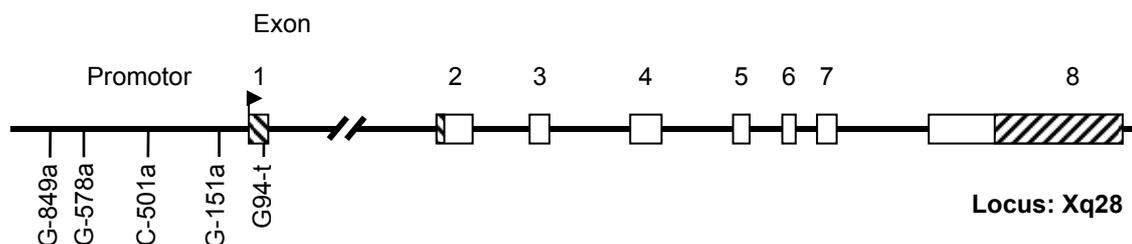
```

**Abbildung 17 SNPs in der 5'-regulatorischen Region und der 5'UTR des humanen BGN-Gens (Accession-Nr. [Acc#] X83526.1, M65151.1).**

Genetische Varianten wurden in Bezug auf die Lage zum Transkriptionsstart an Position 1219 der Acc# X83526.1 und Position 505 der Acc# M65151.1 benannt. Das erste Basenpaar in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts wurde als -1 bezeichnet.

SNP	Position in den Referenzsequenzen	Acc# X83526.1	Acc# M65151.1
BGN-G-849a		370	
BGN-A-578g		641	
BGN-C-501a		728	4
BGN-G-151a		1068	354
BGN-G+94t			598

**Tabelle 7 Lokalisation der SNPs in Bezug zu den Referenzsequenzen Acc# X83526.1 und M6515.1.**



**Abbildung 18 Das humane BGN-Gen.** Schematische Darstellung des BGN-Gens und der im 5'-flankierenden Bereich und 5'UTR gelegenen SNPs. Das humane BGN-Gen besteht aus 8 Exons (weiße Boxen) und sieben Introns (Striche zwischen den Exons). Das erste Exon besteht vollständig aus 5'UTR (schraffierte Box). Die im Promotorbereich identifizierten SNPs sind entsprechend 849 bp (BGN-G-849a), 578 bp (BGN-A-578g), 501 bp (BGN-C-501a) bzw. 151 bp (BGN-G-151a) stromaufwärts des Haupttranskriptionsstarts (Pfeil) gelegen. BGN-G+94t ist dementsprechend an Position 94 des ersten Exons lokalisiert.

### 3.2. Allelfrequenzen

Die Auswertung aller SSCP-Analysen ergab folgende Häufigkeiten der identifizierten SNPs.

Nr	G-849a	A-578g	C-501a	G-151a	G+94T	Nr	G-849a	A-578g	C-501a	G-151a	G+94T
1	G	G	/	A	T	49	G	G	C	A	/
2	G	G	C	A	T	50	G	A	C	G	/
3	G	A	C	G	G	51	/	G	C	A	/
4	/	A	/	G	G	52	G	G	C	A	/
5	G	G	C	G	G	53	G	G	C	A	T
6	G	G	C	G	G	54	G	A	C	G	G
7	G	G	C	A	/	55	G	A	C	G	G
8	G	A	C	G	/	56	G	G	C	G	/
9	G	G	C	A	T	57	G	G	C	G	G
10	G	A	C	G	G	58	G	G	C	/	/
11	G	A	C	G	/	59	G	G	C	A	T
12	G	A	C	G	G	60	G	A	C	G	G
13	G	A	C	G	G	61	/	A	C	/	G
14	G	G	C	A	T	62	G	A	C	G	/
15	G	G	C	A	T	63	G	A	A	G	G
16	G	A	C	G	G	64	A	G	C	A	T
17	G	G	C	G	G	65	G	G	C	A	/
18	G	G	C	A	/	66	G	/	C	A	T

Nr	G-849a	A-578g	C-501a	G-151a	G+94T	Nr	G-849a	A-578g	C-501a	G-151a	G+94T
19	G	A	C	G	/	67	G	G	C	G	G
20	G	G	C	A	/	68	G	G	C	G	/
21	G	G	C	G	/	69	/	A	C	G	/
22	G	G	C	G	/	70	G	A	C	G	/
23	G	G	C	A	/	71	G	G	C	/	/
24	G	G	C	A	T	72	G	/	C	G	/
25	G	G	/	/	/	73	G	G	C	G	/
26	G	A	C	/	/	74	G	G	C	A	T
27	G	G	C	/	T	75	/	A	C	G	G
28	G	G	C	/	/	76	G	G	/	/	T
29	G	G	C	/	/	77	G	G	C	/	T
30	G	/	C	/	G	78	G	G	C	/	G
31	G	A	C	/	G	79	G	A	C	/	G
32	G	G	C	A	T	80	G	A	C	G	/
33	G	/	C	A	T	81	G	/	C	A	/
34	G	G	C	A	T	82	G	A	C	G	G
35	G	/	C	A	/	83	G	G	C	/	T
36	G	G	C	A	T	84	G	G	C	/	/
37	G	G	C	A	T	85	/	/	/	/	/
38	G	A	C	G	G	86	/	G	C	/	T
39	G	G	C	A	T	87	G	G	C	A	T
40	G	/	C	A	/	88	G	/	C	G	G
41	G	G	C	A	/	89	G	/	/	A	T
42	G	A	C	/	/	90	G	G	C	G	G
43	/	G	C	/	/	91	/	/	C	/	T
44	G	A	A	/	G	92	/	/	C	G	G
45	G	/	C	G	G	93	G	A	C	G	G
46	/	/	C	/	G	94	/	/	C	G	G
47	G	/	C	A	T	95	/	/	C	T	T
48	G	G	C	A	/	96	/	G	C	G	G

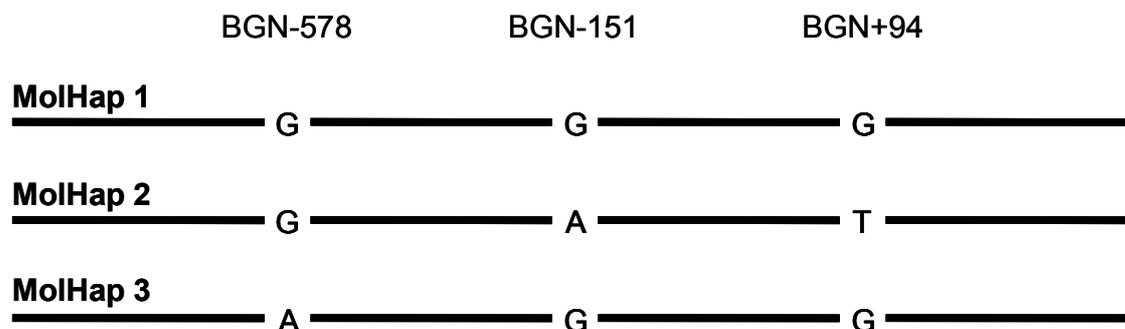
**Tabelle 8 SNP-Verteilung bei 96 Hochrisikopatienten für MI.** Die Tabelle zeigt die Verteilung der Allele an den Positionen -849, -578, -501, -151 und +94. Die Auswertung erfolgte anhand der SSCP-Gele und wurde stichprobenartig mittels Sequenzierung kontrolliert (/= keine eindeutige Zuordnung möglich).

In den von uns untersuchten Patienten (n=96) zeigten die Polymorphismen BGN-G+94t und BGN-G-151a eine nahezu gleichmäßige Verteilung der jeweiligen Allele. BGN-849A und BGN-501A traten nur einmal bzw. zweimal unter den Patienten auf und waren damit selten.

BGN-849		BGN-578		BGN-501		BGN-151		BGN+94	
G	A	A	G	C	A	G	A	G	T
81	1	28	51	88	2	39	34	32	27

**Tabelle 9 Häufigkeitsverteilung der Allele in den untersuchten Patienten.**  
Differenzen in der Gesamtzahl ergeben sich aus nicht klar identifizierbaren Proben.

Desweiteren erlaubte die Analyse der SSCP-Ergebnisse die Postulierung von drei möglichen molekularen Haplotypen (MolHap) MolHap 1 [G-578 G-151 G+94], MolHap 2 [G-578 A-151 T+94] und MolHap 3 [A-578 G-151 G+94] bezogen auf Position -578, -151 und +94 im *BGN*-Promotor. Andere MolHaps traten in unserer Kohorte nicht auf. Abbildung 19 zeigt die drei identifizierten MolHaps.



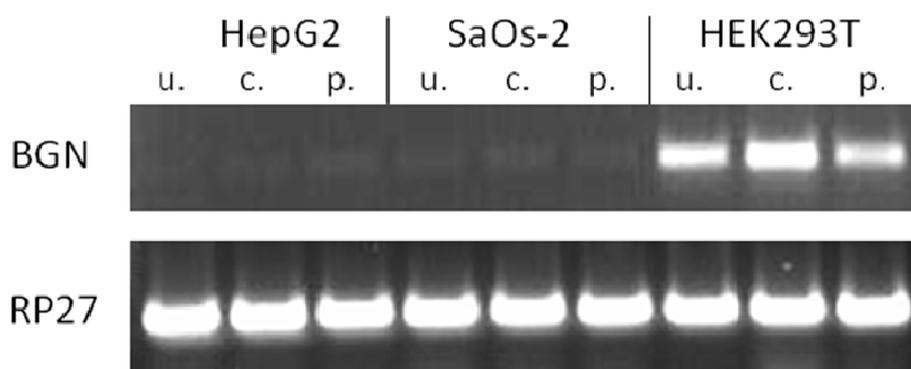
**Abbildung 19 Haplotypenanalyse.** An den Lokalisationen BGN-578, BGN-151 und BGN+94 kamen in der untersuchten Gruppe nur drei MolHaps ([G-578 G-151 G+94], [G-578 A-151 T+94] und [A-578 G-151 G+94]) vor.

Die drei beschriebenen Haplotypen wurden auch mittels Sequenzierung der Patienten-DNA nachgewiesen. Von den 96 untersuchten Patienten konnten mittels SSCP-Analyse 38,54% ein MolHap eindeutig zugeordnet werden. Unter diesen zeigte sich eine Frequenz von 18,92% MolHap1, 43,24% MolHap2 und 37,84% MolHap 3. Unter der Annahme, dass an den Positionen BGN-151 und BGN+94 durch die Identität eines Allels auf das andere geschlossen werden kann (das Allel BGN-151G trat nur mit dem Allel BGN+94G zusammen auf und das Allel BGN-151A nur zusammen mit dem Allel BGN+94T), konnte bei 71,86% der Patienten auf den MolHap geschlossen werden. Die prozentuale Verteilung auf die drei MolHaps war hier: 18,84% MolHap1,

44,93% MolHap 2, 36,23% MolHap 3. Um Unterschiede der transkriptionellen Aktivität der Haplotypen zu untersuchen, wurde der 5'-regulatorische Bereich des BGN-Gens von bp -893 bis +132 von Patienten mit MolHap 1, 2 und 3 amplifiziert und in den pGL3-basic-Vektor subkloniert.

### 3.3. Endogene *BGN*-Expression

Für die funktionelle Analyse der Promotorvarianten wurde eine endogen BGN-exprimierende Zelllinie benötigt, da nur in diesem Fall davon ausgegangen werden konnte, dass diese die zur transkriptionellen Aktivität des Gens benötigten Faktoren besitzt. Die endogene Expression von BGN wurde in HepG2-, HEK293T-, und SaOs-2-Zellen untersucht. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den oben genannten Zelllinien unter verschiedenen Stimulationsbedingungen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Mittels semiquantitativer Hot-Start-PCR und Agarosegelelektrophorese wurde die Expression der zugrundeliegenden mRNA dargestellt. Zur Stimulation nutzten wir cAMP (stimuliert alle Proteinkinase A- [PKA] und Epac-abhängigen Signaltransduktionswege) und PMA (stimuliert alle Proteinkinase C- [PKC] abhängigen Signaltransduktionswege). Auf diese Weise deckten wir zwei der wichtigsten Signaltransduktionsprinzipien ab. Eine endogene Expression von BGN konnte in HEK293T-Zellen, nicht jedoch in Osteosarkoma-Zellen oder HepG2-Zellen nachgewiesen werden. In embryonalen Nierenzellen war die Expression unter Stimulation mit cAMP am höchsten.

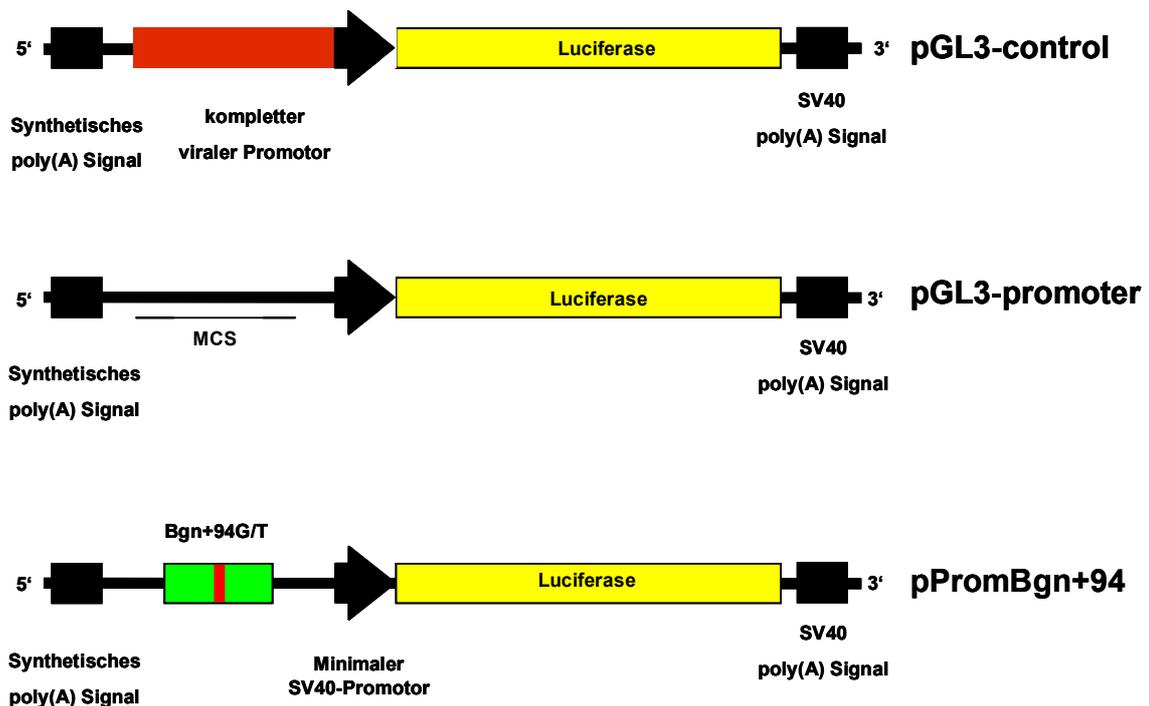


**Abbildung 20** Endogene *BGN*-Expression in HepG2, SaOs-2 und HEK293T unter verschiedenen Stimulationsbedingungen (u.: unstimuliert, c.: mit cAMP, p.: mit PMA). Das *Housekeeping Gen* RP27 (ribosomales Protein 27) diente als Kontrolle. BGN wurde in HEK293T-Zellen, nicht jedoch in HepG2 und SaOs-2 exprimiert.

### 3.4. Herstellung der Reportergerkonstrukte

Ein Ziel dieser Arbeit war, den Effekt der identifizierten SNPs auf die Genexpression *in vitro* unter Verwendung eines Reportergens zu analysieren. Hierzu wurden Bereiche um die identifizierten SNPs amplifiziert und in den Vektor pGEM11zf(-) (in die *SacI/XhoI*-Site) kloniert. Nach Identifikation der korrekten Orientierung der Fragmente im Vektor wurden Paare aus Wildtyp und Mutante für jeden SNP-Lokus durch gezielte Mutagenese hergestellt.

Die Inserts wurden anschließend in den Expressionsvektor pGL3-promoter subkloniert. Auch hier erfolgte die Identifizierung und Kontrolle der korrekten Orientierung mittels diagnostischem Verdau und Sequenzierung. Es entstanden folgende Plasmide: pPromBGN-849G, pPromBGN-849A, pPromBGN-578A, pPromBGN-578G, pPromBGN-501C, pPromBGN-501A, pPromBGN-151G, pPromBGN-151A und pPromBGN+94G, pPromBGN+94GT. Die Plasmide wurden in *E.coli*-Zellen eingebracht, in diesen amplifiziert, anschließend extrahiert und gereinigt.



**Abbildung 21 Herstellung der Reportergerkonstrukte.** Abgebildet sind der pGL3-control-Vektor mit voll funktionsfähigem viralen Promotor plus *Enhancer*-Bereich des Simian Virus 40 (SV40) und der pGL3-promoter-Vektor mit minimalem Promotor des SV40 (schwarzer Pfeil), der lediglich die Assemblierung des Transkriptionsstart-Komplexes erlaubt.

Die DNA-Fragmente um die SNPs (hier BGN+94) wurden in die *Multiple cloning site* (MCS) des pGL3-promoter kloniert (*SacI/XhoI*).

Für die Haplotypanalyse wurde der Bereich von bp -893 bis +132 in den pGL3-basic-Vektor kloniert. Dieser enthält keine eukaryontischen Promotor- oder *Enhancer*-Sequenzen. Die Luciferasegenaktivität ist also direkt vom subklonierten Insert und seiner richtigen Orientierung abhängig.

### 3.5. Reportergenanalyse

Um einen möglichen funktionellen Effekt der genetischen Varianten im *BGN*-Promotor auf die Expressionsrate des nachfolgenden Gens zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit den hergestellten Reportergenvektoren transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Die Reportergenaktivität der Vektoren pGL3-control und pGL3-promoter dienten dabei als Positiv- bzw. als Baselinekontrolle.

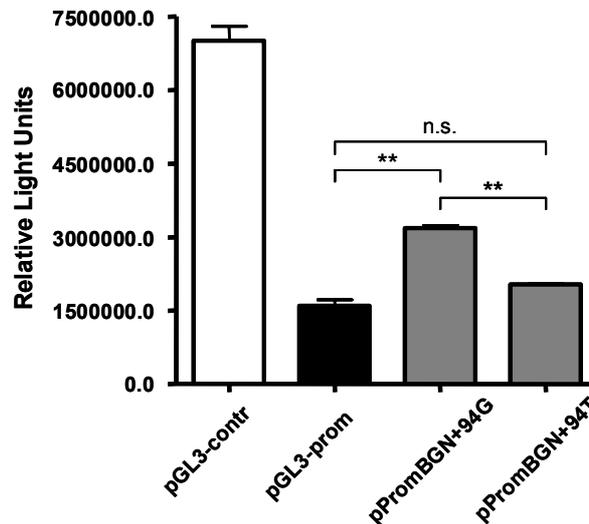
Der pGL3-control-Vektor enthält einen voll funktionsfähigen viralen Promotor inklusive *Enhancer*-Bereich des Simian Virus 40 (SV40) und zeigt daher eine hohe Luciferaseaktivität in allen Mammalia-Zellen. Demgegenüber enthält der pGL3-promoter-Vektor nur einen minimalen Promotor des SV40, der lediglich die Assemblierung des Transkriptionsstart-Komplexes erlaubt, ohne jedoch als *Enhancer* zu fungieren. Beide Vektoren beinhalten das Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase-Gen, welches die Messung der Promotoraktivität anhand der Luciferaseaktivität ermöglicht. Die Reporter-kassette ist von 2 poly(A) Signalen eingeschlossen, womit sichergestellt wird, dass die Luciferasegenaktivität ausschließlich von dem vorgeschalteten Promotorfragment reguliert wird.

#### 3.5.1. Transiente Transfektionen von pPromBGN-G+94t in HEK293T

##### BGN-G+94t ohne Stimulation

Abbildung 22 zeigt die transiente Transfektion unstimulierter HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pPromBGN+94G und pPromBGN+94T. Die Inserts bestanden jeweils aus insgesamt 158 bp (41 bp der 5'-regulatorischen Region und 117 bp der 5'UTR) des *BGN*-Promotors und trugen entweder das G- oder T-Allel an Position +94. Das Plasmid, welches das G-Allel enthielt, zeigte in den Untersuchungen eine signifikant höhere Luciferaseaktivität als das T-Allel ( $P=0.002$ ). Im Vergleich zur Baselineaktivität des pGL3-promoter-Vektors war die Aktivität von pPromBGN+94G ebenfalls signifikant

höher ( $P=0.002$ ). Zwischen pPromBGN+94T und dem pGL3-promoter-Vektor war der Aktivitätsunterschied nicht signifikant ( $P=0.67$ ). Ein Einzelbasenaustausch von T nach G an Position +94 führt demnach zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate des nachgeschalteten Gens.

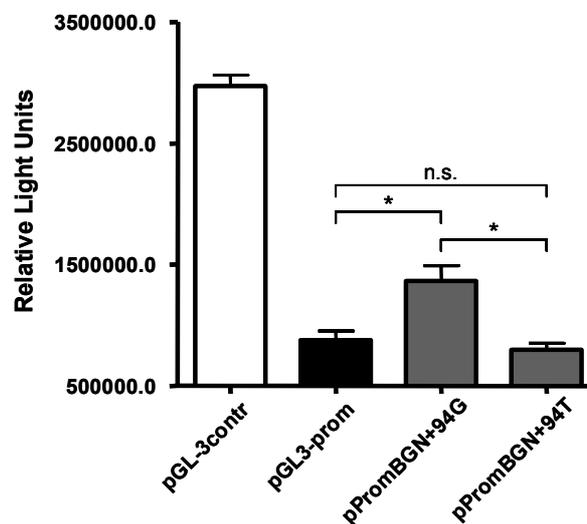


**Abbildung 22 Transiente Transfektion von BGN-G+94t ohne Stimulation.**

Dargestellt ist die standardisierte Luciferaseaktivität (*relative light units*, RLU) der verschiedenen Promotorkonstrukte (pGL3-control [weißer Balken], pGL3-promoter [schwarzer Balken], pPromBGN+94G und pPromBGN+94T [graue Balken]) in einer transienten Transfektion in unstimulierten HEK293T-Zellen. Das G-Allel-tragende Plasmid zeigte eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität als das T-Allel-tragende Plasmid und der pGL3-promoter-Vektor ohne Insert (\*\*:  $P \leq 0.01$ ; n.s.: nicht signifikant).

### pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit cAMP

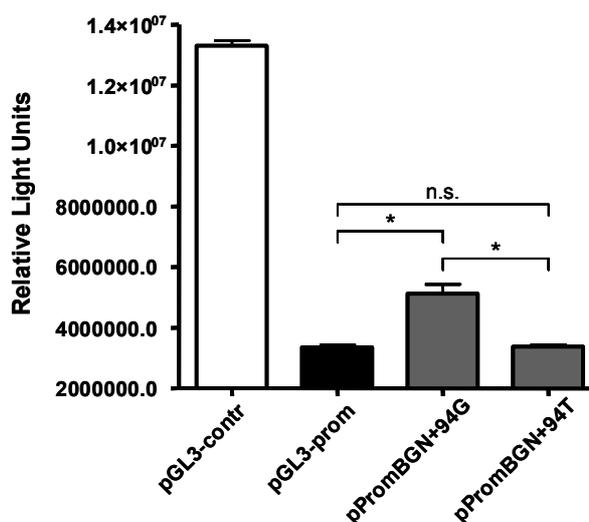
Auch unter Stimulation mit cAMP (Stimulation der PKA- und Epac-abhängigen Signaltransduktionswege) zeigte das Plasmid pPromBGN+94G eine signifikant höhere Luciferasegenaktivität als das Plasmid pPromBGN+94T ( $P=0.035$ ). Der Aktivitätsunterschied zum Baselinevektor, pGL3-promoter, war ebenfalls signifikant ( $P=0.047$ ). Die Unterschiede waren jedoch nicht so deutlich, wie in unstimulierten HEK293T-Zellen. Die Transkriptionsaktivität wurde durch das T-Allel-tragende Insert nicht erhöht. Zwischen dem T-Allel und dem Baselinevektor ergaben sich daher keine ausgeprägten Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität ( $P=0.69$ ).



**Abbildung 23** Transiente Transfektion von pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit cAMP. Das G-Allel zeigt eine signifikant erhöhte Luciferasegenaktivität als das T-Allel und der Baselinevektor ( $P=0.035$ , bzw.  $0.047$ ). (\*:  $P \leq 0.05$ ; n.s.: nicht signifikant).

### pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit PMA

Unter Stimulation mit PMA (Stimulation der PKC abhängigen Signaltransduktionswege) zeigte das G-Allel-tragende Plasmid mit *P*-Werten von 0.025 und 0.039 eine signifikant höhere Luciferasegenaktivität als pPromBGN+94T und der Baselinevektor respektive. Die transkriptionelle Aktivität des T-Allels und des pGL3-promoter-Vektors unterschieden sich nicht (*P*=0.809).



**Abbildung 24 Transiente Transfektion von pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit PMA.** Dargestellt ist die standardisierte Luciferasegenaktivität für die Vektoren pGL3-control, pGL3-promoter und die Promotorkonstrukte pPromBGN+94G und pPromBGN+94T unter Stimulation mit PMA. Das G-Allel zeigte eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivierung als das T-Allel und die Baselinekontrolle. Demgegenüber vermochte letzteres nicht, die Luciferaseexpression zu steigern. (\*:  $P \leq 0.05$ ; *n.s.*: nicht signifikant).

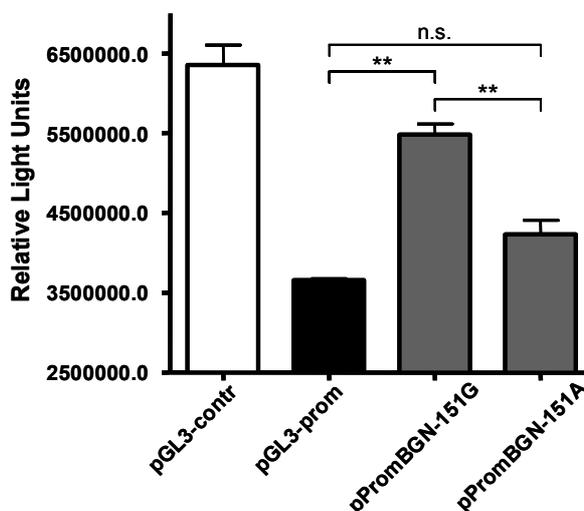
### Zusammenfassung pPromBGN-G+94t

Ein Einzelbasenaustausch von T nach G an Position +94 des humanen *BGN*-Promotors führte in unserem Ansatz zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptionsaktivität unabhängig vom gewählten Stimulationsregime. Der den SNP flankierende Bereich ist Teil eines *cis*-aktiven Elements, dessen Funktion Allel-abhängig verändert ist.

### 3.5.2. Transiente Transfektionen von pPromBGN-G-151a in HEK293T

#### pPromBGN-G-151a ohne Stimulation

Die Abbildung zeigt die transiente Transfektion der Plasmide pPromBGN-G-151a in HEK293T-Zellen ohne Stimulation. Das Insert war 189 bp lang und erstreckte sich von bp -288 bis -100. Das G-Allel zeigte in unseren Untersuchungen eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum A-Allel ( $P=0.006$ ) und dem Baselinevektor, pGL3-promoter ( $P=0.004$ ).

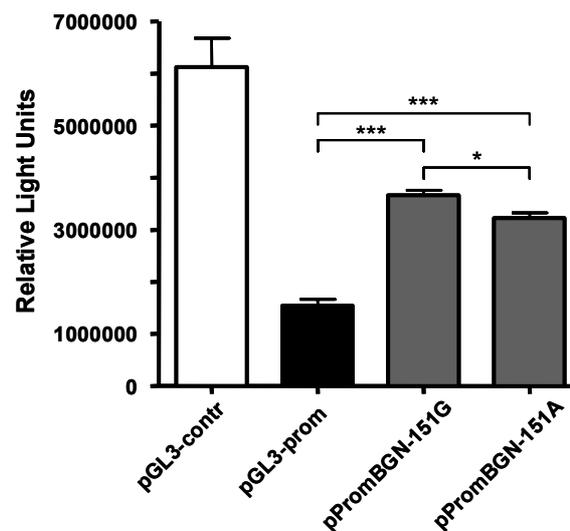


#### Abbildung 25 Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a ohne Stimulation.

Dargestellt ist die standardisierte Luciferasegenaktivität für die Kontroll-Vektoren pGL3-control (weißer Balken), pGL3-promoter (schwarzer Balken) und die Promotorkonstrukte pPromBGN-151G und pPromBGN-151A (graue Balken). Das G-Allel zeigte eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität als das A-Allel ( $P=0.006$ ) und der Baselinevektor ( $P=0.004$ ). Das A-Allel war nicht signifikant aktiver als der Baselinevektor ( $P=0.081$ ) (\*\*:  $P \leq 0.01$ ; n.s.: nicht signifikant).

### pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit cAMP

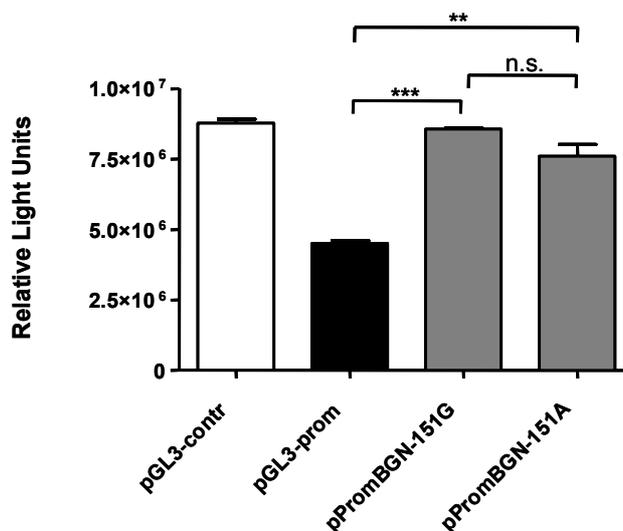
Unter Stimulation mit cAMP war die Aktivität der Plasmide pPromBGN-151G und pPromBGN-151A um das 2-fache höher als die des pGL3-promoter-Vektors ohne Insert. Für das G-Allel und A-Allel betragen die *P*-Werte 0.0002 und 0.0006 respektive. Auch hier zeigte das G-Allel eine signifikant höhere Aktivität als das A-Allel (*P*=0.033). Die transkriptionelle Aktivität war sowohl allel- als auch stimulationsabhängig.



**Abbildung 26** Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit cAMP. Die Aktivität beider Allele gegenüber dem Baselinevektor war deutlich gesteigert (*P*=0.0002 pPromBGN-151G, *P*=0.0006 pPromBGN-151A). Auch der Aktivitätsunterschied zwischen dem G- und A-Allel war signifikant (*P*=0.033). (\*\*\*: *P*≤0.001; \*: *P*≤0.05).

### pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit PMA

An Position -578 des *BGN*-Promotors führte ein Basenaustausch von G nach A nicht zur Änderung der transkriptionellen Aktivität ( $P=0.0837$ ). Beide Inserts zeigten eine nahezu 2-fach höhere transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor pGL3-promoter (pPromBGN-151G  $P<0.0001$ , pPromBGN-151A  $P=0.0019$ ).



**Abbildung 27 Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit PMA.** Die beiden Allele zeigten im Vergleich zum pGL3-promoter eine deutlich erhöhte transkriptionelle Aktivität. Die Allele untereinander unterschieden sich nicht in ihrer transkriptionelle Aktivität (\*\*\*:  $P\leq 0.0001$ , \*\*:  $P\leq 0.01$ ; n.s.: nicht signifikant)

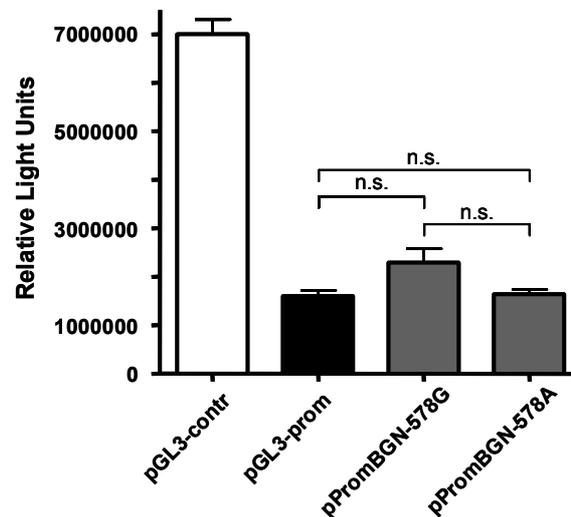
### Zusammenfassung

Im Bereich des SNP BGN-G-151a, der in der proximalen 5'-regulatorischen Region gelegen ist, wird die transkriptionelle Aktivität stimulationsabhängig und allelabhängig reguliert. In unstimulierten HEK293T-Zellen zeigte das G-Allel eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität als das A-Allel und der pGL3-promoter-Vektor. Unter Stimulation mit cAMP und PMA war die Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor immer noch deutlich erhöht, Aktivitätsunterschiede im Vergleich zum A-Allel waren nicht mehr signifikant.

### 3.5.3. Transiente Transfektionen von pPromBGN-G-578a in HEK293T

#### pPromBGN-G-578a ohne Stimulation

Die Promotorkonstrukte pPromBGN-578A und pPromBGN-578G enthielten jeweils ein 188 bp langes Insert von Position -691 bis -504 des humanen *BGN*-Promotors mit dem entsprechenden A- bzw. G-Allel an Position -578. Transiente Transfektions-Analysen der Promotorkonstrukte ohne Stimulation zeigten keine signifikanten Unterschiede der Transkriptionsaktivität des G-Allels im Vergleich zum A-Allel ( $P=0.744$ ), oder dem pGL3-promoter-Vektor ( $P=0.273$ ). Auch pPromBGN-578A und der pGL3-promoter-Vektor unterschieden sich nicht in der transkriptionellen Aktivität ( $P=0.146$ ).

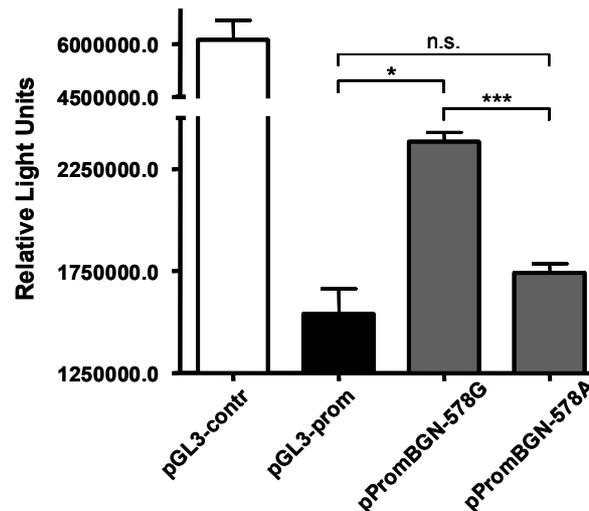


#### Abbildung 28 Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a ohne Stimulation.

Dargestellt ist die standardisierte Luciferasegenaktivität für die Vektoren pGL3-control (weißer Balken), pGL3-promoter (schwarzer Balken) und die Promotorkonstrukte pPromBGN-578G und pPromBGN-578A (graue Balken). Die Allele G und A zeigten keine signifikanten Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität. Auch im Vergleich zur Aktivität des Baselinevektors wurde keine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität durch die subklonierten Inserts detektiert (*n.s.*: nicht signifikant).

### pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit cAMP

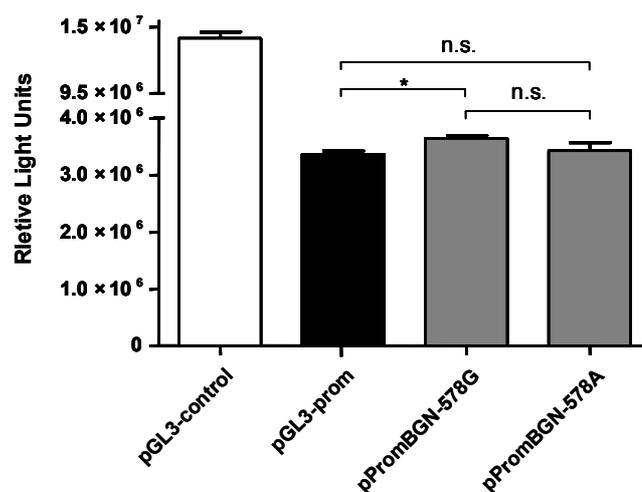
Unter Stimulation mit cAMP war die transkriptionelle Aktivität des pPromBGN-578G-Plasmids 1,4-fach höher als die des A-Allel-tragenden Plasmids ( $P=0.0005$ ) und des pGL3-promoter-Vektors ( $P=0.013$ ). Letztere unterschieden sich in Ihrer Aktivität nicht signifikant ( $P=0.239$ ).



**Abbildung 29** Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit cAMP. Der Einzelbasenaustausch von A nach G an Position -578 bedingte eine signifikante Erhöhung der transkriptionellen Aktivität ( $P=0.0005$ ). Im Vergleich zum Baselinevektor (pGL3-promoter) war das A-Allel-tragende Insert transkriptionell nicht aktiver (\*\*\*:  $P\leq 0.001$ ; \*:  $P\leq 0.05$ ; n.s.: nicht signifikant).

### pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit PMA

Unter Stimulation mit PMA zeigten die Allele G und T keinen signifikanten Unterschied in der transkriptionellen Aktivität ( $P=0.261$ ). Das G-Allel zeigte eine nur sehr leicht erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor ( $P=0.03$ ). Zwischen pPromBGN-578A und pGL3-promoter ergaben sich keine signifikanten Aktivitätsunterschiede ( $P=0.685$ ).



**Abbildung 30** Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit PMA. Die Abbildung zeigt die transiente Transfektion der oben genannten Plasmide im Vergleich zum Baselinevektor, pGL3-promoter. Das A-Allel hatte keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität, das G-Allel erhöhte sie nur leicht (\*:  $P \leq 0.05$ ; n.s.: nicht signifikant).

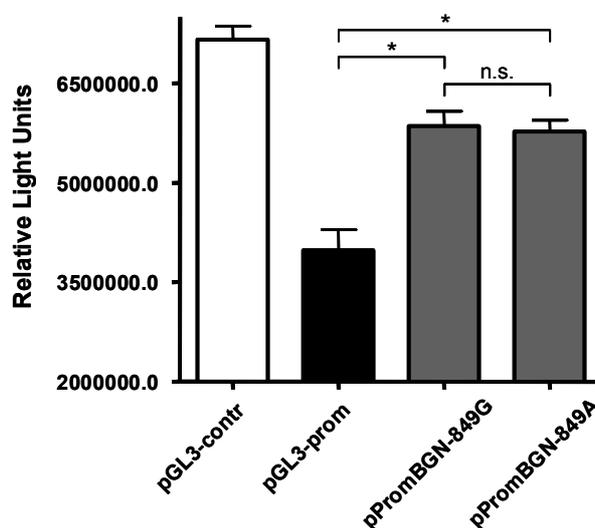
### Zusammenfassung

An Position -578 der regulatorischen Region des BGN-Gens hat ein Basenaustausch von G nach A keinen signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität in unstimulierten HEK293T-Zellen. Auch unter Stimulation mit PMA ließ sich zwischen den Allelen kein signifikanter Aktivitätsunterschied nachweisen. Es zeigte sich jedoch eine leicht erhöhte transkriptionelle Aktivität des G-Allels im Vergleich zum Baselinevektor. Stimulation mit cAMP führte zur deutlichen Steigerung der Aktivität der BGN-Plasmide und zeigte eine signifikant höhere Aktivität des G-Allels im Vergleich zum A-Allel. Die transkriptionelle Aktivität dieses Bereichs war sowohl abhängig von der Stimulationsbedingung als auch vom Allel an Position -578.

### 3.5.4. Transiente Transfektionen von pPromBGN-G-849a in HEK293T

#### pPromBGN-G-849a ohne Stimulation

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Transfektion der Promotorkonstrukte pPromBGN-849. Das 178 bp-lange Insert entsprach der Sequenz von Position -914 bis -737 der 5'-regulierenden Region des BGN-Gens. Die transkriptionelle Aktivität der beiden Allelen an Position -849 zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $P=0.787$ ). Im Vergleich zum pGL3-promoter-Vektor war die transkriptionelle Aktivität beider Konstrukte um das ca. 1,5-fache erhöht ( $P=0.01$  pPromBGN-849G,  $P=0.014$  pPromBGN-849A). Das einklonierte Insert konnte die transkriptionelle Aktivität deutlich steigern.

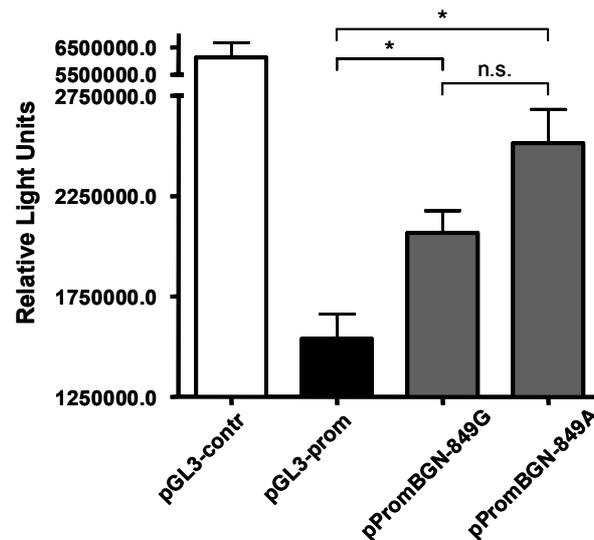


**Abbildung 31** Transiente Transfektion von pPromBGN-G-849a ohne Stimulation.

Dargestellt ist die standardisierte Luciferasegenaktivität für die Vektoren pGL3-control (weißer Balken), pGL3-promoter (schwarzer Balken) und die Promotorkonstrukte pPromBGN-849G und pPromBGN-849A (graue Balken). Die *BGN*-Plasmide zeigten eine signifikant höhere Transkriptionsrate als der pGL3-promoter-Vektor. Durch einen Basenaustausch von G nach A wurde die transkriptionelle Aktivität nicht beeinflusst (\*:  $P \leq 0.05$ , n.s.: nicht signifikant)

### pPromBGN-G-849a unter Stimulation mit cAMP

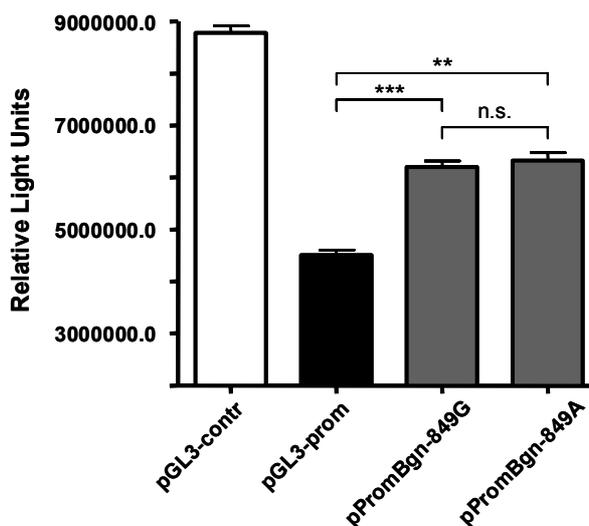
Auch unter Stimulation mit cAMP war die transkriptionelle Aktivität der *BGN*-Plasmide deutlich höher als die des Baselinevektors ( $P=0.034$  G-Allel,  $P= 0.012$  A-Allel). Die Unterschiede waren jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie in den Versuchen ohne Stimulation (siehe oben). Die Allele G und A unterschieden sich in ihrer transkriptionellen Aktivität nicht signifikant ( $P=0.105$ ).



**Abbildung 32** Transiente Transfektion von pPromBGN-849G/A unter Stimulation mit cAMP. Die *BGN*-Plasmide zeigen eine signifikant erhöhte transkriptionelle Aktivität als der pGL3-promoter-Vektor. Unterschiede in der transkriptionelle Aktivität zwischen den beiden Allelen waren nicht signifikant (\*:  $P \leq 0.05$ ; n.s.: nicht signifikant).

### pPromBGN-G-849a unter Stimulation mit PMA

Unter Stimulation mit PMA war die transkriptionelle Aktivität der *BGN*-Plasmide 1,4-fach höher als die des pGL3-promoter-Vektors (G-Allel  $P=0.00046$ , A-Allel  $P=0.0014$ ). Ein Basenaustausch von G nach A führte hingegen nicht zu einer deutlichen Änderung der transkriptionelle Aktivität. Das inklonierte Insert steigert unter Stimulation mit PMA die transkriptionelle Aktivität.



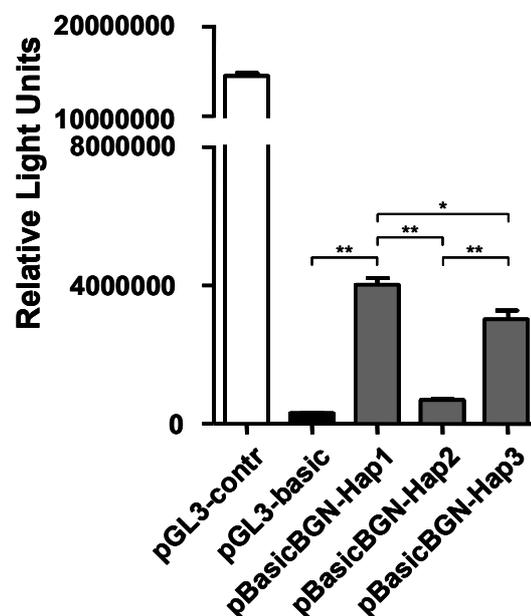
**Abbildung 33 Transiente Transfektion von pPromBGN-G-849a unter Stimulation mit PMA.** Die Unterschiede in der Transfektionsaktivität zwischen den zwei Allelen waren nicht signifikant ( $P=0.563$ ). Beide Inserts zeigten jedoch eine signifikant höhere transkriptionelle Aktivität als der Baselinevektor, pGL-promoter (pPromBGN-849G  $P=0.00046$ , pPromBGN-849A  $P=0.0014$ ) (\*\*\*:  $P\leq 0.001$ ; \*\*:  $P\leq 0.01$ ; n.s.: nicht signifikant).

### Zusammenfassung

Die Sequenz von bp -914 bis -737 der 5'-regulierenden Region des *BGN*-Gens wirkt als transkriptioneller *Enhancer*. stimulationsunabhängig zeigten Plasmide, die diese Sequenz enthielten, eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität als der pGL3-promoter-Vektor. Der Basenaustausch an Position -849 hatte keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität.

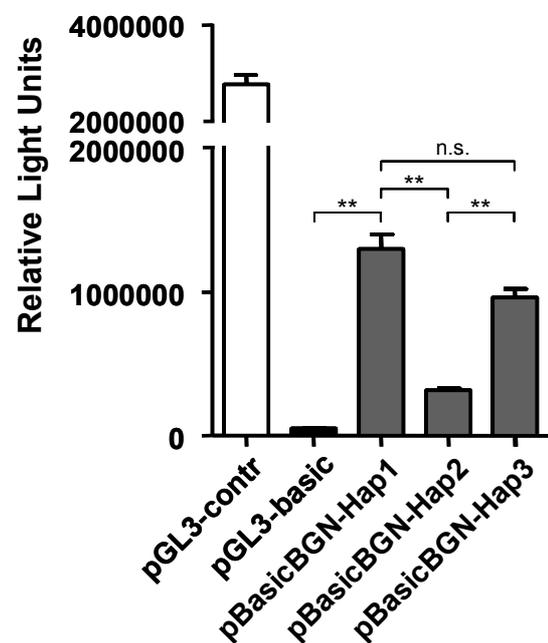
### 3.6. Reportergenanalyse der molekularen Haplotypen (MolHaps)

Zur funktionellen Analyse der MolHaps im 5'-regulatorischen Bereich des BGN-Gens wurden DNA-Bereiche von -691 bis +116 in den pGL3-basic-Vektor einkloniert. Dieser Vektor enthält keine Promotor- oder *Enhancer*-Sequenzen. Seine Aktivität ist also von dem in korrekter Orientierung einklonierten regulatorischen Bereich abhängig. Die Inserts unterschieden sich allein in den Allelen an Position -578, -151 und +94 (MolHap 1 [G-578 G-151 G+94], MolHap 2 [G-578 A-151 T+94] und MolHap 3 [A-578 G-151 G+94]). Transiente Transfektionen in HEK293T-Zellen ohne Stimulation zeigten im Vergleich zum leeren pGL3-basic-Vektor eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität für die MolHaps 1 und 3 (entsprechend einem  $P$ -Wert von  $P=0.0024$  und  $P=0.0079$ ). Die transkriptionelle Aktivität war für den MolHap 1 um das ~13-fache, für MolHap 2 um das ~10-fache im Vergleich zum leeren pGL3-basic-Vektor erhöht. Das Fragment mit dem Haplotyp [G-578 A-151 +94T] (MolHap 2) zeigte hingegen nur eine ~2-fach höhere Aktivität ( $P=0.0047$ ). Die transkriptionelle Aktivität des ersten MolHap war ~6-fach höher als die des zweiten ( $P=0.0024$ ), die des dritten MolHaps ~5-fach höher ( $P=0.0097$ ). Die Unterschiede in der transkriptionelle Aktivität zwischen MolHap 1 und 3 waren weniger deutlich ausgeprägt (~1,5-fach,  $P=0.035$ ).



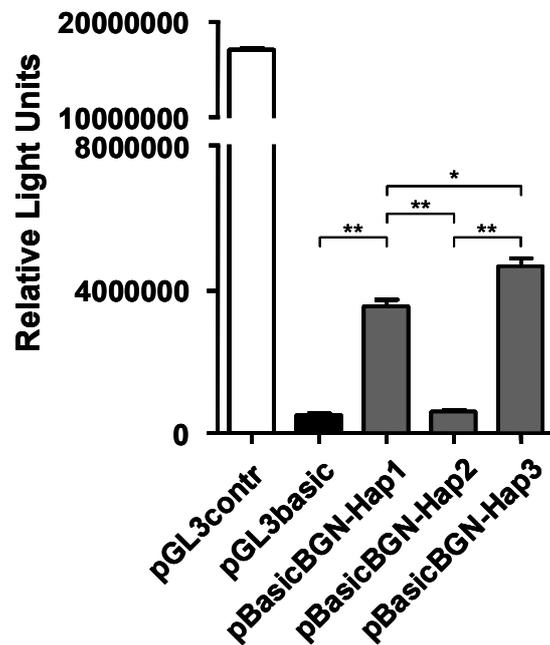
**Abbildung 34** Transiente Transfektion der MolHaps ohne Stimulation (\*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*:  $P \leq 0.05$ )

Unter Stimulation mit cAMP zeigte sich wiederum eine deutlich gesteigerte transkriptionelle Aktivität der Haplotypen 1 (~26-fach,  $P=0.0061$ ) und 3 (~20-fach,  $P=0.0038$ ) im Vergleich mit dem leeren pGL3-basic-Vektor. Auch die Aktivität des MolHap 2 war gesteigert (~6-fach,  $P<0.001$ ). Der Unterschied der transkriptionellen Aktivität zwischen MolHap 2 und 3 war nicht signifikant. Beide Inserts zeigten aber eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität als der Haplotyp 2 [G-578 A-151 T+94]: MolHap 1 ~4-fach,  $P=0.0096$ , MolHap 2 3-fach,  $P=0.0071$ .



**Abbildung 35** Transiente Transfektion der MolHaps unter Stimulation mit cAMP (\*\*:  $P\leq 0.01$ ; n.s.: nicht signifikant)

Auch unter Stimulation mit PMA zeigten die MolHaps 1 und 3 eine signifikant höhere Luciferasegenaktivität als der Baselinevektor ( $P=0.0026$  für MolHap 1,  $P=0.0023$  für MolHap 2). Die transkriptionelle Aktivität von MolHap 1 war hier 7-fach höher, die von MolHap 2 9-fach höher als die von pGL3-basic. MolHap 2 zeigte keine signifikant höhere Aktivität als der pGL3-basic-Vektor ( $P=0.218$ ). MolHap 3 zeigte eine ~1,5-fach höhere Aktivität als der Vektor mit MolHap 1 ( $P=0.018$ ).



**Abbildung 36** Transiente Transfektion der MolHaps unter Stimulation mit PMA

(\*\* :  $P \leq 0.01$ ; \* :  $P \leq 0.05$ )

Unabhängig von der Stimulationsbedingung zeigten die MolHaps 1 [G-578 G-151 G+94] und 3 [A-578 G-151 G+94] eine signifikant höhere Luciferasegenaktivität als MolHap 2 [G-578 A-151 T+94]. Letzterer zeigte ohne Stimulation und unter Stimulation mit PMA nur eine leicht erhöhte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum pGL3-basic-Vektor. Unter Stimulation mit cAMP war dieser Unterschied deutlicher.

## 3.7. Änderung der Protein-Bindungsaffinität durch genetische Varianten

### 3.7.1. *In silico*-Analyse

Mit Hilfe computergestützter Suchalgorithmen und zugrundeliegender Datenbanken (AliBaba 2.1, Transfac 7.0) können die Regionen um die SNPs auf potentiell bindende Transkriptionsfaktoren analysiert werden. Durch Anpassung verschiedener Suchparameter wie der Suchmatrixbreite in bp, der minimalen Matrixkonservierung in %, und der Anforderung an die Paarähnlichkeit wurde die Analyse für jeden Bereich optimiert.

Abbildung 37 zeigt die Alibaba-Analyse des Bereichs um den SNP BGN+94G/T. Ein Einzelbasenaustausch von G nach T an Position +94 des *BGN*-Promotors führt demnach zu einer Änderung der potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen. Die Analyse des T-Allels ergab 2 Bindungsstellen für SP1 und eine für AP-2alpha, wohingegen bei der Analyse des G-Allels zusätzlich dazu eine SP1-Bindungsstelle vorausgesagt wurde.

**G+94T**  
 tgcggacggcccaccaccccagccc<sup>g</sup>ccaactagtcagcctgcgctggcg

=====SP1=====

=====SP1====

=====SP1====

=====AP-2alph====

**Abbildung 37** Alibaba-Analyse BGN-G+94t. Dargestellt ist die Alibaba-Analyse des Bereichs um den SNP BGN+94G/T. Schwarz dargestellt sind die Bindungsfaktoren, die für beide Allele gefunden wurden. Bindungsfaktoren, die nur für ein Allel gefunden wurden, erscheinen in der dem Allel entsprechenden Farbe. Durch den Basenaustausch von G nach T an Position +94 entfällt eine potentielle Bindungsstelle für SP1.

An die Region um Position -151 binden laut computergestützter Analyse NF-1, Krox-20 und SP1. Dabei ergab sich für das G-Allel mit drei potentiellen SP1-Bindungsstellen eine mehr als für das A-Allel. Die Literaturrecherche ergab zudem die core-Sequenz für ein IL-6RE im Bereich -144 bis -150 des *BGN*-Promotors, die bereits von

Ungefroren et al beschrieben worden war. Durch Alibaba 2.1 wurde sie nicht vorausgesagt.

### G-151A

tgctccctttgaagctgccagggg<sup>g</sup><sub>a</sub>ccgggaagcctgccccctctgctc

====NF-1==

====SP1====

=IL-6RE=

====SP1==

====SP1====

==Krox-20=

**Abbildung 38** Alibaba-Analyse BGN-G-151a. Ergebnis der Alibaba-Analyse für den Bereich um BGN-151. Durch Basenaustausch von A nach G an Position -151 wurde eine potentielle Bindungsstelle für SP1 (blau) "generiert". Im Bereich der Basenpaare -144 bis -150 ist potentiell ein IL-6RE (grün) mit der Konsensus-Sequenz 5'-CCGGGAA-3' lokalisiert. Diese war von Alibaba 2.1 nicht angezeigt worden, konnte aber durch Literaturvergleich bestätigt werden (40, 92).

Alibaba-Analysen der Sequenz um den SNP BGN-G-501a zeigten für das C-Allel drei zusätzliche potentielle TFBS. Durch Basenaustausch von C nach A an Position gingen drei potentielle Bindungsstellen (für die Transkriptionsfaktoren REV-ErbA, USF und c-Ets-1) verloren.

### C-501A

aatccacaacagctacctctctgat<sup>c</sup><sub>a</sub>ctggagaaaccacctccttgcttag

=REV-ErbA=

====USF====

=c-Ets-1 =

====SRF====

**Abbildung 39** Alibaba-Analyse BGN-C-501a. Das C-Allel ergab in der Analyse potentielle Bindungsstellen für REV-ErbA, USF, c-Ets-1 und SRF, wohingegen das A-Allel nur eine Bindungsstelle für SRF zeigte.

Für die untersuchte Sequenz um den SNP BGN-G-578a wurden eine Bindungsstelle für GR und eine für SP1 angezeigt. Durch den Basenaustausch von G nach A kam eine potentielle SP1-Bindungsstelle hinzu.

### G-578A

cctctttttaaggggaagaaagtctg<sup>g</sup><sub>a</sub>agtggaagggagggcacagggcgcc

====SP1====

====GR====

====SP1====

**Abbildung 40** Alibaba-Analyse BGN-G-578a. Durch einen Basenaustausch von A nach G an Position -578 ging eine potentielle SP1-Bindungsstelle verloren.

Die Analyse ergab für die Sequenz um -849A potentielle TFBS für K-2a, PU.1, NF-EM5 und RAR-alpha. Die G-Allel-tragende Sequenz zeigte hingegen eine Bindungsstelle für SP1.

### G-849A

tgggctctagccactggaggaactg<sup>g</sup><sub>a</sub>actcattgggccctcaggaagcgg

====K-2a==

====PU.1==

===NF-EM5=

=RAR-alpha=

====SP1====

**Abbildung 41** Alibaba-Analyse BGN-G-849a. Das A-Allel zeigte potentielle Bindungsstellen für K-2a, PU.1, NF-EM5 und RAR-alpha, wohingegen das G-Allel eine potentielle Bindungsstelle für SP1 enthielt.

## 3.7.2. EMSA

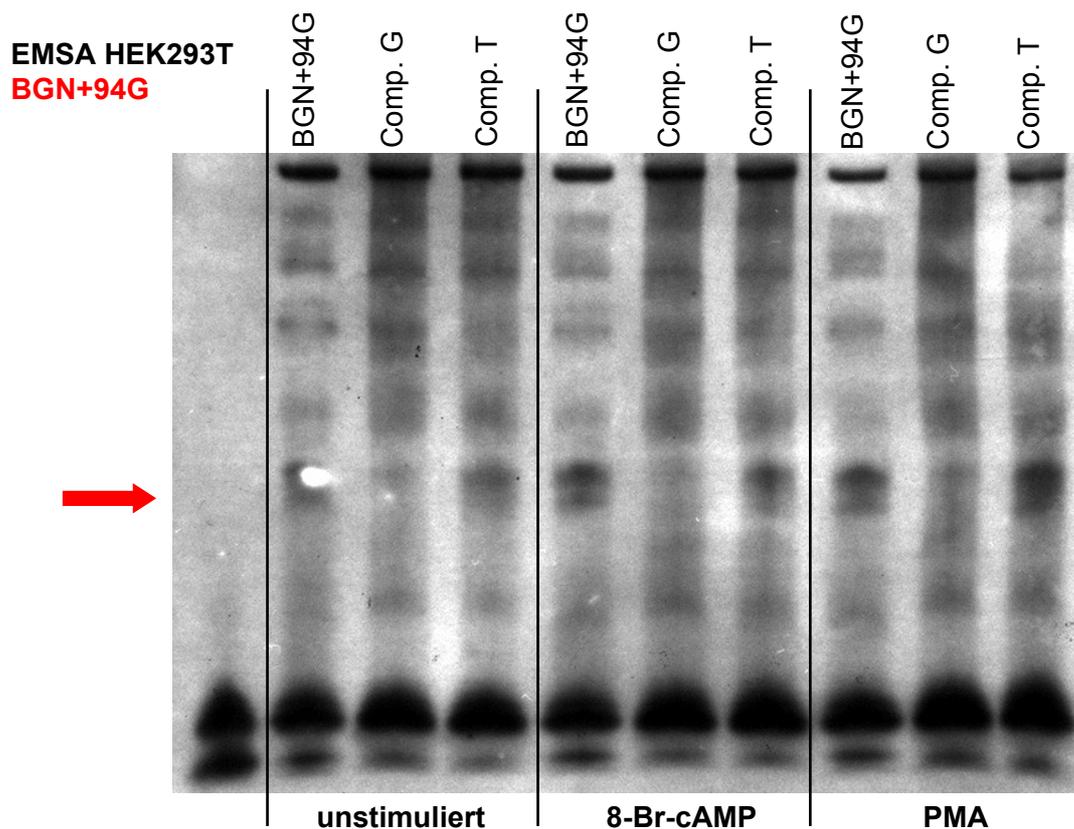
Um die Interaktion der Promotorfragmente mit nukleären Proteinen zu untersuchen, wurden EMSAs mit Kernproteinen aus HEK293T-Zellen durchgeführt. Für jeden SNP wurden beide Allele und ihre flankierenden Bereiche als DNA-Sonden (31-36 bp lange Oligonukleotide) generiert (IBA, Göttingen) und ein Teil der Oligonukleotide mit

biotinylierten dUTPs am 3'-Ende gelabelt. Ungelabelte DNA-Sonden dienten später als Kompetitoren.

Die Gele wurden wie folgt beladen: Die erste Spur eines jeden Gels enthielt das gelabelte Oligonukleotid ohne Proteine als Referenz (free Oligo= Froli-Lane). Die übrigen Spuren wurden in drei Blöcke aufgeteilt (ein Block für jede Stimulationsbedingung). Die erste Spur eines Blocks enthielt jeweils das gelabelte Oligonukleotid zusammen mit den Kernproteinen aus HEK293T, die zweite und dritte zusätzlich ungelabelten Kompetitor (jeweils ein Allel) in 200-fach molarem Überschuss. Konnte das gelabelte Oligonukleotid durch den Kompetitor aus der Protein-DNA-Bindung verdrängt werden (eine Bande verschwindet nach Zugabe des Kompetitors), so konnte von einer spezifischen Protein-DNA-Interaktion ausgegangen werden.

Abbildung 42 zeigt das Ergebnis für die BGN+94G-Sonde. Die jeweils erste Spur eines jeden Blocks zeigt die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe in der nativen PAGE. Da die DNA-Sonde zuvor biotinyliert worden war, waren die Komplexe nun detektierbar. Durch Zugabe einer 200-fach höheren molaren Menge eines identischen ungelabelten Kompetitors konnte die gelabelte DNA aus der Bindung verdrängt werden (siehe Pfeil). Dies zeigte eine spezifische Protein-DNA-Bindung an. Die 200-fach höhere molare Menge des T-Allel-tragenden ungelabelten Oligonukleotides hingegen konnte die biotinylierte G-Allel-Sonde nicht aus der Bindung verdrängen. Das gebundene Protein zeigte in unseren Untersuchungen eine höhere Affinität zu dem G-Allel als zu dem T-Allel.

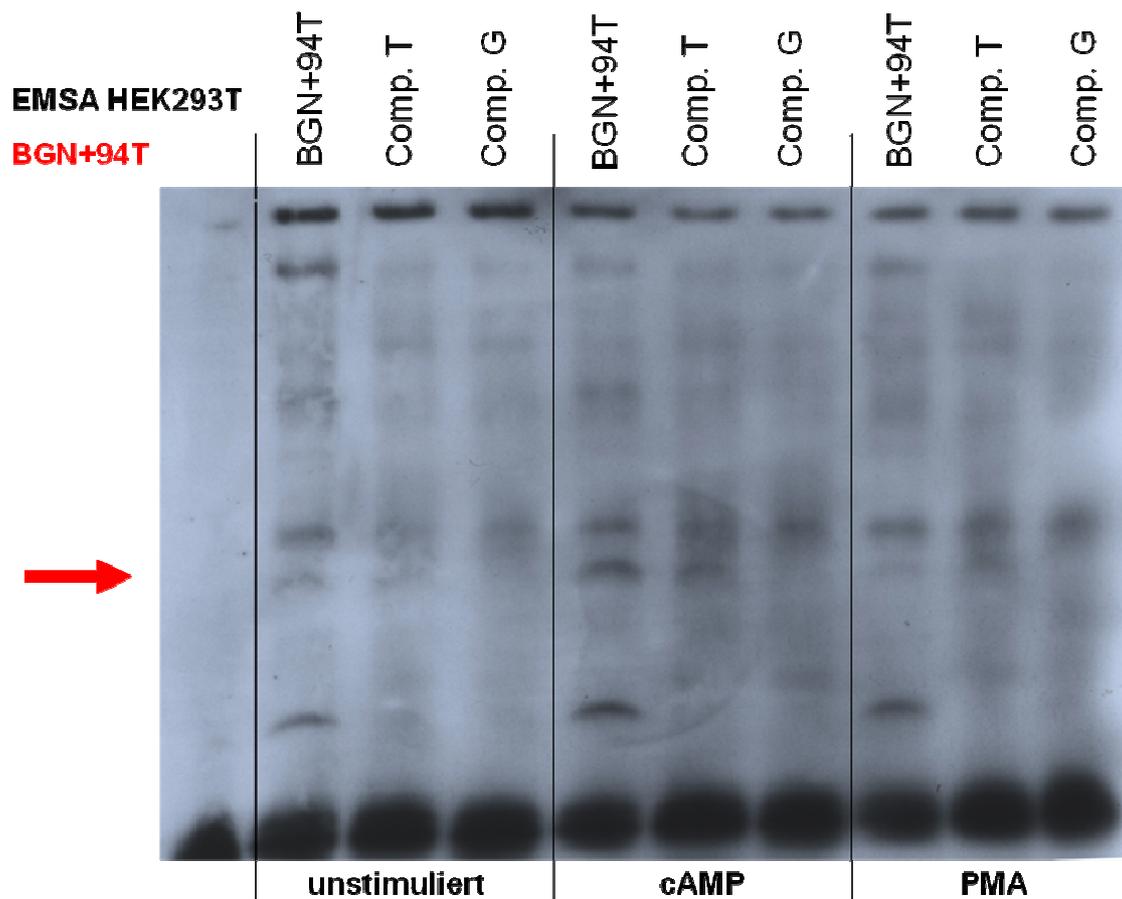
Der DNA-Bereich um Position +94 des BGN-Gens ging also spezifische Interaktionen mit nukleären Proteinen aus HEK293T-Zellen ein. Die Affinität dieser Bindung war Allel-spezifisch, aber unabhängig von der Stimulationsbedingung.



**Abbildung 42 EMSA BGN+94G in HEK293T-Zellen** mit Oligonukleotiden der Region um +94 (G/T) zeigt, dass die DNA spezifisch an nukleäre Proteine aus HEK293T-Zellen bindet. Die Kernproteine waren aus unstimulierten, mit 8-Br-cAMP und PMA stimulierten Zellen gewonnen worden. Pro Stimulationsbedingung wurden 3 Spalten angelegt. Jede erste Spalte enthielt gelabelte Oligonukleotide, die an Position +94 das G-Allel enthielten und Kernproteine. In der zweiten und dritten Spalte wurden zudem jeweils ein 200-facher molarer Überschuss ungelabelter Oligonukleotide mit dem G-Allel (Comp G) oder dem T-Allel (Comp T) hinzugefügt. Vergleicht man die zweite und dritte Spalte eines jeden Triplikates, so wird deutlich, dass das G-Allel-Oligonukleotid eine höhere Protein-Bindungsaffinität besitzt als das Oligonukleotide, welches das T-Allel enthält.

Diese Ergebnisse konnten in einer Untersuchung des gelabelten T-Allels bestätigt werden. Hier zeigte sich eine spezifische Proteinbindung, die sowohl durch ungelabeltes T- als auch G-Allel kompetiert werden konnte. Abbildung 43 zeigt das Ergebnis für die BGN+94T-Sonde. Jeder der drei Blöcke spiegelte eine Stimulationsbedingung wieder (unstimuliert, stimuliert mit cAMP, stimuliert mit PMA).

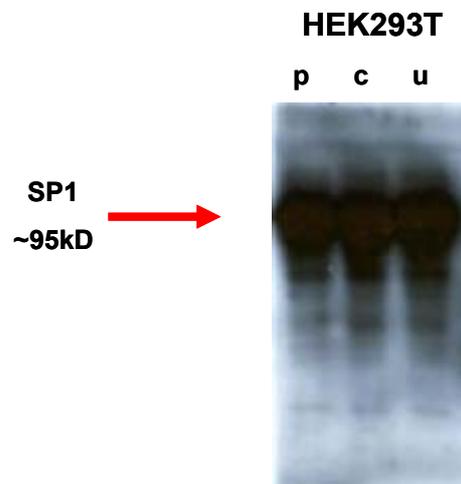
Die erste Spur eines jeden Blocks zeigte die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe (biotinylierte BGN+94T-Sonde plus Kernproteine aus HEK293T unter verschiedenen Stimulationsbedingungen) in einer nativen PAGE. Die 2. Spur eines jeden Blocks zeigte dann die Situation nach Zugabe eines 200-fach molaren Überschusses an ungelabelter BGN+94T-Sonde. In der jeweils dritten Spalte wurde ungelabeltes BGN+94G-Oligonukleotid in 200-fach molarem Überschuss hinzugegeben.



**Abbildung 43 EMSA BGN+94T in HEK293T-Zellen.** Gelabelte Oligonukleotide enthielten das T-Allel. Als Kompetitoren wurden ungelabelte Oligonukleotide mit T- und G-Allel verwendet. Die Analyse erfolgte an Kernpräparationen von unstimulierten, mit cAMP und mit PMA-stimulierten HEK293T-Zellen.

### 3.7.3. Western-Blot-Analyse - HEK293T-Zellen exprimieren SP1

Die computergestützte Analyse der 5'-regulatorischen Region des BGN-Gens zeigte mehrere SP1-Bindungsstellen. Auch vorausgegangene Arbeiten haben bereits Bindungsstellen für SP1 im *BGN*-Promotor identifiziert und die SP1-abhängige Regulation von BGN dargelegt (34, 94). Um die Expression des Transkriptionsfaktors SP1 in HEK293T-Zellen nachzuweisen, wurden Kernproteine aus unstimulierten und mit cAMP bzw. PMA stimulierten HEK293T-Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Überführung der Proteine auf eine Membran wurde diese mit SP1-Antigen (rabbit) inkubiert. Durch den sekundären, markierten Anti-rabbit-Antikörper konnte die SP1-Bande detektiert werden. HEK-293T-Zellen exprimierten unabhängig vom Stimulationszustand den Transkriptionsfaktor SP1.



**Abbildung 44** Western Blot zum Nachweise der SP1-Expression in HEK293T-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen (p: mit PMA, c: mit cAMP, u: unstimuliert). Unter allen Stimulationsbedingungen lässt sich der Transkriptionsfaktor SP1 in HEK293T nachweisen.

## 4. Diskussion

### 4.1. BGN und CVD

CVD sind die häufigste Todesursache in industrialisierten und nicht-industrialisierten Nationen und spielen gesundheitsökonomisch eine bedeutende Rolle (99). Neben klassischen Risikofaktoren wie Hypertonie, Adipositas, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und Dyslipoproteinämie spielen genetische Faktoren bei der Krankheitsentwicklung eine große Rolle. Da es sich bei der CVD um eine komplex (polygen) determinierte Erkrankung handelt, ist der Einfluss eines einzelnen genetischen Faktors auf die Erkrankung häufig schwer nachweisbar. Ein geeignetes Instrument zur Identifikation „genetischer Risikofaktoren“ ist der sogenannte Kandidatengenapproach, bei dem genetische Unterschiede zwischen Erkrankten und gesunden Kontrollen identifiziert und mit dem Erkrankungsrisiko assoziiert werden können. Am Beginn der CVD steht gewöhnlich die endotheliale Dysfunktion mit anschließender Entwicklung der Arteriosklerose. BGN, als Bestandteil der EZM ist ein potentiell Kandidatengen arteriosklerotischer Erkrankungen. Nach Su et al ist seine Expression in Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen besonders hoch (44, 88). Eine Aufgabe des BGN ist die Organisation der Assemblierung der EZM. Sein Core-Protein tritt mit Typ-I- und Typ-VI-Kollagenen in Verbindung und steuert die Kollagenfibrillogenese (17, 68, 83). Wiberg et al konnten zeigen, dass BGN und das nahe verwandte Decorin in der Lage sind, Kollagen VI N-terminal zu binden und in hexadimensionale Netzwerke zu organisieren (100).

Nach einem MI ist nicht nur die myokardiale Kollagen-, sondern auch die *BGN*-Expression in der Infarktzone gesteigert (103). Auch in den Myokardarealen, die nicht direkt von der Ischämie betroffen sind, wird BGN verstärkt exprimiert (1). Im Tiermodell zeigten *BGN*<sup>-/-</sup>-Knock-out-Mäuse nach Infarkt eine erhöhte Mortalität und ungeordnete Kollagenfasergeflechte im Narbenbereich. BGN trägt also nicht nur zur Narbenbildung in der direkten Infarktzone bei, sondern ist auch für das kardiale Remodeling in nicht-ischämischen Arealen von Bedeutung. Die Induktion von BGN erfolgt in neonatalen kardialen Fibroblasten über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor durch autokrine Freisetzung von TGF- $\beta$  und kann durch AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden (91). Zudem wird postuliert, dass BGN Einfluss auf das Wachstum verschiedener Zelltypen hat, indem es die Verfügbarkeit und Funktion von Wachstumsfaktoren, z.B. durch Bindung von TGF- $\beta$ , beeinflusst (43, 76, 80).

Eine Beteiligung von BGN an der Arterioskleroseentstehung wird zudem dadurch wahrscheinlich, dass seine Überexpression in vaskulären glatten Muskelzellen zur Lipoproteinretention in der EZM führt (62, 63). In Gefäßen mit Intimahyperplasie werden vermehrt Proteoglykane sezerniert. Sie binden und retinieren Apolipoprotein-B-enhaltende Lipoproteine in der Gefäßwand und beeinflussen das Wachstum verschiedener Zellreihen (11).

BGN ist also sowohl an frühen Phasen der Arterioskleroseentstehung (Lipoproteinretention) als auch am kardialen Remodeling bei chronischer Herzinsuffizienz beteiligt. Seine Funktionen in der Assemblierung der EZM, als proinflammatorischer Faktor und als bindendes Agens von Lipoproteinen in der Gefäßwand machen es zu einem wichtigen Kandidatengen der Arterioskleroseentwicklung und -Progression. Seine spatiotemporale Verfügbarkeit spielt hierbei eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es, genetische Varianten in der regulatorischen Region des BGN-Gens funktionell zu analysieren und zu charakterisieren.

## 4.2. Identifikation genetischer Varianten im *BGN*-Promotor

In der vorliegenden Arbeit wurden der Promotorbereich und die 5'UTR des humanen BGN-Gens in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie an Patienten nach MI gescreent. Dabei konnten vier Polymorphismen in der 5'-regulierenden Region (BGN-849, BGN-578, BGN-501, BGN-151) und einer in der 5'UTR (BGN+94) identifiziert werden. Bezogen auf die Positionen BGN-578, BGN-151 und BGN+94 wurden drei Haplotypen identifiziert.

Wie in allen eukaryontischen Genen erfolgt die Genexpression des BGN-Gens auf verschiedenen Kontrollebenen. Die erste entspricht der Assemblierung des Transkriptionsstart-Komplexes. Der *BGN*-Promotor besitzt weder eine TATA-Box, noch eine CAAT-Box. Er enthält einen hohen Guanin-/Cytosin-Anteil (Position -1 bis -164, 73%; Position -204 bis -256, 87%), multiple teils überlappende SP1-Bindungsstellen und nutzt variable Transkriptionsstart-Stellen (21, 92). Diese Merkmale teilt er mit mehreren *Housekeeping*-Genen, die konstitutiv exprimiert werden, sowie einigen wachstumsassoziierten Genen (86). Die Assoziation zum Wachstum und Differenzierung wird besonders im Skelettsystem deutlich: In fetalen Osteoblasten ist die *BGN*-Expression besonders hoch, in Chondrozyten sinkt sie mit zunehmendem Alter (71).

Die Genexpression wird desweiteren über die Bindung *trans*-aktiver Faktoren (Transkriptionsfaktoren) an *cis*-aktive DNA-Bereiche reguliert. In vorangegangenen Studien konnten bereits Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die Einfluss auf die Expression des BGN haben. Der *BGN*-Promotor enthält neben zahlreichen potentiellen SP1-, und AP2-Bindungsstellen auch Interleukin-6-responsive Elemente (IL-6RE). IL-6 ist ein Zytokin, das vor allem von Monozyten/Makrophagen und Epithelien sezerniert wird und an der Regulierung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Die IL-6RE-Konsensus-Sequenz 5'-CCGGGAA-3' ist an Position -144 bis -150 bp des *BGN*-Promotors lokalisiert und wurde ursprünglich als IL-6 responsives Element in den Promotoren verschiedener Akute-Phase-Proteine nachgewiesen (33). Untersuchungen von Schaefer et al (2005) führten zu der Erkenntnis, dass BGN unter Stimulation mit IL-6 und IL-1 $\beta$  von Makrophagen produziert und sezerniert wird. BGN wiederum induziert TNF- $\alpha$  und Macrophage inflammatory protein (MIP-2) über Toll-like Rezeptoren 2 und 4 und wirkt so als proinflammatorischer Faktor (81).

TGF- $\beta$ , ein Zytokin, welches die Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung reguliert, ist in der Lage, BGN dosisabhängig zu induzieren (34). Untersuchungen an Deletionskonstrukten identifizierten die ersten 218 bp stromaufwärts des Haupttranskriptionsstarts als TGF- $\beta$  responsive Region. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass TGF- $\beta$  über eine SP1-Bindungsstelle (Position -216 bis -208) die endogene *BGN*-Expression stimuliert.

cAMP ist ein universeller second-messenger. In Osteosarkom-Zellen (MG-63) wird die *BGN*-Expression durch Aktivierung des Protein-Kinase A-Signalwegs über cAMP um das 3.8-fache erhöht (93). Ungefroren et al konnten zeigen, dass in Leiomyosarkom-Zellen (SK-UT-1) sowohl die basale als auch die cAMP-stimulierte Transkription von BGN über die Bindung von SP1-like/Sp3-Proteinen reguliert wird. Der Bereich von -59 bis -49bp konnte hier als Bindungsstelle für SP1 identifiziert werden (94).

Die *BGN*-Expression wird mithin durch unterschiedliche Signaltransduktionswege adressiert und gesteuert, die eine Zusammenstellung gemeinsamer TF nutzen, wie z.B. SP1 (34, 94). Der *BGN*-Promotor zeigt viele zum Teil überlappende SP1-Bindungsstellen. Die Familie der Sp/Krüppel-Proteine umfaßt mehr als 20 Mitglieder. Sie werden ubiquitär exprimiert und binden über drei tandemartige Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> Zinkfinger-Motive an die DNA Konsensussequenzen 5'-GGCGGG-3' bzw.

5'-CACCC-3'. Der C-Terminus ist hochkonserviert, wohingegen der Aminoterminus variabel ist und sowohl transkriptionelle Aktivatorsequenzen als auch Repressorsequenzen enthalten kann.

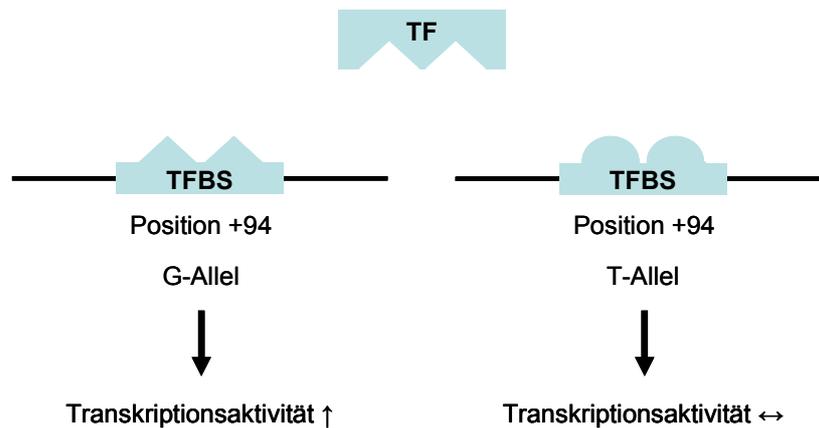
SP1 ist ein starker transkriptioneller Aktivator, der an seine glutaminreichen Aktivator-domänen am Aminoterminus Koaktivatoren wie TAFII130 (37) und CRSP (*cofactor required for SP1 activation*) rekrutieren kann (77). Der C-Terminus von SP1 interagiert hingegen z.B. mit dem Koaktivator p300. Hierdurch wird die Affinität der SP1-DNA-Bindungsdomäne zum Zielpromotor verstärkt (89). Phosphorylierung, Glycosilierung und Acetylierung beeinflussen die Aktivität und Stabilität von SP1 (46, 69), so dass Kinasen und Phosphatasen wie z.B. die Casein Kinase II (CKII) (4), PKC (64, 104), PKA (73), CyclinA/cdk2 (32), und PP2A (24), meist über die Modifikation der DNA-Bindung, die transkriptionelle Aktivität von SP1 regulieren.

Dieses Zusammenspiel transkriptioneller Module kann durch genetische Varianten beeinflusst werden, indem diese die Affinität der Konsensusstellen für ihren jeweiligen Bindungspartner verändern (16, 90).

Potentielle Effekte der jeweiligen genetischen Varianten im *BGN*-Promotor wurden im Rahmen dieser Arbeit durch transiente Transfektionsanalysen in eukaryonter Zellkultur unter verschiedenen Stimulationsbedingungen analysiert. HEK293T-Zellen exprimierten unter allen drei gewählten Stimulationsbedingungen (ohne Stimulation, cAMP, PMA) *BGN* und stellten sich daher als geeignete Zelllinie für unsere Untersuchungen dar. Als positive Kontrolle diente der pGL3-control-Vektor, der in allen Mammalia-Zellen eine hohe Expression zeigt und Aufschluss darüber gab, ob und wie effizient die Transfektion der Zellen funktioniert hatte. Der pGL3-promoter-Vektor wurde als Baselinekontrolle verwendet, um zu veranschaulichen, wie die transkriptionelle Aktivität des Plasmids durch die Inserts verändert wurde.

An Position +94 der 5'UTR führte der Basenaustausch von T nach G in HEK293T-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der transkriptionellen Aktivität. Dieser Effekt war Allel-, aber nicht stimulationsspezifisch. Der G-Allel-tragende Bereich wirkte unabhängig von Stimulationsbedingungen. Deletionsuntersuchungen von Ungefroren et al haben 1996 gezeigt, dass nach Subklonierung des Bereichs von +42 bis -46 in ein Promotor-freies Plasmid die Transkriptionsmaschinerie, wenn auch nur mit geringer Aktivität, assembliert und gestartet werden kann (92). Das von uns

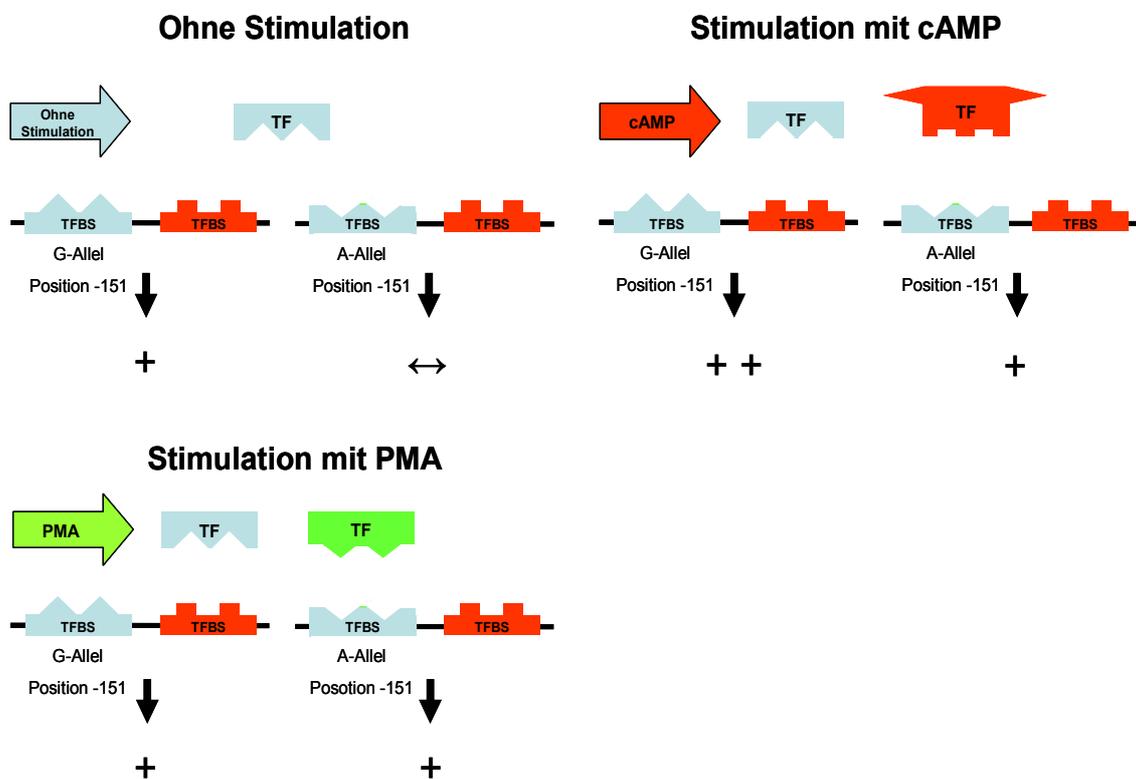
untersuchte Fragment in pPromBGN+94 (bp -41 bis +117) enthielt somit den Core-Promotor und einen Bereich distal des Haupttranskriptions-Starts. Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass Bereiche stromabwärts des Transkriptionsstarts in der 5'UTR durchaus an der Regulierung der Transkriptionsaktivität beteiligt sein können.



**Abbildung 45** Schematische Darstellung Position BGN+94. Mögliche Erklärung der Ergebnisse der Transfektions-Analysen. Wie die Abbildung zeigt, wird durch den Basenaustausch von G nach T die Konsensusregion eines Transkriptionsfaktors so verändert, dass er nicht mehr an dieser Sequenz binden kann und somit die transkriptionelle Aktivität nicht mehr beeinflussen kann. TFBS: *Transcription Factor Binding Site*, Transkriptionsfaktors: TF.

An Position -151 in der proximalen 5'-regulatorischen Region zeigte die Sequenz, die das G-Allel trug, unabhängig von der Stimulationsbedingung eine signifikant höhere Transkriptionsaktivität als der Baselinevektor. Für das A-Allel war die transkriptionelle Aktivität unter Stimulation mit cAMP und PMA erhöht, ohne Stimulation jedoch nicht. Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zwischen dem aktiveren G-Allel und dem A-Allel waren unter Basalbedingungen (ohne Stimulation) am deutlichsten, unter cAMP-Stimulation gering und unter Stimulation mit PMA nicht mehr signifikant ( $P=0.0837$ ) (Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Die Ergebnisse erlauben den Schluss, dass die Variante in der Nähe eines transkriptionellen *Enhancer*-Bereichs lokalisiert ist, der situationsspezifisch die Transkriptionsrate erhöhen kann. Diese stimulationsabhängige Aktivierung betraf beide Allele, eine Unterbindung der stimulationsdiktieren Effekte erfolgte somit nicht. Dies könnte durch die Existenz und Bindung eines transkriptionellen Moduls zweier oder mehrerer Faktoren an zwei

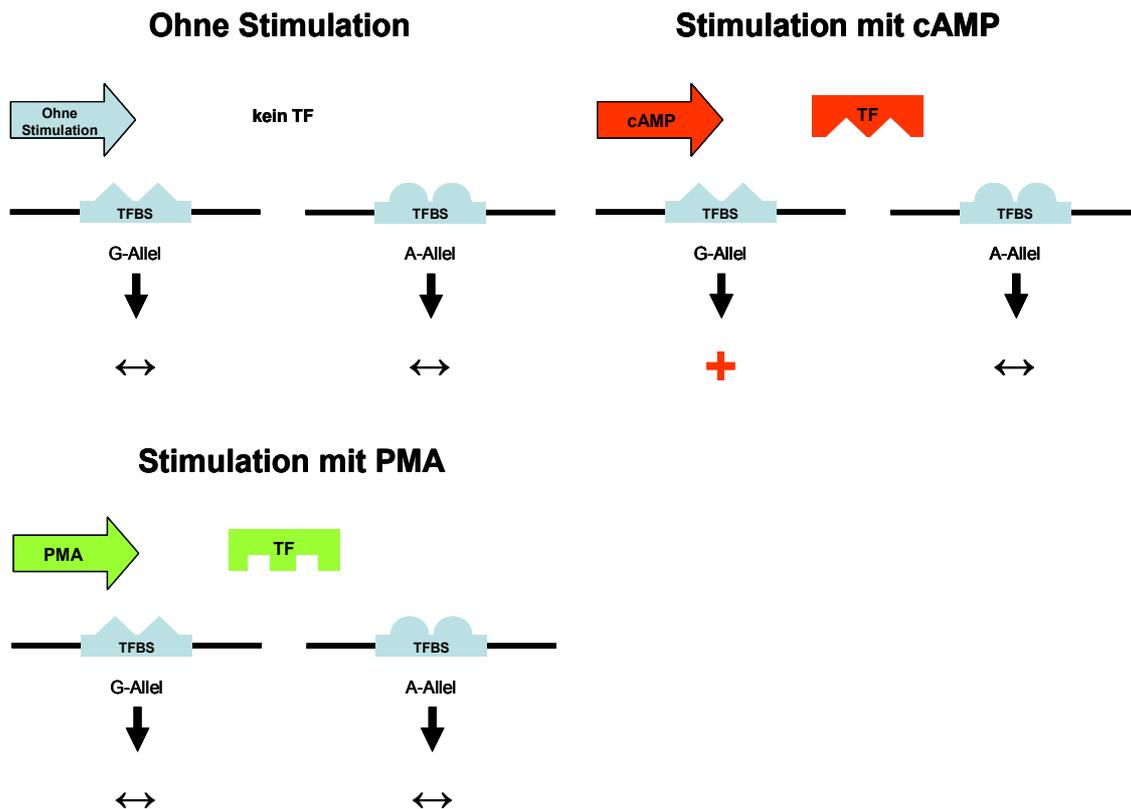
kooperierende TFBS erklärt werden. Basale Transkriptionsfaktoren, die auch ohne Stimulation auftreten, können nur an die Sequenz mit dem G-Allel binden, da ihre Konsensussequenz durch den Basenaustausch von G nach A verändert wurde. Eine benachbarte Bindungsstelle für TF, die unter Stimulation mit cAMP aktiv werden, wird von dem Basenaustausch nicht beeinflusst. Ohne Stimulation zeigt der Promotorbereich mit dem G-Allel an Position -151 daher eine höhere transkriptionelle Aktivität, unter Stimulation mit cAMP nimmt die transkriptionelle Aktivität beider Konstrukte zu. Unter Stimulation mit PMA treten neben den basalen TF stimulationsabhängige TF auf, welche an die Sequenz des A-Allel-tragenden Plasmids binden und dessen Aktivität erhöhen können. Die transkriptionelle Aktivität beider Plasmide wird erhöht.



**Abbildung 46** Mögliche Interaktionen von Transkriptionsfaktoren an Position -151 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Der untersuchte SNP (blaue TFBS, unterschiedliche Formen symbolisieren die Allele G und A) liegt in Nachbarschaft zu einer TFBS (rote TFBS), die cAMP-abhängig von einem TF gebunden wird. Sind die Zellen unstimuliert, so sind nur die basalen Transkriptionsfaktoren (blaue TF) vorhanden, die sequenzspezifisch an das G-Allel, nicht aber an das A-Allel binden können (oben links). Ein

Plus symbolisiert die Zunahme der transkriptionellen Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor, der Doppelpfeil symbolisiert, dass die transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor nicht erhöht war. Das G-Allel zeigt eine deutlich höhere Transkriptionsaktivität als das A-Allel. Unter Stimulation mit cAMP wird auch die benachbarte TFBS gebunden. Sie wird nicht von dem Basenaustausch an Position -151 beeinflusst. Die transkriptionelle Aktivität beider Allele ist erhöht. Die Stimulation mit cAMP bewirkte in Anwesenheit des G-Allels eine geringere Zunahme der transkriptionellen Aktivität im Vergleich zum unstimulierten Zustand. Der Unterschied in der transkriptionellen Aktivität beider Allele nahm ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die beiden TFBS (blau für den basalen Transkriptionsfaktor und rot für den Transkriptionsfaktor, der unter Stimulation mit cAMP auftritt) zusammen ein transkriptionelles Modul generieren. Die bindenden Faktoren können interagieren (hier als räumliche Interaktion symbolisiert), so dass sich die Effekte nicht einfach addieren lassen. Unter Stimulation mit PMA (unten links) treten neben den basalen TF weitere auf, die eine höhere Bindungsaffinität zu der A-Allel-tragenden Sequenz aufweisen. Da der basale TF (blau) nur an das G-Allel, der TF (grün), der unter Stimulation mit PMA auftritt, bevorzugt an das A-Allel bindet, wird die transkriptionelle Aktivität beider Plasmide erhöht.

Bei Transfektionsanalysen mit pPromBGN-G-578a in unstimulierten Zellen und PMA-stimulierten Zellen zeigten die beiden Allele keine signifikanten Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität. Unter Stimulation mit cAMP war jedoch eine deutlich höhere transkriptionelle Aktivität des G-Allels zu beobachten. Dies lässt den Schluss zu, dass der SNP in einem cAMP-abhängigen *Enhancer*-Bereich liegt und die Konsensussequenz eines cAMP-abhängigen TF verändert. Ohne Stimulation hat der Basenaustausch keine Auswirkung auf die transkriptionelle Aktivität. Durch Bindung von TF an die Promotorbereiche von Genen wird die spatiotemporale Verfügbarkeit der Gen-Produkte reguliert. Die Expressionrate wird auf diese Weise den äußeren Bedingungen des Organismus angepasst (Wachstum, Wundheilung etc.). Wird die Fähigkeit des Promotors, adäquat auf einen Stimulationsreiz hin die Expressionsrate des Gens zu erhöhen, durch einen SNP gestört, so ist die situationsabhängige Verfügbarkeit des Proteins nicht mehr gewährleistet. Im Falle von BGN könnte die verminderte Expression z.B. – wie im Tiermodell gezeigt (98)– nach MI zur insuffizienten Narbenbildung führen.



**Abbildung 47** Schematische Darstellung des Einflusses des Basenaustauschs BGN-G-578a. Die unterschiedlichen Formen der blauen TFBS symbolisieren die beiden Allele an Position -578. Ohne Stimulation war die transkriptionelle Aktivität beider Bereiche gleich (der Doppelpfeil symbolisiert, dass die transkriptionelle Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor nicht erhöht war). Unter Stimulation mit cAMP wurden TF aktiviert, die an das G-Allel, nicht aber an das A-Allel binden konnten. Die transkriptionelle Aktivität des G-Allels war unter Stimulation mit cAMP höher als die des A-Allels (das Plus symbolisiert die Zunahme der transkriptionellen Aktivität im Vergleich zum Baselinevektor). Anders als an Position +94 wurde dieser Unterschied im Bindungsverhalten erst unter Stimulationsbedingungen deutlich, da der TF wahrscheinlich sonst nicht auftrat.

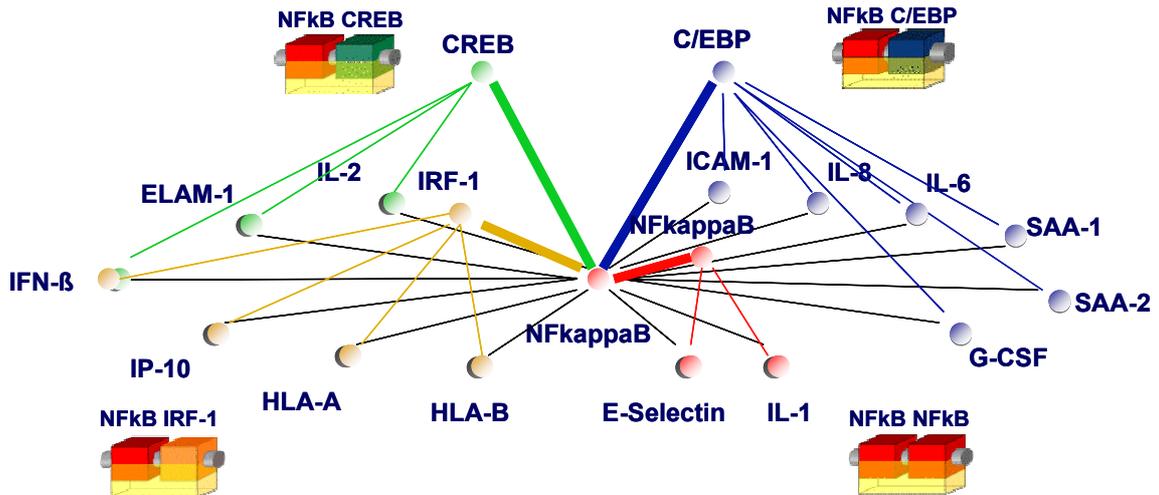
An Position -849 konnten keine Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität zwischen den Allelen festgestellt werden. Im Vergleich zum Baselinevektor zeigten die Inserts um den SNP in den Transfektionen jedoch eine deutlich erhöhte Luciferasegenaktivität. Diese war unter allen drei Stimulationsbedingungen nachzuweisen. Hieraus lässt sich ableiten, dass BGN-849 in einem transkriptionellen *Enhancer*-Bereich lokalisiert ist, der stimulationsunabhängig die Transkriptionsrate erhöht.

Transfektionsanalysen der molekularen Haplotypen verdeutlichten, dass die moderaten Veränderungen der einzelnen Einzelbasenaustausche (1.3 bis 2-fache Erhöhung der Transkriptionsaktivität) in Summe zu einer deutlichen Änderung der transkriptionellen Aktivität des Inserts führen. Unterschieden sich die Allele eines Einzelbasenaustauschs in der transkriptionellen Aktivität um das 1.3 bis 2-fache, so zeigten sich zwischen dem Haplotypen mit der höchsten und dem mit der niedrigsten Transkriptionsaktivität eine Erhöhung um das 5-fache. Die Haplotypen G/G/G und A/G/G zeigten in unseren Versuchen eine deutlich höhere Luciferasegenaktivität als der Haplotyp G/A/T. Die Bereiche um SNP -151 und +94 scheinen besondere Bedeutung für die Expressionsrate des nachgeschalteten Gens zu haben und die Einzelbasenaustausche von G nach A an Position -151 und G nach T an Position +94 vermindern die transkriptionelle Aktivität.

#### 4.3. BGN-Promotor-SNPs beeinflussen Protein-DNA-Interaktionen

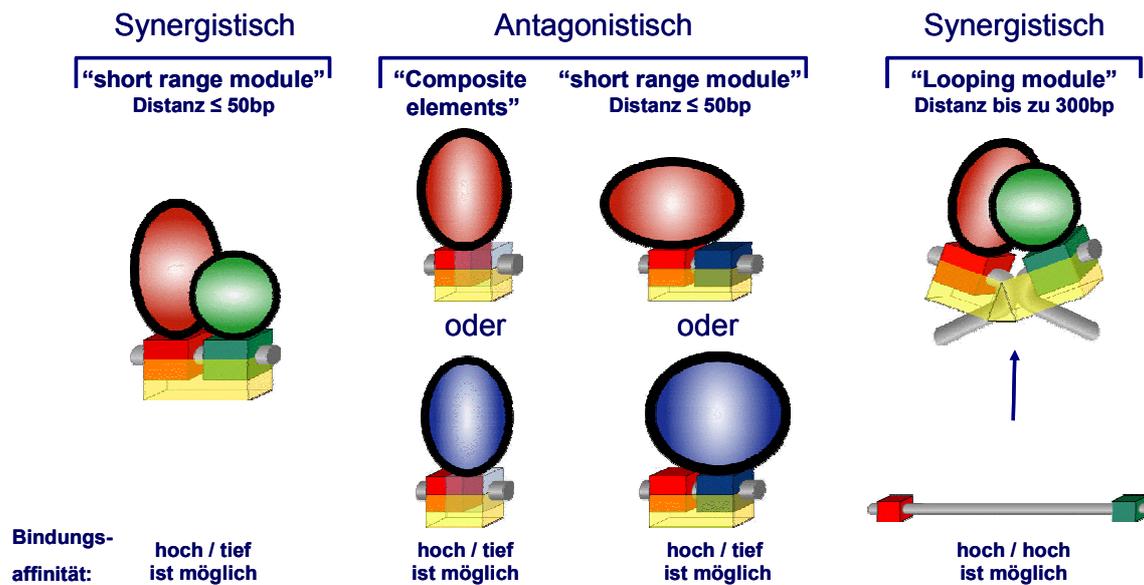
Wie wir in unseren Untersuchungen gezeigt haben, beeinflussen genetische Varianten in TFBS die Bindungsaffinität des zugehörigen TF. Kernproteine aus HEK293T-Zellen gingen eine spezifische Interaktion mit der DNA-Sequenz um den SNP BGN+94 ein. Das G-Allel zeigte dabei eine höhere Bindungsaffinität zu den Proteinen als das T-Allel. Ein Basenaustausch von T nach G an Position +94 führt also nicht nur, wie von uns gezeigt, zu einer gesteigerten Transkriptionsaktivität, sondern auch zu einer stärkeren Proteinbindung. Die *Insilico*-Analyse der Sequenz um BGN+94 ergab eine zusätzliche potentielle Bindungsstelle für SP1 für das BGN+94G-Allel. Die erhöhte transkriptionelle Aktivität könnte also durch den aktivierenden Einfluss von SP1 zu erklären sein. Unter allen Stimulationsbedingungen konnte SP1 in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Um zu beweisen, dass der Basenaustausch an Position +94 eine Änderung der SP1-Bindungsaffinität zur Folge hat, sollte SP1 durch Super-Shift-Analysen nachgewiesen werden.

Die transkriptionelle Aktivität eines Gens wird aber nicht nur von einem einzelnen TF, sondern von der Gesamtheit der an seinen Promotor gebundenen Faktoren bestimmt. Ihre Zusammensetzung wird sowohl durch den proteomischen als auch genomischen Kontext des Gens bestimmt. TF agieren dabei als transkriptionelle Module. Sie interagieren und beeinflussen sich in der DNA-Bindung und Aktivität gegenseitig.



**Abbildung 48** Transkriptionelle Module bestimmen situationspezifisch das genetische Expressionsmuster einer Zelle. Die Abbildung zeigt, dass die Zielgene des TF NFκB über verschiedene Regulationspfade durch unterschiedliche Interaktionspartner (Module) reguliert werden. NFκB: CREB (grüne Linien), IRF-1 (braune Linien), C/EBP (blaue Linien), NFκB (schwarze Linien).

Das kleinste Modul besteht aus zwei TF, es sind jedoch auch größere Module beschrieben worden (90). Die TF können synergistisch oder antagonistisch zusammenwirken (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49** Interaktionsmöglichkeiten in transkriptionellen Modulen. In einem „short range module“ liegen zwei TFBS nahe beieinander ( $\leq 50$  bp) (links). Die bindenden TF (hier roter und grüner Kreis) beeinflussen gegenseitig ihre Bindungsaffinität zur entsprechenden TFBS. Die Affinität der TF kann hoch oder niedrig sein. Bei antagonistisch wirkenden Modulen unterscheidet man solche, deren TFBS sich teilweise entsprechen (*Composite elements*) und solche, die als „short-range module“ bis zu 50 bp voneinander entfernt liegen. Durch sterische Effekte kann der jeweils andere TF von seiner Bindungsstelle „verdrängt“ werden (mitte). In „Looping modules“ werden die TFBS durch Loop-Bildung der DNA einander angenähert und erhöhen gegenseitig ihre Bindungsaffinität zur entsprechenden Bindungsstelle (rechts). Sie liegen bis zu 300 bp voneinander entfernt.

Der proteomische Kontext bestimmt, welche Module die Zelle zu bilden vermag (welche TF sind vorhanden). Die Bedeutung des genomischen Kontextes hingegen wird anschaulich, wenn ein chromosomaler Abschnitt in eine veränderte chromosomale Umgebung transloziert wird (Bsp. Burkitt-Lymphom). Obwohl das eigentliche Gen durch die Translokation nicht verändert wurde, kann seine Expressionsrate deutlich beeinflusst werden. Probleme computergestützter Analysen auf potentielle TFBS sind, dass sie weder den physiologischen Zustand der Zelle, noch den genomischen Kontext erfassen können. Sie geben also nur einen Hinweis auf physikalisch bestehende TFBS, lassen aber keine Aussage über ihre Funktionalität zu. Durch Untersuchung molekularer Haplotypen kann zumindest ein Teil des Einflusses des genomischen Kontextes untersucht werden.

## 5. Ausblick

Die genetische Prädisposition für die Entwicklung einer Erkrankung wird durch funktionelle genetische Varianten mitbestimmt. CVD gehören wie die essentielle Hypertonie und der Typ II Diabetes mellitus zu den komplex (polygen) determinierten Erkrankungen, die aus einem komplexen Zusammenspiel zwischen Umwelt- und genetischen Faktoren entstehen.

Neue Technologien wie genomweite Assoziationsstudien erlauben die Untersuchung großer Studienkohorten und leisten einen interessanten Beitrag zur Erforschung genetischer Krankheitsprädisposition, weil hier – durch hypothesenfreie Ansätze – neue unerwartete Krankheits-Loci identifiziert werden können. Aussagen über die funktionellen Aspekte der genetischen Varianten können sie jedoch nicht treffen. Eine funktionelle Analyse der identifizierten SNPs ist also geradezu indiziert und unerlässlich.

Nur 3% des humanen Genoms kodierenden für ein Protein, während die restlichen 97% aus intergener DNA und Introns bestehen. Anders als lange angenommen, sind diese Bereiche nicht funktionslose *Junk*-DNA (Müll-DNA), sondern sie übernehmen wichtige regulatorische Aufgaben, um die zeitlich und situativ angepasste Expression zu gewährleisten. Die einzelnen Basen in TFBS haben anders als in kodierenden DNA-Sequenzen unterschiedliche Bedeutung und Relevanz. Eine genetische Variante im regulatorischen Bereich führt oftmals eher zu einer Änderung der Affinität des zugehörigen TF, als dass die Bindung vollständig ausbleibt.

Wie oben bereits beschrieben, kommen TF nicht alleine vor, sondern interagieren in transkriptionellen Modulen. Sie werden von ihrem genomischen und proteomischen Kontext beeinflusst. Auch unsere Untersuchungen zeigten, dass die *BGN*-Expression sowohl von der gewählten Zelllinie, als auch den Stimulationsbedingungen, also dem proteomischen Kontext (Enzymausstattung der Zelle, stimulationsabhängige TF) abhängig war. Um dem genomischen Einfluss zumindest in Ansätzen Rechnung zu tragen, sollte ein einzelner SNP und seine umgebene Region nicht isoliert betrachtet werden, sondern in ihrem genomischen Kontext. Wie die Analyse der möglichen Haplotypen in unserer Kohorte zeigen konnte, kamen an den Positionen +94, -151 und -578 nur drei MolHaps vor. Zeigte jeder einzelne Basenaustausch im *BGN*-Promotor auch nur einen moderaten Effekt auf die Transkriptionsaktivität, so resultierte durch Kombination dieser Bereiche eine starke Änderung der transkriptionellen Aktivität für den entsprechenden Haplotyp (genomischer Kontext).

BGN ist ein zentrales Kandidatengen in der Arterioskleroseentwicklung, insbesondere unter Einbeziehung neuer Erkenntnisse über die Schlüsselstellung der EZM in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle Bereiche des Promotors identifiziert, die für dessen transkriptionelle Aktivität verantwortlich sind. Wir konnten zeigen, dass genetische Varianten in diesen Bereichen die transkriptionelle Aktivität des gesamten Promotors grundlegend beeinflussen. Die Untersuchung molekularer Haplotypen machte das Zusammenspiel verschiedener TF in transkriptionellen Modulen deutlich.

Wir haben hiermit den Grundstein gelegt, um in Zukunft die funktionellen Änderungen im Promotorbereich (in vitro) durch Genotypisierung größerer Studienpopulationen mit klinischen Manifestationen zu verknüpfen (9).

Ein weiterer Schritt wäre, BGN in arteriosklerotischen Plaques immunhistochemisch und auf Transkriptionsebene nachzuweisen und die identifizierten Genotypen mit molekularen Phänotypen zu assoziieren. Dieser Schritt ist in soweit vorbereitet, als dass in einem gemeinsamen Projekt mit der Klinik für Neurologie (Universitätsklinikum Münster) mit dem Titel „Erstellung einer Gewebesammlung atherosklerotischer Karotisplaques zur Analyse varianter Expression kardiovaskulärer Kandidatengene in situ“ offiziell begonnen wurde.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahmed MS, Oie E, Vinge LE, Yndestad A, Andersen GG, Andersson Y, Attramadal T, Attramadal H (2003) Induction of myocardial biglycan in heart failure in rats--an extracellular matrix component targeted by AT(1) receptor antagonism. *Cardiovasc Res* 60: 557-568
2. Amorino GP, Hoover RL (1998) Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol* 152: 199-207
3. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB (1991) An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* 83: 356-362
4. Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW, Mueller CR (1997) Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 272: 13489-13495
5. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523
6. Bolli P, Hemmelgarn B, Myers MG, McKay D, Tremblay G, Tobe SW (2007) High normal blood pressure and prehypertension: the debate continues. *Can J Cardiol* 23: 581-583
7. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394: 894-897
8. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998) Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 97: 1382-1391
9. Brand-Herrmann SM (2008) Where do we go for atherothrombotic disease genetics? *Stroke* 39: 1070-1075
10. Cambien F, Poirier O, Nicaud V, Herrmann SM, Mallet C, Ricard S, Behague I, Hallet V, Blanc H, Loukaci V *et al* (1999) Sequence diversity in 36 candidate genes for cardiovascular disorders. *Am J Hum Genet* 65: 183-191
11. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G (1998) Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139: 205-222

12. Campbell PH, Hunt DL, Jones Y, Harwood F, Amiel D, Omens JH, McCulloch AD (2008) Effects of biglycan deficiency on myocardial infarct structure and mechanics. *Mol Cell Biomech* 5: 27-35
13. Collins T, Cybulsky MI (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107: 255-264
14. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U *et al* (2003) Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24: 987-1003
15. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251: 788-791
16. Dordelmann C, Telgmann R, Brand E, Hagedorn C, Schroer B, Hasenkamp S, Baumgart P, Kleine-Katthofer P, Paul M, Brand-Herrmann SM (2008) Functional and structural profiling of the human thrombopoietin gene promoter. *J Biol Chem* 283: 24382-24391
17. Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H (2006) Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7: 2388-2393
18. ESH (2003) 2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21: 1011-1053
19. Fischer JW (2007) Die Extrazelluläre Matrix. *MedReport* 2: 7
20. Fisher LW, Termine JD, Young MF (1989) Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 264: 4571-4576
21. Fisher LW, Heegaard AM, Vetter U, Vogel W, Just W, Termine JD, Young MF (1991) Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266: 14371-14377
22. Franco V, Oparil S (2006) Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. *J Am Coll Nutr* 25: 247S-255S
23. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM *et al* (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861

24. Garcia A, Cereghini S, Sontag E (2000) Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters. *J Biol Chem* 275: 9385-9389
25. Gospodarowicz D, III C (1980) Extracellular matrix and control of proliferation of vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 65: 1351-1364
26. Grabe N (2002) AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2: S1-15
27. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B *et al* (2007) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Atherosclerosis* 194: 1-45
28. Graw J: *Genetik. Volume 4*: Springer-Verlag; 2006.
29. GSC (1999) 1999 World Health Organization--International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Sub-Committee. *Blood Press Suppl* 1: 9-43
30. Guttmacher AE, Collins FS (2005) Realizing the promise of genomics in biomedical research. *Jama* 294: 1399-1402
31. Haeseler Av: *Molekulare Evolution*: Fischer Taschenbuchverlag; 2003.
32. Haidweiger E, Novy M, Rotheneder H (2001) Modulation of Sp1 activity by a cyclin A/CDK complex. *J Mol Biol* 306: 201-212
33. Hattori M, Abraham LJ, Northemann W, Fey GH (1990) Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat alpha 2-macroglobulin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2364-2368
34. Heegaard AM, Xie Z, Young MF, Nielsen KL (2004) Transforming growth factor beta stimulation of biglycan gene expression is potentially mediated by sp1 binding factors. *J Cell Biochem* 93: 463-475
35. Herrmann S, Paul M (2001) The genetics of coronary heart disease. *Eur J Intern Med* 12: 2-10
36. Herrmann SM, Paul M (2002) Studying genotype-phenotype relationships: cardiovascular disease as an example. *J Mol Med* 80: 282-289
37. Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R (1993) Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72: 247-260

38. Hurt-Camejo E, Camejo G, Rosengren B, Lopez F, Ahlstrom C, Fager G, Bondjers G (1992) Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipoprotein oxidation and its uptake by human macrophages and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 12: 569-583
39. Hurt E, Bondjers G, Camejo G (1990) Interaction of LDL with human arterial proteoglycans stimulates its uptake by human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res* 31: 443-454
40. Immenschuh S, Nagae Y, Satoh H, Baumann H, Muller-Eberhard U (1994) The rat and human hemopexin genes contain an identical interleukin-6 response element that is not a target of CAAT enhancer-binding protein isoforms. *J Biol Chem* 269: 12654-12661
41. International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*: 431:931-945.
42. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. (2005) *Nature* 437: 1299-1320
43. Iozzo RV (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 141-174
44. Jarvelainen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandell LJ (1991) Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, PG-I/biglycan and PG-II/decorin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *J Biol Chem* 266: 23274-23281
45. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, Cybulsky MI (2006) Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J Exp Med* 203: 2073-2083
46. Kavurma MM, Santiago FS, Bonfoco E, Khachigian LM (2001) Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular FasL-Fas engagement. *J Biol Chem* 276: 4964-4971
47. Kee F, Morrison C, Evans AE, McCrum E, McMaster D, Dallongeville J, Nicaud V, Poirier O, Cambien F (2000) Polymorphisms of the P-selectin gene and risk of myocardial infarction in men and women in the ECTIM extension study. *Etude cas-temoin de l'infarctus myocarde*. *Heart* 84: 548-552
48. Kresse H, Schonherr E (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol* 189: 266-274

49. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
50. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A (2008) Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 371: 1513-1518
51. Leitschuh M, Cupples LA, Kannel W, Gagnon D, Chobanian A (1991) High-normal blood pressure progression to hypertension in the Framingham Heart Study. *Hypertension* 17: 22-27
52. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 197-204
53. Libby P (2002) Inflammation in Atherosclerosis. *Nature* 420: 7
54. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, Vermeire S, Dewit O, de Vos M, Dixon A *et al* (2007) Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 3: e58
55. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367: 1747-1757
56. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U (1994) Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 330: 1041-1046
57. Maston GA, Evans SK, Green MR (2006) Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7: 29-59
58. McBride OW, Fisher LW, Young MF (1990) Localization of PGI (biglycan, BGN) and PGII (decorin, DCN, PG-40) genes on human chromosomes Xq13-qter and 12q, respectively. *Genomics* 6: 219-225
59. Middeke M: *Arterielle Hypertonie. Volume 1*: Thieme; 2005.
60. Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB (1990) Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am Heart J* 120: 963-969
61. Nagler A, Miao HQ, Aingorn H, Pines M, Genina O, Vlodaysky I (1997) Inhibition of collagen synthesis, smooth muscle cell proliferation, and injury-induced intimal hyperplasia by halofuginone. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 194-202

62. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A (1998) Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* 98: 519-527
63. O'Brien KD, Lewis K, Fischer JW, Johnson P, Hwang JY, Knopp EA, Kinsella MG, Barrett PH, Chait A, Wight TN (2004) Smooth muscle cell biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 177: 29-35
64. Osaki F, Ikeda Y, Suehiro T, Ota K, Tsuzura S, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K (2004) Roles of Sp1 and protein kinase C in regulation of human serum paraoxonase 1 (PON1) gene transcription in HepG2 cells. *Atherosclerosis* 176: 279-287
65. Packard RR, Libby P (2008) Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54: 24-38
66. Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, Cambou JP, Amouyel P, Bingham A, McMaster D, Schaffer P, Douste-Blazy P, Luc G *et al* (1992) A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 12: 701-707
67. Pearson TA, Manolio TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *Jama* 299: 1335-1344
68. Pogany G, Hernandez DJ, Vogel KG (1994) The in vitro interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys* 313: 102-111
69. Rafty LA, Khachigian LM (2001) Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C-zeta. *Nucleic Acids Res* 29: 1027-1033
70. Rickenbacher P (2001) Herzinsuffizienz: Epidemiologie, Pathophysiologie. *Swiss Medical Forum* 1: 4-9
71. Rigaud AS, Forette B (2001) Hypertension in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: M217-225
72. Rittenhouse J, Marcus F (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal Biochem* 138: 442-448

73. Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI (1997) Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272: 21137-21141
74. Roses AD (2000) Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet* 355: 1358-1361
75. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 86: 675-684
76. Ruoslahti E, Yamaguchi Y (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64: 867-869
77. Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R (1999) The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397: 446-450
78. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687-695
79. SBD (2008) Herz-/Kreislaufkrankungen weiterhin häufigste Todesursache. Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung 303
80. Schaefer L, Beck KF, Raslik I, Walpen S, Mihalik D, Micegova M, Macakova K, Schonherr E, Seidler DG, Varga G *et al* (2003) Biglycan, a nitric oxide-regulated gene, affects adhesion, growth, and survival of mesangial cells. *J Biol Chem* 278: 26227-26237
81. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Young MF, Mihalik D, Gotte M *et al* (2005) The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 115: 2223-2233
82. Schnall PL, Pieper C, Schwartz JE, Karasek RA, Schlusser Y, Devereux RB, Ganau A, Alderman M, Warren K, Pickering TG (1990) The relationship between 'job strain,' workplace diastolic blood pressure, and left ventricular mass index. Results of a case-control study. *Jama* 263: 1929-1935
83. Schonherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, Robenek H, Rauterberg J, Kresse H (1995) Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 270: 2776-2783
84. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17: 6419

85. Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, Friedman N (2003) Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet* 34: 166-176
86. Sehgal A, Patil N, Chao M (1988) A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol* 8: 3160-3167
87. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S *et al* (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881-885
88. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G *et al* (2004) A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6062-6067
89. Suzuki T, Kimura A, Nagai R, Horikoshi M (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells* 5: 29-41
90. Telgmann R, Dordelmann C, Brand E, Nicaud V, Hagedorn C, Pavenstadt H, Cambien F, Tiret L, Paul M, Brand-Herrmann SM (2008) Molecular genetic analysis of a human insulin-like growth factor 1 promoter P1 variation. *Faseb J*
91. Tiede K, Stoter K, Petrik C, Chen WB, Ungefroren H, Kruse ML, Stoll M, Unger T, Fischer JW (2003) Angiotensin II AT(1)-receptor induces biglycan in neonatal cardiac fibroblasts via autocrine release of TGFbeta in vitro. *Cardiovasc Res* 60: 538-546
92. Ungefroren H, Krull NB (1996) Transcriptional regulation of the human biglycan gene. *J Biol Chem* 271: 15787-15795
93. Ungefroren H, Cikos T, Krull NB, Kalthoff H (1997) Biglycan gene promoter activity in osteosarcoma cells is regulated by cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 413-417
94. Ungefroren H, Gellersen B, Krull NB, Kalthoff H (1998) Biglycan gene expression in the human leiomyosarcoma cell line SK-UT-1. Basal and protein kinase A-induced transcription involves binding of Sp1-like/Sp3 proteins in the proximal promoter region. *J Biol Chem* 273: 29230-29240
95. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D (2001) Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet* 358: 1682-1686

96. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA *et al* (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
97. Wellcome Trust Case Control Consortium (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678
98. Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L, Lullmann-Rauch R, Lettau O, Jacoby C, Schrader J *et al* (2008) Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 117: 1269-1276
99. WHO (2008) The top 10 causes of death (2004). Fact Sheet No 310
100. Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, Timpl R, Morgelin M (2002) Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem* 277: 49120-49126
101. Williams KJ, Tabas I (1998) The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol* 9: 471-474
102. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodriguez-Artalejo F *et al* (2003) Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *Jama* 289: 2363-2369
103. Yamamoto K, Kusachi S, Ninomiya Y, Murakami M, Doi M, Takeda K, Shinji T, Higashi T, Koide N, Tsuji T (1998) Increase in the expression of biglycan mRNA expression Co-localized closely with that of type I collagen mRNA in the infarct zone after experimentally-induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1749-1756
104. You HL, Eng HL, Hsu SF, Chen CM, Ye TC, Liao WT, Huang MY, Baer R, Cheng JT (2007) A PKC-Sp1 signaling pathway induces early differentiation of human keratinocytes through upregulation of TSG101. *Cell Signal* 19: 1201-1211

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD).....	4
Abbildung 2	Blutdrucknormwerte.....	5
Abbildung 3	Hypertonieprävalenz in Europa und Nordamerika .....	6
Abbildung 4	Änderung des Blutdrucks mit dem Alter.....	6
Abbildung 5	Mononukleäre Phagozyten bei der Arterioskleroseentstehung.....	9
Abbildung 6	Ratiostruktur des menschlichen Genoms .....	15
Abbildung 7	Kontrollebenen der eukaryontischen Transkription.....	16
Abbildung 8	Schematische Darstellung einer genregulatorischen Region .....	18
Abbildung 9	EZM und Arteriosklerose. ....	19
Abbildung 10	Aufbau des BGN-Gens.....	22
Abbildung 11	pGEM1 1zf(-)-Vektor. ....	39
Abbildung 12	pGL3-promoter Vektor.....	40
Abbildung 13	pGL3-Basic Vektor. ....	42
Abbildung 14	Diagnostischer Verdau zur Identifikation der Inserts. ....	43
Abbildung 15	Exemplarische Darstellung einer SSCP-Analyse .....	53
Abbildung 16	Sequenzierung BGN_prom 4 .....	53
Abbildung 17	SNPs in der 5'-regulatorischen Region und der 5'UTR des humanen BGN-Gens .....	55
Abbildung 18	Das humane BGN-Gen. ....	56
Abbildung 19	Haplotypanalyse.....	58
Abbildung 20	Endogene <i>BGN</i> -Expression .....	59
Abbildung 21	Herstellung der Reportergenkonstrukte.....	60
Abbildung 22	Transiente Transfektion von BGN-G+94t ohne Stimulation.....	62
Abbildung 23	Transiente Transfektion von pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit cAMP.....	63
Abbildung 24	Transiente Transfektion von pPromBGN-G+94t unter Stimulation mit PMA. ....	64
Abbildung 25	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a ohne Stimulation. ....	65
Abbildung 26	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit cAMP.....	66
Abbildung 27	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-151a unter Stimulation mit PMA. ....	67
Abbildung 28	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a ohne Stimulation. ....	68
Abbildung 29	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit cAMP.....	69
Abbildung 30	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-578a unter Stimulation mit PMA .....	70
Abbildung 31	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-849a ohne Stimulation. ....	71
Abbildung 32	Transiente Transfektion von pPromBGN-849G/A unter Stimulation mit cAMP. ....	72
Abbildung 33	Transiente Transfektion von pPromBGN-G-849a unter Stimulation mit PMA. ....	73
Abbildung 34	Transiente Transfektion der MolHaps ohne Stimulation.....	74
Abbildung 35	Transiente Transfektion der MolHaps unter Stimulation mit cAMP .....	75
Abbildung 36	Transiente Transfektion der MolHaps unter Stimulation mit PMA .....	76
Abbildung 37	Alibaba-Analyse BGN-G+94t.....	77
Abbildung 38	Alibaba-Analyse BGN-G-151a.....	78
Abbildung 39	Alibaba-Analyse BGN-C-501a.....	78
Abbildung 40	Alibaba-Analyse BGN-G-578a.....	79
Abbildung 41	Alibaba-Analyse BGN-G-849a.....	79

Abbildung 42	EMSA BGN+94G in HEK293T-Zellen .....	81
Abbildung 43	EMSA BGN+94T in HEK293T-Zellen .....	82
Abbildung 44	Western Blot zum Nachweise der SP1-Expression in HEK293T-Zellen.....	83
Abbildung 45	Schematische Darstellung Position BGN+94 .....	88
Abbildung 46	Mögliche Interaktionen von Transkriptionsfaktoren an Position -151 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen.....	89
Abbildung 47	Schematische Darstellung des Einflusses des Basenaustauschs BGN-G-578a.....	91
Abbildung 48	Transkriptionelle Module bestimmen situationsspezifisch das genetische Expressionsmuster einer Zelle. ....	93
Abbildung 49	Interaktionsmöglichkeiten in transkriptionellen Modulen .....	94

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Standard-PCR-Programm .....	33
Tabelle 2	Primer und PCR-Bedingungen für den <i>BGN</i> -Promotor .....	34
Tabelle 3	Ankerprimer zur Amplifizierung der DNA-Fragmente .....	38
Tabelle 4	Oligonukleotidesequenzen für die EMSAs .....	48
Tabelle 5	Pipettierschema für die EMSAs. ....	49
Tabelle 6	Bezeichnungen, Sequenzen, Lage und zugehörige rs-Nummern der identifizierten SNPs. ....	54
Tabelle 7	Lokalisation der SNPs .....	55
Tabelle 8	SNP-Verteilung bei 96 Hochrisikopatienten für MI .....	57
Tabelle 9	Häufigkeitsverteilung der Allele in den untersuchten Patienten .....	58

## 9. Lebenslauf

## Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan-Martin Brand, für die Überlassung des interessanten Themas, die Einbindung in die Arbeitsgruppe und fortwährende Unterstützung bei der Dissertation. Durch regelmäßige Fortbildung, unter anderem auch in Paris, hat er mir ermöglicht, meine wissenschaftlichen Kenntnisse auszubauen und mir verschiedene molekularbiologische Fertigkeiten anzueignen.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Dr. Ralph Telgmann, der mich mit viel Geduld in die Labormethoden eingearbeitet hat und nicht nur in fachspezifischen, sondern auch in privaten Gesprächen immer wieder meine Begeisterung für molekulargenetische Fragestellungen wecken konnte. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Brand-Herrmann und Brand, besonders Frau Dr. Claudia Hagedorn, Frau Dr. Sandra Hasenkamp und Frau Dr. Corinna Dördelmann, die mir mit ihren Erfahrungen und ihrer konstruktiven Kritik immer tatkräftig zur Seite standen.

Auch geht mein Dank an meinen Freund, Peter Brockamp, der mich stets ermutigte, weiter zu machen und verständnisvoll immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Besonders möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich während des Medizinstudiums und der Doktorarbeit nicht nur finanziell unterstützten, sondern mir immer den Rücken stärkten und für mich da waren. Ihnen widme ich diese Arbeit.