

Aus der
Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. J. Eulert

Klonierung der cDNA des Protein A Kinase-Adaptor-Proteins-2
und Untersuchungen zur Regulation seiner mRNA in humanen fötalen Osteoblasten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Sonja Reichel
aus Weißenburg/Bay.

Würzburg, Dezember 2001

Referent: Prof. Dr. med. F. Jakob

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. E. Blind

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2002

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Das Organ Knochen	1
1.2	Zellen im Organ Knochen und ihre Entwicklung	2
1.3	TNF α , Herkunft und Bedeutung	4
1.4	Signaltransduktionswege	5
1.5	TNF- Rezeptor	8
	Die Familie der Ankerproteine der Proteinkinase A	9
1.7	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Zellkultur	14
2.2.2	RNA-Analyse	14
2.2.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA	14
2.2.2.2	Denaturierende Gelelektrophorese	15
2.2.2.3	Diffusionsblot (Northernblot)	16
2.2.2.4	Herstellung von DNA-Sonden für die Hybridisierung der Blots	16
2.2.2.5	Markierung der DNA-Sonden	17
2.2.2.6	Hybridisierung	17
2.2.3	Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2 mit Hilfe einer cDNA-Bank	18
2.2.3.1	Untersuchung von cDNA-Bänken (Arrayfilter)	18
2.2.3.2	Bakterienkultur	19
2.2.3.3	Miniplasmidpräparation der Klone	19
2.2.3.4	Restriktionsverdau der Plasmide	20
2.2.3.5	Southernblot	20
2.2.3.6	Maxiplasmidpräparation	21
2.2.4	Synthese einer cDNA von AKAP-2 (5'RACE)	21
2.2.5	Sequenzierung von cDNA	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Gewinnung der vollständigen Sequenz der cDNA von AKAP-2	23
3.1.1	Screening von Datenbänken	23
3.1.2	Screening von cDNA-Bänken	23
3.1.3	Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2 durch genspezifische reverse Transkription	25
3.2	Regulation der mRNA-Expression von AKAP-2	27
3.2.1	Untersuchungen mit TNF α	28
3.2.1.1	TNF α -Kinetik	28
3.2.1.2	Kobehandlung mit TNF α und Actinomycin D bzw. Cycloheximid	29

3.2.1.3	Kobehandlung mit TNF α und Hemmstoffen der Phosphatidylkinase, der Diacylglycerolkinase und der Wirkung von NF κ B	30
3.2.1.4	Kobehandlung mit TNF α und Inhibitoren der Proteinkinase C	30
3.2.2	Untersuchungen mit TPA	32
3.2.2.1	TPA-Kinetik	32
3.2.2.2	Kobehandlung mit TPA und Actinomycin D bzw. Cycloheximid	33
3.2.2.3	Kobehandlung mit TPA und Hemmstoffen der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der Diacylglycerolkinase und der Wirkung von NF κ B	34
3.2.2.4	Kobehandlung mit TPA und Hemmstoffen der Proteinkinase C	34
3.2.3	Untersuchungen der Regulation der mRNA von AKAP2 mit weiteren Faktoren	36
3.2.3.1	Untersuchungen mit Calciumionophore	36
3.2.3.2	Untersuchungen im Signaltransduktionsweg mit cAMP	36
3.2.3.3	Stimulationsversuche mit verschiedenen Zytokinen Wachstumsfaktoren, Vitamin D und Dexamethason	36
3.2.4	Expression von AKAP-2 in anderen Zelllinien	38
4	Diskussion	39
4.1	Humane fötale Osteoblasten hFOB 1.19 als Modellsystem	39
4.2	Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2	40
4.3	Charakterisierung der Regulation der mRNA von AKAP-2	41
4.3.1	Regulation der mRNA von AKAP-2 durch Vitamin D	41
4.3.2	Wirkung von TNF α auf die Expression der mRNA von AKAP-2	42
4.3.3	Signaltransduktionsweg von TNF α im Zusammenhang mit der Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2	44
4.3.3.1	TNF α und NF κ B	44
4.3.3.2	TNF α und Phosphatidylinositol 3-Kinase	46
4.3.3.3	TNF α und PKC	47
4.3.4	Wirkung von TPA auf die Expression der mRNA von AKAP-2	48
4.3.5	Signaltransduktionsweg von TPA im Zusammenhang mit der Regulation der Expression der mRNA von AKAP-249	
4.3.5.1	TPA und NF κ B	49
4.3.5.2	TPA und Phosphatidylinositol 3-Kinase	50
4.3.5.3	TPA und PKC	51
4.3.6	Expression der mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen und Inositoltriphosphat	51
4.3.7	Expression der mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen und cAMP	52
4.4	Weitere Zytokine und Hormone und die Induktion der mRNA von AKAP-2	53
4.5	Expression der mRNA von AKAP-2 in anderen Zelllinien und Geweben	53
4.6	Einordnung von AKAP-2 in die Familie der Proteinkinase A-Ankerproteine	55
5	Zusammenfassung	58
6	Anhang	60
6.1	Sequenz der cDNA von AKAP-2, Lage der zur Sequenzierung verwendeten Primer	60
6.2	Sequenz der verwendeten Primer	65
7	Literaturverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 *Das Organ Knochen*

Phylogenetisch war es für alle Lebewesen schon sehr früh nötig, daß ihr Körper ein stabiles Gerüst erhält. In einfachen Organismen führt der hydrostatische Druck im Körper bereits zu einer Festigung. Die Entwicklung ging jedoch vom zunächst noch äußeren Panzer (Ektoskelett) bald zum inneren Stützskelett der Wirbeltiere und Menschen. Dieser Vorgang hat sich im Laufe von Millionen von Jahren vollzogen. Im Zuge der Ontogenese macht der Körper durchgreifende Veränderungen durch, um schließlich in hervorragend angepaßter Weise den Erfordernissen des Lebens gerecht zu werden.

Unser Körper, der uns ein Leben lang trotz aller Veränderungen gleich und beständig erscheint, besteht aus Organen, welche letztlich von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden, die für sich genommen wieder einen eigenen Organismus darstellen und ebenso wie der ganze Körper einem Kreislauf von Entstehung, Umgestaltung und des Vergehens unterworfen sind. Damit diese unterschiedlichen Bestandteile in der Dynamik zur vollkommenen Entwicklung des durch sie gebildeten Ganzen führen, bedarf es präziser und wirkungsvoller Regulationsmechanismen.

Betrachtet man das Organ Knochen, so erscheint es auf den ersten Blick stabil und gleichbleibend. Dennoch ist es während des Wachstums sehr starken und offensichtlichen Veränderungen unterworfen. Auch nach Abschluß des Längenwachstums reagiert es noch auf unterschiedliche Belastungen und Einflüsse sehr effektiv. Ein eindringliches Beispiel ist hier der Vorgang der Knochenheilung, der auch nach ausgeprägten Schäden häufig zu einer restitutio ad integrum führt. Bei besonders starken oder asymmetrischen Belastungen oder bei pathologischen Krafteinflüssen wie z.B. durch spastischen Muskelzug oder Muskelschwäche kommt es zu reaktivem Knochenumbau und -anpassung.

Julius Wolff hat bereits 1892 in seinem „Gesetz der Transformation der Knochen“¹ die Theorie aufgestellt, daß der Knochenumbau ein Ergebnis von mechanischen und metabolischen Faktoren ist. Durch die baulichen Veränderungen ist es möglich, dem Leben unter dem Einfluß der Schwerkraft gerecht zu werden².

Die große Einheit Knochen wird aus einzelnen Zellen unterschiedlicher Herkunft und Bedeutung gebildet, deren Zusammenspiel durch vielfache Mechanismen reguliert wird. Auch heute sind nicht alle Zusammenhänge in Bezug auf die Regulation dieses Zusammenspiels geklärt.

Als wesentliche Bestandteile des Knochens sind hier Zellen (Osteoblasten, Osteozyten, sogenannte „lining cells“ und Osteoklasten), Matrixproteine (Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine) und Mineral (Hydroxylapatit) zu nennen. Die Organisation und Entwicklung dieser einzelnen Bestandteile wird durch verschiedenste endokrin, parakrin, autokrin und intrakrin wirkendene Mediatoren [z.B. Vitamin D, PTH, STH, Glukokortikoide, Sexualhormone, Tumornekrosefaktor (TNF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Fibroblast Growth Factor b (bFGF), Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), Interleukine und Insulin-like Growth Factor (IGF)] vermittelt. Diese Botenstoffe wirken über Rezeptoren auf die einzelnen Zellen ein und führen zu Knochenaufbau oder Abbau. Bei Überwiegen oder Mangel verschiedener Faktoren kann es dabei zu pathologischen Entwicklungen etwa in Form von Osteopetrose oder Osteoporose kommen.

1.2 Zellen im Organ Knochen und ihre Entwicklung

Osteoblasten stammen von undifferenzierten, pluripotenten mesenchymalen Stammzellen ab³. Sie entwickeln sich über Präosteoblasten zu Osteoblasten und schließlich zu sogenannten „lining cells“ und Osteozyten. Während des Reifungsprozesses des Präosteoblasten werden nacheinander verschiedene Gene aktiviert und inaktiviert, so daß sich die Entwicklung im Muster der exprimierten Genprodukte widerspiegelt: in der noch wenig bekannten frühen Differenzierungsphase von Osteoblasten spielt das Cbfa1-Gen eine Schlüsselrolle⁴. Später werden wachstumsassoziierte Gene wie c-myc und c-fos exprimiert und Kollagen I, Fibronectin und Wachstumsfaktoren wie TGF- β synthetisiert. Schließlich kommen matrixassoziierte Proteine wie alkalische Phosphatase und Matrix-gla-Protein hinzu. Wenn die Synthese dieser frühen Proteine nach und nach unterdrückt wird, werden Proteine der Mineralisationsphase, z.B. Osteocalcin und Osteopontin, gebildet⁵. Diese Entwicklung wird von systemisch wirkenden Hormonen [Vitamin D-Hormon, somatotropes Hormon (STH), Parathormon (PTH) und Kortikosteroiden] und einer Reihe von lokalen Faktoren gesteuert.

Endpunkte der Entwicklung von Osteoblasten sind die noch wenig untersuchten „lining cells“, die eine Schicht an der Knochenoberfläche bilden, welche sich nicht mehr direkt an der Knochenneubildung noch an der Resorption beteiligt⁶. Sie bilden vermutlich einen Pool ruhender Osteoblasten, stehen über Zellfortsätze mit Osteozyten in Verbindung und können möglicherweise sogar wieder zu aktiven Osteoblasten rekrutiert werden².

Osteozyten bilden die zweite mögliche Endform der Osteoblasten und sind von mineralisierter Knochensubstanz ummauert, zu deren Bildung sie selbst aktiv beigetragen haben. Man vermutet,

daß etwa 15% der Osteoblasten sich zu diesen in ihrer metabolischen Aktivität drastisch eingeschränkten, jedoch keineswegs inaktiven Zellen entwickeln, deren Ernährung über zahlreiche Zellfortsätze in Kanalikuli geschieht⁷. Sie bilden zusammen mit den „lining cells“ eine Art Netzwerk, detektieren auch unter Einbeziehung des Flußmusters in den Haverschen Kanälen mechanische Spannung und Belastung und spielen dadurch eine vermutlich nicht unwesentliche Rolle bei der Adaption des Knochengewebes⁸.

Eng mit den Osteoblasten zusammen agieren Osteoklasten. Dies führt im Endost zu einem streng regulierten Umsatz von Knochensubstanz: im Knochen von Erwachsenen erfolgt Knochenneubildung nur an Stellen vorheriger Resorption in einer Art Aktivations-Resorptions-Formationssequenz³. Die Dauer eines solchen Zyklus beträgt etwa drei bis sechs Monate und findet in vergleichbarer Weise in kortikalem und lamellärem Knochen statt. Physiologisch führt dieser ständige Vorgang des Knochenumbaus zu einer optimalen Anpassung des Skeletts an veränderte Belastung.

Osteoklasten gehören zum Monozyten-Makrophagensystem und leiten sich von einer myeloischen Stammzelle her⁹. Sie sind multinukleäre Zellen mit zahlreichen Mitochondrien und Lysosomen, weisen eine besonders gestaltete Zelloberfläche in Form einer gefalteten Membran auf und sind an Stellen vermehrter Knochenresorption in von ihnen gebildeten Resorptionslakunen (Howshipsche Lakunen) zu finden. Neben der Fähigkeit zur Zytoplasmakontraktion zeichnen sie sich durch Rezeptoren für Calcitonin und durch die Expression einer jedoch nicht zellspezifischen tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) aus. PTH, Interleukin-1 (IL-1), TNF, TGF- β und Vitamin D gehören zu den Stimulatoren der Osteoklastenaktivität, während Calcitonin, Interferon- γ (IFN- γ) und TGF- β inhibitorisch wirken¹⁰. Die Entwicklung von Osteoklasten aus der im Blut zirkulierenden Monozytenfraktion ist zum einen von endo-, para- und autokrinen Faktoren abhängig. So sind Vitamin D, Makrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)^{11 12}, aber auch Prostaglandin-2 (PGE-2)¹³, IL-6¹⁴, TGF- β , IL-1 und TNF¹⁵ und das erst kürzlich entdeckte und OPGL/OPG/RANK-System¹⁶ bei Reifung der Vorläuferzellen von Osteoklasten wichtig. Die Anwesenheit von Osteoblasten in der unmittelbaren Nachbarschaft ist eine wesentliche Voraussetzung für die Osteoklastogenese und die Aktivität der reifen Zellen¹⁷. Die meisten osteotropen Faktoren induzieren in Stromazellen und Osteoblasten die Expression von OPGL/RANKL (Osteoprotegerin-Ligand/ Receptor Activator of NF κ B- Ligand), welches wiederum an RANK-Rezeptoren (Receptor Activator of NF κ B- Rezeptoren) osteoklastärer Vorläuferzellen bindet und deren Entwicklung zu reifen Osteoklasten

induziert¹⁸. OPGL-Knockoutmäuse weisen dramatische Veränderungen in Form von schwerer Osteopetrose, fehlendem Zahndurchbruch und Defekten in der Thymozytendifferenzierung auf¹⁹. Dies zeigt, wie wichtig die Balance der verschiedenen Faktoren und der interzellulären Kommunikation für eine physiologische Entwicklung ist.

1.3 *TNF α , Herkunft und Bedeutung*

Eines der Zytokine von großer Bedeutung im Knochenstoffwechsel ist Tumornekrosefaktor α (TNF α). Es wird hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Fibroblasten, T- und B-Lymphozyten sowie Osteoblasten gebildet²⁰ und ist ein aus drei Untereinheiten bestehendes Protein von 17 kD mit zytostatischen, zytolytischen und antiviralen Eigenschaften²¹. Untransformierte Zellen jedoch werden in ihrem Wachstum gefördert. TNF α stimuliert die Replikation in Knochenzellen und führt zu vermehrter Knochenresorption^{22 23}. Mäuse entwickelten nach Injektion von CHO (Chinese Hamster Ovar)-Zellen, die mit dem humanen Gen für TNF α transfiziert waren, innerhalb von zwei Wochen eine Hyperkalziämie, histologisch zeigte sich eine erhöhte Osteoklastenzahl²⁴. In Knochenmarkkulturen stimuliert TNF α die Bildung von Osteoklasten-ähnlichen Zellen²⁵. Die Wirkung von TNF α auf Osteoklasten erfolgt zumindest teilweise indirekt, da sein Effekt ebenso wie auch der anderer Wachstumsfaktoren nur in Anwesenheit von Osteoblasten zu beobachten ist²⁶. Die funktionelle Kopplung von Osteoblasten und Osteoklasten geschieht vor allem durch Faktoren, die von Osteoblasten gebildet werden und auf Osteoklasten wirken. TNF α und IL-1 β führen zu einer verringerten osteoblastären Genexpression etwa von IGF, BMP und Platelet Derived Growth Factor (PDGF), welche die Formation von Knochen induzieren²⁷. Ebenso kann TNF α die Freisetzung von Faktoren, die für Resorption verantwortlich sind, fördern. Ein solcher Stoff ist z.B. Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1). Er ist für die Bildung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen verantwortlich¹² und wird von Osteoblasten bereits konstitutiv, vermehrt aber nach Stimulation durch PTH, Parathormonähnliches Peptid (PTHrP) und TNF α gebildet^{28 29}.

In vielen Modellen ist die Wirkung von TNF α auf verschiedene Genprodukte untersucht worden. So wird in der humanen promyelozytischen Zelllinie HL-60 die basale Sekretion von Kollagenase IV gesteigert und autokrin die Differenzierung der Zellen propagiert³⁰. In humanen Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen induziert TNF α zusammen mit IL-1 β die Expression des Early Growth Response 1 (EGR-1)-Gens²⁷, in Fibroblasten wird die Stabilität der mRNA von IL-1 durch

TNF α reguliert³¹. Die genannten Beispiele zeigen, daß TNF α auf unterschiedlichen Ebenen in die Regulation der Syntheseleistung von Zellen eingreifen kann.

Die klinischen Auswirkungen einer vermehrten TNF α -Bildung sind vielfältig. Da zunächst beobachtet wurde, daß das Zytokin zumindest teilweise an den Folgen von konsumierenden Krankheiten in Form von Kachexie und paraneoplastischen Syndromen beteiligt ist, lautet die synonyme Bezeichnung Cachectin³². Auch in entzündetem Gewebe wird TNF α vermehrt gebildet. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde eine Beteiligung von TNF α bei der Pathogenese nachgewiesen und dieses Wissen bereits pharmakologisch durch Einsatz von chimären Antikörpern gegen TNF α umgesetzt³³. Bei der rheumatoiden Arthritis kommt es infolge der vermehrten Freisetzung von TNF α zu Knochenverlust in den betroffenen Gelenken. Auch hier wurden positive Effekte einer Behandlung mit Antikörpern gegen TNF α bzw. mit Fusionsproteinen des p75-Rezeptors für TNF α verzeichnet³⁴. Dagegen führt postmenopausaler Östrogenmangel über eine Reihe verschiedener nachgeschalteter Mechanismen, darunter auch die Erhöhung von TNF, zu vermehrtem Knochenabbau. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, daß der erhöhte Knochenverlust in ovariectomierten Mäusen durch Gabe von IL-1-Rezeptorantagonist und TNF-Bindungsprotein aufgehoben werden konnte³⁵. Ähnliche Zusammenhänge wurden bei Studien mit prä- und postmenopausalen Frauen festgestellt, bei denen durch Gabe von Östrogenen und Progesteron die erhöhte Bildung von IL-1 und TNF verringert werden konnte^{36 37}.

TNF α ist also ein Zytokin von großer Bedeutung sowohl bei der Regulation des physiologischen Umbaus von Knochensubstanz als auch bei pathologisch erhöhtem Knochenverlust.

1.4 Signaltransduktionswege

Ein geordneter Ablauf des Knochenumbaus ist das Ergebnis der Wirkung mehrerer Faktoren wie Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und physischer Belastung. Die meisten dieser Stoffe wirken nach ihrer Bindung an membranständige Rezeptoren über teilweise gemeinsame Mechanismen der Signaltransduktion auf die einzelne Zelle ein und führen hier zu einer Änderung der zellulären Aktivität.

Am Anfang stehen drei große Signaltransduktionswege: der Adenylatzyklaseweg, der Inositoltriphosphatweg und der Tyrosinkinaseweg. In den letzten Jahrzehnten konnten hier viele Mechanismen aufgeklärt werden. Stoffen unterschiedlicher Herkunft und chemischer Struktur, die zum Teil auch als Pharmaka Verwendung finden, konnte eine inhibitorische oder exzitatorische

Wirkung auf einzelne Glieder der Signalkette zugeschrieben werden, so daß sie als Hilfsmittel bei der Untersuchung von Mechanismen der Zellbeeinflussung verwendet werden (siehe Abbildungen 1 und 2).

Je besser man jedoch die Funktion von Rezeptoren und der sogenannten zweiten Botenstoffe verstanden hatte, desto klarer wurde, wie komplex die Zusammenhänge sind und wie viele Komponenten miteinander netzwerkartig in Verbindung stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Die Frage nach den Zusammenhängen und der Übertragung von Signalen weiter stromabwärts bis hin zur Genebene ist auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung.

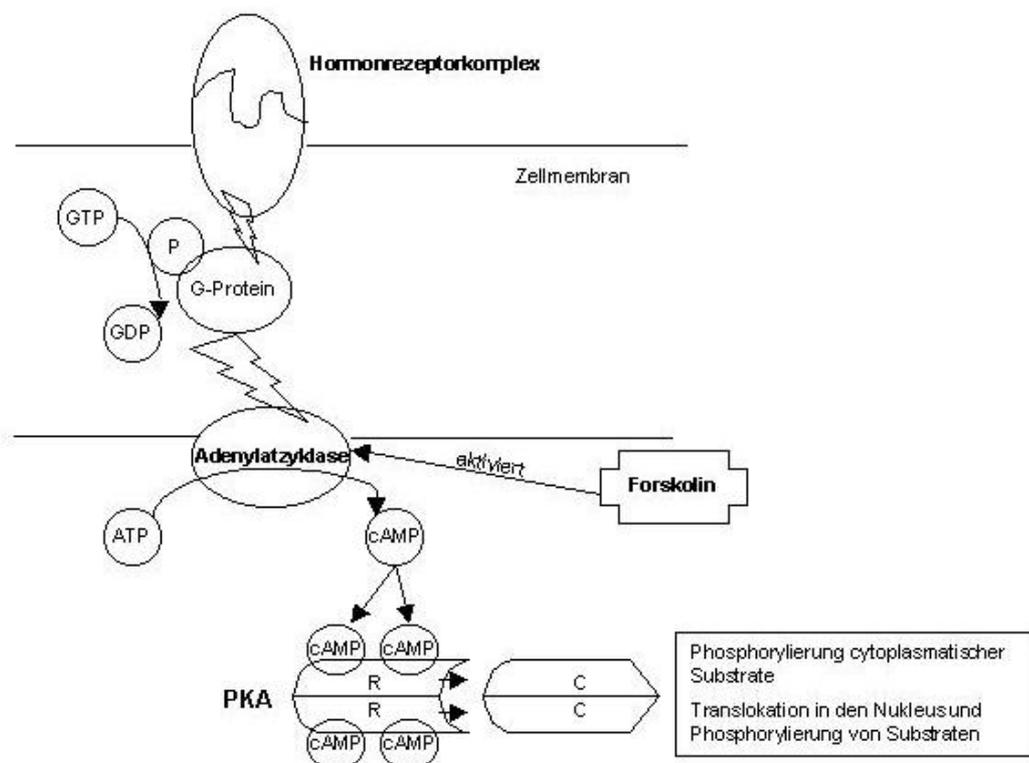


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion ausgehend von der Rezeptorbindung bis zur Wirkung des zweiten Botenstoffes, cAMP.

Experimentell kann in Zellversuchen die Aktivität der Adenylatzyklase durch Forskolin gesteigert werden bzw. cAMP direkt gegeben werden.

GTP= Guanosintri-phosphat, GDP= Guanosindiphosphat, P= Phosphat, ATP= Adenosintri-phosphat,

R= regulatorische Untereinheit der PKA, C= katalytische Untereinheit der PKA, \Rightarrow = Aktivierung

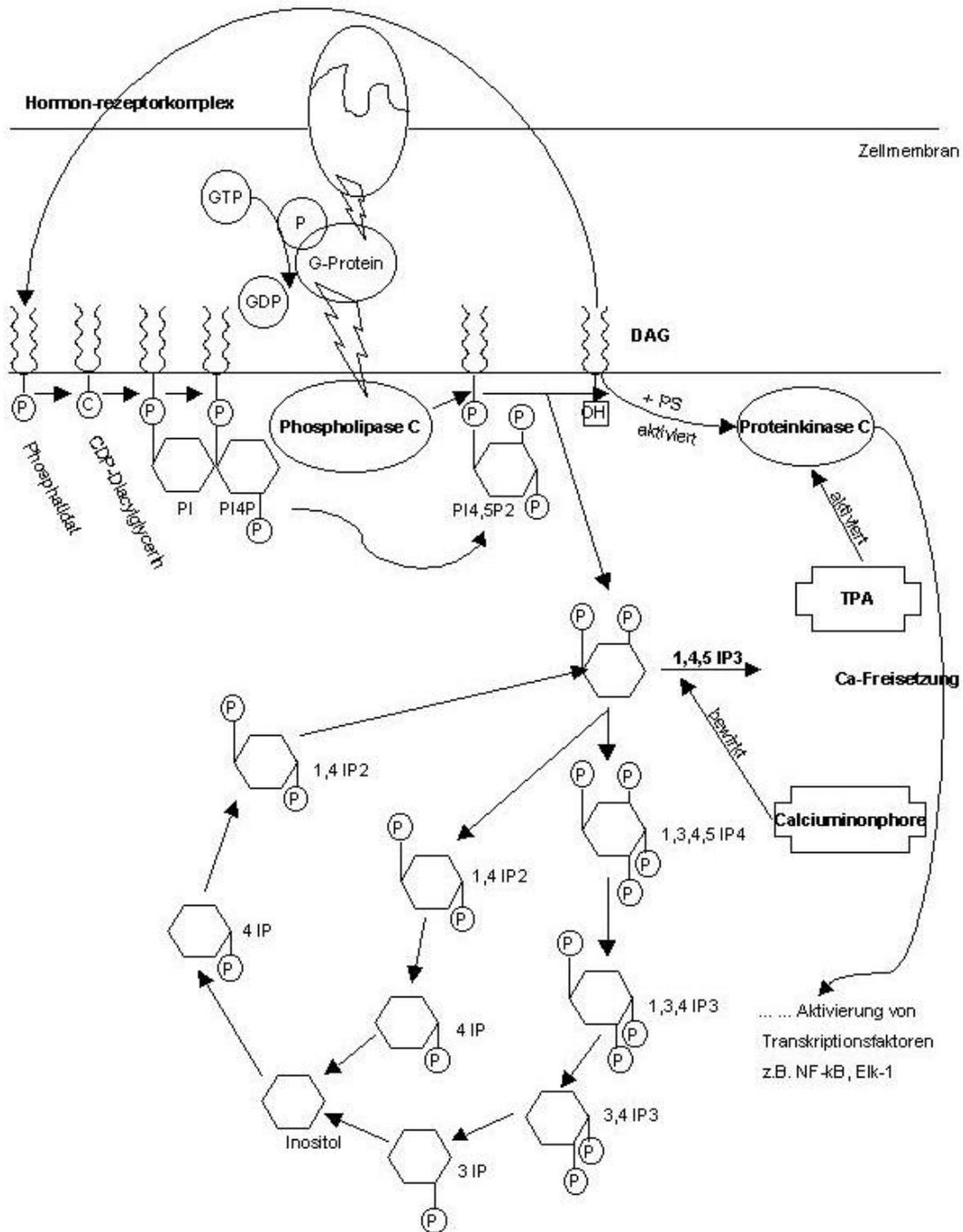


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Inositoltriphosphatweges. Nach Freisetzung der zweiten Botenstoffe DAG und IP3 kommt es zur Aktivierung der PKC bzw. zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Die Regeneration der beteiligten Effektoren erfolgt durch verschiedene Kreisläufe. Eingezeichnet sind die Möglichkeiten des experimentellen Eingreifens in die verschiedenen Zweige durch TPA und Calciumionophore. PI= Phosphatidylinositol, PS= Phosphatidylserin, PI4,5P2= Inositol-4,5-bisphosphat, 1,4,5 IP3= Inositol-1,4,5-trisphosphat, 1,4 IP2= Inositol-1,4-bisphosphat, 4 IP= Inositol-4-Phosphat, 1,3,4,5 IP4= Inositol-1,3,4,5-Tetraphosphat, 1,3,4 IP3= Inositol-1,3,4-Triphosphat, 3,4 IP2= Inositol-3,4-Bisphosphat, 3 IP= Inositol-3-Phosphat

1.5 TNF- Rezeptor

Für TNF α sind zwei membranständige Rezeptoren beschrieben³⁸. Sowohl Rezeptor 1, auch p55 genannt, als auch Rezeptor 2 oder p75 sind biologisch aktiv. Welche Rolle die beiden Rezeptoren im einzelnen spielen, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Bei einigen Effekten von TNF α scheint nur die Aktivierung von Rezeptor p55 nötig zu sein, etwa bei der Immunantwort nach Kontakt mit *Listeria monocytogenes*³⁹. Die Entzündungsreaktion der Haut nach Injektion von TNF α scheint beide Rezeptoren zu involvieren. Tartaglia⁴⁰ entwickelte das sogenannte Ligand-passing-Modell, demzufolge Rezeptor p75 selbst intrazellulär keine Signale weiterleiten soll. Dagegen soll er die Antwortrate von Rezeptor p55 erhöhen, indem er zu einer lokalen Konzentrationsanreicherung von TNF α an der Zelloberfläche führt. In einer Untersuchung zur Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in verschiedenen Zellarten mit Hilfe von RT-PCR wurden die beiden Rezeptoren nur in MG-63-Zellen, nicht jedoch in primären humanen Osteoblasten nachgewiesen⁴¹. Diese Beobachtung wird dadurch erklärt, daß manche Rezeptoren für Zytokine nur in bestimmten Entwicklungsstadien exprimiert werden, was eine Kontrolle der Zytokinwirkung bedeutet.

Beide Rezeptoren besitzen selbst keine intrinsische Kinaseaktivität⁴² wie etwa der Insulin- und andere Rezeptoren. Sie wirken durch Interaktion mit einer Reihe von intrazellulären Proteinen. Dazu gehören die Familie der TNF-Rezeptor-assoziierten Proteine (TRAP1 und 2), TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 1, 2 und 3 (TRAF1, 2 und 3), Fas-assoziiertes Death Domain Protein (FADD) und TNF-R55 assoziiertes Death Domain Protein (TRADD) (siehe Abbildung 3). Diese Proteine wirken selbst als Kinasen, stimulieren verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege oder binden direkt an die DNA⁴².

TNF α aktiviert verschiedene zweite Botenstoff-Systeme wie Arachidonsäure⁴³ und zyklisches Adenosinmonophosphat⁴⁴ sowie die Proteinkinase C (PKC)⁴⁵ und die Sphingosinkinase⁴⁶. Durch Interaktion des Rezeptors mit TRAF und TRADD kommt es zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF κ B^{47 48} und damit schließlich zur Wirkung auf die Zielgene.

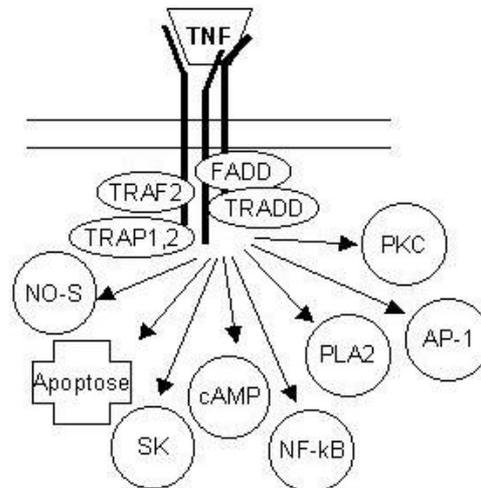


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des TNF-Rezeptors p55 und von mit dem Rezeptor assoziierten Proteinen. Aufgeführt sind verschiedene vom TNF-Rezeptor aktivierte intrazelluläre Botenstoffe, nicht berücksichtigt ist ihre Stellung in den unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden. TRAF= TNF-Rezeptor assoziierter Faktor, FADD= Fas-assoziiertes Death Domain Protein, TRAP= TNF-Rezeptor assoziiertes Protein, TRADD= TNF-Rezeptor assoziiertes Death Domain Protein, NO-S= NO-Synthetase, SK= Sphingosinkinase, PLA2= Phospholipase A2, AP-1= aktivierendes Protein-1.

1.6 Die Familie der Ankerproteine der Proteinkinase A

Wie bereits erwähnt, werden Signale von extrazellulär über verschiedene Rezeptoren und Transmitterwege in die Zelle weitergeleitet. Nach der Aktivierung von zweiten Botenstoffen werden diese durch andere Moleküle in Bezug auf ihre Aktivität oder Lokalisation modifiziert und so ihre Wirkung gesteuert. So können durch sogenannte Ankerproteine Signale gezielt an unterschiedliche intrazelluläre Komponenten weitergeleitet werden.

Die Familie der Ankerproteine der Proteinkinase A ist eine Gruppe strukturell zum Teil sehr unterschiedlicher Proteine. Die Größe der Moleküle reicht von 15 bis 300kD, und man hat versucht, dies in der Nomenklatur miteinzubinden⁴⁹. Gemeinsam ist den Mitgliedern der Familie die Fähigkeit, an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) zu binden und durch ihre Lage in unterschiedlichen Zellkompartimenten die Funktion der PKA zu lokalisieren. Sie besitzen eine streng konservierte amphiphathische Helix, die eine der beiden Varianten der regulatorischen Untereinheit der PKA, RI α und RII α , oder beide bindet⁵⁰ (siehe Abbildung 4 A). An den Positionen 2 und 10 der amphiphatischen Helix befindet sich eine Aminosäure mit kleiner Seitenkette bzw. eine hydrophobe Aminosäure. Diese sind für die Fähigkeit zur Bindung der PKA nötig. Die Aminosäure an Position 6 ist durch die Länge ihrer hydrophoben Seitenkette ausschlaggebend für die Bindungsspezifität: kleine Seitenketten führen zur Bindung von RI α ,

lange aliphatische Seitenketten zur Bindung von $R11\alpha$ ⁵¹. Schließlich sorgen weitere Regionen, die C- oder N-terminal im Protein liegen können, für die intrazelluläre Lokalisierung des AKAP/PKA-Komplexes⁵². AKAPs haben zunächst zwei Funktionen. Einmal können sie die PKA in der Nähe von Bildungsorten von cAMP, welches zur Aktivierung der PKA führt, lokalisieren. Gleichzeitig jedoch sorgen sie auch für ausreichend ungehinderten Kontakt mit den Substraten der PKA⁵³. Damit kann die Effektivität der Signalvermittlung maximiert werden. Manche AKAPs können auch zur Aktivierung von Ionenkanälen an der Plasmamembran führen. Während die neuronal exprimierte AKAP-79 direkt an Phospholipide der Plasmamembran bindet, benötigt AKAP-18 zunächst die kovalente Bindung von Fettsäuren, um an die Plasmamembran koppeln zu können⁵⁴. In Abbildung 4 B sind verschiedene Ankerproteine und ihre intrazelluläre Lokalisation gezeigt.

Im Unterschied zur PKA wird die Proteinkinase C (PKC) im allgemeinen von längerwirkenden Botenstoffen aktiviert, was zur Assoziation mit der Plasmamembran führt⁵⁵. Allerdings existieren auch für die PKC verschiedene Proteine, sogenannte Rezeptoren für aktivierte C-Kinasen (RACK), die das Enzym binden, an verschiedenen Orten des Zytoskeletts lokalisieren und so ihre Aktivität beeinflussen⁵⁶. Die Signaltransduktionswege der beiden Kinasen sind jedoch nicht völlig streng voneinander getrennt. Einige Vertreter der AKAP-Familie binden nämlich nicht nur die PKA sondern auch andere Enzyme der Signaltransduktion wie die PKC oder die Proteinphosphatase 2B. Damit können die Signale unterschiedlicher zweiter Botenstoffe an gemeinsam kontrollierten Vorgängen zusammengeführt werden⁵⁷. In Mammaryzellen scheint sich das Expressionsmuster verschiedener AKAPs mit dem Entwicklungsstadium der Zelle im Verlauf von Schwangerschaft, Laktation und Involution zu verändern⁵⁸. Manche Mitglieder der Proteinfamilie besitzen ein Leuzin-Zipper-Motiv, was auf die Möglichkeit zur Bindung an die DNA hinweist. Die Interaktion mit der DNA konnte allerdings für die AKAP-120, die ein solches Motiv enthält, nicht nachgewiesen werden. Die Bedeutung des Motives kann also noch nicht endgültig eingeordnet werden⁴⁹.

Abbildung 4 A

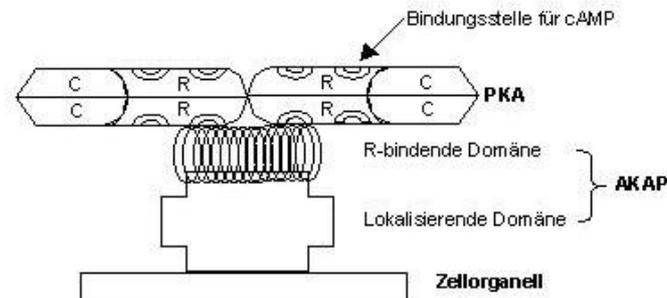


Abbildung 4 B

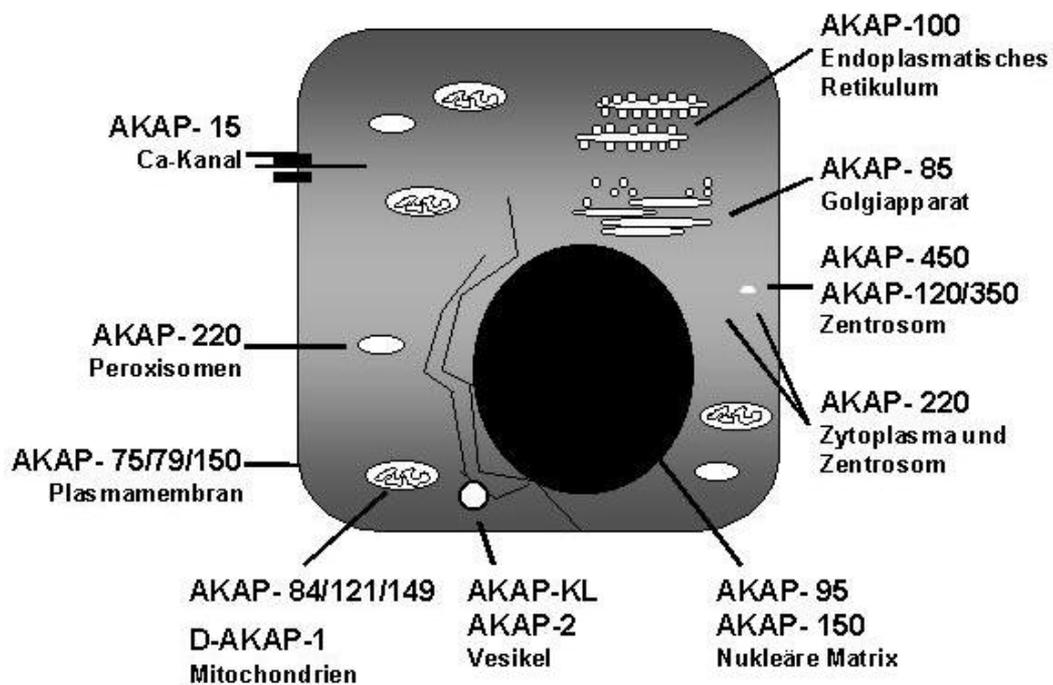


Abbildung 4 A: Vereinfachte Darstellung eines Ankerproteins der PKA. Eine lokalisierende Domäne bindet spezifisch an ein Zellorganell, eine streng konservierte amphipatische Helix bindet die regulatorische Untereinheiten von zwei Proteinkinasen A. Nach Aktivierung der PKA durch Bindung von cAMP kommt es zur Freisetzung der katalytischen Untereinheit der PKA an der jeweiligen Lokalisation.
R= regulatorische Untereinheit, C= katalytische Untereinheit

Abbildung 4 B: Schematische Darstellung verschiedener in der Literatur erwähnter Ankerproteine der PKA und deren intrazelluläre Lokalisation.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Idee zur vorliegenden Arbeit nahm ihren Ursprung in der Untersuchung von Vitamin D-regulierten Genen in Knochenzellen. Um so komplexe Vorgänge wie den Um- und Neubau von Knochensubstanz besser zu verstehen, muß man die molekularen Strukturen und biochemischen Zusammenhänge des Organes Knochen erforschen. Schon lange ist bekannt, daß Vitamin D eine Schlüsselrolle beim Knochenstoffwechsel spielt. Die bekannte Krankheit Rachitis, aus historischen Gründen Englische Krankheit genannt, äußert sich unter anderem durch Knochendeformitäten und konnte auf einen Mangel an Vitamin D durch Fehlernährung und zu geringe Sonnenlichtexposition zurückgeführt werden. Andererseits kann es auch bei zu großer Zufuhr von Vitamin D, meist iatrogen bedingt, zu Krankheitserscheinungen kommen. Schließlich sind Enzymdefekte bei der Bioaktivierung zu funktionstüchtigem 1,25- Dihydroxyvitamin, dem Vitamin D-Hormon oder Defekte im Vitamin D-Rezeptor, bekannt⁵⁹.

Die vielfältigen Wirkungen von Vitamin D-Hormon können hier nur kurz aufgezählt werden⁶⁰: Homöostase im Mineralhaushalt via Niere, Intestinum und Knochen, Differenzierung von Keratinozyten, Beeinflussung von Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinomzellen, Einfluß auf hormonelle Sekretion und Modulation des Immunsystems. Die Gesamtheit der von Vitamin D abhängigen Gene im Knochen und anderen Organen kann kaum abgeschätzt werden.

Nachdem unsere Arbeitsgruppe zunächst die Expression des Vitamin D-Rezeptors in humanen fötalen Osteoblasten (hFOB-Zellen) nachweisen konnte⁶¹, wurde Gesamt-RNA dieser Zellen mit und ohne Vitamin D-Behandlung in einem Screening auf Vitamin D responsive Gene mit Hilfe von ddPCR untersucht. Dabei konnte die Expression des Selenoproteins Thioredoxinreduktase, des humanen cysteinreichen Proteins 61 (hCYR 61) sowie einer dritten, noch nicht weiter bekannten mRNA nachgewiesen werden^{61 62}.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese mRNA genauer charakterisiert. Ausgehend von den zunächst bekannten Daten (mRNA mit 7,5 Kilobasen [kb], davon bekannt eine Sequenz von 165 Nukleotiden, mit denen in Datenbankabgleichen 100% Homologie zu zwei uncharakterisierten IMAGE-Klonen mit maximaler Insertlänge von 1860 Nukleotiden gefunden worden war), ergaben sich folgende Ziele:

- Ermittlung der vollständigen Sequenz der cDNA
- Untersuchung der Regulation der Expression der zugehörigen mRNA
- davon ausgehend Aussagen zur Funktion des Genprodukts.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Kunststoffartikel wurden von Falcon, Greiner und Eppendorf bezogen. Die verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen: Sigma, Roth, Merck und Boehringer Mannheim.

IMAG 998D171155, IMAG 998F05223, cDNA-Bank Humanes Herzgewebe Nr. 405, cDNA-Bank Humanes Placentagewebe Nr. 427, davon ausgewählte Klone: DKFZp405K1852Q2 (kurz: Klon 1852), DKFZp405I416Q2 (kurz: Klon 416), DKFZp427P1146Q2 (kurz: Klon 1146), DKFZp427H0864Q2 (kurz: Klon 864), DKFZp427B0860Q2 (kurz: Klon 860), DKFZp427L1035Q2 (kurz: Klon 1035), DKFZp427L0435Q2 (kurz: Klon 435), DKFZp427B0841Q2 (kurz: Klon 841), DKFZp427L0835Q2 (kurz: Klon 835), alle Ressourcenzentrum/Primärdatenbank des Humanen Genomprojekts, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

GAPDH cDNA (1,5kb, humanes fötales Lebergewebe): ATCC (Nr. 57091)

Bay11-7085 (kurz: Bay11, Katalognr. EI-279), Caffeic acid phenethyl ester (kurz: CAPE, Katalognr. FR-102), 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (kurz: H7, Katalognr. EI-148), N-[2-(Methylamino)ethyl]-5-isoquinoline-Sulfonamide (kurz: H8, Katalognr. EI-158) SN-50 (Katalognr. P-600), Staurosporin (Katalognr. EI-156) alle Biomol Plymouth Meeting, USA

Phorbol-(12-myristol-13-acetyl) (kurz: TPA, Artikelnr. 32496) Serva, Heidelberg

Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham (kurz: DMEM, Katalognr. D-2906), Forskolin (Katalognr. F-6886), Calcium Ionophore A23187 (Katalognr. C-5149), Diacylglycerol-Kinase-Inhibitor (kurz: DAG-KI, Katalognr. D5919), Wortmannin (Katalognr. W1628) alle Sigma, St Louis, USA

bFGF, EGF, IFN γ , IL-2, IL-6, PDGF, TGF- β alle Pharma Biotechnology, Hannover

IL-1 β , TNF α , NotI, EcoRI, XbaI, PstI, Sall, One Phor All Puffer alle Gibco BRL

Vitamin D3 Duphar, Weesp, Niederlande

Primer SR1-35 alle Gibco BRL (Nukleotidsequenz der Primer und Lage der Primer in der cDNA-Sequenz siehe Anhang).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Ein Großteil der Zellversuche wurde mit der Zelllinie hFOB 1.19 (hFOB) durchgeführt. Es handelt sich dabei um humane, fötale osteoblastäre Zellen, die durch Transfektion mit dem Gen einer temperatursensitiven Mutante des large-T-Antigens des SV-40-Virus konditionell immortalisiert wurden. Die Expression dieses Genes ist an Kultur bei 34,5°C gebunden⁶³.

Die Zellen wurden in DMEM/F12 Ham-Medium (Sigma) unter Zugabe von 10% fötalem Rinderserum (FCS, Gibco BRL, aktivkohlebehandelt und gefiltert), 2,5U/l Penicillin, 2,5mg/l Streptomycin und 6µg/l Amphotericin (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma) kultiviert und jeden zweiten Tag einem Mediumwechsel unterzogen. Um eine mögliche Beeinflussung der Genaktivität auszuschließen, wurde phenolrotfreies Medium verwendet. Die Zellen wurden bei 34°C und 5% CO₂ inkubiert, proliferierten unter diesen Bedingungen bis zur Konfluenz (visuell bestimmt, Tag 0) und wurden am siebten Tag nach Konfluenz geerntet. Um mögliche Effekte auf die Genaktivität durch den Mediumwechsel zu vermeiden, wurde der letzte Wechsel jeweils zwei Tage vor der Ernte durchgeführt.

Die Osteosarkomzelllinien SaOs-2, TE-85 und MG-63 wurden zweimal pro Woche mit dem oben genannten Medium versorgt und bei 37°C unter ansonsten gleichen Bedingungen wie die hFOB-Zellen inkubiert. Diese Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz geerntet.

Für die RNA-Extraktion wurden hFOB-Zellen in kleinen Kulturflaschen (25 cm², Greiner) mit 4ml Medium gezüchtet, Osteosarkomzellen in Flaschen mit 75 cm² (Greiner) bekamen 10ml Medium.

2.2.2 RNA-Analyse

2.2.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die verwendete Methode lehnte sich weitgehend an die von Chomczynski und Sacchi⁶⁴ beschriebene Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode an.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2,5ml Guanidinthiocyanat (GTC)-Lösung wurden die Zellen lysiert und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers und einer Pipette in ein 25ml-Röhrchen mit 250µl Natriumacetat (25mM, pH4,3) überführt und gevortext. Anschließend wurden 2,5ml Phenol (pH4,3) und 700µl Chloroform zugefügt, gevortext und zentrifugiert (4000U/min, 4°C, 10min), um so eine Auftrennung von DNA bzw. RNA in die organische bzw. wässrige Phase zu erreichen, während sich Proteine in der Interphase ansammelten. Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase in

ein neues Röhrchen mit 4ml Isopropanol überführt, gevortext und bei -20°C für mindestens 30 Minuten präzipitiert. Nach Zentrifugation (4000U/min, 4°C, 10min) wurde das Pellet in 300µl GTC-Lösung gelöst und in Eppendorfgefäßen mit 400µl Isopropanol versetzt, gevortext und erneut für mindestens 30 Minuten bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (17000U/min, 4°C, 10min) wurde das Pellet in 500µl Ethanol 70% gelöst, gevortext und zentrifugiert (17000U/min, 4°C, 10min). Jetzt wurde das Pellet für etwa zehn Minuten unter Vakuum getrocknet und die RNA in 40µl sterilem Wasser gelöst, wobei dieser Vorgang meist durch zehnmütiges Erhitzen im Wasserbad bei 65°C unterstützt wurde. In dieser Form konnte die RNA bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt, wobei gleichzeitig die Verunreinigung durch Proteine überprüft werden konnte. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, daß in monochromatischem Deuteriumlicht RNA ein Absorptionsmaximum bei 260nm hat, Protein hingegen bei 280nm. Im Extinktionsintervall zwischen 0 und 1,0 liegt eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration der RNA vor.

Die Intaktheit der RNA wurde durch Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.2.2).

Guanidinthiocyanat (GTC)-Lösung:

4 M GTC
25 mM N-Laurylsarcosine
25 mM Natriumacetat pH 4,3
0,1 M β-Mercaptoethanol

Phosphate buffered saline (PBS-Puffer):

0,14 M Natriumchlorid
2,5 mM Kaliumchlorid
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat

2.2.2.2 Denaturierende Gelelektrophorese

15µg RNA (photometrisch bestimmt) wurden in einem denaturierenden Agarosegel (1% Agarose, Gibco BRL, 1×MOPS, 2,2M Formaldehyd pH>4, 0,8µg/ml Ethidiumbromid) im Laufpuffer 1×MOPS elektrophoretisch aufgetrennt (100V, 5h). Die RNA wurde vor dem Auftragen in einem denaturierenden Probenpuffer (7µl entionisiertes Formamid, 2,3µl Formaldehyd (pH>4), 2,1µl 10x MOPS und 2,0µl Ladungspuffer) zehn Minuten lang auf 65°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Das Volumen wurde jeweils mit sterilem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Wurde mehr als 10µl RNA-Lösung benötigt, verdoppelten sich die Volumina der angegebenen Komponenten.

10×MOPS (pH7):

0,2 M Morpholinopropansulfonsäure
10 mM EDTA
50 mM Natriumacetat

2.2.2.3 Diffusionsblot (Northernblot)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in 10×SSC etwa 15 Minuten lang gewaschen und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Anschließend wurde die RNA durch Kapillartransfer auf Nylonmembran (HybondN, Amersham Pharmacia Biotech) geblottet (36h mit 20×SSC). Nach zweistündiger kovalenter Fixierung der RNA auf der Membran bei 80°C konnte die Membran unter ausreichendem Schutz vor UV-Licht bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

20×SSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH7,5

2.2.2.4 Herstellung von DNA-Sonden für die Hybridisierung der Blots

Für die Hybridisierung von Northern- und Southernblots wurden zwei IMAGE-Klone des IMAGE-Konsortiums vom Ressourcenzentrums/Primärdatenbank (RZPD) des Humanen Genomprojekts/Berlin mit einem Insert von je 1,8kb mit Homologie zum ursprünglich bekannten ddPCR-Produkt mit 184bp und der DKFZ-Klon 841 vom RZPD/Berlin verwendet. Als interne Kontrolle diente GAPDH.

Restriktionsansatz (30µl):

3 µl 10× Puffer
je 1 µl Enzym
6 µl Plasmid
Aqua ad 30 µl
Verdauung bei 37°C über 1 Stunde

Restriktionsenzyme: IMAG-Klone: Eco R1, Not 1
DKFZ-Klon 841: Not 1, Sal 1 (Puffer: One Phor All)
GAPDH: HindIII, XbaI

Die Restriktion wurde durch Zugabe von 3µl 6×Ladungspuffer gestoppt, anschließend wurden Vektor und Insert durch Gelelektrophorese (1% Agarose, 1×TBE, 0,25µg/ml Ethidiumbromid) getrennt (100V, 30min). Als Laufpuffer diente 1×TBE. Die im UV-Licht sichtbare Insertbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA wurde mit dem NucleoTrap Kit (Macherey und Nagel) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

10×TBE:

0,89 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA
pH 8,0

2.2.2.5 Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. In beiden Fällen wurde 5µl DNA-Sonde (25-50ng) mit 50µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) inkubiert und entsprechend der Herstellerangaben gearbeitet (Random Priming labeling System, Gibco; Rediprime II, Amersham Pharmacia Biotech).

In beiden Fällen wurden die Proben anschließend über MicroSpin™ S-300 HR Säulchen (Pharmacia Biotech) abzentrifugiert, um die radioaktiv markierten Moleküle von nicht eingebauten Nukleotiden abzutrennen.

Zur Überprüfung der spezifischen Aktivität wurden 1µl der markierten DNA in 4ml Szintillator (Ultima Gold, Packard) mit einem Beta-Counter (Packard) gezählt. Die Ausbeute lag im Mittel um 5×10^5 cpm/µl.

2.2.2.6 Hybridisierung

Die Northernblots wurden in einem Hybridisierofen mit 9ml Hybridisierungslösung 1 bei 41°C mindestens vier Stunden vorhybridisiert. Vor der ersten Verwendung wurden die Membranen etwa zehn Minuten mit 0,1×SSC, 0,1% SDS gewaschen, um gegebenenfalls auskristallisierte Salze von der Oberfläche abzuwaschen. Nach der Vorhybridisierung wurde die Hybridisierungslösung erneuert und die markierten DNA-Sonden zugegeben (10^6 cpm/ml Lösung). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Die Blots wurden zunächst 20 Minuten in 3×SSC 0,1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend noch einmal für je 30 Minuten in 0,5×SSC 0,1% SDS bei 41°C, 51°C und 58°C. Die in Folien eingeschweißten Blots wurden nun auf Röntgenfilme (Kodak X-OMAT XAR) aufgelegt. Die Dauer der Exposition bei -70°C lag zwischen einem und sieben Tagen.

Die densitometrisch ermittelten Zahlenwerte der Autoradiographiesignale wurden durch Division auf den jeweiligen Wert der Kontrolle normiert, anschließend wurden die Werte der Hybridisierungen mit Sonden für AKAP-2 und GAPDH jeder einzelnen Probe zueinander in Beziehung gesetzt. Somit sind alle Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle mit dem Wert 1 zu sehen (Densitometer, LTF-Labortechnik GmbH, Wasserburg, Software: Bioprofile).

Hybridisierungslösung 1:

- 3×SSC
- 5×Denhards
- 50% entionisiertes Formamid
- 0,1% SDS
- 50 µg/ml Salmon Testes DNA (Sigma)

50× Denhards: 100ml

1 g Bovines Serum Albumin
 1 g Ficoll
 1 g Polyvinylpyrrolidon
 Aqua ad 100 ml

20×SSC:

3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 pH7,5

10% SDS:

100 g Laurylsulfat
 Aqua ad 1 l

2.2.3 Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2 mit Hilfe einer cDNA-Bank

2.2.3.1 Untersuchung von cDNA-Bänken (Arrayfilter)

Vom RZPD des Humanen Genomprojekt/Berlin wurden sogenannte Arrayfilter bezogen. Diese Filter enthalten jeweils die cDNA eines Organs und können mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert werden. Damit können Klone, deren Sequenz mit der verwendeten Sonde übereinstimmt, ermittelt werden.

Zur Hybridisierung wurde die DNA-Sonde der IMAGE-Klone in höherer Konzentration als bei den Northernblots verwendet. Zunächst wurden vier Ansätze mit 6µl Plasmid restringiert (siehe 2.2.2.4). Beim Eluieren der DNA mit dem NucleoTrap Kit wurde im letzten Schritt das Eluat (100µl) des ersten Gefäßes jeweils in das nächste überführt, um damit eine höhere Konzentration zu erreichen. Das Labeln erfolgte dann mit dem Rediprime II System, wobei ebenfalls 5µl der konzentrierten Sonde eingesetzt wurden (siehe 2.2.2.5). Im Mittel wurde eine Aktivität von 2×10^6 cpm/µl gemessen.

Die Vorhybridisierung der Filter erfolgte unter ständigem Schütteln mit je 150ml der Hybridisierungslösung 2 in Wannen bei 65°C über fünf Stunden. Nach Erneuerung der Hybridisierungslösung wurde die radioaktiv markierte Sonde (3×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung) zupipettiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Filter anschließend bei 65°C gewaschen und in Plastikfolie eingeschweißt dann für zehn bzw. 15 Minuten bzw. zwei Stunden bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert. Mit Hilfe eines Koordinatennetzes konnten nun zu den Autoradiographiesignalen die Kennziffern der entsprechenden Klone der cDNA-Bank ermittelt werden.

Hybridisierungslösung 2:

7% Laurylsulfat
 1 mM EDTA
 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat
 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat

Waschlösung für Arrayfilter:

40 mM Natriumdihydrogenphosphat
 40 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 0,1% SDS

2.2.3.2 Bakterienkultur

Die nach Hybridisierung der Arrayfilter ausgewählten, mit dem Vektor pSPORT1(BRL) in E.coli DH10B transfizierten cDNA-Klone wurden ebenfalls vom RZPD des Humanen Genomprojekts/Berlin bezogen.

Mit einer ausgeglühten Öse wurden die einzelnen Klone auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Miniplasmidpräparation wurde von den Platten jeweils eine Kolonie mit einer Öse abgenommen, in 5ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert.

Für die Maxiplasmidpräparation wurde der Ansatz von 5ml LB-Medium am Abend in einen Erlenmeyerkolben mit 250ml LB-Medium überführt und über Nacht weiter unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

Agar:

15g/l Agar (DI FCO, Detroit, USA)

LB-Medium:

1% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 5,8 M Natriumchlorid
 pH 7,0
 nach Autoklavierung Zugabe von Ampicillin (2 µl/ml)

2.2.3.3 Miniplasmidpräparation der Klone

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien in kleiner Menge wurde weitgehend nach dem Protokoll von Sambrook et al.⁶⁵ durchgeführt.

1,5ml der Bakteriensuspension wurden mit 5000g drei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das die Bakterien enthaltende Pellet mit 100µl Lösung I aufgelöst und gevortext. Anschließend wurde das doppelte Volumen Lösung II zupipettiert und gevortext, wobei im alkalischen Milieu die Zellen, nicht aber die Plasmide zersetzt wurden. Mit 150µl Lösung III wurde der Ansatz neutralisiert und fünf Minuten lang mit 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Trennung von DNA, RNA und Proteinen mit 200µl Phenol (pH 7,5-7,8)

und 200µl Chloroform versetzt und bei 10000g fünf Minuten zentrifugiert. Zur wässrigen Phase wurde zur Zersetzung von Enzymen 200µl Chloroform zugegeben. Nach dem Vortexen trennte sich die wässrige Phase sofort ab. Die DNA wurde mit 1,5ml Ethanol 100% 15 Minuten lang auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation (12000U/min, 4°C, 10min) wurde das Pellet mit 400µl Ethanol 70% gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das Pellet in Vakuum getrocknet und anschließend die Plasmid-DNA in 20µl sterilem Wasser gelöst.

Lösung I:

50 mM Glucose
25 mM Tris pH7,5
10 mM EDTA

Lösung II:

1×SDS
0,2 N Natronlauge

Lösung III:

3 M Kaliumacetat
11,5 ml Essigsäure

2.2.3.4 Restriktionsverdau der Plasmide

Der Vektor pSPORT1(BRL) besitzt zum Ausschneiden des Inserts mehrere Angriffspunkte für Restriktionsenzyme. In einem ersten Ansatz wurden zunächst XbaI und PstI verwendet, in einer weiteren Doppelrestriktion NotI und Sall. Die Schnittstellen dieser beiden Enzyme liegen dem Insert am nächsten, so daß man damit nur wenig Vektorsequenz mit ausschneidet.

Restriktionsansatz 15 µl:

8 µl Aqua
1,5 µl 10×Puffer
2×0,75 µl Enzym
4 µl Plasmid-DNA (1 µg)

Bei der Restriktion mit XbaI und PstI wurde der vom Hersteller angegebene Puffer verwendet, bei NotI und Sall One Phor All (Gibco BRL).

Die Restriktion erfolgte bei 37°C über eine Stunde und wurde durch Zugabe von 2µl Ladungspuffer gestoppt. Die Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch (100V, 20-40 Minuten) (siehe 2.2.2.4) aufgetrennt und zur Dokumentation photographiert.

2.2.3.5 Southernblot

Das Agarosegel, in dem die Spaltprodukte des Restriktionsverdaus aufgetrennt worden waren, wurde für 45 Minuten unter ständigem Schütteln in Denaturisierungslösung und anschließend für ebenfalls 45 Minuten in Neutralisierungslösung gelegt, wodurch die doppelsträngige DNA getrennt wurde. Nach Abspülen des Gels mit Wasser wurde es vor Aufbau des Blots zehn

Minuten lang in $10\times$ SSC äquilibriert. Nach dem DNA-Transfer auf die Membran über Nacht und nach Fixierung der DNA auf der Membran unter UV-Licht erfolgte die Hybridisierung (siehe 2.2.2.5 und 2.2.2.6). Die Membran wurde mit $1\times$ SSC, 0,1%SDS bei 60°C gewaschen. Die Expositionszeit auf dem Röntgenfilm betrug mindestens zwei Stunden.

Southern-Denaturisierungslösung:

0,5 M Natronlauge
1,5 M Natriumchlorid

Southern-Neutralisierungslösung:

1M Tris pH7,4
1,5M Natriumchlorid

2.2.3.6 Maxiplasmidpräparation

Bei der Isolierung der Plasmide für die Sequenzierung wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die DNA wurde in $200\mu\text{l}$ Wasser gelöst, die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 und 280nm in monochromatischem Deuteriumlicht bestimmt.

2.2.4 Synthese einer cDNA von AKAP-2 (5'RACE)

Mit dem Ziel, die vollständige Sequenz von AKAP-2 zu erhalten, wurde mit genspezifischen Primern eine cDNA der RNA dieses Gens im 5'RACE-Verfahren (Rapid Amplification of cDNA Ends, Clontech) hergestellt.

Bei diesem Verfahren wird eine Variante der Moloney Murine Leukemia Virus Reversen Transkriptase (MMLV RT) verwendet, die bei Erreichen des Endes eines RNA-Strangs eine Transferaseaktivität entwickelt und an den cDNA-Strang ein Oligonukleotid, das hauptsächlich aus dC-Resten besteht, anhängt. Diese Sequenz dient als Anlagerungsstelle für das dG-reiche SMART-Oligonukleotid und es kommt zur Bildung von cDNA-Kopien der Ursprungs-RNA mit der zusätzlichen SMART-Sequenz. Da die MMLV RT ihre Transferaseaktivität vor allem nach Erreichen des Endes eines RNA-Stranges entwickelt, wird eine besonders hohe Ausbeute an vollständig synthetisierter cDNA erreicht. Darüber hinaus werden durch geeignete Konstruktion der Primer für die RACE-Reaktion cDNAs eliminiert, die aufgrund unspezifischer Primerbindung synthetisiert wurden.

Die Synthese der cDNA erfolgte ausgehend von $2\mu\text{g}$ Gesamt-RNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Die entstandenen Produkte wurden elektrophoretisch auf ihre Größe hin überprüft und mit genspezifischen Primern sequenziert.

2.2.5 Sequenzierung von cDNA

Mit Hilfe der Dye-Terminator-Sequenzierung sollte die Abfolge der Nukleotide der Inserts der DKFZ-Klone und der durch RACE hergestellten cDNA ermittelt werden. Bei dieser Methode werden in einer PCR für die vier Basen vier verschiedene fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide als Terminatoren eingebaut und deren Abfolge im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) ermittelt.

Sequenz-PCR-Ansatz:

- 1 µl DNA (0,25 µg/µl bzw 0,5 µg/µl)
- 1 µl Primer (5 µM)
- 8 µl Big Dye™ Terminator RR Mix
- 10 µl steriles Wasser

Big Dye™ Terminator RR Mix (Perkin Elmer) enthält: A-Dye-Terminator mit dichloro[R6G], C-Dye-Terminator mit dichloro[ROX], G-Dye-Terminator mit dichloro[R110], T-Dye-Terminator mit [TAMRA], dATP, dCTP, dITP, dUTP, AmliTaq Polymerase, MgCl₂ und Tris-Puffer, pH 9.

Nach einer initialen Denaturierung von vier Minuten bei 94°C erfolgten 20 bzw. 30 Zyklen (bei 0,5µg bzw. 0,25µg DNA) mit einer Minute Anlagerungszeit bei 58°C, drei Minuten Extension bei 60°C und 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C. Nach dem letzten Zyklus wurde noch einmal fünf Minuten bei 72°C elongiert, bevor abschließend auf 4°C abgekühlt wurde. Jetzt wurde das PCR Produkt zwei Minuten mit 5000g über eine Auto-Seq-Säule abzentrifugiert, um nicht eingebaute Farbstoffe und Nukleotide abzutrennen.

Ansatz zur Ermittlung der Sequenz:

- 20 µl PCR-Produkt
- 60 µl steriles Wasser
- 8,1 µl Natriumacetat 3 M, pH4,3
- 220 µl reines Ethanol

Der Ansatz wurde fünf Minuten auf Eis gekühlt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 10000g wurde das Pellet mit 400µl Ethanol 70% gewaschen und weitere zehn Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Vakuum getrocknet und konnte so bei -20°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt werden.

Zur Sequenzierung wurde das wie oben beschrieben aufbereitete PCR Produkt mit 25µl Template Supression Reagenz (TSR) gelöst und in einem Heizblock zwei Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis überführt. Die Sequenz der Proben wurden in einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ermittelt.

3 Ergebnisse

Das Organ Knochen befindet sich stets in einem Zustand von gleichzeitigem Anbau und Abbau. Dabei wirken eine Reihe von Hormonen und Zytokinen auf Osteoblasten und Osteoklasten, die wiederum durch Veränderung ihrer Genaktivität reagieren.

Ausgehend von 165 Nukleotiden eines PCR-Produkts, welches bei Vorarbeiten der Arbeitsgruppe im Rahmen der Suche nach Vitamin D-regulierten Genen in Osteoblasten gefunden worden war, wurde in der vorliegenden Arbeit die vollständige Sequenz seiner cDNA ermittelt und die Regulation seiner mRNA untersucht.

3.1 Gewinnung der vollständigen Sequenz der cDNA von AKAP-2

3.1.1 Screening von Datenbanken

Mit dem ursprünglich bekannten 165 Nukleotide langen PCR-Produkt war im Rahmen der Vorarbeiten bei Datenbankabgleichen Homologie zu zwei uncharakterisierten EST-Sequenzen (IMAG 998D1711, IMAG 998G05223), deren Inserts eine Länge von maximal 1,8kb hatten, festgestellt worden. Diese Klone waren von der Arbeitsgruppe bereits sequenziert worden. Bei Beginn der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche waren aus Datenbankabgleichen keine weiteren homologen Sequenzen bekannt.

3.1.2 Screening von cDNA-Bänken

Mit dem Ziel, die vollständige Sequenz der cDNA dieses noch unbekanntes Genes zu ermitteln, wurden ausgehend von den Ergebnissen der Hybridisierung von Multiple Tissue Blots (Clontech) (siehe 3.2.4) zwei cDNA-Bänke aus Placenta- und Herzgewebe (Arrayfilter des Ressourcenzentrums/Primärdatenbank des Humanen Genomprojekts/Berlin) auf Übereinstimmung mit den bis dahin bekannten 1,8 Kilobasen von AKAP-2 überprüft. Dabei wurden neun Klone identifiziert (Klon 841, 864, 435, 1146, 835, 1852, 860, 416, 1035). Um die Größe der Inserts zu bestimmen, wurden zwei Restriktionen mit XbaI und PstI bzw. NotI und Sall durchgeführt und anschließend im Southernblot die Übereinstimmung mit den bekannten 1,8kb bestätigt (siehe Abbildung 5).

Mit Ausnahme von Klon 1852, dessen Proben keinen Vektor enthielten, wurden alle Klone mit einem bereits in Vorarbeiten verwendeten Primer aus dem bekannten Fragment von 1,8kb sequenziert. Bei den Klonen 841, 864, 435, 1146, 416 und 1035 konnte eine Homologie nachgewiesen werden. Klon 860 war in den ersten 169 Basen ebenfalls konkordant, dann jedoch

folgten über 270 Basen, deren Sequenz nicht mehr mit der von AKAP-2 übereinstimmt. Klon 835 ergab keine lesbare Sequenz.

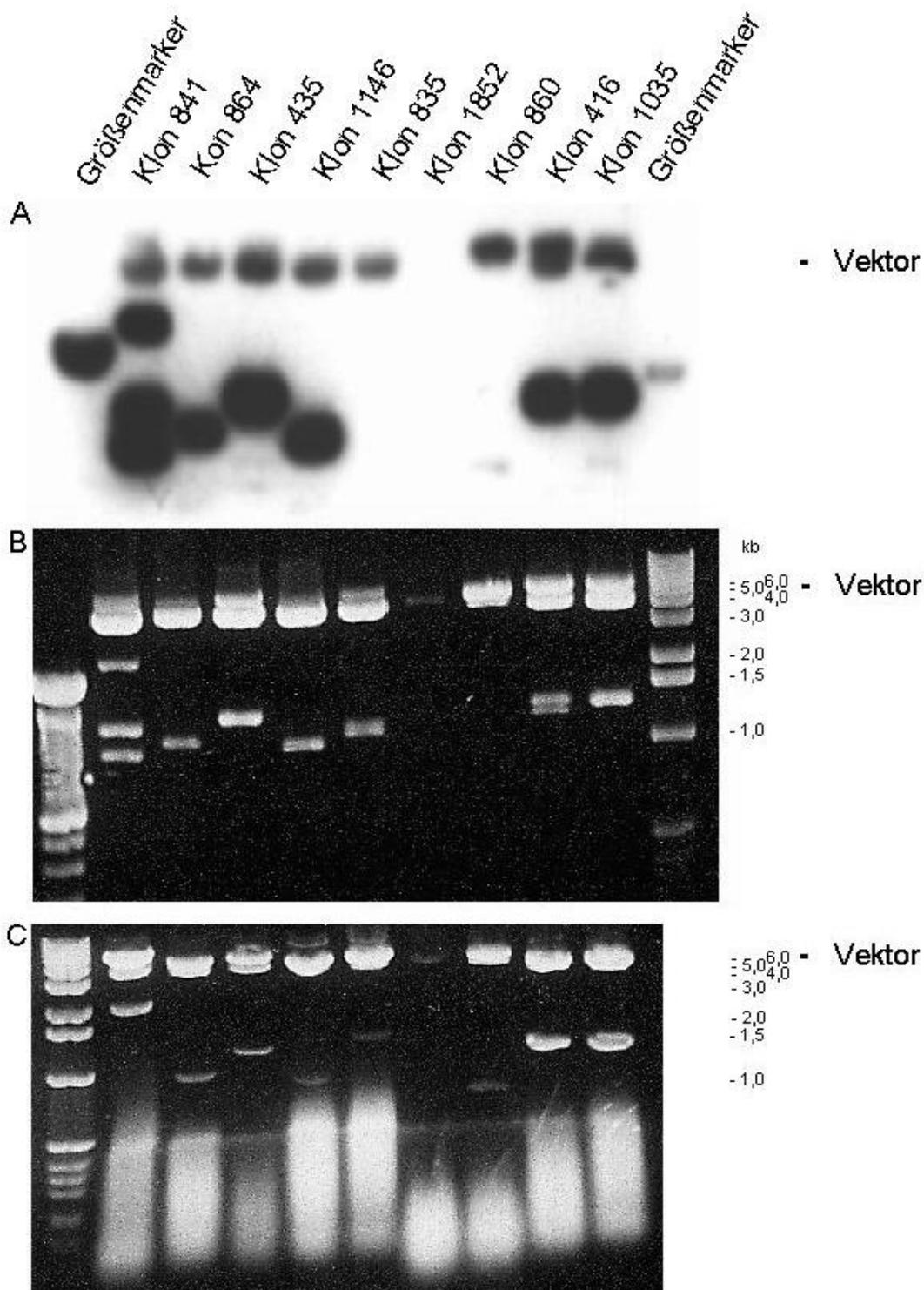


Abbildung 5: Southernblot und Restriktion von neun Klonen mit Homologie zu AKAP-2. A: Southernblot nach zwei Stunden Expositionszeit. Nach einem Tag Expositionszeit kamen die hier nur schwer erkennbaren kleineren Banden von Klon 841, 864, 435, 860 und 1035 noch deutlicher zur Erscheinung (nicht gezeigt). B: Gelelektrophorese nach Restriktion der Klone mit XbaI und PstI. C: Gelelektrophorese nach Restriktion der Klone mit NotI und Sall. Hier wurde keine RNase verwendet, die Schlieren in den Banden sind RNA-Kontamination.

Mit der Sequenzierung von Klon 841, der das längste Insert enthielt, konnten weitere 300 Nukleotide der cDNA-Sequenz als Ergänzung zu den bereits bekannten 1860 Nukleotiden ermittelt werden. Zunächst wurden dabei sechs Primer verwendet, mit denen in den Vorarbeiten die beiden IMAGE-Klone sequenziert worden waren. Damit konnte die Homologie des Klons 841 mit AKAP-2 bereits fast vollständig bewiesen werden. Die Lücken konnten mit den Primern SR 1 bis SR7 geschlossen sowie die Sequenz durch die Sequenzierung des Gegenstranges bestätigt werden. Die Lage dieser Primer sowie die der weiteren verwendeten Primer ist in der im Anhang eingefügten cDNA-Sequenz von AKAP-2 eingezeichnet.

3.1.3 Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2 durch genspezifische reverse Transkription

Nach der Sequenzierung von Klon 841 waren 2168 der insgesamt etwa 7500 Nukleotide (gemäß der Größenabschätzung im Northernblot) von AKAP-2 bekannt. Die Herstellung einer cDNA-Bank erfolgt ausgehend vom PolyA-Ende der Gesamt-RNA von Zellen. Da der Vorgang der cDNA-Synthese meist nach etwa 2kb abbricht, die gesamte Länge von AKAP-2 im Northernblot aber auf 7,5kb geschätzt wurde, war nicht damit zu rechnen, die vollständige Sequenz mit Hilfe von kommerziell erhältlichen, mit unspezifischen Primern hergestellten cDNA-Bänken zu erhalten. Daher wurde eine cDNA-Synthese mit genspezifischen Primern (5'RACE siehe 2.2.4) durchgeführt. Dabei wird der Primer so gewählt, daß er möglichst weit am 5'-Ende der bereits bekannten Sequenz liegt. Es kann dabei aufgrund ungünstiger Sekundärstrukturen bereits vor Erreichen des Endes der mRNA zum Kettenabbruch kommen, im günstigen Fall aber wird die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben. Nach Durchführung einer ersten cDNA-Synthese konnte die Länge der bekannten Sequenz von AKAP-2 auf 3658 Nukleotide verlängert werden. Eine zweite cDNA-Synthese führte schließlich zu einer Sequenz von insgesamt 5000 Nukleotiden. Die neu ermittelte Sequenz wurde stets durch Sequenzierung des Gegenstranges komplettiert und bestätigt. Die Lage der Primer innerhalb der Sequenz ist im Anhang verzeichnet. Routinemäßige Datenbankabgleiche der jeweils neu ermittelten Nukleotide der Sequenzrecherchen zeigten 100% Übereinstimmung mit dem Eintrag einer 5000 Nukleotide langen Sequenz einer cDNA aus humanem Hirngewebe (Akzessionsnummer NM_007203) sowie 37% Homologie zu einer cDNA aus murinem Gewebe (Akzessionsnummer NM_009649). Das Ausmaß der Überlappung mit diesen Datenbankeinträgen legte die Identität unserer cDNA als Protein Kinase A-Ankerprotein-2 (AKAP-2) nahe. Allerdings hat der Eintrag NM_007203 eine Gesamtlänge von etwa 5000 Nukleotiden und überlappt mit unserer Sequenz nur auf einer Länge von 2500 Nukleotiden. Somit verlängerte er unsere Sequenz um 2500 Nukleotide am 5'-Ende.

Diese neue Teilsequenz wurde von unserer Arbeitsgruppe durch PCR-Analysen mit genspezifischen Primern auch in der osteoblastären cDNA von hFOB-mRNA nachgewiesen. Die Gesamtlänge der bekannten cDNA-Sequenz betrug somit 7500 Nukleotide und entsprach somit der geschätzten Länge der zugehörigen mRNA. Es war also die vollständige Länge der cDNA-Sequenz ermittelt, entsprach einem Ankerprotein der Proteinkinase A und wurde unter der Akzessionsnummer AJ249826 in die Datenbanken gegeben. Zu dieser cDNA existierten in der Literatur bis dahin keine Daten zur Regulation der mRNA, es waren lediglich die beiden oben genannten Datenbankeinträge veröffentlicht. Dort fehlten jedoch 2500 Nukleotide am 3'-Ende, welche nur in unserer Sequenz vorhanden sind.

Weitere Datenbankvergleiche ergaben, daß die chromosomale DNA von AKAP-2 auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q31-9q33) liegt.

3.2 Regulation der mRNA-Expression von AKAP-2

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellversuche zur Regulation der mRNA von AKAP-2 durchgeführt. Im folgenden werden die Ergebnisse der Zellversuche anhand der Northernblots gezeigt.

Die densitometrisch ermittelten Zahlenwerte der Autoradiographiesignale wurden durch Division auf den jeweiligen Wert der Kontrolle normiert, anschließend wurden die Werte der Hybridisierungen mit Sonden für AKAP-2 und GAPDH jeder einzelnen Probe zueinander in Beziehung gesetzt. Somit sind alle Ergebnisse als Vielfaches der Kontrolle mit dem Wert 1 zu sehen.

Folgende Versuche wurden mit hFOB-Zellen durchgeführt:

Substanz/Art der Inkubation	siehe Kapitel
TNF α -Kinetik	3.2.1.1
Kobehandlung mit TNF α und AmD bzw. CHX	3.2.1.2
Kobehandlung mit TNF α und Inhibitoren der Phosphatidylkinase	3.2.1.3
Kobehandlung mit TNF α und Inhibitor der Diacylglycerolkinase	3.2.1.3
Kobehandlung mit TNF α und Inhibitoren NF κ B	3.2.1.3
Kobehandlung mit TNF α und Inhibitoren der PKC	3.2.1.4
TPA-Kinetik	3.2.2.1
Kobehandlung mit TPA und AmD bzw. CHX	3.2.2.2
Kobehandlung mit TPA und Inhibitoren der Phosphatidylkinase	3.2.2.3
Kobehandlung TNF α /Inhibitor der Diacylglycerolkinase	3.2.2.3
Kobehandlung mit TPA und Inhibitoren NF κ B	3.2.2.3
Kobehandlung mit TPA und Inhibitoren der PKC	3.2.2.4
Calciumionophore A23187	3.2.3.1
cAMP, Forskolin	3.2.3.2
bFGF, EGF, PDGF, IL-2, IL-6, TGF- β , IFN γ , IL-1 β	3.2.3.3
Vitamin D, Dexamethason	3.2.3.3

Weitere Versuche wurden mit den Zellarten SaOS2, MG63, TE85, U2, THP-2 und HL-60 durchgeführt (siehe 3.2.4).

3.2.1 Untersuchungen mit TNF α

Bei der Suche nach Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die Expression der mRNA von AKAP-2 beeinflussen, zeigte sich, daß Tumornekrosefaktor α (TNF α), dessen Wirkung im Knochenstoffwechsel bekannt ist, hier eine wesentliche Rolle spielte.

3.2.1.1 TNF α -Kinetik

Um die Zeitabhängigkeit der mRNA-Expression von AKAP-2 nach Stimulation mit TNF α zu untersuchen, wurden postkonfluente hFOB-Zellen über unterschiedliche Zeiten mit 2nM TNF α stimuliert und anschließend die gesamte RNA isoliert. Der Mittelwert der Induktion nach fünf Stunden Stimulation lag bei $4,9 \pm 1,2$ (n=12). Abbildung 6 zeigt eines von zwei zum Zeitverlauf der Induktion durchgeführten repräsentativen Experimenten.

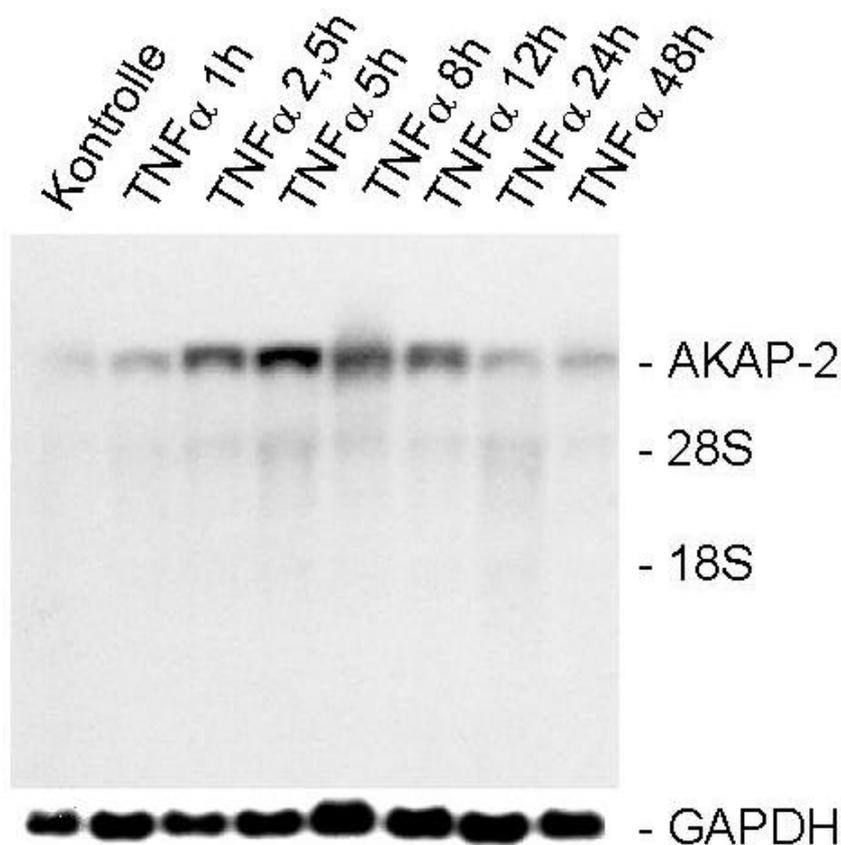


Abbildung 6: Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2 durch TNF α . Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag+7) wurden mit 2nM TNF α behandelt. Die Dauer der Stimulationen betrug zwischen einer und 48 Stunden. Die Lösung wurde direkt in die Kulturflaschen gegeben, eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine Northernblotanalyse durchgeführt. Die Membranen wurden nacheinander mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und einem 1kb langen GAPDH-Fragment inkubiert. Auf Höhe der 28S-RNA ist eine Bande mit ähnlicher Regulation wie der des 7,5kb-Produkts zu erkennen. (n=12 für die 5-Stundenwerte, für die übrigen Werte n=2)

3.2.1.2 Kobehandlung mit $TNF\alpha$ und Actinomycin D bzw. Cycloheximid

Um den Mechanismus der Induktion der mRNA von AKAP-2 durch $TNF\alpha$ zu untersuchen, wurde der Effekt von ActinomycinD (AmD), einem Hemmstoff der Transkription, und von Cycloheximid (CHX), das die Proteinsynthese inhibiert, auf $TNF\alpha$ -behandelte Zellen getestet. Vor der Zugabe von 2nM $TNF\alpha$ wurde 15 Minuten mit 2,5 μ M AmD bzw. 25 μ M CHX vorinkubiert, die RNA-Extraktion erfolgte nach fünf Stunden. In Abbildung 7 wird eines von insgesamt drei repräsentativen Experimenten dargestellt.

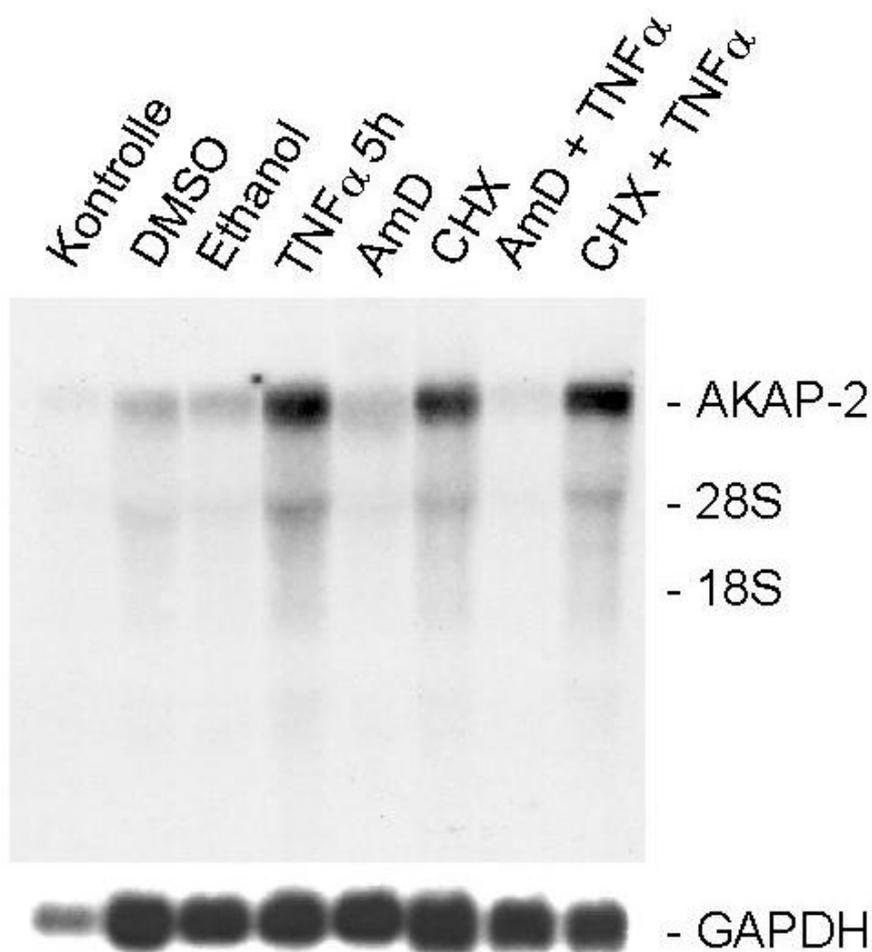


Abbildung 7: Kobehandlung von hFOB-Zellen mit Actinomycin D und Cycloheximid. Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag +7) wurden mit 2,5 μ M AmD bzw. 25 μ M CHX behandelt. Nach 15 Minuten wurde 2nM $TNF\alpha$ zugegeben. Ebenso wurden auch mit den Lösungsmitteln Ethanol und DMSO alleine (je 4 μ l) inkubiert und eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach weiteren fünf Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und Northernblotanalyse mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und anschließend einem 1kb langen GAPDH-Fragment. Auf Höhe der 28S-RNA ist wieder eine Bande mit vergleichbarer Regulation wie der Bande von AKAP-2 zu sehen. (n=3)

3.2.1.3 Kobehandlung mit $TNF\alpha$ und Hemmstoffen der Phosphatidylkinase, der Diacylglycerolkinase und der Wirkung von $NF\kappa B$

Mit dem Ziel, genauere Kenntnis über die Wirkung von $TNF\alpha$ bei der Induktion von AKAP-2 zu erlangen, wurden verschiedene Signaltransduktionewege mit Inhibitoren untersucht. Obwohl es sich hier um zum Teil unterschiedliche Mechanismen handelt, sollen die Ergebnisse aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammen dargestellt werden.

Nach Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat entsteht Inositol-1,4,5-Phosphat und Diacylglycerol (DAG), welches die PKC stimuliert. Physiologisch wird es rasch durch Phosphorylierung zu Phosphatidat inaktiviert. Dieser Schritt wird durch DAG-Kinase Inhibitor (DAG-KI) gehemmt⁶⁶. Durch die vermehrte Bildung von DAG kommt es zu einer verstärkten Aktivierung der PKC. DAG-KI wurde mit einer Konzentration von $20\mu M$ verwendet.

Wortmannin (Wm) ist ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase⁶⁷, die mit Rezeptoren unterschiedlicher Wachstumsfaktoren interagiert und so deren Effekte vermittelt. Wortmannin wurde in einer Konzentration von $25nM$ eingesetzt, was fünfmal über der halbmaximalen Hemmkonzentration in neutrophilen Granulozyten liegt⁶⁸.

BAY-11 ($100\mu M$) verhindert durch Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit von $NF\kappa B$ die Freisetzung dieses Transkriptionsfaktors⁶⁹.

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) inhibiert die Bindung von $NF\kappa B$ an die DNA⁷⁰ und wurde in einer Konzentration von $25\mu g/ml$ eingesetzt. SN-50 ($100\mu g/ml$) hemmt die Translokation von $NF\kappa B$ in den Zellkern⁷¹. Alle Stoffe wurden in den angegebenen Konzentrationen jeweils 15 Minuten vor der Stimulation mit $TNF\alpha$ ($2nM$) zugegeben. Die Ernte der mRNA erfolgte nach fünf Stunden.

Bei allen mit Wortmannin behandelten Proben fällt auf, daß die GAPDH-Signale geringer sind, als es die Bandenintensität der ribosomalen RNA im Ethidiumbromidgel (nicht gezeigt) erwarten läßt. In Abbildung 8 ist eines von drei repräsentativen Experimenten dargestellt.

3.2.1.4 Kobehandlung mit $TNF\alpha$ und Inhibitoren der Proteinkinase C

Um eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der Induktion der Expression der mRNA von AKAP-2 durch $TNF\alpha$ zu überprüfen, wurden hFOB-Zellen 15 Minuten vor der Inkubation mit $2nM$ $TNF\alpha$ mit verschiedenen Inhibitoren der PKC vorbehandelt. Es handelte sich dabei um Staurosporin ($3,5nM$), H7 ($30\mu M$) und um H8 ($75\mu M$). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt (nicht gezeigt). Alleine hatten alle drei Inhibitoren keinen Effekt auf die Expression

der mRNA, in der Kobehandlung wurde ein sehr unterschiedlicher Gehalt an mRNA von AKAP2 beobachtet, zwischen den Experimenten war keine Kongruenz zu erkennen.

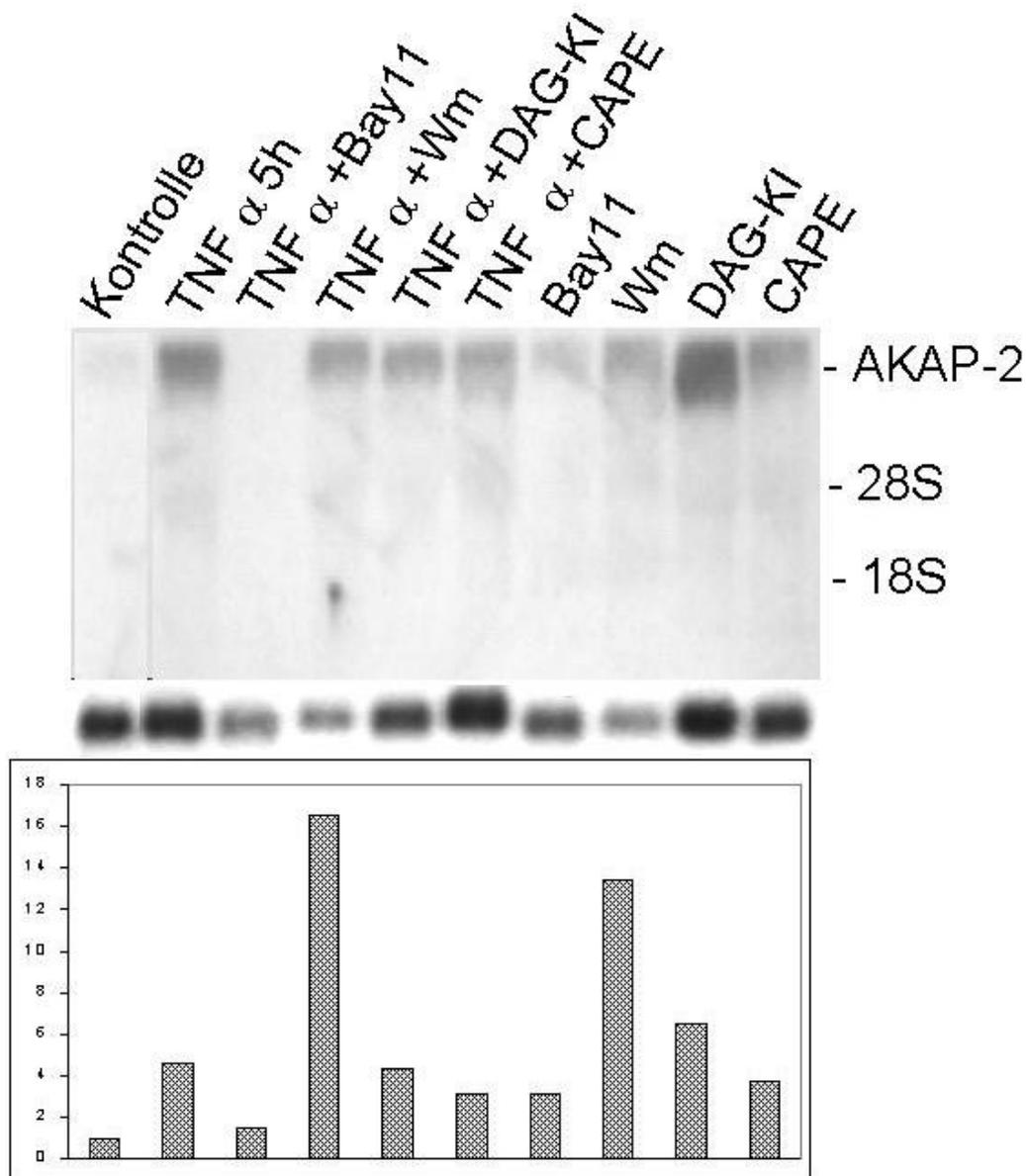


Abbildung 8: Kostimulation von hFOB-Zellen mit Hemmstoffen der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der Diacylglycerolkinase bzw. Inhibitoren der Wirkung von NF κ B und TNF α . Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag +7) wurden mit 100 μ M Bay11, 25nM Wortmannin, 20 μ M DAG-KI, 25 μ g/ml CAPE bzw. 100 μ g/ml SN-50 behandelt. Nach 15 Minuten wurde 2nM TNF α zugegeben. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Nach weiteren fünf Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und Northernblotanalyse mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und anschließend einem 1kb langen GAPDH-Fragment. Die Banden stammen aus dem gleichen Experiment und wurden Zusammen densitometriert. Für eine einheitliche Darstellung mußten sie getrennt und neu zusammengestellt werden. Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung. Die Skalierung in der Vertikalachse bezieht sich auf die Normierung auf die Kontrolle mit dem Wert 1. (n=3)

3.2.2 Untersuchungen mit TPA

Phorbol-12-myristol-13-acetyl ist ein spezifischer Induktor der Proteinkinase C (PKC) und eignet sich als Hilfsmittel zur Untersuchung dieses Signaltransduktionsmechanismus.

3.2.2.1 TPA-Kinetik

Mit (TPA, 2 μ M), einem Induktor der Proteinkinase C, ließ sich eine erhöhte Expression der mRNA von AKAP-2 feststellen. Das Maximum der Induktion lag bei fünf Stunden (5,2 \pm 1,4, n=8).

Abbildung 9 zeigt eine für zwei Versuche repräsentative Zeitreihe über 24 Stunden.

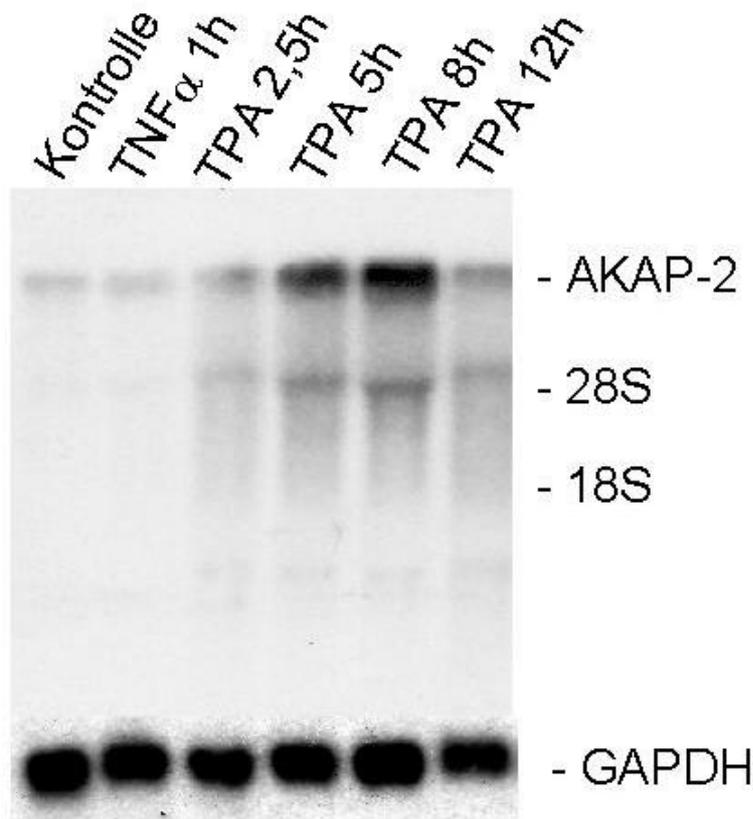


Abbildung 9: Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2 durch TPA. Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag+7) wurden mit 2nM TPA behandelt. Die Dauer der Stimulationen betrug zwischen einer und 24 Stunden. Die Lösung wurde direkt in die Kulturflaschen gegeben, eine Flasche wurde als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde Northernblotanalyse durchgeführt. Die Membranen wurden nacheinander mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und einem 1kb langen GAPDH-Fragment. Auf Höhe der 28S-RNA ist wieder eine Bande mit vergleichbarer Regulation wie der Bande von AKAP-2 zu sehen. (n=2)

3.2.2.2 Kobehandlung mit TPA und Actinomycin D bzw. Cycloheximid

Mit Hilfe von AmD und CHX wurde die Wirkebene von TPA bei der Regulation der mRNA von AKAP-2 untersucht. Die Zellen wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben behandelt, es wurde mit 2 μ M TPA gearbeitet. In Abbildung 10 ist ein für drei Experimente repräsentativer Versuch zu sehen.

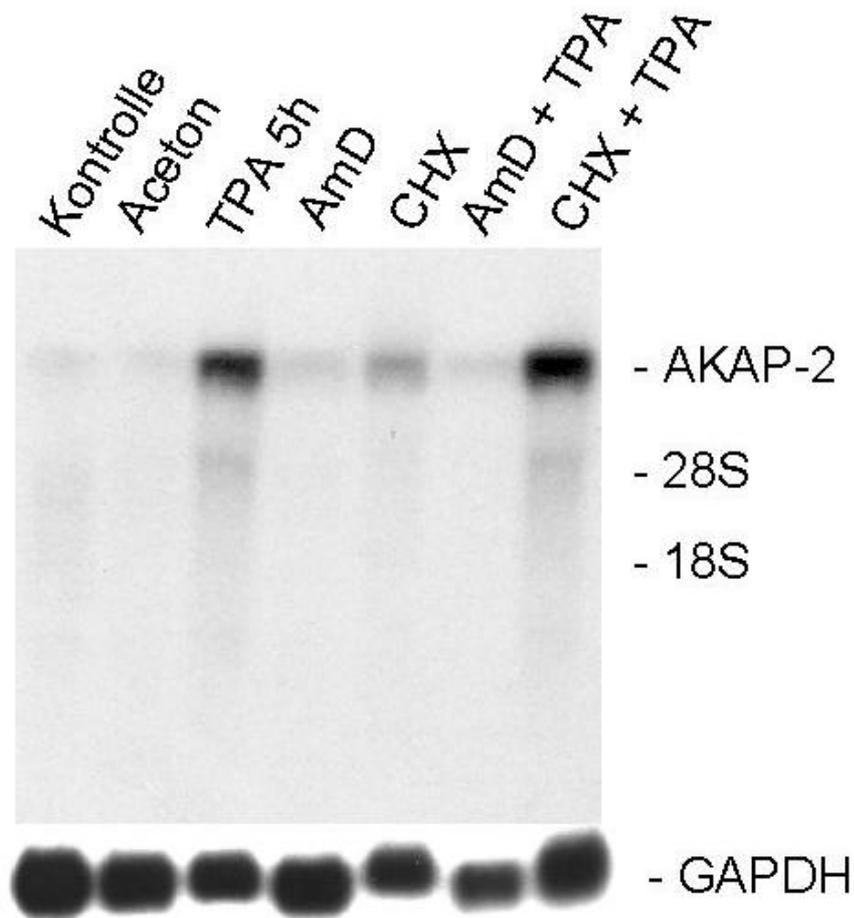


Abbildung 10: Kobehandlung von hFOB-Zellen mit Actinomycin D und Cycloheximid. Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag +7) wurden mit 2,5 μ M AmD bzw. 25 μ M CHX behandelt. Nach 15 Minuten wurde 2nM TPA zugegeben. Zur Kontrolle wurde mit dem Lösungsmittel Aceton (4 μ l) inkubiert und eine unbehandelte Probe mitgeführt. Nach weiteren fünf Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und Northernblotanalyse mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und anschließend einem 1kb langen GAPDH-Fragment. Auf Höhe der 28S-RNA ist wieder eine Bande mit vergleichbarer Regulation wie der Bande von AKAP-2 zu sehen. (n=3)

3.2.2.3 Kobehandlung mit TPA und Hemmstoffen der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der Diacylglycerolkinase und der Wirkung von NF κ B

Mögliche Signalwege, die die PKC nach ihrer Aktivierung durch TPA bei der Regulation der mRNA von AKAP-2 benutzt, wurden mit verschiedenen Inhibitoren untersucht (vgl. 3.2.1.3). CAPE und Bay11, die mit der Aktivierung von NF κ B interagieren, DAG-KI, der eine verstärkte Aktivierung der PKC bewirkt, und Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase, wurden 15 Minuten vor Inkubation mit TPA in den bereits oben angegebenen Konzentrationen zugegeben. Auch hier fällt auf, daß in den mit Wortmannin behandelten Proben die GAPDH-Signale geringer ausfallen als es die Bandenintensität der ribosomalen RNA im Ethidiumbromidgel erwarten läßt (nicht gezeigt). Abbildung 11 zeigt eines von drei repräsentativen Experimenten.

3.2.2.4 Kobehandlung mit TPA und Hemmstoffen der Proteinkinase C

TPA stimuliert die Proteinkinase C. Durch Kobehandlung mit drei Inhibitoren der PKC (Staurosporin, 3,5nM, H7, 30 μ M, H8, 75 μ M) 15 Minuten vor Inkubation mit 2nM TPA sollte deren Wirksamkeit auf die Aktivität der PKC bestätigt werden, um damit die Aussagen im Zusammenhang mit den Kobehandlungen mit TNF α zu bekräftigen. In einem Versuch wurden nach Kobehandlung mit den Hemmstoffen und TPA zwischen 50 und 75% der nach Inkubation mit TPA alleine erreichten Werte beobachtet (n=1, Daten nicht gezeigt).

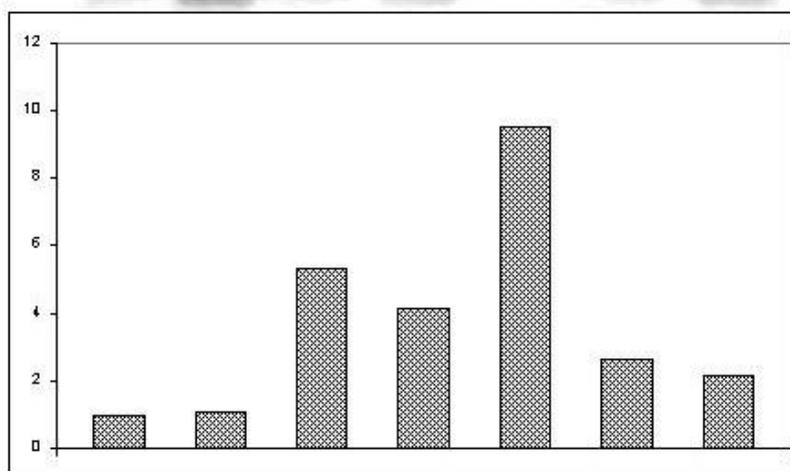
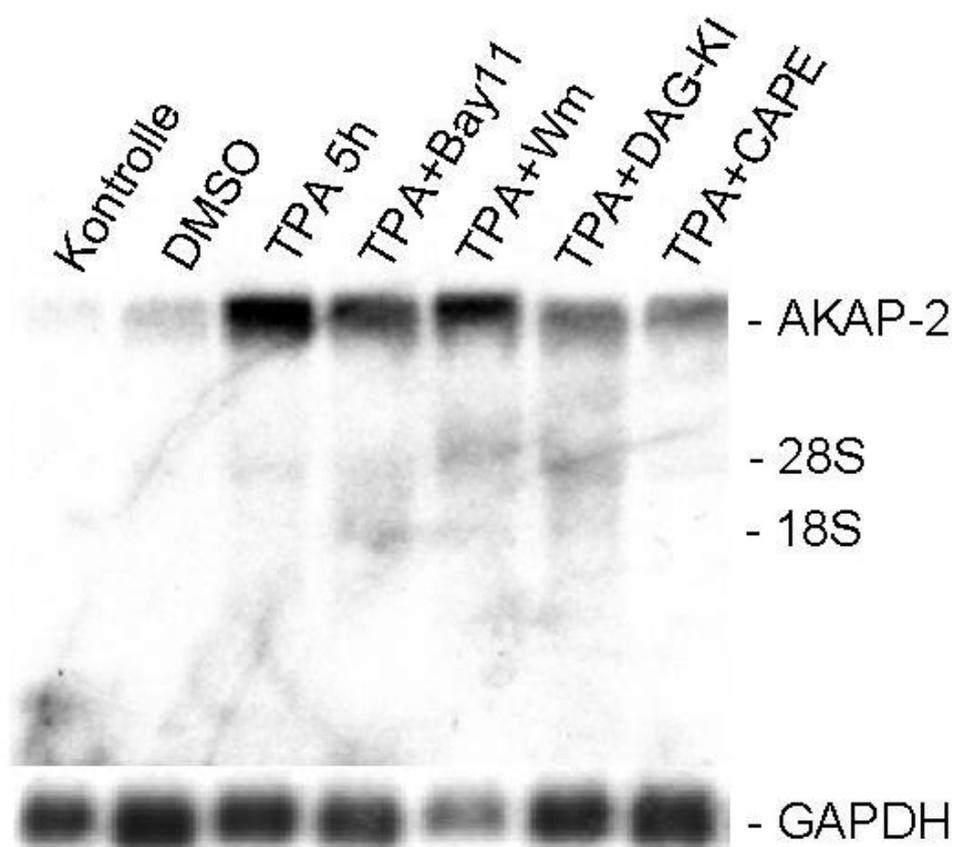


Abbildung 11: Kostimulation von hFOB-Zellen mit Hemmstoffen der Phosphatidylinositol 3-Kinase, der Diacylglycerol-kinase bzw. Inhibitoren der Wirkung von NF κ B und TPA. Postkonfluente hFOB-Zellen (Tag +7) wurden mit 100 μ M Bay11, 25nM Wortmannin, 20 μ M DAG-KI, 25 μ g/ml CAPE bzw. 100 μ g/ml SN-50 behandelt. Nach 15 Minuten wurde 2nM TPA zugegeben. Eine Probe wurde mit dem Lösungsmittel DMSO (4 μ l) inkubiert sowie eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach weiteren fünf Stunden erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA und Northernblotanalyse mit einem radioaktiv markierten 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und anschließend mit einem 1kb langen GAPDH-Fragment. Auf Höhe der 28S-RNA ist wieder eine Bande mit vergleichbarer Regulation wie der Bande von AKAP-2 zu sehen. Das Säulendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung. Die Skalierung in der Vertikalachse bezieht sich auf die Normierung auf die Kontrolle mit dem Wert 1. (n=3)

3.2.3 Untersuchungen der Regulation der mRNA von AKAP2 mit weiteren Faktoren

3.2.3.1 Untersuchungen mit Calciumionophore

Nach der Aktivierung der Phospholipase C (PLC) entsteht aus Phosphoinositol-4-5-Bisphosphat Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (1,4,5 IP₃), das zur Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. Um zu untersuchen, ob neben DAG auch 1,4,5 IP₃ bei der Regulation der mRNA von AKAP-2 von Bedeutung ist, wurde mit Calciumionophore A23187 die Wirkung von 1,4,5 IP₃ imitiert. Die Inkubation mit 1 μ M Calciumionophore erfolgte über eine, fünf und 24 Stunden. Es wurde keine Änderung des mRNA-Gehalts verzeichnet (1,15 \pm 0,05 nach 24 Stunden, n=2, Daten nicht gezeigt).

3.2.3.2 Untersuchungen im Signaltransduktionsweg mit cAMP

Ein wichtiger Signaltransduktionsweg vieler Zytokine und Wachstumsfaktoren beginnt mit der Aktivierung von G-Proteinen, was zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem zweiten Botenstoff, führt. Es wurde daher Stimulationsversuche mit Forskolin (1 μ M), einem Aktivator der Adenylatzyklase, über eine bis 24 Stunden durchgeführt. Ebenso wurde die Wirkung von cAMP (1mM, eine bis 24 Stunden) direkt getestet. Es ließ sich aber keine Regulation der mRNA von AKAP-2 nachweisen (Forskolin: 1,25 \pm 0,25, nach fünf Stunden, n=3, cAMP: 1,75 \pm 0,55, nach 5 Stunden, n= 2, davon eine Doppelbestimmung, Daten nicht gezeigt).

3.2.3.3 Stimulationsversuche mit verschiedenen Zytokinen Wachstumsfaktoren, Vitamin D und Dexamethason

In einer Art Screening zu Beginn der Versuche wurde die Wirkung einer Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Stimulationszeit 15 Minuten, einer und 24 Stunden) untersucht, in einigen Fällen wurde eine fragliche Regulation durch weitere Stimulationsversuche geprüft. Dabei wurde bFGF (Fibroblast Growth Factor, 10ng/ml), EGF (Epidermal Growth Factor, 20ng/ml), PDGF (Platelet derived Growth Factor, 5ng/ml), IL-2 (Interleukin-2, 1U/ml), IL-6 (Interleukin-6, 10ng/ml), TGF- β (Transforming Growth Factor β , 2ng/ml), IFN γ (Interferon γ , 10ng/ml), IL-1 β (Interleukin-1 β , 3ng/ml) und TNF α (2nM) verwendet (Daten nicht gezeigt). Nur mit TNF α konnte eine Induktion der mRNA von AKAP-2 beobachtet werden.

In Vorarbeiten war wiederholt eine Vitamin D-Abhängigkeit der mRNA von AKAP-2 festgestellt worden. Der Effekt stellte sich jedoch bei weiteren Stimulationsversuchen als unbedeutend heraus. In einer Doppelbestimmung lagen die Werte für den Zeitraum zwischen 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden bei 0,71 \pm 0,19, d.h. unter dem Wert der Kontrolle. Ein weiterer Versuch mit

Bestimmungen nach einer und fünf Stunden Stimulation brachte vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Dexamethason (10^{-8}M) wurde nach einer, fünf und 24 Stunden Stimulation getestet ($n=2$). Der Mittelwert nach fünf Stunden betrug das $1,45 \pm 0,35$ fache der Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

3.2.4 Expression von AKAP-2 in anderen Zelllinien

In hFOB-Zellen wird AKAP-2 konstitutiv exprimiert. Mit der Frage nach der Gewebespezifität des Gens wurden verschiedene Zelllinien im Northernblot auf AKAP-2 hin untersucht. In den Osteosarkomzellen SaOs2, MG63, TE85 und U2 wird AKAP-2 kaum bis überhaupt nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt).

In leukämischen THP-1- und HL-60-Zellen wird AKAP-2 konstitutiv exprimiert.

Zwei käuflich erworbene Blots mit RNA aus unterschiedlichen Geweben (Clontech) zeigten die Expression von AKAP-2-mRNA in Placenta, Herz, Magen, Dünndarm und Nebennierenmark, am geringsten war sie in Testisgewebe und Hirn. Abbildung 12 zeigt einen dieser Blots.

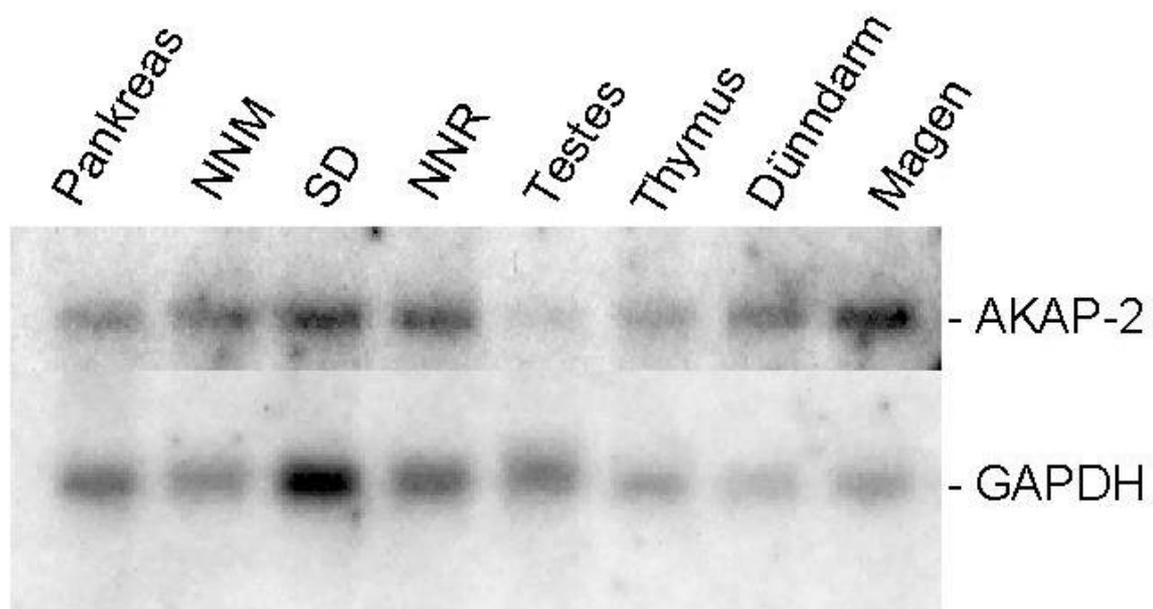


Abb 12: Northernblot mit Gesamt-RNA verschiedener Gewebe. Der Blot wurde mit einem 1,8kb langen cDNA-Fragment von AKAP-2 und anschließend mit einem 1kb langem GAPDH-Fragment inkubiert. NNM= Nebennierenmark, SD= Schilddrüse, NNR= Nebennierenrinde

4 Diskussion

Im Organ Knochen herrscht ein ständiges Nebeneinander von Auf- und Abbau. Die Regulation dieser Ereignisse läuft von verschiedenen Achsen kommend auf zellulärer Ebene zusammen und wird hier von endo- para- und autokrin auf Osteoblasten und Osteoklasten wirkenden Faktoren getragen. So liegt der Gedanke nahe, sich über die Mechanismen seiner Regulation durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine einem Gen zu nähern, von dem man nur von seiner Existenz in Osteoblasten weiß und einen kleinen Teil seiner Nukleotidsequenz kennt.

Schließlich ging man in der vorliegenden Arbeit auch daran, die vollständige Sequenz der cDNA des unbekanntes Gens zu ermitteln, um es damit besser in seiner Funktion und Stellung im Knochenstoffwechsel einordnen zu können.

4.1 *Humane fötale Osteoblasten hFOB 1.19 als Modellsystem*

Um komplexe Zusammenhänge in der Natur wissenschaftlich zu untersuchen, muß man möglichst überschaubare und steuerbare Modellsysteme verwenden, die jedoch gleichzeitig den tatsächlichen Gegebenheiten möglichst nahekommen sollen.

Das Organ Knochen entwickelt sich unter einer Vielzahl zellulärer sowie auto- para- und endokriner Einflüsse. Zwei wesentlich daran beteiligte Zellarten sind Osteoklasten und Osteoblasten, wobei sich beide Zellarten in ihrer Entwicklung und Funktion gegenseitig beeinflussen. Zu Beginn der Untersuchungen eines noch nicht weiter bekannten Genes ist es sinnvoll, möglichst viele dieser unberechenbaren Einflußmöglichkeiten durch andere Zellen z.B. in einer Mischkultur auszuschließen. Die mRNA von AKAP-2 war zuerst in der humanen fötalen Osteoblastenzelllinie hFOB1.19 nachgewiesen worden. Es lag also nahe, für die weiteren Untersuchungen zunächst diese Zellreihe zu verwenden.

Der Nachteil von Primärkulturzellen humaner Osteoblasten, die in ihrem Genmuster den natürlichen Bedingungen am nächsten stehen, ist deren langsame Proliferation und rasche Alterung. Diese Eigenschaft entfällt bei hFOB-Zellen durch Transfektion mit dem Gen für eine temperatursensitive Mutante des large-T-Antigen des SV 40-Virus. Die Expression dieses Gens ist konditionell, d.h. an eine Temperatur von 34,5°C gebunden. Unter diesen Bedingungen entsteht das Genprodukt T-Antigen, welches mit dem Produkt des Retinoblastomgens interagiert. Es führt so zu einer gesteigerten Proliferation, ohne daß dabei der osteoblastäre Charakter der Zellen, zu messen unter anderem an der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Sekretion von Osteocalcin, verlorengeht⁶³. Kultivierung bei 37°C führt zu langsamer Proliferation und

rascher Alterung. Bei postkonfluenten Zellen sind Mineralisationsknoten, ein Zeichen eines späten Differenzierungsstadiums, zu beobachten. Insofern stellt diese Zelllinie ein "schnell proliferierendes Modellsystem zum Studium der Differenzierung und Physiologie humaner Osteoblasten sowie der Effekte von Zytokinen auf Osteoblasten"⁶³ dar.

4.2 Ermittlung der vollständigen cDNA-Sequenz von AKAP-2

164 Nukleotide von AKAP-2 waren im Rahmen einer Suche nach Vitamin D-regulierten Genen mit Hilfe von Differential Display PCR (ddPCR) identifiziert worden. Datenbankabgleiche zeigten Homologien zu zwei EST-Sequenzen, durch Sequenzierung dieser Klone konnten insgesamt 1860 Nukleotide ermittelt werden. In regelmäßig durchgeführten Datenbankabgleichen konnte zunächst keine Homologie zu bekannten cDNAs festgestellt werden. Es lag also die mRNA eines noch uncharakterisierten menschlichen Genes vor.

Um die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten, wurden cDNA-Bänke aus Plazenta- und Herzgewebe auf Homologie mit den bekannten 1860 Nukleotiden hin überprüft und die Sequenz der positiven Klone ermittelt. Dadurch konnte die Länge der bekannten Sequenz auf 2168 Nukleotide verlängert werden. Weiter konnten mit Hilfe von 5'RACE insgesamt 5kb der Sequenz ermittelt werden.

Während der Arbeiten an der Sequenzierung wurden wiederholt Datenbankabgleiche mit der nun verlängerten bekannten Sequenz durchgeführt. Schließlich kamen zwei neue Einträge in die Datenbank (Akzessionsnummer NM_007203, humanes Proteinkinase A-Ankerprotein-2 der und NM_009649, murines Proteinkinase A-Ankerprotein-2)^{72 73}, die 100% bzw. 37% Homologie zu der Sequenz der osteoblastären cDNA aufwiesen. NM_007203 entspricht einer cDNA aus humanem Hirngewebe mit einer Länge von 5210 Nukleotiden. Homologe Sequenzen liegen zwischen den Basen 1 und 5198 der osteoblastären cDNA, welche dann jedoch noch um weitere 2,3kb in das 3'-Ende hineinreicht. 12 Basen am 5'-Ende dieser cDNA sind nicht in dem Datenbankeintrag der cDNA von AKAP-2 veröffentlicht, jedoch sicher darin enthalten, da dieser Bereich erfolgreich als Primer zur Sequenzierung genutzt wurde (siehe Anhang). Das murine Äquivalent hat homologe Bereiche zwischen den Basen 301 und 4004 von AKAP-2. Die Gesamtlänge der gesuchten cDNA wurde entsprechend dem Bandenmuster der zugehörigen mRNA im Northernblots auf 7,5kb geschätzt.

Open-reading-frame-Berechnungen ergaben eine Aminosäuresequenz, die einem Protein aus der Familie der Ankerproteine der Proteinkinase A, AKAP-2⁷² entspricht. Das errechnete Molekulargewicht liegt bei 122 Kilodalton (kD). Bisher liegen zu diesem Protein keine

Experimente vor. Analysen der hypothetischen Proteinstruktur weisen auf die Existenz von drei sogenannten coiled-coil Strukturen hin. Region cc1 liegt zwischen den Aminosäuren 59 und 120 (Genauigkeit für jede Aminosäure zwischen 0,68 und 1,00), cc2 zwischen den Aminosäuren 538 und 566 (Genauigkeit für jede Aminosäure zwischen 0,68 und 0,69), cc3 zwischen den Aminosäuren 940 und 978 (Genauigkeit für jede Aminosäure zwischen 0,93 und 1,00). Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,8 weit im sauren Bereich, entsprechend denen anderer Mitglieder der AKAP-Familie.

Weitere Datenbankvergleiche ergaben, daß die chromosomale DNA von AKAP-2 Chromosom 9 (9q31-9q33) enthalten ist. Bislang existieren in der Literatur noch keine Daten zum Aufbau und Regulation der genomischen DNA oder zur Regulation der mRNA von AKAP2.

4.3 Charakterisierung der Regulation der mRNA von AKAP-2

4.3.1 Regulation der mRNA von AKAP-2 durch Vitamin D

Im Knochenstoffwechsel spielt Vitamin D eine herausragende Rolle. Es führt unter anderem zur Knochenneubildung durch Osteoblasten und Mineralisation von vorhandener Knochensubstanz. Ebenso ist es an der Stimulation der Knochenresorption durch Osteoklasten beteiligt und ist somit ein wichtiger Regulator beim Umbau der Knochensubstanz. Es wirkt über einen intrazellulären Rezeptor direkt auf die Aktivität von Genen⁵⁹. Neben diesem klassischen Steroidrezeptorkonzept scheint aber auch die Vermittlung von schnellen Effekten von Vitamin D über einen membranständigen Rezeptor von Bedeutung zu sein^{74 75}.

Die mRNA von AKAP-2 war zunächst bei der Suche nach Kandidatengenen von Vitamin D entdeckt worden (siehe Einleitung). Nach den Ergebnissen der Experimente mit ddPCR ging man daher zunächst davon aus, daß die Expression der mRNA von AKAP-2 von Vitamin D reguliert wird. Die Kinetik sprach für einen schnellen nichtgenomischen Effekt von Vitamin D, da sich die Wirkung auf den klassischen nukleären Vitamin D Rezeptor erst nach mehreren Stunden bis Tagen zeigt⁷⁶. In Chondrozyten ist ein membranständiger Rezeptor für Vitamin D-Hormon bekannt, der die Aktivität der PKC reguliert⁷⁷. Es wurden also Northernblotuntersuchungen mit hFOB-Zellen nach zwei bis 24 Stunden Vitamin D-Behandlung (Doppelbestimmung) durchgeführt. Ebenso wurden Zellen nach einer bzw. fünf Stunden Stimulation mit Vitamin D untersucht. Es ergab sich jedoch im Vergleich mit unbehandelten Zellen keine Veränderung der Expression der mRNA von AKAP-2. Die ddPCR ist zwar ein gutes Mittel zur Untersuchung unterschiedlich exprimierter Gene, jedoch wird wie bei allen Screeningmethoden von einer nicht unerheblichen Zahl falsch positiver Ergebnisse berichtet⁷⁸. Eine mögliche Ursache sind dabei

DNA-Fragmente gleicher Länge wie die gesuchte cDNA, die somit in der Elektrophorese in einer gemeinsamen Bande laufen⁷⁹. Es ist denkbar, daß es während der ddPCR, bei der zur Vervielfältigung unbekannter RNA-Sequenzen mit Zufallsprimern gearbeitet wurde, ein von der ursprünglichen RNA unterschiedliches Produkt vergleichbarer Länge gebildet wurde. Dies würde also bedeuten, daß man hier die mRNA eines anderen, von Vitamin D unabhängigen Gens untersucht hat, als die, die man zu Beginn in den Untersuchungen mit ddPCR zunächst beobachtet hat.

Da jedoch die Sequenz der nun tatsächlich untersuchten mRNA keiner bisher veröffentlichten Gensequenz entsprach und sich die mRNA eindeutig in osteoblastären Zellen nachweisen ließ, wurde in einigen Experimenten eine Anzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren auf ihre Wirksamkeit auf die Expression der mRNA von AKAP-2 hin überprüft (siehe 3.2.3.3). Es stellte sich heraus, daß TNF α und TPA dabei die stärksten Effekte hatten.

4.3.2 Wirkung von TNF α auf die Expression der mRNA von AKAP-2

Zellen können nach Kontakt mit Zytokinen und anderen Botenstoffen mit einer Veränderung ihrer Zellaktivität reagieren. Dabei kommt es durch Hemmung oder Induktion z.B. der Transkription, Translation und Proteinverarbeitung zu einem veränderten Expressionsmuster von mRNAs.

TNF α führte nach zweieinhalb Stunden Stimulation zu einem deutlichen Anstieg des Gehalts an mRNA von AKAP-2. Das Maximum der Stimulation lag bei fünf Stunden (siehe 3.2.1.1). Die mRNA von AKAP-2 ist also von TNF α reguliert und weist eine relativ rasche, aber transiente Induzierbarkeit auf. TNF α hat im Knochen eine große Bedeutung bei der Regulation unterschiedlichster Genprodukte, bei denen es sich oft um sogenannte schnell responsive Gene handelt. Die Kinetik der Induktion der mRNA von AKAP-2 durch TNF α gab bereits einen ersten Hinweis darauf, daß es sich hier um einen Vertreter dieser Gengruppe handeln könnte (s.u.).

Um zu klären, auf welcher Ebene im Zellstoffwechsel diese vorübergehende Erhöhung des mRNA-Gehalts von AKAP-2 durch TNF α geschieht, wurden Kobehandlungen durchgeführt, bei denen durch Zugabe von Actinomycin D bzw. Cycloheximid die Fähigkeit der Zellen zur Transkription bzw. Translation gehemmt wurde.

Inkubation der hFOB-Zellen mit AmD alleine führte zu keiner Veränderung der Expression der mRNA von AKAP-2 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (siehe 3.2.1.2). Dies weist auf eine relativ lange Halbwertszeit der mRNA hin, deren Gehalt in unstimulierten Zellen unabhängig von aktuell stattfindender Transkription ist.

Dagegen führte die Hemmung der Translation durch CHX zu einer Erhöhung des Signals von AKAP-2 im Northernblot auf das Doppelte der Kontrollwerte (siehe 3.2.1.2).

Die Regulation der basalen Expression der mRNA von AKAP-2 geschieht also auf Ebene der Proteinsynthese. Dabei sind verschiedene Mechanismen in Erwägung zu ziehen: Kurzlebige Proteine (RNAsen) können für die ständige Degradation der mRNA von AKAP-2 und somit für den geringen basalen Gehalt sorgen²⁹. Da diese Enzyme aber einer ständigen Neusynthese bedürfen, kann nach Unterbrechung der Translation durch CHX der Gehalt an mRNA von AKAP-2 steigen. Andererseits wird auch von einer Kopplung der Degradation von mRNA an ihre Translation berichtet²⁸. Wird durch CHX die Translation unterdrückt, so wird gleichzeitig die Degradation der mRNA gehemmt. Da der Anstieg des Gehalts der mRNA von AKAP-2 nach Zugabe von CHX sehr ausgeprägt ist, kann man darauf schließen, daß die ansonsten geringe basale Expression dieser mRNA durch eine andauernd stattfindende und rasche Bildung des von ihr kodierten Proteins bedingt ist. Einige Proteinsynthesehemmer wie CHX können RNA nach ihrer Bildung an den Polysomen festhalten und somit vor degradierenden zytoplasmatischen Ribonukleasen schützen⁸⁰.

Gleichzeitige Stimulation von hFOB-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und AmD zeigte eine vollständige Unterdrückung des $\text{TNF}\alpha$ -Effekts auf den Gehalt an mRNA von AKAP-2. Die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ ist also wesentlich an die intakte Fähigkeit der Zelle zur Transkription gebunden.

In der Kobehandlung der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und CHX kam es zu einer Superinduktion, d.h. zu stärkeren Signalen als nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ bzw. CHX alleine. Dies zeigt, daß die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auf die mRNA von AKAP-2 unabhängig von der Proteinneusynthese ist. Insgesamt wird dieses Verhalten der mRNA (Induktion der mRNA durch CHX alleine, Superinduktion bei Kobehandlung) für eine Gruppe von Genen diskutiert und gilt als charakteristisch für sogenannte „immediate early genes“ oder „primary response genes“, also schnell responsive Gene, die früh im Zellzyklus aktiviert werden und den Übergang der Zelle von der G_0 -Phase in die S-Phase propagieren⁸¹. Sie sind durch die Aktivierung bereits vorhandener Transkriptionsmodulatoren von aktuell stattfindender Proteinsynthese unabhängig⁸² und werden oft schon innerhalb von 15 bis 30 Minuten schnell und transient induziert⁸³. Aber auch bei langsamer induzierbaren mRNAs, etwa denen von Interleukin-1³¹ oder Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1)²⁹, konnte eine ähnliches Verhalten im Zusammenhang mit CHX beobachtet werden. Diese beiden Vertreter werden ebenfalls von $\text{TNF}\alpha$ reguliert und ähneln in ihrer Kinetik der der mRNA von AKAP-2. Bei vielen schnell responsiven Genen ist eine AUUUA-reiche Sequenz in der 3' untranslatierten

Region (3'UTR) bekannt⁸⁴. Sie stellt eine Erkennungsstelle für Proteine dar und vermittelt eine rasche Degradation der mRNA durch Abspaltung des Poly-A-Schwanzes oder den erleichterten Angriff von Endonukleasen. In der mRNA von AKAP-2 wurden zwar durchaus mehrere einzelne solcher Motive gefunden, sie liegen aber nicht streng gehäuft in der 3' untranslatierten Region.

Die Kinetik der Expressionsinduktion der mRNA von AKAP-2 durch $\text{TNF}\alpha$ ähnelt also der sogenannter schnell responsiver Gene und geschieht unabhängig von gerade stattfindender Proteinsynthese auf Ebene der Transkription, wahrscheinlich durch Aktivierung bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren.

4.3.3 Signaltransduktionsweg von $\text{TNF}\alpha$ im Zusammenhang mit der Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2

Es gibt verschiedene Wege der Signaltransduktion, mit denen ein Botenstoff nach Bindung an seinen membranständigen Rezeptor eine Wirkung im Inneren der Zelle hervorrufen kann. $\text{TNF}\alpha$ wirkt über zwei Typen von Rezeptoren, p55 und p75, und führt damit zur Aktivierung einer Reihe von Proteinen, zweiten Botenstoffen und Transkriptionsfaktoren (siehe Einleitung). Einige dieser Signaltransduktionswege sind hier genauer untersucht worden im Hinblick auf eine Beteiligung bei der Expressionsinduktion der mRNA von AKAP-2 durch $\text{TNF}\alpha$ in hFOB-Zellen.

4.3.3.1 $\text{TNF}\alpha$ und $\text{NF}\kappa\text{B}$

$\text{NF}\kappa\text{B}$ ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, von dem primär seine Bindung an ein Enhancerelement im Gen der κ -Leichtkette von Immunglobulinen bekannt war⁸⁵. Viele Gene besitzen Promotoren mit einer Bindungsstelle für $\text{NF}\kappa\text{B}$ mit der Sequenz 5'-GGGGYNNCCY-3'⁸⁶. $\text{NF}\kappa\text{B}$ wird unter anderem von Hormonen, inflammatorischen Zytokinen, darunter auch $\text{TNF}\alpha$, bakteriellen und viralen Stoffen wie z.B. Lipopolysaccharid aktiviert, ebenso aber auch durch physikalischen und oxidativen Stress, Phorbolster, Proteinkinase C und Mitogene^{87 88 89}. Die unterschiedlichen Stoffe aktivieren im Anschluß an die Bindung an ihren Rezeptor zunächst verschiedene Signalwege⁹⁰, schließlich führen sie jedoch zum gleichen Ziel, zur Freisetzung der aktiven Form von $\text{NF}\kappa\text{B}$ ⁹¹, welches nach Translokation in den Nukleus die Genexpression kontrolliert⁹². Teilweise ist dabei auch eine Protein-Protein-Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren nötig, deren Bindungsstelle am Promotor in der Nähe der Bindungsstelle von $\text{NF}\kappa\text{B}$ liegt⁹³.

Experimentell kann mit Inhibitoren in die Aktivierungskaskade eingegriffen werden. Der erste Schritt der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$, die Phosphorylierung und Ubiquitinierung des inhibitorischen Regulatorproteins $\text{I}\kappa\text{B}$, wird durch BAY11 verhindert⁶⁹. SN-50 inhibiert die Translokation von

NF κ B in den Nukleus⁷¹. Die spezifische Interaktion von NF κ B mit der DNA wird von CAPE inhibiert, ohne daß dabei die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, Oct-1 und TFIID an die DNA beeinflusst wird⁷⁰.

Proteine, die durch Vermittlung von NF κ B nach Stimulation mit TNF α sezerniert werden, sind unter anderem akute Phasen Proteine (Hepatozyten), IL-2-Rezeptor (T-Zellen) und E-Selectin (Endothelzellen)⁹⁴. In Osteoblasten wird die Bildung von Faktoren, die zur Resorption von Knochensubstanz beitragen, wie die Cyclooxygenase 2, Stickstoffmonoxid oder Interzellular Adhesion Protein-1 durch TNF α und NF κ B reguliert⁹⁵.

Daher wurde mit Hilfe der oben genannten Inhibitoren geprüft, ob bei der Wirkung von TNF α auf die mRNA von AKAP-2 NF κ B von Bedeutung ist (siehe 3.2.1.3).

In der Kobehandlung von hFOB-Zellen mit TNF α und BAY11 wurde in zwei Experimenten eine vollständige Hemmung des TNF α -Effekts erzielt. In einem weiteren Versuch jedoch war das Signal stärker als das der Stimulation mit TNF α alleine. Eine Inkubation mit BAY11 alleine konnte nur einmal durchgeführt werden, im Northernblot lag die Signalstärke zwischen denen der Kontrolle und der Stimulation mit TNF α . Da auch die gleichzeitig mit TPA durchgeführten Versuche ähnliche Ergebnisse brachten, stellt sich die Frage, ob es in der Versuchsreihe, in der BAY11 keinen inhibitorischen Effekt auf die Wirkung von TNF α oder TPA hatte, zu einer Aktivierung von NF κ -B oder anderer Transkriptionsfaktoren, die wie oben angeführt schon auf unspezifische Stimuli reagieren, etwa durch unbemerkte Temperaturschwankungen während des Transports der Zellen im Labor oder durch andersartige Streßstimuli gekommen ist, und so als falsch negativ zu betrachten wäre. Diese Hypothese ist jedoch nur schwer zu überprüfen. Eine Hemmung der TNF α -Wirkung auf die Induktion von AKAP-2 durch BAY11 scheint aber unter Berücksichtigung dieser möglichen Beeinflussung in einem Versuch durchaus denkbar.

CAPE wirkt auf einen der letzten Aktivierungsschritte von NF κ B ein. Daher ist auch anzunehmen, daß entsprechend der oben aufgeführten Hypothese einer Aktivierung von NF κ B durch Veränderung der Umweltbedingungen seine Wirkungsentfaltung dennoch verhindert wird. Tatsächlich verminderte CAPE den Effekt von TNF α auf die mRNA von AKAP-2 in allen drei Versuchen um etwa die Hälfte. Die Ergebnisse lagen ungefähr in Höhe der jedoch nur einmal mit CAPE alleine durchgeführten Stimulation. Eine Hemmung der TNF α -abhängigen Induktion der mRNA von AKAP-2 durch CAPE kann also als gesichert gelten.

Die Wirkung von SN-50 konnte nur einmal geprüft werden, daher kann dieses Einzelergebnis, bei dem sich kein Effekt auf die mRNA von AKAP-2 ablesen ließ, nicht als repräsentativ betrachtet werden.

Insgesamt ist jedoch anzunehmen, daß $\text{TNF}\alpha$ bei der Induktion der mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen auch über den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ wirkt.

Neben $\text{TNF}\alpha$ aktivieren auch PTH und $\text{IL-1}\beta$ in Osteoblasten die Bindung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ an die DNA, nicht dagegen Vitamin D^{95} . Es handelt sich dabei also vorwiegend um osteolytisch wirkende Faktoren, die jedoch unterschiedliche Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege benutzen. $\text{NF}\kappa\text{B}$ ist also eine Instanz, bei der verschiedene Signalwege zusammenlaufen. Die von $\text{NF}\kappa\text{B}$ regulierten Gene in Osteoblasten kodieren häufig Faktoren, die auf Osteoklasten wiederum aktivierend wirken. Man wird also in weiteren Untersuchungen der Frage nachgehen müssen, ob das Genprodukt der hier untersuchten mRNA, AKAP- 2, ebenfalls eine Bedeutung bei der Informationsübertragung von Osteoblasten auf Osteoklasten hat.

4.3.3.2 $\text{TNF}\alpha$ und Phosphatidylinositol 3-Kinase

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) spielt eine Rolle bei der Übertragung vieler unterschiedlicher Signale. Neben der Beteiligung beim Glukosetransport⁹⁶ und beim Schutz vor Apoptose⁹⁷ wird ihr die Mitwirkung an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. $\text{NF}\kappa\text{B}$ ⁹⁸ und AP-1⁹⁹ zugeschrieben. Sie vermittelt dabei die Wirkung zahlreicher Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren, darunter auch $\text{TNF}\alpha$ ⁹².

PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PI 3,4,5-P3). Das Enzym ist nicht mit der Phosphatidylinositolkinase des klassischen Inositoltriphosphatweges (vgl. Einleitung) identisch¹⁰⁰. Die regulatorische Untereinheit p85 enthält unter anderem zwei sogenannte SH2-Domänen, die nach Autophosphorylierung bestimmte Motive von Proteinen, hauptsächlich Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, aber auch Phosphotyrosinmotive intrazellulärer Proteine wie etwa Insulin Rezeptor Substrat-1 (IRS-1) erkennen und mit ihnen interagieren kann¹⁰¹, was zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit führt. Der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor besitzt selbst keine Tyrosinkinaseaktivität, kann jedoch durch Aktivierung einer Tyrosinkinase zur Phosphorylierung entsprechender Motive von IRS-1 führen, das dann mit der PI3K interagiert¹⁰¹.

Wortmannin, ein Metabolit verschiedener Pilzspezies, eignet sich als spezifischer Inhibitor der PI3K zur Untersuchung der PI3K⁶⁷.

In drei Kobehandlungen von hFOB-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ und Wortmannin sowie in der nur einmal durchgeführten Einzelinkubation mit Wortmannin ergaben sich für die mRNA von AKAP-2 Signalstärken, die jeweils mindestens doppelt so hoch waren wie die der Stimulationen mit $\text{TNF}\alpha$ alleine (siehe 3.2.1.3). Es konnte also kein hemmender Effekt von Wortmannin auf die Expression der mRNA von AKAP-2 und somit auch die von Reddy et al.⁹² berichtete Involvierung der PI3K bei der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ durch $\text{TNF}\alpha$ mit den hier dargestellten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Es müssen also noch weitere Mechanismen der Signalvermittlung von der Rezeptorbindung von $\text{TNF}\alpha$ bis zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ und Vermittlung des Effekts auf die mRNA von AKAP-2 beteiligt sein.

Die scheinbare Induktion der mRNA von AKAP-2 durch Wortmannin wird durch die bereits oben (siehe 3.2.1.3) erwähnte Problematik bei der Bewertung der Signalstärken erzeugt. Die Expression der als Kontrolle verwendeten RNA von GAPDH scheint durch von Wortmannin gehemmt zu werden. Daher kommt es nach Verrechnung der Signalstärken zu einem falsch positiven Effekt auf die mRNA von AKAP-2 durch $\text{TNF}\alpha$. Durch Verwendung einer anderen Kontrollsonde könnte dieser hemmende Einfluß von Wortmannin nachgewiesen werden.

4.3.3.3 $\text{TNF}\alpha$ und PKC

Um ein Signal vom Rezeptor ausgehend bis zu seinem Zielort weiterzuleiten, ist oft eine Reihe aufeinanderfolgender Schritte nötig. Die oben dargestellte Aktivierung des Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ steht hier sehr weit hinten in der Kette. Es ist bekannt, daß $\text{TNF}\alpha$ eine Reihe von Signaltransduktionswegen aktivieren kann, darunter auch den Inositolphosphatweg, der zur Aktivierung der Proteinkinase C führt. Die PKC wiederum phosphoryliert die regulatorische Untereinheit $\text{I}\kappa\text{B}$ und führt so wiederum zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ ¹⁰². Daher gilt die PKC als potentielles Bindeglied zwischen der Wirkung von TNF und der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ ¹⁰³. Experimentell war bereits bekannt, daß die mRNA von AKAP-2 durch Phorbol ester, einem Aktivator der PKC induzierbar ist (siehe 3.2.1.4). Daher stellte sich die Frage, ob $\text{TNF}\alpha$ bei der Aktivierung der Expression von AKAP-2 über die PKC wirkt.

Staurosporin, ein von der Familie der Streptomyceten gebildetes Alkaloid¹⁰⁴, gilt als der potenteste Hemmstoff einer Reihe von Proteinkinasen¹⁰⁵. Es hemmt die katalytische Domäne von Proteinkinasen mit Homologien zu diesem Bereich, darunter die Proteinkinase A und C und die Proteintyrosinkinase K. Hier wurde mit 3,5nM, dem 1,3fachen der halbmaximalen Hemmkonzentration für die PKC, gearbeitet. Damit werden andere Proteinkinasen in keinem stärkeren Masse inhibiert¹⁰⁵.

H7 hemmt cGMP und cAMP- abhängige Proteinkinasen und die PKC in vergleichbarer Potenz¹⁰⁶. In einer von Vandenabeele⁴² veröffentlichten Zusammenstellung von Signalwegen und Signalmolekülen von TNF α ist weder die cGMP- noch die cAMP-abhängige Proteinkinase aufgeführt. Man kann also bei H7 davon ausgehen, daß ein Effekt auf die TNF α -Wirkung in erster Linie über die Inhibition der PKC zustandekommt. H8 ist ein potenter Inhibitor der cGMP- und cAMP-abhängigen Proteinkinasen, hemmt in höherer Konzentration jedoch auch die PKC¹⁰⁶. Die bei den Versuchen eingesetzte Konzentration von H7 und H8 lag fünfmal über der halbmaximalen Hemmkonzentration für die PKC.

Die Wirksamkeit auf die PKC konnte durch Kobehandlungen der Inhibitoren mit dem PKC-Induktor TPA nachgewiesen werden. Alle drei Inhibitoren hatten in Einzelinkubationen von hFOB-Zellen keinen Einfluß auf die Expression der mRNA von AKAP-2. In den Kobehandlungen kam es jedoch zu keinen kongruenten Ergebnissen, einmal wurde eine Inhibition des TNF α -Effekts im Schnitt um mehr als 50% beobachtet, im Wiederholungsexperiment dagegen kam es zu keiner Inhibition. Eine Beteiligung der PKC an der Induktion der mRNA von AKAP-2 durch TNF α konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung der PKC in der Signaltransduktion zu untersuchen, besteht darin, ihre Aktivität zu steigern. Der Abbau von DAG, welches die PKC direkt stimuliert, wird von DAG-Kinaseinhibitor gehemmt, so daß es zu einer andauernden Aktivierung der PKC kommt.

Der Effekt der alleinigen Inkubation von hFOB-Zellen mit DAG-KI auf die Bildung von mRNA von AKAP-2 konnte nur einmal geprüft werden. Es kam im Northernblot dabei zu einem Signal, dessen Stärke mit dem der Stimulationen mit TNF α und mit TPA vergleichbar ist (siehe 3.2.1.3 und 3.2.2.3).

Bei der insgesamt geringen Anzahl durchgeführter Experimente gab es also keinen Hinweis auf die Beteiligung der PKC an der Induktion der mRNA von AKAP-2 durch TNF α .

4.3.4 Wirkung von TPA auf die Expression der mRNA von AKAP-2

Der Phorbolster TPA erhöht direkt die Affinität der PKC zu Calcium und bewirkt so deren Aktivierung¹⁰⁷. Nach 2,5 Stunden Stimulation wurde ein ansteigender Gehalt von mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen beobachtet (siehe 4.3.4). Das Induktionsmaximum (Mittelwert $5,2 \pm 1,4$, $n=8$) lag bei fünf Stunden. In einem Experiment scheint die Wirkung von TPA noch über 24 Stunden hinaus anzuhalten, wegen der geringen Datenmenge kann dies jedoch nicht als gesichert angesehen werden.

Falls sich in weiteren Versuchen die Induktion von AKAP-2 durch TPA über 24 Stunden bestätigen lassen sollte, kann dies durch eine größere biologische Aktivität von TPA als von $\text{TNF}\alpha$ im Medium zustande kommen. Andererseits wird bei Inkubation mit TPA über 24 Stunden oder länger von einer Abnahme der Aktivität der PKC durch Erschöpfung von Enzymreserven bzw. durch Downregulation des Enzyms berichtet¹⁰⁸, so daß es trotz langer Inkubationszeit zu keinem anhaltenden TPA-Effekt kommt.

Eine Reihe von Hormonen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren wirken über die Aktivierung der PKC. In Analogie zu den Experimenten mit $\text{TNF}\alpha$ wurde untersucht, ob TPA durch Veränderung der Transkription oder der Translation die Expression der mRNA von AKAP-2 reguliert. So wurden zunächst Kobehandlungen von hFOB-Zellen mit AmD und CHX durchgeführt. Die Bewertung der Kobehandlung mit AmD ist wegen der wenigen Daten schwierig. Nur zwei der insgesamt drei durchgeführten Versuche brachten auswertbare Ergebnisse, die allerdings sehr stark variieren. In beiden Fällen jedoch liefern die Kobehandlungen schwächere Autoradiographiesignale im Northernblot als die Stimulation mit TPA alleine.

Die Kobehandlung von hFOB-Zellen mit TPA und CHX ergab in allen Fällen eine Superinduktion. Die Induktion der mRNA von AKAP-2 nach Aktivierung der PKC durch TPA geschieht also auf transkriptionelle Weise. Hemmung der Proteinsynthese führt zu einer Superinduktion, die z.B. durch eine Stabilisierung der mRNA durch Wegfall von degradierenden Enzymen geschehen kann (siehe 4.3.2). Insgesamt reagiert AKAP-2 also wieder wie ein schnell responsives Gen, bei dem es unabhängig von aktuell stattfindender Proteinsynthese durch Aktivierung bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Bereitstellung der mRNA kommt.

4.3.5 Signaltransduktionsweg von TPA im Zusammenhang mit der Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2

TPA aktiviert die PKC unabhängig von der Bildung von DAG. Im Anschluß daran folgt eine Reihe von nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden, welche zur endgültigen Wirkung führen. Ähnlich wie im Zusammenhang mit $\text{TNF}\alpha$ wurden einige der möglichen Mechanismen weiter untersucht.

4.3.5.1 TPA und $\text{NF}\kappa\text{B}$

TPA kann zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ führen. Dabei wirkt es über zum Teil andere Signaltransduktionswege als $\text{TNF}\alpha$. So kann es ebenso wie Ocadaic Acid oder LPS durch Aktivierung von pp90rsk, einer Mitogen aktivierten Kinase, zur Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ und damit zur Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ führen, während $\text{TNF}\alpha$ dagegen keinen Effekt auf pp90rsk hat⁹⁰.

Daher wurde die durch TPA induzierte Expression der mRNA von AKAP-2 mit BAY11, CAPE und SN-50, Inhibitoren der Aktivierung von NF κ B, weiter untersucht.

BAY11 führte in zwei Versuchen zu einer Verringerung der Induktion von AKAP-2 durch TPA um 100% bzw. 28%. In einem Fall konnte keine Hemmung beobachtet werden. Eine mögliche Aktivierung von NF κ B durch externe Faktoren bei Versuchsdurchführung wurde schon weiter oben diskutiert (siehe 4.3.3.1). Mit CAPE wurde in allen drei Versuchen eine Minderung der TPA-Wirkung um $63\% \pm 17\%$ erreicht. SN-50 zeigte auch hier in dem nur einmal durchgeführten Versuch keinen Effekt.

TPA wirkt also bei der Induktion der mRNA von AKAP-2 zumindest teilweise über die Aktivierung von NF κ B. Bei den hier durchgeführten Experimenten mit Inhibitoren, die an unterschiedlichen Schritten der Aktivierung von NF κ B angreifen, konnte kein Unterschied zwischen dem Verhalten von TNF α und TPA festgestellt werden. Nach Experimenten mit den hier verwendeten Stoffen kann jedoch keine Aussage über die Wirkung der schon erwähnten pp90rsk, bei der Unterschiede bei ihrer Aktivierung durch TNF α und TPA beobachtet worden waren, gemacht werden. Sie steht höher oben in der Signaltransduktionskette und wird von BAY11, CAPE und SN-50 nicht mehr erfaßt.

4.3.5.2 TPA und Phosphatidylinositol 3-Kinase

Die Induktion von AKAP-2 durch TPA wird unter anderem durch NF κ B vermittelt (siehe 4.3.5.1). Bei der Aktivierung von NF κ B wiederum spielt die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) eine Rolle. Ebenso wird berichtet, daß TPA in osteoblastären Zellen über die PKC zu einer Aktivierung der Phospholipase D und schließlich zur Bildung von Cholin führt¹⁰⁹. Die Aktivierung der Phospholipase D wird außerdem durch eine Tyrosinkinase reguliert, welche auch die PI3K in ihrer Aktivität steuert. Dabei hat die PI3K einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung der Phospholipase D, eine Hemmung der PI3K durch Wortmannin führt also zu einer verstärkten Bildung von Cholin nach Induktion durch TPA. Daher wurden in Analogie zu den Versuchen mit TNF α Kobehandlungen mit TPA und Wortmannin durchgeführt (siehe 3.2.1.3).

Wortmannin selbst führte, wie auch im Zusammenhang mit TNF α berichtet, zu einer Änderung der Signalstärke von GAPDH im Autoradiogramm. Daher kam es durch Verrechnung der Signalwerte zu falsch hohen Werten für die Stimulationen mit Wortmannin. Berücksichtigt man dies, kommt man zu der Aussage, daß Wortmannin und damit die PI3K wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Expression der mRNA von AKAP-2 hat. Welche anderen Mechanismen bei der

Signalübertragung im Zusammenhang mit NF κ B und der Regulation der mRNA von AKAP-2 von Interesse sein können, bleibt also weiterhin eine offene Frage.

4.3.5.3 TPA und PKC

TPA ist ein spezifischer Induktor der PKC. Ein Stimulationseffekt in Bezug auf die mRNA von AKAP-2 durch TPA ist deutlich nachgewiesen (siehe 3.2.2.1). Im Hinblick auf die gleichzeitig durchgeführten analogen Versuche mit TNF α wurden zu Beginn der Untersuchungen Versuche mit verschiedenen Inhibitoren der PKC in Kobehandlung mit TPA durchgeführt (siehe 3.2.2.2): Da diese Inhibitoren immer auch unspezifisch andere Proteinkinasen hemmen, sollte ihre Wirkung auf die durch TPA induzierte PKC im Zusammenhang mit der Expression der mRNA von AKAP-2 gezeigt werden. Damit sollte die Vermutung, daß TNF α im Zusammenhang mit der Regulation der mRNA von AKAP-2 durch Vermittlung durch die PKC wirkt, bestätigt werden. Da jedoch die Kobehandlungen mit TNF α und den Inhibitoren der PKC keine eindeutigen Ergebnisse lieferten, sind die Versuche mit TPA selbst von geringerer Bedeutung.

Die TPA-Wirkung wird von allen drei Inhibitoren verringert, wobei H7 hier mit einer Hemmung um etwa 75% am potentesten wirkte. Staurosporin und H8 führten zu einer Inhibition um etwa 50%.

Mit 2 μ M TPA kann die PKC wirksam aktiviert werden¹¹⁰. In der Kobehandlung von hFOB Zellen mit DAG-KI, das zu einer verstärkten Aktivierung der PKC führt, war also keine oder nur eine geringe Steigerung der mRNA-Menge von AKAP-2 zu erwarten. Tatsächlich wurde in drei Versuchen nur einmal keine Veränderung der mRNA-Menge von AKAP-2 beobachtet. In den anderen Fällen wurde dagegen nur maximal 67% des Stimulationsergebnisses mit TPA erreicht. Dies bedeutet also eine Minderung der TPA-Wirkung auf den mRNA-Gehalt von AKAP-2 durch Kobehandlung mit DAG-KI. Denkbar ist hier eine Konkurrenz von TPA mit dem vermehrt vorhandenen DAG um eine gemeinsame Bindungsstelle an der PKC. Eine solche Fragestellung und Hypothese wurde jedoch bisher in der Literatur noch nicht erwähnt.

4.3.6 Expression der mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen und Inositoltriphosphat

Der Signalweg, der zur Aktivierung der PKC führt, beginnt mit der Phosphorylierung des Membranlipids Phosphatidylinositolphosphat (PIP) zu Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PIP₂). Durch die Phospholipase C (PLC) wird aus PIP₂ Diacylglycerol (DAG), das schließlich zur Aktivierung der PKC führt, sowie Inositol-1,4,5-Triphosphat (1,4,5 IP₃) freigesetzt (siehe Abbildung 2). In Osteoblasten verringert TNF α die Konzentration von Inositolphosphaten und führt zur Bildung von DAG durch die PLC¹¹¹. Andererseits wird berichtet, daß die Erhöhung der Phosphoinositolproduktion durch kalzitrope Faktoren wie PGE₂ und PTH¹¹² durch TNF α , IL-1 α

und Lipopolysaccharid supprimiert wird und daß $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\alpha$ alleine keinen Einfluß auf den Basalwert von Phosphoinositolen haben¹¹³. Da die Induktion der Expression von AKAP-2 durch Aktivierung der PKC klar gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage nach der Bedeutung von 1,4,5 IP3 bei der Regulation der mRNA von AKAP-2.

Der Calciumionophore A23187 wirkt als Agonist von 1,4,5 IP3 bei der Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum¹¹⁴. In zwei Versuchen mit Calciumionophore wurde nach einer, fünf und 24 Stunden jedoch keine Wirkung auf die mRNA Expression von AKAP-2 beobachtet.

Calciumionophore bzw. 1,4,5 IP3 alleine ist also nicht in der Lage, AKAP-2 in bezug auf die Menge der mRNA zu regulieren. Eine Vermittlung des Signals von $\text{TNF}\alpha$, das zur Veränderung der Expression der mRNA von AKAP-2 führt, über den Inositolphosphatweg kann somit ausgeschlossen werden.

4.3.7 Expression der mRNA von AKAP-2 in hFOB-Zellen und cAMP

Ein bedeutender Signalweg, der zur Aktivierung der Proteinkinase A führt, beginnt mit der G-Protein-abhängigen Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase (siehe Abbildung 1). Von verschiedenen Zellarten wie Fibroblasten und der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF7 ist bekannt, daß TNF hier über eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP zu vermehrtem Wachstum bzw. Zellyse führt^{115 116}. In osteoblastären Zellen reguliert unter anderem Phorbol ester die mRNA der Prostaglandinsynthase-2 durch cAMP¹¹⁷. Andererseits konnte in osteoblastären MC3T3-E1-Zellen keine Bildung von cAMP nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen werden¹¹⁸. Ebenso ist auch die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Expression des CSF-1-Gens in Osteoblasten unabhängig von cAMP²⁹

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellstimulationsversuche mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, durchgeführt. Es konnte aber keine Änderung der Expression der mRNA von AKAP-2 beobachtet werden. Auch cAMP selbst wurde eingesetzt. Auch hier waren die Signalwerte mit denen der Kontrolle vergleichbar.

Es ist also anzunehmen, daß die mRNA von AKAP-2 nicht durch cAMP-abhängige Signaltransduktionswege reguliert wird. Da cAMP primär für die Aktivierung der PKA verantwortlich ist¹¹⁹, bedeutet dies, daß die PKA keine bedeutende Rolle bei der Induktion eines ihrer Ankerproteine, der AKAP-2, etwa im Sinne eines intrinsischen Regelkreises spielen kann. Für andere Vertreter der Familie der Ankerproteine der PKA liegen noch keine Daten zur

Regulation vor. Daher können noch keine allgemeingültigen Aussagen in diesem Zusammenhang gemacht werden.

4.4 Weitere Zytokine und Hormone und die Induktion der mRNA von AKAP-2

Zu Beginn der Untersuchungen zur Regulation von AKAP-2 wurden außer $\text{TNF}\alpha$ und TPA eine Reihe unterschiedlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren, die im Knochenstoffwechsel von Bedeutung sind, auf deren Wirksamkeit auf die mRNA von AKAP-2 hin überprüft. Die Stimulationszeiten betragen 15 Minuten, eine und 24 Stunden.

EGF, bFGF, $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL-6, PDGF, TGF- β und IL-1 β zeigten keine Effekte. Die Versuche, die im Zusammenhang mit Vitamin D durchgeführt wurden, sind bereits weiter oben diskutiert worden (siehe 4.3.1).

4.5 Expression der mRNA von AKAP-2 in anderen Zelllinien und Geweben

Die Zellen unterschiedlicher Gewebe eines Organismus enthalten das gesamte Genom mit den darin enthaltenen DNA-Sequenzen, die die Information für alle im Körper synthetisierten RNA-Moleküle und Proteine enthalten. Gene und deren Produkte können streng gewebsspezifisch oder aber ubiquitär exprimiert werden. Ebenso kann sich das Expressionsmuster von Genen im Laufe der Zelldifferenzierung ändern.

Die mRNA von AKAP-2 wurde zunächst in humanen fötalen Osteoblasten identifiziert, wo sie in geringem Maße bereits in unstimulierten Zellen exprimiert wird. Die Untersuchungen zur Regulation der mRNA von AKAP-2 wurden daher mit diesen Zellen durchgeführt. Die zunächst bekannte Sequenz von 164 Nukleotiden stammte aus einer EST-Sequenz einer cDNA-Bank aus Placentagewebe. Daher wurde ein kommerziell erworbener Blot mit RNA unterschiedlicher menschlicher Gewebe mit der cDNA-Sonde von AKAP-2 hybridisiert, um die Expression der mRNA von AKAP-2 in verschiedenen Geweben zu untersuchen (siehe 3.2.4). In Placenta-, Herz-, Magen-, Duodenum-, Nebennierenmarkgewebe wird die mRNA relativ stark exprimiert, in anderen Organen (Pankreas, Schilddrüse, Nebennierenrinde, Thymus, Lunge, Milz, Testes) dagegen schwächer, in Hirn, Skelettmuskel, Colon, Niere, Leber, peripheren Blutlymphozyten ist überhaupt keine Expression zu erkennen. Nach Hybridisierung dieser Blots mit der genspezifischen Sonde konnte eine Bande auf Höhe von 7,5kB Länge nachgewiesen werden. Weitere Banden waren hier nicht zu erkennen. In Northernblots mit RNA von hFOB-Zellen jedoch ist neben der Bande von 7,5kB zum Teil eine weitere Bande von etwa 4,6kb Länge zu sehen (siehe Abbildungen 5,6,8,9). Diese weist eine ähnliche Regulation auf wie die 7,5kb lange mRNA. Es kann sich dabei also nicht um den Effekt einer unspezifischen Hybridisierung handeln.

Anzunehmen ist also, daß AKAP-2 in mindestens zwei Spleißvarianten vorliegt. Vom murinen Äquivalent von AKAP-2, AKAP-KL⁷³ existieren durch alternatives Spleißen und durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen Translationsstartcodons sechs verschiedene Isoformen⁷³. Durch unterschiedliches Spleißen erhält das Protein der D-AKAP-1 verschiedene NH₂- bzw. COOH-Enden, wodurch es zu unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation kommt. Das Spleißmuster ist dabei gewebespezifisch¹²⁰.

Die leukämische Zelllinie THP-1 stellt zunächst undifferenzierte monozytäre Zellen dar, die sich zu Makrophagen entwickeln, und eignet sich daher zur Untersuchung von entwicklungsbedingten Veränderungen^{121 122}. Da sich Osteoklasten aus der Linie der Makrophagen entwickeln¹⁰, können die THP-1-Zellen als einfaches Modell für osteoklastäre Zellen gesehen werden. Während ihrer Entwicklung exprimieren sie AKAP-2 nur bis zum vierten Tag, als reife Makrophagen dagegen nicht mehr. Ihre Expression scheint nur in geringem Maße von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren abhängig (einmalige Ergebnisse, nicht gezeigt).

Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Entwicklung. Osteoblasten wirken dabei wohl über die Sekretion von parakrin wirkenden Faktoren, Osteoklasten produzieren selbst stimulatorische und inhibitorische Faktoren und beeinflussen damit ihre eigene Entwicklung und Aktivität¹⁸. AKAP-2 konnte in späteren Arbeiten der Arbeitsgruppe in der Nähe der Zellmembran im Zusammenhang mit dem Aktinzytoskelett lokalisiert werden. Ob AKAP-2 dabei auch eine Rolle bei Zell-Zellkontakten spielen kann bzw. ob Osteoblasten durch AKAP-2 auf Osteoklasten einwirken können, ist derzeit noch reine Spekulation.

In Osteosarkomzellen (SaOs2, TE85, MG63 und U2) wird AKAP-2 nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert. Da Sarkomzellen als transformierte Zellen ein verändertes Expressionsmuster aufweisen und dadurch in ihrem Wachstumsverhalten verändert sein können, ist es durchaus möglich, daß auch die Expression der mRNA von AKAP-2 von diesem Transformationsprozeß betroffen ist. Das Genprodukt (AKAP-2) könnte also eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen. Dies wird auch durch die oben erwähnte Beobachtung gestützt, daß AKAP-2 im Laufe der Entwicklung von THP-1-Zellen in unterschiedlichem Maße exprimiert wird. Das Expressionsmuster verhält sich hier allerdings umgekehrt. Tumorzellen, die als undifferenzierte Zellen betrachtet werden müssen, exprimieren AKAP-2 nicht. Dagegen kommt es in THP-1-Zellen im Laufe ihrer Differenzierung zu einem Verlust der Expression von AKAP-2. Dies wirft die Frage nach der Relevanz der differentiellen Expression von AKAP-2 im Zusammenhang mit der Entwicklung von Osteoblasten auf.

4.6 Einordnung von AKAP-2 in die Familie der Proteinkinase A-Ankerproteine

Obwohl die Aufgabe der Ankerproteine der Proteinkinase A bereits relativ gut aufgeklärt ist und mit verschiedenen Proteinstrukturen und Motiven, die allen Vertretern der Familie gemeinsam ist, verknüpft werden konnte, ist bisher noch wenig über die Regulation ihrer Expression bekannt. In Granulosazellen von Ratten hat man die Regulation der AKAP-140 auf Proteinebene untersucht¹²³. FSH reduzierte hier die Expression des Ankerproteins und verhinderte gleichzeitig die Ausbreitung der Zellen während des Wachstums. Beide Effekte konnten durch Phorbol ester, das durch Stimulation der PKC als Antagonist von FSH wirkt, aufgehoben werden. Dexamethason hatte zusammen mit FSH einen synergistischen Effekt. Alleine jedoch verringerte es die Expression von AKAP-140 nicht. Dagegen wirkten beide Stoffe zusammen positiv auf die Expression einer AKAP-80, FSH jedoch in geringerer Masse als Dexamethason. Es wird angenommen, daß FSH eine über die Wirkung von Dexamethason dominante Rolle bei der Regulation der Expression von AKAPs spielt.

Sowohl die mRNA als auch das Protein von AKAP-121 selbst wird nach Inkubation von Thyroideazellen mit cAMP und TSH vermehrt exprimiert¹²⁴. Dieser Effekt scheint zumindest teilweise auf transkriptionelle Weise zu geschehen. TPA und Insulin dagegen hatten keine Wirkung auf die Expression. Die Expression dieses Ankerproteins der PKA ist also in eine Art Kreislauf eingebaut und wird positiv durch cAMP reguliert, das ja physiologisch die PKA aktiviert. TSH seinerseits wirkt unter Vermittlung von cAMP auf die Zellen ein. Die Folge ist, daß die an Ankerproteine gebundene PKA vor allem an Orten mit aktivierter Adenylatzyklase zu finden ist und dadurch Effekte durch Diffusion von cAMP im Zytosol vermindert werden¹²⁵.

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2 konnte jedoch keine Wirkung von cAMP bzw. Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase, nachgewiesen werden. Es wurde 1mM cAMP verwendet, Feliciello et al.¹²⁴ arbeiteten mit der gleichen Konzentration, jedoch benutzten sie 8-Chlorophenylthio-cAMP, ein membranpermeables Analog zu cAMP. Weder in den Versuchen mit cAMP noch in denen mit Forskolin (siehe 3.2.3.2) gab es einen Hinweis auf eine veränderte Expression der mRNA von AKAP-2. Es scheint also, daß die Regulation der mRNA dieses Ankerproteins der PKA unabhängig von cAMP ist und es nach Aktivierung der Adenylatzyklase und der anschließenden Bildung von cAMP zwar zu einer Aktivierung der PKA, nicht aber zu einer positiven Rückwirkung auf die Bereitstellung des Ankerproteins der PKA kommt. Welche Bedeutung diese Beobachtung

hat, ist mit dem derzeitigen Stand des Wissens um das hier zur Debatte stehende Ankerprotein nicht abzuschätzen.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei AKAP-121 hat TPA einen starken Effekt auf die Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten mRNA von AKAP-2. TPA wirkt hier auf Ebene der Transkription, unabhängig von gerade stattfindender Translation. Es muß also Transkriptionsfaktoren geben, die auf Promotoren am Gen von AKAP-2 wirken. Dazu ist bereits weiter oben (siehe 4.3.3.1) eine mögliche Beteiligung von NF κ B diskutiert worden, dessen Beteiligung an der Regulation der mRNA von AKAP-2 angenommen werden kann. Dieser Transkriptionsfaktor wird unter anderem von der durch TPA induzierten PKC aktiviert. Um zu klären, inwieweit hier Zusammenhänge bestehen, bedarf es jedoch noch weiterer Versuche.

Wie bereits oben erwähnt ist für wahrscheinlich mehrere Vertreter der Familie der Ankerproteine der PKA, z.B. für das neuronal und in Myometriumzellen exprimierte AKAP-79, auch eine Bindung von anderen Proteinkinasen, etwa der PKC nachgewiesen. Dabei werden die gebundenen Enzyme inaktiviert⁵³. Es wird vermutet, daß AKAP-79, welches in dieser Beziehung am besten untersucht ist, eine Art Konvergenzstelle für verschiedene zweite Botenstoffe wie cAMP, Ca²⁺ und Phospholipide ist¹²⁶ und verschiedene Enzyme spezifisch an einigen Rezeptoren und Ionenkanälen lokalisiert¹²⁷. Solange das Protein selbst und seine Bindungsfähigkeit mit verschiedenen Proteinkinasen noch nicht weiter untersucht ist, kann nur darüber spekuliert werden, ob es sich bei AKAP-2 um ein Mitglied der Proteinfamilie handelt, von dem nicht nur die Expression seiner mRNA unter Beteiligung der PKC reguliert wird, sondern das auch auf Proteinebene mit dieser Kinase interagiert. Sollte AKAP-2 jedoch selbst nicht die PKC binden, kann es sich hier um eine Kreuzungsstelle innerhalb verschiedener intrazellulärer Signalwege handeln, bei der die PKC durch Expressionsinduktion des Ankerproteins die Effektivität der Signalübertragung über die PKA modulieren könnte. Welche Konsequenzen dies jedoch für die Zelle und ihre Funktion hat, bleibt weiter im Dunkeln. Hier können Untersuchungen zum Proteinaufbau von AKAP-2 und zur Existenz von Bindungsstellen für die PKA bzw. für die PKC weiterführen.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß die Expression der mRNA von AKAP-2 von TNF α induziert wird. Ein solcher Zusammenhang ist bisher noch für keines der Ankerproteine der PKC berichtet worden. TNF α ist ein Zytokin, das eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen unterschiedlicher Art spielt. Ebenso ist seine Beteiligung bei Knochenresorption und Osteoklastogenese im Knochengewebe, in dem AKAP-2 zunächst untersucht wurde, hinreichend

bekannt (siehe Einleitung). Unter den zahlreichen Signaltransduktionsmolekülen, die nach Bindung von $\text{TNF}\alpha$ an einen seiner beiden Rezeptoren aktiviert werden, befindet sich nach bisherigem Wissenstand nicht die PKA⁴². Man muß sich daher fragen, welche Funktion ein Ankerprotein der PKA bei der Vermittlung der Effekte von $\text{TNF}\alpha$ im Knochen spielen kann. Da einige Ankerproteine durch Lokalisation der PKA in der Nähe von Kanalproteinen deren Aktivitätszustand modulieren können⁵⁴, könnte dadurch das interzelluläre Ionenmilieu und damit schließlich das Mikromilieu im Knochen verändert werden. Es könnten aber auch durch eine verstärkte Aktivierung von PKA-abhängigen Genen etwa Zytokine gebildet werden, die ihrerseits wieder auf Osteoklasten und Osteoblasten wirken.

In weiterführenden Versuchen der Arbeitsgruppe nach Abschluß der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurde die intrazelluläre Lokalisation von AKAP-2 untersucht. Experimente mit Fusionsproteinen mit AKAP-2 und Green Fluorescent Protein (AKAP-2-GFP) zeigten Expression bzw. Lokalisation des Fusionsproteins in einer vesikelähnlichen, unter der Plasmamembran gelegenen solitären Struktur. In AKAP-2 wurde durch algorithmische Berechnungen nach Lupas¹²⁸ drei sogenannte coiled-coil-Strukturen angenommen, die in Verbindung mit Mechanismen der Signaltransduktion und molekularen Erkennungssystemen gebracht werden¹²⁹. Sie wurden aber auch in Proteinen mit zentrosomaler Lokalisation gefunden, darunter auch einem Vertreter der AKAP-Familie, AKAP-450¹³⁰. Mit Antikörpern gegen Zentrosomen konnte gezeigt werden, daß AKAP-2 nicht mit den Zentrosomen kolokalisiert ist. Eine Verbindung zum Golgi-Apparat kann durch das intrazelluläre Lagemuster ausgeschlossen werden. Das murine Analogon AKAP-KL dagegen wurde sowohl an Zentrosomen als auch am Golgi-Apparat nachgewiesen⁷³. Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D führte ähnlich wie bei AKAP-KL zu einer veränderten Verteilung des AKAP-2-GFP-Fusionsproteins. Man kann daraus ableiten, daß AKAP-2 mit der Aufrechterhaltung und Modulation der strukturellen Ordnung der Zellen assoziiert ist.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die vollständige cDNA-Sequenz des Proteinkinase A-Ankerproteins-2 (AKAP-2, 7,5kB) ermittelt werden. Zu diesem neuen humanen Gen sind bis dato außer einem unvollständigem Datenbankeintrag noch keine experimentellen Daten zur cDNA, mRNA oder zum Protein veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Northernblot die Regulation der Expression der mRNA von AKAP-2 in humanem osteoblastären hFOB-Zellen sowie ihre Expression in unterschiedlichen Geweben untersucht. Es zeigte sich, daß die mRNA in hFOB-Zellen bereits basal in geringem Maße exprimiert wird und schnell und transient induziert werden kann. Nach fünf Stunden konnte eine maximale Induktion sowohl durch $\text{TNF}\alpha$ als auch durch TPA beobachtet werden. Sowohl $\text{TNF}\alpha$ als auch TPA bewirken die Induktion der Expression hauptsächlich auf der Ebene der Transkription, was der Kinetik eines sogenannten schnell induzierbaren Gens entspricht. Ob dabei auch eine erhöhte Stabilität der mRNA hier eine Rolle spielt, kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht beurteilt werden. Durch die Verwendung von Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß beide Stoffe über den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ wirken. Andere Faktoren wie die Phosphatidylinositol-3-Kinase und cAMP dagegen scheinen keine Relevanz für die Expressionsinduktion der mRNA zu haben.

$\text{TNF}\alpha$ ist ein Zytokin, das im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle bei Osteoklastenaktivierung, Knochenresorption und bei der Entstehung von Osteoporose spielt. AKAP-2 wird in Osteoblasten, aber auch in undifferenzierten monozytären Zellen, welche als Vorläufer von Osteoklasten betrachtet werden können, exprimiert. Osteoblasten und Osteoklasten stehen zueinander in enger Beziehung und beeinflussen sich in ihrem Aktivitätsniveau gegenseitig. Dabei ist die lokale Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung. AKAP-2 kann also bei der interzellulären Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten von Bedeutung sein.

Vertreter der Familie der Proteinkinase A-Ankerproteine sind in unterschiedlichen Organen (unter anderem in Hirn, Endometrium, Spermatozyten, Mamma, Magen) nachgewiesen, bisher jedoch noch nicht in Knochengewebe. Ihre Bedeutung für die Organfunktion ist vielfältig. Auf zellulärem Niveau kommt es durch Bindung der PKA in der Nähe der Adenylatzyklase und des hier entstehenden cAMP zu einer lokal erhöhten Wirkung von cAMP-vermittelten Signalen. Da die Expression der mRNA von AKAP-2 selbst unabhängig von cAMP ist, scheint es sich hier um eine

Kreuzungsstelle verschiedener Signaltransduktionswege zu handeln, bei der von $\text{TNF}\alpha$ aktivierte Botenstoffe bzw. Transkriptionsfaktoren (z.B. $\text{NF}\kappa\text{B}$), die PKC und möglicherweise weitere, hier jedoch nicht weiter identifizierte Zytokine und Wachstumsfaktoren zur vermehrten Bereitstellung eines Ankerproteins der PKA führen.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Bedeutung dieses Zusammenhanges für den Knochenstoffwechsel zu klären. AKAP-2 konnte in verschiedenen Osteosarkomzellen nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte seine Expression in zu osteoklastären Zellen gereiften THP-1-Zellen nicht gezeigt werden. Es scheint also einen Zusammenhang zwischen der Zelldifferenzierung und der Expression von AKAP-2 zu geben.

Ob eine gestörte Bildung von AKAP-2 klinische Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat, kann noch nicht abgeschätzt werden. Experimentell kämen hier Versuche mit vermehrter bzw. reduzierter Bildung des Proteins in geeigneten Modellsystemen in Betracht. Da $\text{TNF}\alpha$ im Knochen eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung von Effekten inflammatorischer Prozesse, z.B. bei rheumatoider Arthritis, aber auch bei der Entstehung von Osteoporose infolge eines Östrogenmangels hat, ist es also denkbar, daß AKAP-2 hier eines der zahlreichen Räder in einem sehr genau aufeinander abgestimmten Maschinenwerk namens „Knochen“ ist, dessen Ziel es ist, durch lokal geordneten Auf- und Abbau von Knochensubstanz zu einem funktionsfähigen Gesamtorgan zu führen.

Welche Funktionen das Protein darüber hinaus in anderen Organen hat, in denen es exprimiert wird (Placenta, Herz, Magen, Duodenum), ist nur eine weitere der vielen offenen Fragen und führt zur Aufgabenstellung weitergehender Arbeiten.

6 Anhang

6.1 Sequenz der cDNA von AKAP-2, Lage der zur Sequenzierung verwendeten Primer

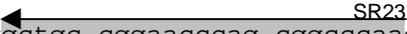
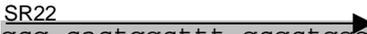
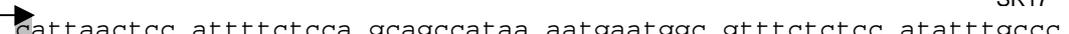
Darstellung der Nukleotidsequenz der cDNA von AKAP-2 (AJ303709) in 5' -3' -Richtung. Eingezeichnet sind die zur Sequenzierung verwendeten Primer sowie Beginn und Ende der homologen cDNA-Sequenz NM_07203. Der Bereich zwischen den Positionsnummern 5711 und 7482 entspricht den vor Beginn der Arbeit bekannten Sequenz.

```

                    5'
                    Beginn NM_07203
                    SR30
                    -----
1  ---ccgggcgag cccgcccgtgc gcacagctct gcccgccgcc cctggagcgg atccccagcc
   gagccc...
61  gtccctgggc gttctcccgg gttctagcaa agccccccgg ggtgcccatc agtttccttg
121 ggtgactaca gcggtgtgtt tttctttctt ctttcccctg cctgtgtgcc cttctccagg
181 atggcagagg cggaattgca caaggaaagg ctgcaagcca tagcagaaaa aagaaagagg
241 cagactgaaa tagaaggcaa gcgacaacag cttgacgagc agatacttct gctgcagcat
                    SR21
                    -----
301 tccaagtcca aagtgcttcg ggagaaatgg ctgctgcagg gcatacccgc tggaaactgcc
361 gaagaggagg aagccaggag gcggcagtct gaagaggatg agttcagagt caagcaactt
                    SR32
                    -----
421 gaagataaca ttcagaggct ggagcaagaa atacaaacgc tagaaagtga agagtcccag
481 atatctgcca aagagcaaat catcctagag aaactgaagg aacagaaaa atccttcaag
541 gactttcaga agggtttctc cagtacggat ggagatgcag taaattacat ttcctcccag
601 cttcccgacc tgccaatcct ctgttcacga acagcagaac catcacctgg gcaggacggg
661 accagcagag cggctggagt cgggtgggag aatgtgctgc taaaggaagg tgagtcagcc
721 tcgaacgcca cagaaacatc cggcccagac atgactatca agaagcctcc ccagctttct
                    SR33
                    -----
781 gaggatgata tctggctaaa aagcgaggga gacaactata gtgccaccct cctggagcct
841 gctgccagct ctctttcccc agatcacaaa aacatggaaa ttgaggtgtc tgttgagaaa
901 tgtaaaaagtg ttcttggaaat cacctctacc ccacatccca tggaccatcc ctccgctttc
961 tattcacccc cgcataatgg cctccttact gatcaccacg aatccctgga taatgatggt
1021 gccagagaga tccgctatct agatgaggtg ctagaggcca actgctgtga ttctgctgtg
1081 gatggaacgt acaatggaac atcctccccca gagcctgggtg cagtggttct ggtgggcggc
1141 ctaagcccc ctgtccacga ggcgaccag ccagaacca ctgaaagaac agctagccgg
                    SR34
                    -----
1201 caggcactc ctcacatcga gctcagtaat agcagccctg accccatggc agaggcagaa
1261 agaacaaatg gccattcccc cagccagcct agagatgcgc tgggggacag cctgcaggtg

```

1321 cctgtcagcc ccagctccac aaccagctca cgggtgttctt cccgagatgg agagttcact
 1381 ctcaccacac tgaaaaagga ggccaagttt gagctgcgtg ctttccatga ggacaagaag
 1441 ccctccaagc tctttgagga tgacgagcat gagaaagaac aatactgcat tagaaaagtg
 1501 aggccttcag aggagatgct ggagctggaa aaggagagga gagagctcat ccgagccag
 1561 gccgtcaaga agaatcctgg cattgcagca aaatggtgga atccccgca ggaaaaaacc
 1621 atcgaggagc agctggacga ^{SR35} ggaacatctg gagtcgcaca aaaagtacaa ggagcgcaaa
 1681 gagagaaggg cacagcagga acagttgctg ctgcagaagc agttacagca gcagcagcag
 1741 cagcccccat cgcagctctg cacagcccct gcctcttctc atgaacgcgc aagcatgatt
 1801 gacaaagcaa aggaggacat tgtcacagag cagatagatt tctctgctgc tcgcaaacia
 1861 tttcagctga tggagaattc caggcaagcg gtggccaagg gccagagtac acccaggctg
 1921 ttctccatca agcctttcta caggcctctg gggtcagtca actcagacia gccactgact
 1981 aatccgagac caccttctgt cgggggacct ccagaagaca gtggtgcctc agccgccaag
 2041 ggacagaaat cccccggtgc cctggagacc ccatcggcag caggaagcca gggcaacaca
 2101 gcctctcagg ggaaggaagg gccctacagc gagccttcta aacgtgggccc cttatctaaa
 2161 ctgtgggctg aggatggaga atttacgagc gcccgggctg tcctcactgt ggtcaaggat
 2221 gatgaccatg ggattttgga tcagtttca agatctgtca atgtctcctt gacccaagag
 2281 gagcttgact ctggtctgga cgaattgtcg gtgaggtctc aggataccac agtcctggag
 2341 accctatcca atgatttcag catggacaac atcagtgaca gcggggcctc caatgagaca
 2401 accaatgccc tccaggaaaa ttcactggct gatttttctc tgccccagac accacaaact
 2461 gacaaccctc cagagggccg aggagaaggc gtctccaagt catttagtga tcattggtttc
 2521 tattcccctt cctccacgct ^{SR28} gggggactct ccgttggttg atgaccctt ggagtatcag
 2581 gctggcctcc tgggtgcagaa tgccattcaa caagccatag ccgagcaggt ggataaagct
 2641 gtgtccaaaa ccagcagga tggagcagag caacagggac ctgaagcgac tgtagaggaa
 2701 gctgaagctg cggctttcgg ctcagaaaag cctcagagca tgtttgagcc acctcaggtg
 2761 tcttctcctg ttcaagagaa aagggatgta ttaccaaaga ttctgcctgc tgaagacagg
 2821 gcgctcaggg aaagggggcc cccccagcca ctgccagctg tgagcccag tggcccgatt ^{SR26}
 2881 aacatggagg agaccaggcc cgaaggaagc tatttcagca agtactcgga ggcagctgag
 2941 ctgagaagca cagcctcct cctggccact caagaatctg acgtgatggt tgggcctttc ^{SR24}
 3001 aagctgaggt ccaggaaca gcggactttg tccatgattg aggaagagat ccgagcagct
 3061 caggaaaagg aagaggagct gaagaggcag ^{SR25} agacaagtct tgagagctac gcagagcccc

3121 aggacaaaaga atgccccatc actgccctcc agaacatgct acaaaactgc tccagggaaa
 3181 atagagaaaag tcaaacctcc tccatcccc accactgaag gccccagcct gcagcctgac
 3241 ttagcccctg aagaggctgc  cggccaaga atctgatgca gaccctcatg
 3301 gaagactatg agacacacaa atctaaaagg cgcgagagaa tggatgatag tagttacact
 3361 tctaagttac tgtcttgcaa ggtgacttcc gaggtcctcg aggccacacg ggttaatcga
 3421 agaaagagcg  cactggcttt gcgctgggaa gcagggatct atgccaacca ggaggaagaa
 3481 gacaacgaat aaacttcctt caaccagga agcgtctttg gtgcttggga gaccaagaaa
 3541 ccaagaaatt aacaactgaa agcattttaa tggactattht attaaagtgc aaacaaactc
 3601 agcaatcctt atgtagacca gaagctgcaa tatacaatga tgaaaatgaa acgaaaagga
 3661 agtcccccca tcagactctg gacaccagg aatcaaaaga gaaaggactt ttttgggtgac
 3721 tcaatcccag tgtctggttt ggggccaatc tacaatggat ccaaaggac aaaacatgtht
 3781 acaagcaaat caacatagtht  gctgcaggcg  cagcctctct gggcgatgaa
 3841  ggacaatggt ggtaggccca cttagagagc agtagggccc aggtggtgac agcctacatg
 3901 gcacaggata tttccctgca ccagtttccc acctgtcact  tgcagcatca gaggggtgtg
 3961  gattaactcc attttctcca gcagccataa aatgaatggc gtttctctcc atatttgccc
 4021 agaagaggca gttatgattc cacttctcct acatttaatt atttttaatt gagaacaact
 4081 catgatcaca attcataaaa tccatatttt aagacaatag ttcttcatgt cacaaacaca
 4141 atctatttcta catgaggagg ctgagaaagg ggaagagaaa aacaaacca atggatgatg
 4201 ttagcttttag gatcgtgtct gcttataata ttcactgatc tgcagtttat gagaacacat
 4261 tttcacagtht atgtttcttc ataggaaaac tatatttagt gggcaacaac tatttttatg
 4321 atgggatggg  ggagtatata cacgtataga atctgtacgc gttgaacaac ttggttcaag
 4381 atggtggggg cattttttaga gcggcaataa ttgaaaaaaa aggcgaactc tgccttggag
 4441 aggtagatga taagaaataa aaaggtgtht ataactattht tgtattataa agtgggcctt
 4501 agagatagga agaagaatga tggattcctt ttggatcaat cagaaaggaa acacgaaaga
 4561 aaagtcagga aggtagagag agaaaaaggg aggggaaggag aaagaatggg aataaaataa
 4621 ggaggtaaga gatactattht ttgctgagca accagtgtgt ttcaggatga tacaagaaa
 4681 aatatagaat agaaataa  aatcagctac  gcaggcttgg
 4741 gtgtggatgt gtgtgtgtgt gtgtgtacac cattgtgtgt ttgtaaaatg tgtatgttca
 4801 tgagtaaggg tgtgtgtgtg tgtgtattaa aattccagag tgaccgtggc acttgggtgt

4861 acaggtaatt cctccagagc tgtttgctgg cttcaggagt ggagtgagaa tttctttttt
 4921 atgaaaaggg atataaaggc accgagctga tgcagtattt gtaatattaa gttgacctaa
 4981 caaggatatt gcatgagtca caattacaaa gttttgagcg gttttgtaat ttgacattta
 5041 ggaaagtctc ctatttattc tcatacttta cattcatgct tagtatacta tagaggatgc
 5101 cagctttaat ctttctgtca tttaaagcca tatgataagg gtattcaata attgggtgcc
 SR11
 SR10 ...a...
 5161 ctaaatttct ggatgagaaa attttcaatt ctggccatga gaaagaaaaaaa aaaataaaca
 ...g 3' Ende NM_07203
 5221 gccttctttt tttttccttt gttttaaacc tgtgggtttt taaaaagca ataattaact
 5281 cagacctcac taaaaatcat ttttgttttt atattgttat gtcataagct ctattatggt
 5341 attctaacaa gtagcaattt cacaaaattt gtatgtagat gttaacgcac atttcctttg
 5401 cttcttttat tagactagtg ttgactttgg ggggggacat ttattcacia atgagaagta
 5461 ggcacaaagt aaaaaatgga accatctact aacaaggatc ctttaaaact gccaaagggg
 5521 ctctaacttg aagccacatc ctacagatgg cagcccaaat agcacatggg caattggcac
 SR9
 5581 catctttata tggttgagtc tctgaatat tttgaatgaa ttctcaacia aatgtgctag
 5641 ccaactgggga cgcaaaaacia gtaagatccc tgttgcaaga aattcatttt atagtggggg
 5701 aggttggcat ggag actaaa attctcagga aatgagatc cgtgttagat tagaagtcct
 SR8
 5761 gatgtgaaat gggaggactc aggaaggagg atcgtcttta cctgaggatt tctagccaga
 5821 ggtcccagat gcctgggctg agaaccagc gataaggggg cgttcccaga gcagacacag
 5881 ggataagaac agaggaggca gcagcattgc acagccccag gcacagtggc agttaggatg
 SR5
 5941 gctggagagt aggatagttc tatgggttgc ccaaaaaatg tgatgcgctt catgttttct
 6001 ctgactcatg gatctggtag agaccataga catgatatag actaacttcc ccatttttca
 6061 caatgaaggt aaaccatcct tatgacttac cttaaagttt tttgttctgt tttgaaggaa
 6121 accatgtgct tcatgaaacc tacagttgac aagagaatgt acagctaaga gaaaagctta
 6181 agaggccaca ctattcgcgg aatggcttta gaggcagatg aagtggcttt tgaccacagt
 6241 tgattgaacc agagcactta ttgcttaaag aataacagag ttctagagct gggggttctt
 6301 gggccatgct ccgtgtgtgg ataaggaaag aaatactggt tctgggactc tcccacagtc
 6361 acaaagctgt tttcactgtg gccctacat ctcttaactt ttgctattac tctatgctg
 6421 ccttccggat tactgctgtc tatcttcttg ctccactcac tgaagatcct attataatcc
 6481 catgaaaatg taaattacag tttacttggg agagccagat tttctctgtg ctcttgagtt
 6541 ttttattcat tcaagaacc ttggccacc gctttgtaca tagcaccgtg ctaggctctg
 SR1
 SR2
 6601 ggatcccaaa tggacccttt taactttctg aagatgggac cgtcccctgg aggaaagtca

6661 ttcctgccta atccatcgag agaaagaggc ttacgaaaaa ct^{SR4}ttgcctct gatgctcagc
 6721 ccaccccca aatagcacac aagcttgta accccacctc ttacaaaatg ttagattct
 6781 gtaggtgta aaagccttc tggaggtatt gcattctgcc gtgtttatag gtgttcactt
 6841 tcctccagag ctgattaact actgacatga cttggcttcc tcatccagaa attatggaaa
 6901 cagggctctg cagtggcagg aggccgtgct gtgttttact tggatgacac aatgcagttt
 6961 acttgctctc tcatacccat gcatgctgct caccctagac aatgacatat aagccgtata
 7021 tagatcaatg tccacatata tatacacaca cacatatata tatataaagt gtaacaagga
 7081 aactaaaac agtggtgatt cttgtctctg aagacaaata attaaacctt ttttttccca
 7141 actaaagaat ggatttaatt aaactatgta ttgaaaaaaa agtagcctaa gtgttagaga
 7201 tggatgaat attccatttt agttaaagaa caaatttctt gaattttaag cattcagtga
 7261 gctgccaatt ttgattttgt gttgctcttt acccaaatta ttttttcttt gtttttcttt
 7321 ttttggggga ggaggggaaa aaagcagcaa tactgtgttt ggaaattata ctctgtatct
 7381 ggttttcctg tgtatgttaa ccacttaaat gttattatcc tgctttgggt ttagagtgat
 7441 tgtgaggcat tcaatgcaag tatacagtta ttttctcatt aaaatccaat gtgtgttgag
 7501 tttttataaa aaaaaaaaaa aaaaa 3'

6.2 Sequenz der verwendeten Primer

In der folgenden Auflistung sind die genspezifischen Primer aufgeführt, die erstmals Verwendung fanden. Nicht aufgelistet sind die Primer, die bereits in den Vorarbeiten im Zusammenhang mit AKAP-2 verwendet worden waren.

SR1	5' ATA GCA CCG TGC TAG GCT CTG 3'	SR2	5' CAG AGC CTA GCA CGG TGC 3'
SR3	5' AGT CTC CCT CGT GCC GAA TTC 3'	SR4	5' TTG CCT CTG ATG CTC AGC C 3'
SR5	5' GTT CTT ATC CCT GTG TCT GCT TG 3'	SR8	5' CTC CAT GCC AAC CTC CCT CAC 3'
SR9	5' ATG TGG CTT CAA GTT AGA GCT C 3'	SR10	5' TGA CAG AAA GAT TAA AGC TGG C 3'
SR11	5' CCA GTT TAA TCT TTC TGT C 3'	SR12	5' AGC TGA TTC CAA GCC TGC AC 3'
SR13	5' CAG GCT TGG AAT CAG CTA C 3'	SR14	5' ATT CTA TAC GTG TAT ATA CTC C 3'
SR15	5' TAT TTT ATG ATG GGA TGG GGG AG 3'	SR16	5' AGC ATC AGA GGG TGT TGC 3'
SR17	5' AAC ACC CTC TGA TGC TGC 3'	SR18	5' CCC TAC CAC CAT TGT CCT TC 3'
SR19	5' CAG AGA GGC TGG TCT CAG TTC 3'	SR20	5' TCT CAG TTC CGC CTG CAG C3'
SR22	5' GCG CAC TGG CTT TGC GCT GGG 3'	SR23	5' TTG GGC CGC TGG GTT CCG GCA GC 3'
SR24	5' GAA AGG CCC AAC CAT CAC GTC AG3'	SR25	5' AGG GAA GAG GAG CTG AAG AG 3'
SR26	5' ATC GGG CCA CTG GGC TGC ACA GC 3'	SR27	5' CCC TTA CCC TGA GCG CC 3'
SR28	5' GAA GGG GAA TAG AAA CCA TG 3'	SR29	5' CAT GAT CAC TAA ATG ACT TGG AGA C 3'
SR30	5' CCA GAG GCT GAG CCC GGG C 3'	SR31	5' CCG TGC GCACAG CTC TGC 3'
SR32	5' AGT CTG AAG AGG ATG AGT TCA 3'	SR33	5' CTG AGG ATG ATA TCT GGC 3'
SR34	5' AGA ACA GCT AGC CGG CAG GCA C 3'	SR35	5' CCA TCG AGG AGC AGC TGG AC 3'

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Wolff J.: Das Gesetz der Transformation der Knochen. Verlag Aug. Hirschwald, Berlin, 1892.
- ² Schütze N., Jakob F.: Osteoporose. in Ganthen D., Ruckpaul K. (Hrsg.): Molekularmedizinische Grundlagen von klassischen Endokrinopathien, Springer, Berlin 2001.
- ³ Baron R.E.: Anatomy and ultrastructure of bone. In Favus M.J.: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Lippincot-Raven, Philadelphia, USA, 3. Aufl. 1996, S. 3-10.
- ⁴ Olson B.R., Reginato A.M., Wang W.: Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000,16:191-220.
- ⁵ Puzas J.E.: Osteoblast Cell Biology-Lineage and Funktionen. In Favus M.J.: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Lippincot-Raven, Philadelphia, USA, 3. Aufl. 1996, S. 11-16.
- ⁶ Burger E.H., Klein-Nulend J.: Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res* 1999,13:93-98.
- ⁷ Nijweide P.J., Burger E.H., Klein-Nulend J., Van der Olas A.: The osteocyte. In: Principles of bone biology. Hrsg. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. Academic Press, San Diego, California, USA, 1996, S. 115-126.
- ⁸ Martin R.B.: Toward a unifying theory of bone remodeling. *Bone* 2000,26(1):1-6.
- ⁹ Roodman G.D., Ibbotson K.J., MacDonald B.R., Kuehl T.J., Mundy G.R.: 1,25(OH)₂ vitamin D₃ causes formation of multinuclear cells with osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Soc* 1985,82:8213-8217.
- ¹⁰ Mundy G.R.: Bone-resorbing cells. In: Favus M.J.: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. American Society for Bone and Mineral Research, Lippincot-Raven, Philadelphia, USA, 3. Aufl. 1996, S. 16-24.
- ¹¹ Takahashi N., Yamama H., Yoshiki S., Roodman D.G., Mundy G.R., Jones S.J., Boyde A., Suda T.: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse marrow cultures. *Endocrinology* 1988,122:1373-1382.
- ¹² Tanaka S., Takahashi N., Udagawa N., Tamura T., Akatsu T., Stanley E.R., Kurokawa T., Suda T.: Macrophage colony stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993,91:257-263.
- ¹³ Kaji H., Sugimoto T., Kanatani M., Fukase M., Kumegawa M., Chihara K.: Prostaglandin E₂ stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity via osteoblasts: Role of cAMP-dependent protein kinase. *J Bone Miner Res* 1996,11(1):62-71.
- ¹⁴ Manolagas S.C., Jilka R.L., Bellido T., O'Brien C.A., Parfitt A.M.: Interleukin-6-type cytokines and their receptors. In: Principles of bone biology. Hrsg. Bilezikien J.P., Raiz L.G., Rodan G.A., Academic Press, San Diego, California, USA, 1996, S. 701-713.
- ¹⁵ Horowitz M.C., Lorenzo J.A.: Local regulators of bone: IL-1, TNF, Lymphotoxin, Interferon- γ , IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family, and additional cytokines. In: Principles of bone biology., Hrsg. Bilezikien J.P., Raiz L.G., Rodan G.A., Academic Press, San Diego, California, USA, 1996, S. 687-700.
- ¹⁶ Takahashi N., Udagawa N., Suda T.: A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANSC/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Com* 1999,256:449-455.
- ¹⁷ Quinn J.M.W., Fujikawa Y., Mcgee O'D., Athanasou N.A.: Rodent osteoblast-like cells support osteoclastic differentiation of human cord blood monocytes in the presence of M-CSF and Dihydroxyvitamin D₃. *Int J Biochem Cell Biol* 1997,29(1):173-179.
- ¹⁸ Roodman G.D.: Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999,27:1229-1241.
- ¹⁹ Kong Y.Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H.-L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A.J., Van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J., Penninger J.M.: OPGL is a key

-
- regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphonode organogenesis. *Nature* 1999,397:315-323.
- ²⁰ Vassalli P.: The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol* 1992,10:411-452.
- ²¹ Kriegler M., Perez C., DeFay K., Albert I., Lu S.D.: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988, 53:45-53.
- ²² Canalis E.: Regulation of bone remodeling. In Favus M.J.: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research, Lippincot-Raven, Philadelphia, USA, 3. Aufl. 1996, S. 35-38.
- ²³ Bertolini D.R., Nedwin G.E., Bringman T.S., Smith D.D., Mundy G.R.: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factors. *Nature* 1986,319:516-518.
- ²⁴ Johnson R.A., Boyce B.F., Mundy G.R., Roodman G.D.: Tumors producing human tumor necrosis factor induce hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology* 1989,124:1424-1427.
- ²⁵ Pfeilschifter J., Chenu C., Bird A., Mundy G.R., Roodman G.D.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1998,4:113-118.
- ²⁶ Thomson B.M., Mundy G.R., Chambers T.J.: Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 1987,138:775-779.
- ²⁷ Chaudhary L.R., Cheng S.-L., Avioli L.V.: Induction of early response-1 gene by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in normal human bone marrow stroma and osteoblastic cells: regulation by a protein kinase C inhibitor. *Mol Cell Biol* 1996,156:69-77.
- ²⁸ Weir E., Horowitz M., Baron R., Centrella M., Kacinski B., Isonga K.: Macrophage colony-stimulating factor release and receptor expression in bone cells. *J Bone Miner Res* 1993,8:1507-1518.
- ²⁹ Kaplan D.L., Eielson C.M., Horowitz M.C., Insogna K.L., Weir E.C.: Tumor necrosis factor- α induces transcription of the colony-stimulating factor-1 gene in murine osteoblasts. *J Cell Phys* 1996,168:199-208.
- ³⁰ Ries C., Kolb H., Petrides P.E.: Regulation of 92-kD gelatinase release in HL-60 leukemia cells: Tumor necrosis factor- α as an autocrine stimulus for basal- and phorbol ester-induced secretion. *Blood* 1994, 83:3638-3646.
- ³¹ Gorospe M., Kumar S., Baglioni C.: Tumor necrosis factor increases stability of interleukin-1 mRNA by activating protein kinase C. *J Biol Chem* 1993,268:6214-6220.
- ³² Beutler B., Cerami A.: Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986, 320:584-588.
- ³³ Seibold F., Wagner A.C.C., Göke B.: Medikamentöse Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen: aktueller Stand und Ausblick. *Schweiz Med Wochenschr* 2000,130:222-232.
- ³⁴ Meyer O.: Place des thérapeutiques anti-TNF dans la polyarthrite rhumatoïde. *Presse méd* 2000,29:463-468.
- ³⁵ Kimble R.B., Matayosi A.B., Vannice J.L., Kung V.T., Williams C., Pacifici R.: Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovarectomy period. *Endocrinology* 1995,136:3054-3061.
- ³⁶ Pacifici R., Rifas L., McCracken R., Vered I., Mc Murtry C., Avioli L.V., Peck W.A.: Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989,86:2398-2402.
- ³⁷ Pacifici R., Vannice J.L., Rifas L., Kimble R.B.: Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: Effect of menopause and estrogen/progesterone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990,77:1135-1141.
- ³⁸ Fiers W.: Tumor necrosis factor. In: *The natural immune system: Humoral factors*. Hrsg. E. Sim, IRL Press at Oxford University Press, Oxford,1993, S.65-119.
- ³⁹ Sheehan K.C.F., Pinckard J.K., Arthur C.D., Dehner L.P., Goeddel D.V., Schreiber R.D.: Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: Identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* 1995,181:607-617.
- ⁴⁰ Tartaglia L.A., Pennica D., Goeddel D.V.: Ligand passing: The 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 1993,268:18542-18548.

-
- ⁴¹ Bilbe G., Roberts E., Birch M., Evans D.B.: PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 1996,19(5):437-445.
- ⁴² Vandenabeele P., Declercq W., Bayaert R., Fiers W.: Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995,5:392-399.
- ⁴³ Sherman M.L., Weber B.L., Datta R., Kufe D.W.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of macrophage-specific colony stimulating factor gene expression by tumor necrosis factor: involvement of arachidonic acid metabolites. *J Clin Invest* 1990,85:442-447.
- ⁴⁴ Zhang Y., Lin J., Yip Y.K., Vilcek J.: Enhancement of cAMP levels and protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988,85:6802-6805.
- ⁴⁵ Schutze S., Nottrott S., Pfizenmaier K., Kronke M.: Tumor necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. *J Immunol* 1990,144:2604-2608.
- ⁴⁶ Xia P., Gamble J.R., Rye K.-A., Wang L., Hii C.S.T., Cockerill P., Khew-Goodall Y., Bert A.G., Barter P.J., Vadas M.A.: Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998,95:14196-14201.
- ⁴⁷ Ozes O.N., Mayo L.D., Gustin J.A., Pfeffer S.R., Pfeffer L.M., Donner D.B.: NF κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine Kinase. *Nature* 1999,401:82-85.
- ⁴⁸ Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V.: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF κ B activation. *Cell* 1995,81:495-504.
- ⁴⁹ Dransfield D.T., Yeh J.L., Bradford A.J., Goldenring J.R.: Identification and characterization of a novel A-kinase-anchoring protein (AKAP120) from rabbit gastric parietal cells. *Biochem J* 1997,322:801-807.
- ⁵⁰ Huang L.J., Durick K., Weiner J.A., Chun j., Taylor S.S.: Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that bind both type I and type II regulatory subunits. *J Biol Chem* 1997,272:8057-8064.
- ⁵¹ Miki K, Eddy E.M.: Single amino acids determine specificity of binding of protein kinase A regulatory subunits by protein kinase A anchoring proteins. *J Biol Chem* 1999,274:29057-29062.
- ⁵² Dell'Acqua M.L., Scott J.D.: Protein A kinase anchoring. *J Biol Chem* 1997,272:12881-12884.
- ⁵³ Colledge M., Scott J.D.: AKAPs: From structure to function. *Trends Cell Biol* 1999,9:216-221.
- ⁵⁴ Fraser I.D.C., Tavalin S.J., Lester L.B., Langeberg L.K., Westphal A.M., Dean R.A., Marrion N.V., Scott J.D.: A novel lipid-anchored A-kinase anchoring protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO* 1998,17:2261-2272.
- ⁵⁵ Clegg R.A., Gordge P.C., Miller W.R.: Expression of enzymes of covalent protein modification during regulated and dysregulated proliferation of mammary epithelial cells: PKA, PKC and NMT. *Advan Enzyme Regul* 1999,39:175-203.
- ⁵⁶ Mochly-Rosen D., Khaner H., Lopez J.: Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci* 1991,88:3997-4000.
- ⁵⁷ Pawson T., Scott J.D.: Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997,278:2075-2080.
- ⁵⁸ Clegg R.A.: AKAP expression in rat mammary gland. *Bioch Soc Trans* 1997,25:264.
- ⁵⁹ Haussler M.R., Whitfield G.K., Haussler C.A., Hsieh J-C., Thompson P.D., Selznick S.H., Dominguez C.E., Jurutka P.W.: The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998,13:325-347.
- ⁶⁰ Christakos S., Raval-Pandya M., Wernyj R.P., Yang W.: Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 1996,316:361-371.
- ⁶¹ Schütze N., Lechner A., Groll C., Siggelkow H., Hüfner M., Köhrle J., Jakob F.: The human analog of murine cystein rich protein 61 is a 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. *Endocrinology* 1998,139:1761-1770.
- ⁶² Schütze N., Bachthaler M., Lechner A., Köhrle J., Jakob F.: Identification by differential display PCR of the selenoprotein thioredoxin reductase as a 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃-responsive gene in human osteoblasts - regulation by selenite. *Biofactors* 1998,7:299-310.

-
- ⁶³ Harris S.A., Enger R.J., Riggs B.L., Spelsberg Th.C.: Development and characterization of a conditionally immortalized human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995,10:178-186.
- ⁶⁴ Chomczynski P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987,162:156-159.
- ⁶⁵ Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular cloning*. Hrsg. C.Nolin, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- ⁶⁶ de Chauffoy de Courcelles D., Roevens P., Van Belle H.:R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor, its effects on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biol Chem* 1985,260:15762-15770.
- ⁶⁷ Ui M., Okada T., Hazeki K., Hazeki O.: Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *TIBS* 1995,20:303-307.
- ⁶⁸ Arcaro A., Wymann M.P.: Wortmannin is a potent Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 1993,296:297-301.
- ⁶⁹ Pierce J.W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S.A., Collins T., Gerritsen M.E.: Novel inhibitors of cytokine-induced I κ B α phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 1997,272:21096-21103.
- ⁷⁰ Natarajan K., Singh S., Burke T.R., Grunberger D., Aggarwal B.B.: Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996,93:9090-9096.
- ⁷¹ Lin Y.-Z., Yao S., Veach R.A., Torgerson T.R., Hawiger J.: Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 1995,270:14255-14258.
- ⁷² Nagase T., Ishikawa K., Suyama M., Kikuno R., Hirosawa M., Miyajima N., Tanaka A., Kotani H., Nomura N., Ohara O.: Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res* 1999,6(1):63-70.
- ⁷³ Dong F., Feldmesser M., Casadevall A., Rubin C.S.: Molecular characterisation of a cDNA that encodes six isoforms of a novel murine A kinase anchor protein. *J Biol Chem* 1998,273:6533-6541.
- ⁷⁴ Norman A.W.: Receptors for 1 α ,25(OH)2D3: past, present, and future. *J Bone Miner Res* 1998,13:1360-1369.
- ⁷⁵ Pedrozo H.A., Schwartz Z., Rimes S., Sylvia V.L., Nemere I., Posner G.H., Dean D.D., Boyan B.D.: Physiological importance of the 1,25(OH)2D3 membrane receptor and evidence for a membrane receptor specific for 24,25(OH)2D3. *J Bone Miner Res* 1999,14:856-867.
- ⁷⁶ Boyan B.D., Dean D.D., Sylvia V.L., Schwartz Z.: Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites. *L Cell Biochem* 1994,65:331-339.
- ⁷⁷ Nemere I., Schwartz P., Perdozo Z., Sylvia V.L., Dean D.D., Boyan B.D.: Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Miner Res* 1998 13:1353-1359.
- ⁷⁸ Li F., Barnathan E.S., Kariko K.: Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential messenger-RNA display and application of northern blot for affinity capture of cDNAs. *Nucleic Acids Res* 1994,22:1764-1765.
- ⁷⁹ Miele G., MacRae L., McBride D., Manson J., Clinton M.: Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *BioTechniques* 1998,25:138-144.
- ⁸⁰ Cochran B.H., Reffel A.C., Stiles C.D.: Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983,33:939-947.
- ⁸¹ Rollins B.J., Stiles C.D.: Serum inducible genes. *Adv Cancer Res* 1989,53:1-32.
- ⁸² Herschman H.R.: Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991,60:281-319.
- ⁸³ McCubrey J.A., Steelman L.S., McKearn J.P.: Interleukin-3 and phorbol esters induce different patterns of immediate-early gene expression in an interleukin-3 dependent cell line. *Oncogene Res* 1991, 6:1-12.

-
- ⁸⁴ Aharon T., Schneider R.J.: Selective destabilization of short-lived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich 3' noncoding region is mediated by a cotranslational mechanism. *Mol Cell Biol* 1993,13:1971-1980.
- ⁸⁵ Sen R., Baltimore D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986,46:705-716.
- ⁸⁶ Delfino F., Walker W.H.: At the cutting edge: Hormonal regulation of the NF κ B signaling pathway. *Mol Cell Endo* 1999,157:1-9.
- ⁸⁷ Lee J.-I., Burckart G.J.: Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998,38:981-993.
- ⁸⁸ Siebenlist U., Franzoso G., Brown K.: Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Cell Biol* 1994,10:405-455.
- ⁸⁹ Baeuerle P.A., Henkel T.: Function and activation of NF κ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1995,12:141-179.
- ⁹⁰ Baeuerle P.A., Baltimore D.: NF κ B: Ten years after. *Cell* 1996,87:13-20.
- ⁹¹ Mercurio F., Manning A.M.: Multiple signals converging on NF κ B. *Curr Opin Cell Biol* 1999,11:226-232.
- ⁹² Reddy S.A.G., Huang J.H., Liao W.A.-L.: Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF κ B activation. *J Immunol* 2000,164:1355-1363.
- ⁹³ Fry C.J., Farnham P.J.: Context-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999,274:29583-29586.
- ⁹⁴ Saklatvala J., Davis W., Guesdon F.: Interleukin 1 (IL 1) and tumor necrosis factor (TNF) signal transduction. *Phil Trans R Soc Lond B* 1996,351:151-157.
- ⁹⁵ Ali N.N., Gilston V., Winyard P.G.: Activation of NF κ B in human osteoblasts by stimulators of bone resorption. *FEBS Letters* 1999,460:315-320.
- ⁹⁶ Hara K.K., Yonezawa H., Sakaue A., Ando K., Kotani K., Kitamura T., Kitamura Y., Ueda H., Stevens L., Jackson T.R.: 1- Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994,91:7415-7419.
- ⁹⁷ Kulik G., Klippel A., Weber M.J.: Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol* 1997,17:1595-1606.
- ⁹⁸ Maraldi N.M., Mamioli S., Rizzoli R., Mazzaótti G., Manzoli F.A.: Phosphatidylinositol 3-kinase translocation to the nucleus is an early event in the interleukin-1 signalling mechanism in human osteosarcoma Sa Os-2 cells. *Advan Enzyme Regul* 1999,39:33-49.
- ⁹⁹ Reddy S.A.G., Huang J.H., Liao W.S.-L.: Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling: physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NF κ B activation and AP-1 activation. *J Biol Chem* 1997,272:29167-29173.
- ¹⁰⁰ Kapeller R., Cantley L.C.: Phosphatidylinositol 3-kinase. *BioEssays* 1994,16:565-576.
- ¹⁰¹ Guo D., Donner D.B.: Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to Phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996,271:615-618.
- ¹⁰² Schutze S., Wiegmann K., Machleidt T., Kronke M.: TNF-induced activation of NF κ B. *Immunobiol* 1995,193:193-203.
- ¹⁰³ Sanders J.L., Stern P.H.: Protein kinase C involvement in interleukin-6 production by parathyroid hormone and tumor necrosis factor- α in UMR-106 osteoblastic cells. *J Bone Miner* 2000,15, 5:885-893.
- ¹⁰⁴ Omura S., Iwai Y., Hirano A., Nakagawa A., Awaya Y., Tsuchiya H., Takahashi Y., Masuma R.: A new alkaloid AM-2282 OF streptomycetes origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot* 1977, 37:275-282.
- ¹⁰⁵ Tamaoki T.: Use and specificity of staurosporine, UCM-01 and calphostin C as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol* 1991,201:340-347.
- ¹⁰⁶ Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y.: Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochem* 1984,23:5036-5041.

-
- ¹⁰⁷ Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y.: Direkt activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982,257:7847-7851.
- ¹⁰⁸ Matsubara N., Fuchimoto S., Orita K.: Tumor necrosis factor- α induces translocation of protein kinase C in tumor necrosis factor-sensitive cell lines. *Immunology* 1991,73:457-459.
- ¹⁰⁹ Kozawa O., Suzuki A., Shinoda J., Oiso Y.: Geneistin inhibits potentiation by Wortmannin of protein kinase C-activated phospholipase D in osteoblast-like cells. *Cell Signal* 1995,7:219-223.
- ¹¹⁰ Veldman C.M., Schl pfer I., Schmid D.: Prostaglandin E2 stimulates sodium-dependent phosphate transport in osteoblastic cells via a protein kinase C-mediated pathway. *Endocrinology* 1998,139:89-94.
- ¹¹¹ Rapuano B.E., Bockmann R.S.: Proteinkinases A, C regulate positively G-protein dependent activation of phosphatidylinositol-specific Phospholipase C by TNF α in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 1997,65:198-208.
- ¹¹² Yamaguchi D.T., Hahn T.J., Beeker T.G., Kleeman C.R., Muallem S.: Relationship of cAMP and calcium messenger systems in prostaglandin-stimulated UMR-106 cells. *J Biol Chem* 1988,263:10745-10753.
- ¹¹³ Tam V.K., Schotland S., Green J.: Inflammatory cytokines (IL-1 α , TNF- α) and LPS modulate the Ca²⁺ signaling pathway in osteoblasts. *Am J Physiol* 1998, 274:C1686-C1698.
- ¹¹⁴ Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: *Molecular biology of the cell*, 3. Aufl. Garland Publishing, Inc. New York, London 1994, S. 747-749.
- ¹¹⁵ Zhang Y., Lin J.H., Vilcek J.: Synthesis of interleukin 6 (interferon-beta 2/B cell stimulatory factor 2) in human fibroblasts is triggered by an increase in intracellular cyclic AMP. *J Biol Chem* 1988,263:6177-6182.
- ¹¹⁶ Branellec D., De Cremoux P., Barreau P., Calvo F., Chouaib S.: Tumor necrosis factor-mediated cell lysis in vitro: relationship to cAMP accumulation and guanine nucleotide-binding proteins. *Eur J Immunol* 1992,22:963-967.
- ¹¹⁷ Pilbeam C.C., Kawaguchi H., Hakeda H., Voznesensky O., Alander C.B., Raisz L.G.: Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxidase in osteoblastic MC3T3 cells. *J Biol Chem* 1993,268:25643-25649.
- ¹¹⁸ Yanaga F., Abe M., Koga T., Hirata M.: Signal transduction by tumor necrosis factor α is mediated through a guanine nucleotide-binding protein in osteoblast-like cell line, MC3T3-E1. *J Biol Chem* 1992,267:5114-5121.
- ¹¹⁹ Dodge K.L., Carr D.W., Sanborn B.M.: Protein kinase A anchoring to the myometrial plasma membrane is required for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of phosphatidylinositide turnover. *Endocrinology* 1999,140:5165-5170.
- ¹²⁰ Huang L.J., Wang L., Ma Y., Durick K., Perkins G., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Taylor S.S.: NH₂-terminal targeting motifs direct dual specificity A-kinase-anchoring protein 1 (D-AKAP1) to either mitochondria or endoplasmatic reticulum. *J Biol Chem* 1999,145:951-959.
- ¹²¹ Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K.: Establishment and characterization of a human acute monocytic cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980,26:171-176.
- ¹²² Reyes L., Davidson M.K., Thomas L.C., Davis J.K.: Effects of mycoplasma fermentans incognitus on differentiation of THP-1 cells. *Inf Imm* 1999,67:3188-3192.
- ¹²³ Hunzicker-Dunn M., Scott J.D., Carr D.W.: Regulation of expression of A-kinase anchoring proteins in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 1998,58:1496-1502.
- ¹²⁴ Feliciello A., Rubin C.S., Avvedimento E.V., Gottesman M.E.: Expression of A kinase anchor protein 121 is regulated by hormones in thyroid and testicular germ cells. *J Biol Chem* 1998,273:23361-23366.
- ¹²⁵ Feliciello A., Avvedimento E.V., Li Y., Gottesman M.E., Rubin C.S.: A-kinase anchor protein 75 increases the rate and magnitude of cAMP signalling to the nucleus. *Curr Biol* 1997,7:1011-1014.
- ¹²⁶ Short D.B., Trotter K.W., Reczek D., Kreda S.M., Bretscher A., Boucher R.C., Stutts M.J., Milgram S.L.: A, apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998,273:19797-19801.
- ¹²⁷ S k A., Gul csi A., Lai Y., Doyle W.K., Pacia S., Mody I., Freund T.F.: Localisation of the A kinase anchoring protein AKAP79 in the human hippocampus. *Eur J Neurosci* 2000,12:1155-1164.
- ¹²⁸ Lupas A., Van D.M., Stock J.: Predicted coiled coils from protein sequences. *Science* 1991,252:1162-1164.

-
- ¹²⁹ Burkhard P., Stetefeld J., Strelkow S.V.: Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 2001,11:82-88.
- ¹³⁰ Witczak O., Skålhegg B.S., Keryer G., Bornens M., Tasken K., Jahnsen T., Ørstavik S.: Cloning and characterisation of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO* 1999,18:1858-1868.

Danksagung

Wenn man sich auf einen Weg macht, ein Ziel zu erreichen, geht man nicht allein.

Viele Menschen gibt es, die auf meinem Weg gegangen sind und gehen- vor, neben und nach mir. Wichtig sind alle.

So möchte ich zunächst meinen Eltern danken, denn sie haben mir die Welt gezeigt und mein Interesse an ihr geweckt. Sie standen stets hinter mir und ermöglichten mir dieses Studium.

Natürlich danke ich dann Herrn Prof. Dr. med. Franz Jakob, der mir die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten gab und als Vorbild vor mir auf dem Weg stand. Ebenso vor, aber immer auch direkt neben mir stand Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze, der mich in die molekularbiologische Laborarbeit einweihte und stets bereit war, meine Ergebnisse und Ideen zu diskutieren.

Um sie herum steht die gesamte Klinische Forschergruppe der Medizinischen Poliklinik. Danken möchte ich Frau Doris Schneider, die immer ein offenes Ohr hatte für die Probleme eines blutigen Anfängers im Labor und mit ihren praktischen Tips und Tricks weiterhalf. Ebenso wichtig waren Frau Dr. Astrid Baur und Regina Ebert-Dümig, die mir halfen, die Geheimnisse der verschiedenen Programme zu verstehen und die Tücken des Computers zu überlisten. Schließlich müßten hier noch die Namen aller Mitarbeiter stehen, da sie alle zur freundschaftlichen Atmosphäre in der KFG beitragen.

Im Namen „meiner hFOB-Zellen“ möchte ich mich auch bei Frau U. Rummel in der Abteilung für experimentelle Zahnmedizin für die 35,5 Grad warme Unterkunft bedanken.

Lebenslauf

Sonja Erna Reichel

geboren am 2. Januar 1975 in Weißenburg/Bay.

Familienstand: ledig

Eltern: Helmut und Hildegard Reichel

Ausbildung:

Sept. 1981-Jul. 1985	Grundschule Weißenburg
Sept. 1985-Jul. 1994	Werner-von-Siemens-Gymnasium Weißenburg Abschluß: Abitur
Nov. 1994-Sept. 1997	Studium der Humanmedizin, Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abschluß: Ärztliche Vorprüfung, Sept. 1996 1. Staatsexamen, Sept. 1997
Sept. 1997-Mai 1998	Gaststudium (Humanmedizin), Université de Caen, Frankreich
Mai 1998-März 2000	Studium der Humanmedizin, Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abschluß: 2. Staatsexamen März 2000
April 2000-Aug. 2000	1. Abschnitt der Praktischen Jahres an der chirurgischen Klinik des Medical Centre Örebro, Schweden (Universität Linköping, Schweden)
Aug. 2000-Dez. 2000	2. Abschnitt der Praktischen Jahres an der medizinischen Klinik des Medical Centre Örebro, Schweden (Universität Linköping, Schweden)
Dez. 2000-März 2001	3. Abschnitt der Praktischen Jahres an der Kinderklinik der Universität Würzburg
März 2001	Abschluß: 3. Staatsexamen
seit Juli 2001	Ärztin im Praktikum an der Deutschen Klinik für Diagnostik in Wiesbaden, Pädiatrie

Würzburg im Dezember 2001