

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Differentielle Genexpression nach Behandlung mit dem
Parathormon-verwandten Protein
(PTHrP)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elke Heinrich
aus Detmold

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Dietel
 2. Priv.-Doz. Dr. habil. U. Keller
 3. Priv.-Doz. Dr. K. Wiechen

Datum der Promotion: 08.04.2011

Zusammenfassung

Das Parathormon-verwandte Protein (PTHrP) weist teilweise eine Sequenzhomologie zum Parathormon (PTH) auf und wird in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert. In dieser Studie sollte mittels subtraktiver Suppressionshybridisierung (SSH) in einem genomweiten Ansatz untersucht werden, ob PTHrP (1–34) die Expression einzelner Gene auf der Ebene der Transkription steigert. Für die experimentellen Untersuchungen wurde eine Zelllinie ausgewählt, von der bekannt war, dass sie sowohl PTHrP als auch den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) koexprimiert. In Voruntersuchungen war für diese Zelllinie eine autokrine PTHrP-induzierte Regulation von verschiedenen Matrix-abbauenden Enzymen, ohne Veränderungen der mRNA-Spiegel, nachgewiesen worden. Ursprünglich stammt die Zelllinie von einem humanen Nierenzellkarzinom ab, das nach Langzeitpassage auf der Nacktmaus in Zellkultur etabliert wurde.

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit relevanten Aussagen zur Zellspezies belegen für die eingesetzte Zelllinie nicht wie vermutet das Genom einer humanen Zelllinie, sondern einer Mauszelllinie. Basierend auf Voruntersuchungen wird für die verwendete Zelllinie eine neoplastische Transformation angenommen, die bereits während der Langzeitpassage auf der Nacktmaus erfolgt ist und am ehesten auf eine spontane Mutation im Transplantattumor zurückzuführen ist.

Durch die SSH-Technik in eine Richtung (vorwärts) wurden Gene selektiert, die potenziell PTHrP-(1–34)-abhängig hochreguliert wurden. Für zwei Gene wurde ein PTHrP-induzierter mRNA-Anstieg auch im Northern Blot bestätigt. Die Sequenzanalyse dieser Gene ergab eine Homologie zu dem „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1“, *Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1), mRNA* und dem „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“, *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA*. Der in der vorliegenden Arbeit dokumentierte mRNA-Anstieg von RACK1 und Ubc9 ist als PTHrP-induzierte Wirkung auf der Ebene der Transkription zu deuten, die vermutlich über den PTH/PTHrP1R reguliert wird.

Sowohl RACK1 als auch Ubc9 werden in verschiedenen Tumorentitäten vermehrt exprimiert. RACK1 beeinflusst durch Protein-Protein-Interaktion zahlreiche Signalwege und Ubc9 repräsentiert überwiegend die Transkription. Funktionelle Eigenschaften, die diese Proteine zusammenhängend im biologischen Kontext mit PTHrP beschreiben, sind nicht bekannt. Die hier nachgewiesene, PTHrP-induzierte Expressionsänderung von RACK1 und von Ubc9 lässt für PTHrP eine bedeutsame Rolle in der Regulation der Signaltransduktion und der Transkription transformierter Zellen vermuten.

Abstract

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) shares a sequence homology with parathyroid hormone (PTH) and is expressed in various tumour tissues. This study is intended to research by subtractive suppression hybridization (SSH) in a genome-wide setting, whether PTHrP (1-34) raises the expression of individual genes at the level of transcription. For the experiments a cell line was chosen known to co-express both PTHrP and the PTH/PTHrP receptor type I. An autocrine regulation of several matrix-degrading enzymes by PTHrP has been demonstrated previously in this cell line without alterations of the mRNA levels. This cell line is derived from a human renal cell carcinoma, which has been long-term passaged on nude mouse before establishing the cell culture.

With relevant statements concerning the cell species, the investigations carried out here back up the fact that the cell line used here not exhibits the genome of a human cell line, but a mouse cell line. Based on preliminary investigations we assume neoplastic transformation for the used cell line, which has already taken place during the long-term passage on the nude mouse and is most likely to be traced back to a spontaneous mutation in the transplant tumour.

By means of SSH technique in one direction (forward), genes have been selected, which potentially have been upregulated, depending on PTHrP-(1-34). For two genes, a PTHrP-induced mRNA increase has also been confirmed within the Northern blot technique. The sequence analyse of these genes resulted in homology towards the “receptor for activated C kinase 1”, *Mus musculus receptor for activated C kinase 1 (RACK1), mRNA* and the “ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9”, *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA*. In the present work documented mRNA increase of RACK1 and Ubc9 is to be interpreted as a PTHrP-induced effect at the transcription level, that presumably is regulated via PTH/PTHrP1R.

Both RACK1 as well as Ubc9 are expressed to an increased extent in various tumour entities. Through protein-protein-interaction in particular, RACK1 influences many signal paths and Ubc9 predominantly represses the transcription. However, functional characteristics, which describe this protein with PTHrP in connection with the biological context, are not known. The PTHrP-induced expression modification of RACK1 and Ubc9 indicates that PTHrP could adopt an important role in the regulation of signal transduction and the transcription of transformed cells.

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	
1.1 Maligne humorale Hyperkalzämie (MHH) und das Parathormon-verwandte Protein (PTHrP).....	8
1.2 PTH und PTHrP.....	9
1.3 Zellbiologische Wirkungen von PTHrP	11
1.4 PTH/PTHrP-Rezeptoren	12
1.5 PTH/PTHrP regulierte Signalwege und Genexpression	13
1.6 Voruntersuchungen und Fragestellungen	15
2 Material	
2.1 Chemikalien und Bezugsquellen	17
2.2 Software	18
2.3 Geräte	18
2.4 Vorgefertigte Systeme (Kits)	18
2.5 Verwandte Oligonukleotide	19
2.6 Untersuchte Zelllinie	19
3 Methoden	
3.1 Kultivierung der Zellen	20
3.2 Behandlung der Zellen	20
3.2.1 Behandlung der Zellkulturen für die SSH-Technik	20
3.2.2 Behandlung der Zellen für den Northern Blot	21
3.3 RNA Arbeitsmethoden	21
3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA	21
3.3.2 Isolation und Kontrolle der Poly-A ⁺ -mRNA für die SSH-Technik	22
3.4 Subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH).....	22
3.4.1 Prinzip der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH)	22
3.4.2 Durchführung der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH)	25
3.4.3 Präparation der <i>Tester</i> - und <i>Driver</i> -cDNAs	25
3.4.4 Adaptorligation der <i>Tester</i> -cDNAs	26
3.4.5 Effizienzprüfung der Adaptorligation	26
3.4.6 Subtraktive Hybridisierung	27
3.4.7 Erste und zweite PCR-Amplifikation	27
3.5 Klonierung der subtrahierten cDNAs.....	28
3.5.1 Adenylierung und Reinigung der cDNAs	28
3.5.2 Vorbereitung der Agar-Platten	28
3.5.3 Ligation und Transformation der cDNAs	29
3.5.4 Plasmidpräparation	30
3.5.5 PCR-Kontrolle der Klonierung	30
3.6 Bereitstellung der Plasmid-DNA für die Sequenzierung	31

3.7	Northern-Blot-Analyse	31
3.7.1	RNA-Elektrophorese	31
3.7.2	Northern-Blotting	31
3.7.3	Herstellung der Gensonden	32
3.7.4	Extraktion der Gensonden aus dem Agarosegel und Reinigung	32
3.7.5	Radioaktive Markierung und Hybridisierung der Gensonden	33
3.7.6	Auswertung der Northern Blots	33
4	Ergebnisse	
4.1	Subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH)	34
4.2	Kontrolluntersuchungen	35
4.2.1	Kontrolle der Gesamt-RNA und der Poly-A ⁺ -mRNA für die SSH-Technik	35
4.2.2	Kontrolle des RsaI-Verdau der <i>Tester</i> - und <i>Driver</i> -cDNAs	37
4.2.3	Kontrolle der Adaptorligation	38
4.2.4	Kontrolle der PCR Amplifikation I und II	39
4.2.5	PCR-Kontrolle der Klonierung	41
4.3	Überprüfen der differentiellen Expression durch Northern Blot	43
4.3.1	Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)	44
4.3.2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9	48
4.4	Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene.....	50
4.5	BLASTSearch-Ergebnisse der differentiell exprimierten Gene.....	51
5	Diskussion	
5.1	Diskussion der Methoden	52
5.2	Zelllinie	54
5.3	Diskussion der gefundenen Gene	57
5.3.1	Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)	57
5.3.2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9	59
5.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	66
6	Literaturverzeichnis	68
7	Anhang	
7.1	Eidesstattliche Versicherung	81
7.2	Danksagung.....	82
7.3	Lebenslauf.....	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc.	Accesion-Nummer
AP-1	activator protein-1
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
Cdc2	cell division control protein 2
Cdc25B	cell division cycle 25B
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiotreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ets1	E26 transformation specific sequence
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G ₃ PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IE	Internationale Einheiten
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IR	Insulin Rezeptor
kb	Kilobase(n)
KIE	Kallikrein-Inhibitor-Einheiten
M	Mol
ml	Milliliter
mM	millimomolar
MEM	minimum essential medium
min	Minute(n)
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE4D5	Phosphodiesterase 4D5
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
18S/28S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natrium-Dodecylhydrogensulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde(n)
Smad	Sma- und Mad-verwandtes Protein
Sox	Sry-related high mobility group box
Sp1	specificity protein 1
Src	steroid receptor coactivator
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (saline sodium citrate)
ssDNA	einsträngige (single stranded) DNA
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolettstrahlung
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Maligne humorale Hyperkalzämie (MHH) und das Parathormon-verwandte Protein (PTHrP)

Das Hyperkalzämie-Syndrom wurde in den zwanziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen beschrieben (Zondek et al. 1924). Diese Form der Hyperkalzämie wird maligne humorale Hyperkalzämie (MHH) genannt. Die MHH gehört zu einer Gruppe tumorassoziierter Krankheitserscheinungen, die weder primär durch den Tumor noch sekundär durch Metastasen ausgelöst werden. Vielmehr werden die als paraneoplastische Syndrome (PNS) bezeichneten Krankheitserscheinungen indirekt durch Signalstoffe induziert, die vom Tumor freigesetzt werden, wie beispielsweise Hormone oder Zytokine. Die Signalstoffe bedingen unterschiedliche nephrologische, neurologische, dermatologische, hämatologische und insbesondere endokrinologische Krankheitsbilder, die meistens mit den Tumorerkrankungen parallel verlaufen. Die Krankheitsbilder können aber auch dem morphologisch fassbaren Tumorgeschehen zeitlich vorausgehen und somit richtungsweisend für die Entdeckung eines malignen Tumors sein. PNS treten bei ungefähr 15 % aller Krebspatienten auf. Dabei ist die MHH die häufigste Form endokrin bedingter PNS. Sie wird bei etwa 5 % aller Tumormanifestationen gefunden.

Hauptverursacher der MHH ist das Parathormon-verwandte Protein (PTHrP, parathyroid hormone-related protein), ein dem Parathormon (PTH) ähnliches Protein (Goltzman et al. 1989; Singer, 1990; Stewart und Broadus 1990; Stewler und Nissenson 1990; Martin, 1993). Die Bezeichnung als PTH-verwandtes Hormon wurde für PTHrP zum einen aufgrund hoher struktureller Homologie in der N-terminalen Aminosäuresequenz zu PTH und zum anderen wegen PTH-ähnlicher Wirkungen an Knochen und Nieren gewählt. Die erstmalige Isolierung von PTHrP gelang 1987 drei voneinander unabhängigen Forschungsgruppen aus verschiedenen Tumorzelllinien (Burtis et al. 1987; Moseley et al. 1987; Stewler et al. 1987).

1.2 PTH und PTHrP

Obwohl PTH und PTHrP gemeinsame funktionelle und strukturelle Homologien aufweisen, handelt es sich um zwei verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Merkmalen und biologischen Funktionen. Dies wird auch durch die geringe Homologie von nur 16 % in der vollständigen Sequenzabfolge von PTH und PTHrP deutlich (Schlüter, 1999). PTH wird ausschließlich von der Nebenschilddrüse gebildet und freigesetzt. Die Synthese von PTHrP erfolgt in vielen verschiedenen Geweben, der Haut, den Blutgefäßen, der glatten Muskulatur, den Zahnwurzeln, den Wachstumsfugen von Knochen, der Niere und neuronalen Geweben (Datta und Abou-Samra 2009). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich PTH in nachweisbaren Mengen im Blutplasma. Demgegenüber ist PTHrP unter physiologischen Bedingungen im Blutplasma meistens nicht nachweisbar, wohl aber unter pathologischen Bedingungen wie bei der MHH, die mit einer vermehrten Freisetzung von PTHrP einhergeht.

PTH beeinflusst vornehmlich den Kalzium- und Phosphathaushalt über klassische PTH-Zielzellen in Knochen und Niere. PTHrP ruft dagegen viele verschiedene Effekte in unterschiedlichen Organsystemen, wie beispielsweise die Knochenentwicklung und placentare Funktionen, hervor. Das Vorkommen von PTHrP in allen drei Keimblättern weist ebenso wie die Gen-Knock-out-Studie von Karaplis et al. (1994) an Mäusen auf die große physiologische Bedeutung dieses Proteins in der Embryologie hin. Diese Studie deckte eine tödliche chondrodysplastische Deformität bei denjenigen Feten auf, die homozygot für die PTHrP-Null-Mutation waren. Aufgrund dieser komplexen Eigenschaften wurde PTHrP als Polyhormon bezeichnet (Klein et al. 1995).

PTH und PTHrP unterscheiden sich auch in der Genlokalisierung und der Genstruktur. Während sich das PTHrP-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 befindet (Martin und Suva 1988), ist das PTH-Gen in einer analogen Region auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert. Die kurzen Arme der Chromosomen 11 und 12 tragen eine Vielzahl von verwandten Genen, die ursprünglich vermutlich durch Genduplikation entstanden sind (Philbrick et al. 1996), sodass PTH und PTHrP wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer-Gen resultieren. Das PTHrP-Gen ist in seiner Struktur deutlich komplexer als das PTH-kodierende Gen. So setzt sich das PTH-Gen aus nur drei Exons zusammen, während das PTHrP-Gen beim Menschen neun Exons besitzt, die durch drei unterschiedliche Promotoren (P1, P2 und P3) in ihrer Expression reguliert werden. P2 und P3 sind die maßgeblich aktivierten Promotoren von PTHrP (Dittmer 2004; Richard et al. 2005). P2 wird durch die Transkriptionsfaktoren Ets1 und Sp1 aktiviert (Dittmer et al. 1994), P3 enthält zusätzlich Bindungsstellen für Smad3/4 (Dittmer 2007).

PTHrP ist ein Proteohormon, dessen primären Transkriptionsprodukte beim Menschen durch alternatives Spleißen in drei isoforme Proteinprodukte mit 139, 141 und 173 Aminosäuren übersetzt werden (s. Abb. 1) (Philbrick et al. 1996). Demgegenüber entsteht bei Ratte, Maus und Huhn jeweils nur ein Translationsprodukt. Dieses besteht bei der Ratte aus 141 und bei Maus und Huhn aus 139 Aminosäuren. Von zwei Ausnahmen abgesehen sind die Aminosäuresequenzen der primären Transkripte von Mensch, Ratte, Maus und Huhn bis zur Aminosäure 111 identisch, danach weisen sie speziesspezifisch große Unterschiede auf (Martin et al. 1991).

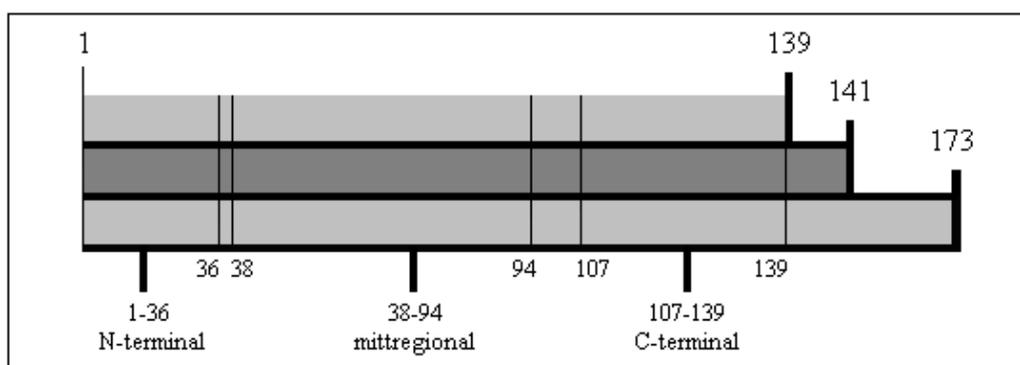


Abb. 1: Schematische Darstellung der drei PTHrP-Isoformen und der aktiven PTHrP-Fragmente. Die grauen Felder mit schwarzer Begrenzung symbolisieren die drei PTHrP-Isoformen (PTHrP 1-139, 1-141, 1-173), die durch alternatives Splicing entstehen. Die drei Zahlenintervalle (1-36, 38-94, 107-139) symbolisieren N-terminale, mittregionale und C-terminale Sequenzbereiche der aktiven PTHrP-Fragmente.

Durch posttranslationale Prozessierung werden die Translationsprodukte an multiplen inneren Spaltstellen gespalten und glykosyliert. Auf diese Weise entstehen unterschiedliche Sekretionsprodukte (PTHrP-Fragmente) mit einem breiten Spektrum an Wirkungen (Orloff et al. 1994; Orloff et al. 1995; Philbrick et al. 1996). Die aktiven PTHrP-Fragmente untergliedern sich in ein N-terminales (PTHrP 1–36), das eine strukturelle Homologie zu PTH aufweist, ein mittregionales (PTHrP 38–94) und ein C-terminales (PTHrP 107–139) (Orloff et al. 1993). Wegen seiner inhibierenden Wirkung auf die Knochenresorption wird PTHrP (107–139) auch als Osteostatin bezeichnet (Fenton et al. 1991).

In der Niere stimulieren N-terminale PTHrP-Fragmente beispielsweise die Reabsorption von Kalzium in renalen Tubuluszellen (Carney et al. 1991) und im Brustgewebe den Kalziumtransport vom Blut in die Muttermilch (Barlet et al. 1992; Seitz et al. 1993). Mittregionales PTHrP fördert den transplazentaren Kalziumtransport und ist bedeutend am Aufbau eines Kalziumgradienten beteiligt, bei dem die Feten im Vergleich zur Mutter hyperkalzämisch sind (Macisaac et al. 1991; Care et al. 1997).

Im Knochen beeinflussen C-terminale PTHrP-Fragmente den Kalziumstoffwechsel, indem sie in Osteoklasten die Kalziumresorption hemmen. Vermutlich wird diese Wirkung durch Osteostatin (PTHrP 107–139) hervorgerufen (Fenton et al. 1991). Neben der Hemmung der Osteoklasten stimulieren C-terminale PTHrP-Fragmente auch die Proliferation und das Wachstum von Osteoblasten. Diese duale Regulation der Osteoblasten und -klasten durch PTHrP bestimmt womöglich auch die Knochenmasse (Cornish et al. 1999).

1.3 Zellbiologische Wirkungen von PTHrP

PTHrP ist Hauptverursacher der malignen humoralen Hyperkalzämie und wird von vielen malignen Zellen produziert (Strewler und Nissenson 1990). Inzwischen belegen zahlreiche Studien, dass PTHrP sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen in vielen Geweben vorkommt, gebildet wird und polyphäne Effekte in der Fetalentwicklung und Erwachsenenphysiologie entfaltet.

Wie die meisten Autoren vermuten, wirkt PTHrP im Wesentlichen über parakrine und/oder autokrine Mechanismen als Wachstums- und Differenzierungsfaktor (Bruton et al. 1990; van den Stolpe et al. 1993; Ortloff et al. 1994; Philbrick et al. 1996; Strewler 2000; Chen et al. 2004).

Ein parakriner PTHrP-Effekt wird beispielsweise für die Stimulation der Adenylatzyklase über Keratinozyten in Fibroblasten angenommen (Philbrick et al. 1996). Auch im ZNS wurde eine PTHrP induzierte, parakrine meningo-astrozytäre Schleife zwischen Astrozyten und Glia limitans nachgewiesen (Struckhoff und Turzynski 1995).

Anhand der Eigenschaften von PTHrP ließ sich dessen autokrine Wirkungsweise in verschiedenen Geweben modellhaft illustrieren. So zeigen Untersuchungen an einer Colon-Zelllinie, dass PTH und PTHrP die Erhöhung von cAMP und Ornithindecarboxylase (ODC) bewirken und diese Wirkung durch den Rezeptorantagonisten (PTHrP 7–34) aufgehoben wird. Da die ODC ein Regulator der Polyamid-Biosynthese ist und Polyamine Zellwachstum und Differenzierung regulieren, belegt diese Studie den autokrinen Einfluss von PTHrP auf das Wachstum und die Differenzierung von Colonzellen (Dahong et al. 1992).

Auch im Zusammenhang mit transformierten Geweben illustrieren verschiedene Befunde für PTHrP autokrine Wirkungsweisen als Wachstums- und Differenzierungsfaktor. Beispielsweise konnte die PTHrP-induzierte DNA-Synthese in einem Prostatakarzinom durch monoklonale Antikörper gegen PTHrP aufgehoben werden (Iwamura et al. 1994). Ferner gelang es, sowohl in einem Nierenzellkarzinom (Burton et al. 1990) als auch in einem Lungenzellkarzinom (Burton und Knight 1992) das Tumorwachstum durch PTHrP-neutralisierende Antikörper und Rezeptorantagonisten für PTH und PTHrP zu hemmen. Autokrine Effekte von PTHrP wurden auch an

anderen Tumorentitäten wie Astrozytomen (Turzynski et al. 1996) und Mammakarzinomen (Lezzoni et al. 1998; Schunke 2008) nachgewiesen.

In der Literatur gibt es aber auch Beweise für intrakrine Wirkungsweisen von PTHrP. So kodiert PTHrP beispielsweise zwei NLS-Domänen (nuclear localization sequence) in den Aminosäuresequenzbereichen 88–91 und 89–106 (Henderson et al. 1995; Massfelder et al. 1997). In Abhängigkeit von diesen Kernlokalisationssequenzen akkumuliert PTHrP im Zellkern. Intrakrin initiiert PTHrP durch noch überwiegend unbekannte Mechanismen anti-apoptotische (Henderson et al. 1995) und proliferative Effekte (Massfelder et al. 1997).

1.4 PTH/PTHrP-Rezeptoren

Sowohl die Sequenzanalyse als auch die Messung der biologischen Aktivität von PTHrP zeigte am N-terminalen Ende eine Übereinstimmung mit PTH (Horiuchi et al. 1987). Hier weist PTHrP in der Aminosäureabfolge 1–13 eine nahezu vollständige Homologie zu PTH auf. Obwohl die Sequenz von PTHrP in der Region 14–34 nur eine geringe Homologie zu PTH besitzt, bindet PTHrP N-terminal, als klassisches Peptidhormon, in äquivalenter Weise wie PTH an den membranständigen PTH-Rezeptor und aktiviert diesen in einer Form, die nicht von der des Parathormons zu unterscheiden ist (Abou-Samra et al. 1992). Daher wird für PTH und PTHrP in der Sequenzabfolge 1–34 eine identische Tertiärstruktur angenommen, welche die Affinität zum PTH-Rezeptor ermöglicht (Philbrick et al. 1996). Dieser gemeinsame N-terminale Rezeptor wird als PTH1-Rezeptor (PTH1R) (Jüppner et al. 1991) oder als PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) bezeichnet.

Ein weiterer N-terminaler Rezeptor, der PTH2-Rezeptor (PTH2R), wurde von Usdin et al. 1995 entdeckt. Dieser Rezeptor weist in seiner Aminosäuresequenz eine 52%ige Homologie zu PTH1R auf. Er bindet PTH, nicht aber PTHrP (Usdin 1997). Ein dritter Rezeptor (PTH3R) wurde im Zebrafisch isoliert. Dieser Rezeptor bindet N-terminale PTHrP-Fragmente, nicht aber PTH als Ligand (Rubin und Jüppner 1999). Da sowohl der PTH1R als auch der PTH2R des Zebrafisches eine große Homologie zu den äquivalenten Rezeptoren in Säugetieren aufweist, wird ein dem PTH3R vergleichbarer Rezeptor des Zebrafisches auch in Säugetieren angenommen (Jüppner 1999). Hinweise auf weitere Rezeptoren beziehen sich auf die Aktivität mittregionaler und C-terminaler PTHrP-Fragmente (Potts et al. 1997). Zugehörige Rezeptoren für diese PTHrP-Fragmente wurden bisher noch nicht identifiziert. Zusammenfassend ist für PTHrP in Säugetieren nur ein Rezeptor bekannt, der klassische PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R).

Der PTH/PTHrP1R wird in den klassischen Zielorganen von PTH und PTHrP, Niere und Knochen, stark exprimiert, in geringerem Umfang aber auch in vielen anderen Gewebearten (Jüppner 1999). Bereits 1991 gelang es, diesen Rezeptor aus der cDNA-Bibliothek einer Opossum-Nierenzelle zu isolieren (Jüppner et al. 1991). Der Rezeptor besteht aus einem 585 Aminosäuren langen Peptid und gehört zu einer Untergruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranären Domänen. Ein Merkmal dieser Klasse-II-Rezeptoren ist eine lange, aus 150 Aminosäuren bestehende, extrazelluläre N-terminale Domäne für die Ligandenbindung (Gensure et al. 2005). Das PTH/PTHrP1R-Protein ist glykosyliert und wird substratabhängig am intrazellulären, C-terminalen Abschnitt phosphoryliert. Vermutlich stellt diese Modifizierung einen entscheidenden Bestandteil der Rezeptordesensibilisierung und der Rezeptor-*down*-Regulation dar (Jüppner 1999).

Wie aktuelle pharmakologische und biophysiological Untersuchungen zeigen, verursachen PTH und PTHrP jeweils eine individuelle Konformationsänderung im PTH/PTHrP1R (Dean et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass PTH und PTHrP über den gleichen Rezeptor auch verschiedene zelluläre Funktionen induzieren können.

1.5 PTH/PTHrP-regulierte Signalwege und Genexpression

Die Aktivierung des PTH/PTHrP-Rezeptors Typ I (PTH/PTHrP1R) durch PTH und PTHrP verursacht einen akuten Anstieg mehrerer Signalmoleküle, die den zwei klassischen G-Protein-gekoppelten Signalwegen, den der Phospholipase C (PLC) und den der Adenylatzyklase (AC), angehören (Abou-Samra et al. 1992). Über diese beiden Signalwege soll PTHrP auch den Signalweg der MAPK-Kaskade (mitogen-activated protein kinase) aktivieren, um das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Genexpression zu regulieren (Swarthout et al. 2001; Chen et al. 2004; Gesty-Palmer et al. 2006; Zheng et al. 2008).

Die Aktivierung der PLC führt zur Akkumulation von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration und DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Letztlich werden über die Kalziumkonzentration und die PKC Transkriptionsfaktoren reguliert (Datta und Abou-Samra 2009). Die Stimulation der AC ruft einen intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Kovacs et al. 1995) hervor sowie die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA wiederum phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise CREB (cAMP response element binding protein) (Datta und Abou-Samra 2009).

Die Stimulierung von PTH/PTHrP1R kann somit zu einer Aktivierung von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC), von Ca²⁺-abhängigen Signalwegen (Cataisson et al. 2000;

Jüppner 1999) und der MAPK-Kaskade führen. Welcher Signalweg initiiert wird, scheint von der Rezeptordichte, dem Vorkommen unterschiedlicher G-Proteine (Guo et al. 1995) und damit von der Zelllinie abhängig zu sein (Cataisson et al. 2000).

Transkriptionsfaktoren, die durch PTHrP aktiviert werden, sind neben CREB auch Sox9 und Mitglieder der AP-1-Familie (activator protein-1). Der Transkriptionsfaktor Sox9 gehört zu den Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie, die die Chondrogenese wie auch die Chondrozyten-differenzierung beeinflussen (Chimal-Monroy et al. 2003). Die Bindung von PTHrP an den PTH/PTHrP1R aktiviert Sox9 durch Phosphorylierung und vermittelt *in vivo* über den cAMP/PKA-Signalweg die Wirkungen von PTHrP auf die Wachstumsfuge (Huang et al. 2001). Zu der AP-1-Familie gehören Mitglieder der Fos- und Jun-Proteinfamilien. Diese Proteine bilden durch Dimerisation den Transkriptionsfaktor AP-1. Der AP-1-Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle in der Knochenentwicklung (Wagner 2002), der Zellproliferation, der Zelltransformation und der Apoptose (Shaulian und Karin 2002). Die Proteine Fos und Jun sind auch als Protoonkogene c-Fos und c-Jun bekannt.

PTH und PTHrP transaktivieren den Transkriptionsfaktor CREB (Tyson et al. 2002) und stimulieren den Promotor von *c-Fos* durch Phosphorylierung von CREB (Pearman et al. 1996). Darüber hinaus bewirken sie die Hochregulierung der Expression von *c-Fos* und *c-Jun* in Osteoblasten (Clohisy et al. 1992; McCauley et al. 1997), die wiederum die Transkription solcher Gene vermitteln, die eine AP-1-Promotorregion besitzen (Datta und Abou-Samra et al. 2009). PTHrP stimuliert neben *c-Fos* auch die Expression von JunB und Fra2, die ebenfalls Mitglieder der AP-1-Familie sind (McCauley et al. 2001; Datta et al. 2005).

Eine PTHrP-induzierte Genregulation wurde auch im Prostatakarzinom und im Mammakarzinom entdeckt. Gujral et al. zeigten 2001, durch Untersuchungen an verschiedenen Prostatakarzinomen, eine PTHrP-vermittelte, intrakrine Hochregulierung von Interleukin 8 (IL8). Nach Transfektion von PTHrP (1–87) war eine erhöhte mRNA-Synthese von IL8 und eine Steigerung der Zellproliferation nachweisbar. Im Mammakarzinom induzierte PTHrP (1–34) über den PTH/PTHrP1R eine zweifache Herunterregulierung der mRNA der beiden Zellzyklusregulatoren, Cdc2 und Cdc25B (Schunke 2008). Hierbei hatte Forskolin, welches die Adenylatzyklase aktiviert, keinen Einfluss auf die Expression von Cdc2 oder Cdc25B. Auch der PKC-Signalweg wurde ausgeschlossen, weil PKC in den untersuchten MDA-MB-231-Zellen konstitutiv aktiv ist. Zudem war bekannt, dass in fortgeschrittenen Mammakarzinomen der Ca^{2+} -abhängige Signalweg das wichtigste Ziel von PTH/PTHrP1R ist. Somit wurde für die PTHrP-(1–34)-abhängige Expressionsabnahme von Cdc2 und Cdc25B der Ca^{2+} -abhängige Signalweg vermutet.

In der Zusammenfassung stellt PTHrP ein eigenständiges Peptidhormon dar, das über autokrine, parakrine und intrakrine Wirkmechanismen sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen polyphäne Effekte in verschiedenen Organsystemen hervorruft. In Säugetieren ist für PTHrP nur der PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) bekannt. Durch Aktivierung dieses Rezeptors vermittelt PTHrP über den Signalweg der Phospholipase C (PLC) oder den der Adenylatzyklase (AC) die Regulation des Zellwachstums, die Zelldifferenzierung und die Genexpression. In Bezug auf die PTHrP-induzierte Genexpression auf der Ebene der Transkription in Tumorzellen ist bisher nur wenig bekannt.

1.6 Voruntersuchungen und Fragestellungen

Durch Untersuchungen an Mammakarzinomen, Astrozytomen und Nierenzellkarzinomen, die sowohl PTHrP und PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) exprimieren als auch verschiedene Proteasen sezernieren, gelang es, die PTHrP-induzierte, autokrine Regulation dieser Proteasen zu demonstrieren (Bunge 1997).

In dieser Studie wurde zunächst in den verschiedenen Tumoren die Zunahme der Proteasensekretion in Abhängigkeit von PTHrP (1–34) nachgewiesen. Anschließend erfolgte die Beweisführung für die autokrine Wirkungsweise von PTHrP (1–34). Zu diesem Zweck wurde die autokrine Schleife auf drei verschiedenen Ebenen unterbrochen:

1. durch Blockierung der Translation mit einem Antisense-Oligonukleotid (asODN),
2. durch Antagonisierung des PTH/PTHrP-Rezeptors Typ I mittels PHTrP (7–34) und
3. durch Inhibition der Signaltransduktion mit einem Inhibitor der PKC.

Diese Unterbrechungen der autokrinen Schleife führten in allen drei Fällen zu einer vergleichbaren Senkung der Proteasensekretion. Somit war die Beweisführung für die autokrine PTHrP-vermittelte Steigerung der Proteasensekretion über den PTH/PTHrP1R erbracht. Darüber hinaus lieferten diese Untersuchungen einen ersten Anhaltspunkt für einen PKC-abhängigen Signaltransduktionweg von PTHrP. Weitere Untersuchungen dienten nun dazu, festzustellen, ob PTHrP die Proteasensekretion ausschließlich über den Signalweg der PKC reguliert. Zur Ergründung dieser Fragestellung wurde sowohl der Signalweg der Adenylatzyklase als auch der der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMK II) inhibiert. In beiden Untersuchungen hatte die Inhibition der Signalwege keinen Einfluss auf die Proteasensekretion. Diese Feststellung untermauerte die Vermutung, dass die Regulation der Proteasen ausschließlich über den Signalweg der PKC erfolgt.

Für eine Protease (uPA, Urokinase-Plasminogen-Aktivator) wurde musterhaft unter allen Bedingungen eine unveränderte Konzentration belegt. Dieser Befund lieferte ein starkes Indiz dafür, dass eine Entleerung intrazellulärer Proteasenspeicher für die Steigerung der Proteasensekretion ursächlich nicht bedeutsam war. Abschließend wurde in dieser Studie eine transkriptionsabhängige Änderung der PTHrP-induzierten Proteasensekretion durch Northern-Blot-Analysen ausgeschlossen.

Basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen wurde in der Zusammenschau geschlussfolgert: Die Steigerung der Proteasensekretion wird über den PTH/PTHrP1R durch PTHrP (1–34) autokrin induziert, ausschließlich durch PKC vermittelt und beruht auf Translationseffizienz.

Anlässlich dieser Voruntersuchungen stellte sich die Frage, ob PTHrP die Genaktivität einzelner Gene nicht nur auf der Ebene der Translation, sondern auch auf der Ebene der Transkription moduliert. Diese Fragestellung sollte exemplarisch anhand einer Tumorzelllinie, die in den Voruntersuchungen eingesetzt worden war, analysiert werden. Als Methode wurde für die Selektion potenziell differentiell exprimierter Gene die subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH) in eine Richtung (vorwärts) durchgeführt. Die Überprüfung der potenziell differenzierten Gene auf tatsächliche Expressionsänderungen erfolgte durch Northern-Blot-Hybridisierung.

Folgenden Fragen wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen:

1. Reguliert PTHrP auf der Ebene der Transkription die Expression einzelner Gene?
2. Falls ja, um welche Gene handelt es sich?

2 Material

2.1 Chemikalien und Bezugsquellen

[α -³²P]dCTP (110 TBq/mmol), Amersham, Braunschweig
10x Klen Taq PCR resection buffer, Clontech, Palo Alto, USA
50x Klen Taq Polymerase Mix, Clontech, Palo Alto, USA
Agarose, Life Technologies, Eggenstein
Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt
Ampicillin, D- α -Aminobenzylpenizillin, Sigma, Deisenhofen
Bacto Agar, Difo Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Trypton, Difo Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto Yeast Extract, Difo Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Borsäure, Merck, Darmstadt
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonphthalein), Sigma, München
BSA (bovin serum albumin, Fraktion V), Serva, Heidelberg
Chloroform, Merck, Darmstadt
dNTP Mix, Clontech, Palo Alto, USA
Eisessig, Merck, Darmstadt
Essigsäure, Merck, Darmstadt
Ethanol, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, Sigma, München
Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), Boehringer, Mannheim
ExpressHyb, Clontech, Heidelberg
Fetuin, Sigma, München
Fetal Calf Serum (FCS), Life Technologies, Eggenstein
Formaldehyd, Merck, Darmstadt
Formamid, Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose, Sigma, München
Glycerin, Merck, Darmstadt
Guanidiniumisothiocyanat, Life Technologies, Eggenstein
HAM's F10-Medium, Sigma, München
H-Insulin, Hoechst, Frankfurt
Isoamylalkohol, Merck, Darmstadt
Isopropanol, Merck, Darmstadt
Leibovitz L15, Life Technologies, Eggenstein
Lithiumchlorid, Merck, Darmstadt
L-Glutamin, Seromed, Biochrom, Berlin
Loading-Dye, Promega, Mannheim
MEM-Vitamine, Seromed, Berlin
Methanol, Merck, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure), Sigma, München
Natriumacetat-Trihydrat, Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat (7,5%ige Lösung), Seromed, Biochrom, Berlin
Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
Oligo-(dT)-Cellulose, Boehringer, Mannheim
PBS, steril, für Zellkultur, Sigma, München
Phenol, Sigma, München
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Sigma, Deisenhofen

Phi-X174/HaeIII-Fragmente, Life Technologies, Eggenstein
PTHrP (1–34): PTHrP(1–34)amid, Bachem, Heidelberg
PTHrP (7–34): (Asn¹², Leu¹¹, D-Trp¹⁰)-PTHrP(7–34)amid, Bachem, Heidelberg
QuikHyb Hybridization Solution, Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen: Eco RI, Hin III, Boehringer, Mannheim
RNase A, Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V), Serva, Heidelberg
Salzsäure, Merck, Darmstadt
Sarcosyl (*N*-Lauroylsarkosin, Natriumsalz), Serva, Heidelberg
SDS (*n*-Dodecylhydrogensulfat Natriumsalz), Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt
Transferrin (30 mg/ml), Boehringer, Mannheim
Trasyloyl (Aprotinin) (100 000 KIE), Bayer, Leverkusen
Tri-Natriumcitrat, Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck, Darmstadt
Trypsin, Seromed, Biochrom, Berlin

2.2 Software

Molecular Analyst von BioRad, München
Microsoft Office: Word, PowerPoint, Excel, Paint

2.3 Geräte

Densitometer: Imaging Densitometer Model GS-670, BioRad, München
Phosphordensitometer: Molecular Imager® Model GS-250, BioRad, München
(Gs-250 Sample Loading Dock, Molecular Imaging Screens-BI, Gs-250 Sample Screen Eraser)
Fotometer: RNA/DNA Calculator Genequant 11, Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilmentwickler:
Hyperprocessor Automatic Film Processor RPN 1700, Amersham, Braunschweig
Rotationsofen: Compact Line OV4, Biometra, Göttingen
Scanner: Imaging Densitometer, Biorad, München
Thermocycler: DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer, Überlingen
UV-Transilluminator: Herolab Laborgeräte, Wiesloch
Wärmeblock: Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen:
Centrifuge (5402 und 5415C), Eppendorf, Hamburg
Centrifuge Beckman (GS-6KR und J2MC), Beckman Instruments, Palo Alto, USA

2.4 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, Clontech, Heidelberg
Megaprime DNA-Labeling System, Amersham, Braunschweig
mRNA-Separator-Kit, Clontech, Heidelberg
QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Hilden (PCR-Sonden-Reinigung)
QIAquick Nucleotide Removal, QIAGEN, Hilden
TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad

3 Methoden

3.1 Kultivierung der Zellen

Kulturmedium L15:10 % FCS, 0,1 % Glucose, 1 mM Glutamin, 80/I IE Insulin, 20000 KIE/I Trasylol, 1x MEM-Vitamine, 0,1125 % Na₂CO₃, 6,25 mg/I Fetuin und 1 µg/ml Transferrin

Die Zellen wuchsen in L15-Medium bei 5 % CO₂, 98 % Luftfeuchtigkeit und 37° C in 175-cm³-Flaschen (Falcon, Becton and Dickinson, Heidelberg). Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Zuerst wurde das Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen und mit 3–4 ml Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach Hinzugeben einer geringen Menge des L15-Kulturmediums wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufnehmen und Spülen des Flaschenbodens vereinzelt. Eine Probe des Zellvolumens, das nach vier Tagen konfluent war, wurde in den Kulturflaschen zurückgelassen und mit 35 ml Medium, Leibovitz`L-15, aufgefüllt. Die entnommenen Zellen wurden in weiteren Flaschen ausgesät.

3.2 Behandlung der Zellen

3.2.1 Behandlung der Zellkulturen für die SSH-Technik

Für die Anwendung der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH) war es erforderlich, zwei verschiedene Zellkulturansätze zu konstruieren. Hierzu wurden die Zellen in zwölf 175-cm³-Flaschen (Falcon, Bekson and Dickson, Heidelberg) ausgesät und mindestens für zwei Tage in L15-Medium inkubiert. Um störende Faktoren, die aus dem Serum dieses Mediums hervorgehen können, zu vermeiden, erfolgte die Zellbehandlung serumfrei. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem HAM's F10 gewaschen. Anschließend wurden aus den zwölf Zellkulturen zwei Ansätze mit jeweils sechs Einzelkulturen gebildet und unterschiedlich mit PTHrP behandelt. Ein Zellkulturansatz wurde mit PTHrP (1–34) in einer Konzentration von 10⁻⁹ M für zwei Stunden inkubiert. Der zweite Zellkulturansatz erfuhr eine 2-stündige Inkubation mit 10⁻⁷ M PTHrP (7–34).

Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium verworfen und direkt die Gesamt-RNA aus den jeweils sechs Kulturflaschen einer Zellkulturpopulation isoliert und vereint. Nach Isolation der Gesamt-RNA erfolgte die Isolation der Poly-A⁺-mRNA beider RNA-Populationen.

3.2.2 Behandlung der Zellen für den Northern Blot

Für den Northern Blot wurden sieben identische Zellkulturen in Zellkulturflaschen (175 cm³) bis zu einem konfluenten Zellwachstum herangezüchtet und zweimal mit HAM's F10 gewaschen. Danach erfolgte die serumfreie Inkubation der Zellen mit PTHrP in der oben genannten Konzentration. Je eine Zellkultur wurde 30, 60, 120, 240 und 480 min mit PTHrP (1–34) und eine Zellkultur wurde für 120 min mit PTHrP (7–34) vorbehandelt. Die Zellen einer Flasche blieben unbehandelt.

3.3 RNA-Arbeitsmethoden

3.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Für die Extraktion der Zellen aus einer großen Falcon-Flasche, 175 cm³ (Falcon, Bekson and Dickson, Heidelberg), wurden folgende Chemikalien im Verhältnis von 1 : 1 : 0,1 : 0,2 verwandt: 5 ml Lysispuffer (Solution D), 5 ml Phenol, 0,5 ml 2 M Natriumacetatlösung, pH 4,0, 1 ml Chloroform.

Lysispuffer: 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat, pH 7,0,
 0,5 % Sarcosyl, 0,1 M β -Mercaptoethanol

Die Zellen wurden in 5 ml Lysispuffer vom Flaschenboden gelöst und in ein Polypropylenröhrchen überführt. Nach Zugabe von Phenol, Natriumacetat und Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1) wurden die Proben durchmischt, für 15 min auf Eis gestellt und 20 min bei 4° C mit 10 000 g zentrifugiert. Zur ersten Präzipitation wurde die RNA mit der wässrigen Phase in ein weiteres Polypropylenröhrchen separiert und mit Isopropanol im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Nach einer einstündigen Fällung bei –20° C erfolgte eine Sedimentation bei 10 000 g und 4° C für 20 min. Für eine weitere Präzipitation wurde zunächst der Überstand verworfen, das Pellet mit 0,5 ml Lysispuffer resuspendiert und präzipitiert. Die RNA wurde vor der abschließenden Sedimentation einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde in Wasser aufgenommen und die Konzentration und die Reinheit im Fotometer (Genequant 11, Pharmacia, Freiburg) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarose-Gel unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

3.3.2 Isolation und Kontrolle der Poly-A⁺-mRNA für die SSH-Technik

Für die Extraktion der Poly-A⁺-mRNA aus der Gesamt-RNA wurde nach dem Protokoll des mRNA-Separator-Kits (Contech) verfahren. Die Poly-A⁺-mRNA wurde mit 3 M NaOH und Ethanol bei -20° C über Nacht gefällt, am nächsten Tag präzipitiert und in RNase-freiem H₂O resuspendiert. Ein Aliquot wurde für die spektrofotometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der Poly-A⁺-mRNA separiert. Zur Kontrolle der Integrität wurde die Poly-A⁺-mRNA in einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht fotodokumentiert.

3.4 Subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH)

3.4.1 Prinzip der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH)

Die SSH-Technik ist ein PCR-Verfahren, das die Selektion differentiell exprimierter Gene durch Hybridisierung zweier cDNA-Subpopulationen (*Tester* und *Driver*) ermöglicht (s. Abb. 2). Die *Tester*-Population unterscheidet sich von der *Driver*-Population dadurch, dass in ihr differentiell exprimierte Gene vermutet werden. Die *Driver*-Population dient als Vergleichspopulation. Der subtraktive Effekt der SSH-Technik basiert auf der Hybridisierung von Sequenzen die in beiden Subpopulationen vorkommen und deshalb ausselektiert werden können. Nicht hybridisierte ss-cDNAs repräsentieren Gene, die ausschließlich in der *Tester*-Population, nicht aber in der *Driver*-Population vorhanden sind. Durch Adaptorligation ist es möglich, diese potenziell differentiell exprimierten Gene der *Tester*-Population mittels PCR-Amplifikation zu selektieren. Nach Umschreibung der mRNA in cDNA werden die *Tester*- und *Driver*-cDNAs zuerst mit einem vier Basen schneidenden Restriktionsenzym (Rsa-I) verdaut, damit ds-cDNAs mit geraden Enden und Phosphatgruppen am 5'-Ende generiert werden. Die verdaute *Tester*-Population wird in zwei Fraktionen aufgeteilt (*Tester* 1-1 und *Tester* 1-2) und mit zwei verschiedenen Adaptoren (Adaptor 1 und 2) ligiert, wodurch zwei unterschiedliche *Tester*-Populationen (*Tester*-1-1-Adaptor 1 und *Tester*-1-2-Adaptor 2) entstehen. Die Adaptoren besitzen an den Enden keine Phosphatgruppen, weshalb nur ein Strang eines jeden Adaptors kovalent an die 5'-Enden der *Tester*-cDNAs gebunden wird.

Im Weiteren erfolgen zwei Hybridisierungen. Vor der ersten Hybridisierung werden die *Tester*-Populationen nach Zugabe von *Driver* im Überschuss denaturiert. Die Denaturierung trennt zum einen die ds-cDNAs und dient zum anderen der Eliminierung nicht kovalent gebundener Adaptoren. Anschließend fand die erste Hybridisierung über Nacht statt. Durch diese Hybridisierung formieren sich in beiden *Tester*-Populationen vier verschiedene cDNA-Fraktionen (a, b, c und d). In den Typ-a-Fraktionen liegen nicht hybridisierte ss-cDNAs der *Tester*-Populationen vor. Unter diesen werden differentiell exprimierte Gene angenommen. Im

Gegensatz dazu bilden die Typ-c-Fraktionen Heteroduplices mit den *Driver*-cDNAs. Diese Hybride stellen die nicht differentiell exprimierten Gene dar. Die Typ-b-Fraktionen beinhalten weiterhin ds-cDNAs der *Tester*-Populationen und in den Typ-c-Fraktionen befinden sich ss- oder ds-cDNAs der *Driver*-Population. Durch die Hybridisierung werden die Konzentrationsunterschiede von gering und hoch exprimierten Genen speziell in den Typ-a-Fraktionen ausgeglichen, weil die Hybridisierung von Molekülen mit höherer Konzentration schneller verläuft als die von Molekülen mit niedriger Konzentration. Zudem häufen sich potenziell differentiell exprimierte ss-cDNAs der Typ-a-Fraktionen an, da nicht differentiell exprimierte *Tester*-cDNAs mit *Driver*-cDNAs Hybride bilden.

Um Hybride mit unterschiedlichen Adaptoren an den Enden zu generieren, wird eine zweite Hybridisierung ohne initiale Denaturierung durchgeführt. Hierzu werden die *Tester*-Populationen vereint und mit frisch denaturiertem *Driver* gemischt, damit auch eine weitere Subtraktion möglich wurde. Das so neu generierte Typ-e-Hybrid besitzt zwei verschiedenen „geschachtelte“ Adaptoren mit einsträngigen Enden: den Adaptor 1 aus der *Tester*-Population 1 und den Adaptor 2 aus der *Tester*-Population 2. Beide Adaptoren besitzen zwei verschiedene Bindungsstellen für die PCR-Primer. Zur Generierung der komplementären Adaptorsequenzen erfolgt eine Auffüllreaktion mit cDNA-Polymerase zu Beginn der ersten Amplifikation mit den PCR-Primern 1 und 2. Durch eine zweite PCR-Amplifikation mit Nested-Primern werden unspezifische PCR-Produkte erneut reduziert und differentiell exprimierte Sequenzen weiter angereichert.

Da ausschließlich die Typ-e-Hybride über verschiedene Adaptoren an beiden Enden verfügen, ist es möglich, nur diese potenziell differentiell exprimierten ds-cDNAs mittels PCR exponentiell zu amplifizieren. Die Typ-a- und die Typ-d-Fraktionen werden nicht amplifiziert, da diese nicht über Bindungsstellen für Primer verfügen. Typ-c-Hybride besitzen zwei gleiche Adaptoren an einem Ende und somit nur eine Bindungsstelle für Primer, die eine lineare Amplifikation ermöglicht. Typ-b-Hybride mit zwei gleichen Adaptoren an beiden Enden bilden Haarnadelstrukturen, wodurch die Bindung der Primer und folglich die Amplifizierung unterbunden werden. Dieser Effekt ist der supprimierende Aspekt der SSH-Technik und beruht darauf, dass die intramolekularen Bindungen im Adaptorbereich wesentlich stabiler sind als die intramolekularen Bindungen mit den viel kürzeren PCR-Primern (Chenchik et al. 1996).

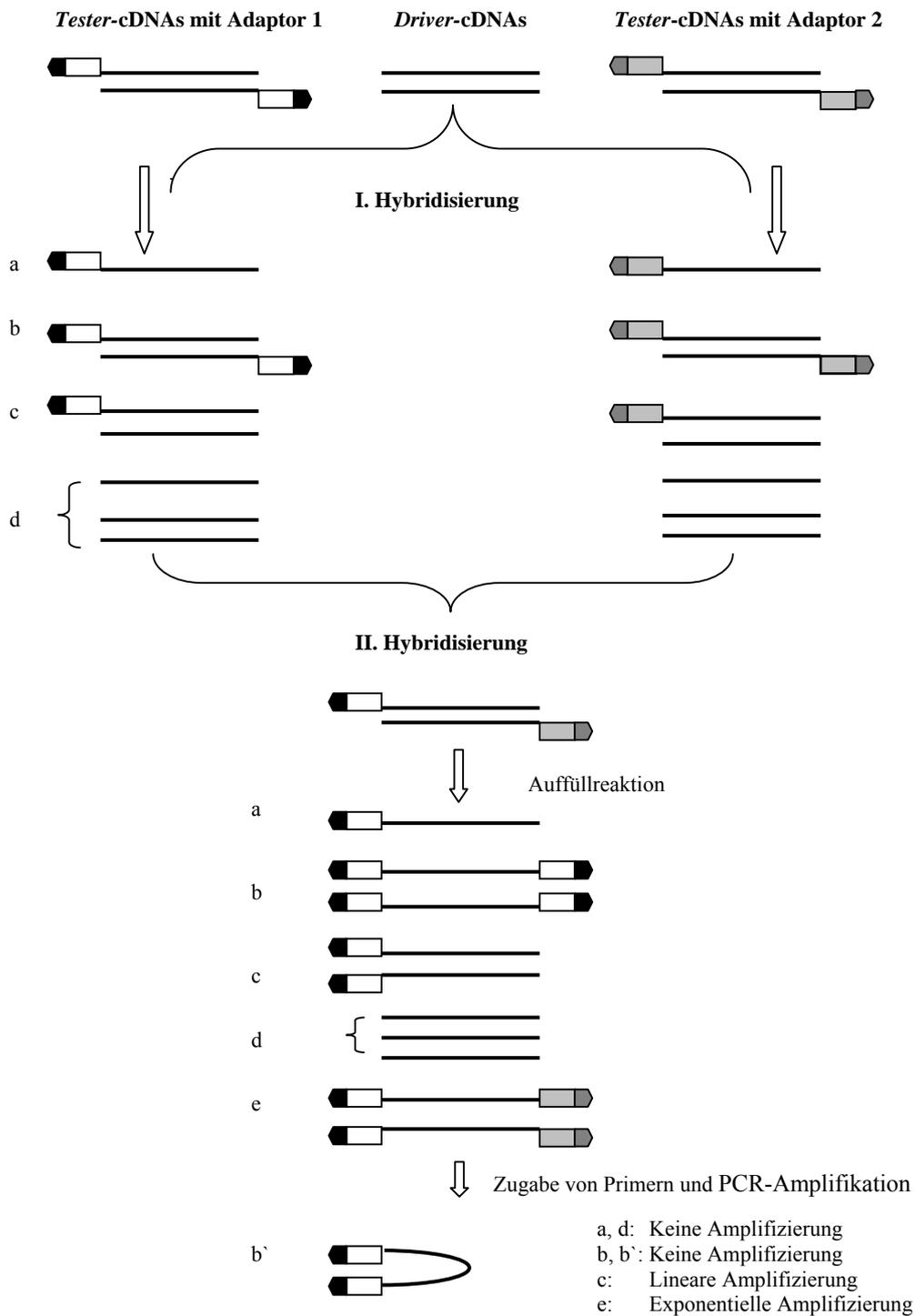


Abb. 2: Schematische Darstellung der SSH-Technik nach Diatchenko et al. 1996. Schwarze Linien symbolisieren die Rsa-I-verdauten *Tester*- und *Driver*-cDNAs. Farblose oder graue Rechtecke kennzeichnen die Bindungsstellen von Adaptor 1 und 2 für die Nested-Primer. Die spitzwinkligen schwarzen oder grauen Symbole repräsentieren die Bindungsstellen von Adaptor 1 und 2 für den PCR-Primer 1 oder 2. a: ss-cDNAs der *Tester*-Populationen mit Adaptor 1 oder 2, b: ds-cDNAs der *Tester*-Populationen, c: ds-cDNAs aus *Driver* und *Tester*, d: ss- oder ds-cDNAs der *Driver*-Population, e: ds-cDNAs mit Adaptor 1 und 2. b': Haarnadelstruktur von *Tester*-cDNAs mit zwei gleichen Adaptoren. Auf die Darstellung der Typ-a-, -b-, -c-Fractionen, die Adaptor 2 nach der zweiten Hybridisierung binden, wurde verzichtet.

3.4.2 Durchführung der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH)

Für die SSH-Technik wurde der Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit eingesetzt. Die mRNA von Zellen, die mit PTHrP (1–34) vorbehandelt waren, wurde mit der mRNA von Zellen verglichen, die mit PTHrP (7–34) präinkubiert worden waren. Für diesen Vergleich wurde die subtraktive Suppressionshybridisierung in eine Richtung (vorwärts) durchgeführt. Nach der Isolation der Gesamt-RNA und der Poly-A⁺-mRNA erfolgte die Umschreibung der Poly-A⁺-mRNA in cDNA. Die cDNA der Zellen, die mit PTHrP (1–34) stimuliert worden war, diente als *Tester*-Population und die Vergleichs-cDNA als *Driver*-Population. Gene die als potenziell differentiell exprimiert galten wurden kloniert und durch Sequenzierung sowie Northern-Blot-Analyse weiter untersucht.

3.4.3 Präparation der *Tester*- und *Driver*-cDNAs

Restriktionsendonuklease-Puffer: 100 mM Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7,0,
100 mM MgCl₂, 1 mM DTT

Die Umschreibung beider Poly-A⁺-mRNA-Subpopulationen (*Tester* und *Driver*) in cDNAs durch AMV Reverse Transkriptase (RT) erfolgte nach dem PCR-Select™-Protokoll von Clontech. Zur Synthese der *Tester*-cDNAs wurden 7 µl, für die Herstellung der *Driver*-cDNAs 11 µl Poly-A⁺-mRNA und 1 µl Pr16 (10 µM) Primer eingesetzt. Die Erst- und Zweitstrangsynthese der cDNA fand unter Verwendung von T4-cDNA-Polymerase statt. Die cDNA-Proben wurden zur weiteren Verarbeitung in 50 µl Wasser resuspendiert. Die Kontrolle der cDNA-Synthese erfolgte mittels Gelelektrophorese.

Um cDNA-Fragmente mit glatten Enden für die Adaptorligation zu generieren, wurden beide cDNA-Populationen durch RsaI verdaut. Der Verdau benötigte zwei Stunden, wobei der Reaktionsmix 43,5 µl cDNA, 5 µl 10x RsaI-Restriktionsendonuklease-Puffer und 1,5 µl RsaI-Enzym enthielt. Nachdem die Verdaureaktion durch Zugabe von 2,5 µl 20x EDTA-Glykogen-Mix gestoppt worden war, wurden die ds-cDNAs durch Phenol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Pellets der *Tester*- und *Driver*-cDNAs wurden in 5,5 µl resuspendiert und bei –20° C gelagert. Hiermit war die Präparation der *Driver*-cDNAs abgeschlossen. Die *Tester*-cDNAs wurden nun in zwei Populationen (*Tester* 1-1, *Tester* 1-2) aufgeteilt und für die Adaptorligation bereitgestellt.

3.4.4 Adaptorligation der *Tester*-cDNAs

Master-Mix: 9 μ l steriles Wasser, 6 μ l 5x Ligations-Puffer und 3 μ l T4-DNA-Ligase

Die *Tester*-1-1-cDNA wurde mit Adaptor 1 und die *Tester*-1-2-cDNA mit Adaptor 2 ligiert. Für beide Ligationen wurde zunächst 1 μ l der verdauten *Tester*-cDNAs mit 5 μ l Wasser verdünnt. Anschließend ergaben je 2 μ l der verdünnte *Tester*-cDNAs, 2 μ l Adaptor (10 μ M) und 6 μ l Master-Mix ein Gesamtvolumen von 10 μ l für jeden Ligationsansatz. Zur Durchmischung wurden beide Ligationsansätze kurz zentrifugiert. Die Ligation erfolgte bei 16° C über Nacht im PCR-Block. Die Reaktionen wurden mit 1 μ l 0,2 M EDTA gestoppt und die Ligase bei 72° C für 5 min hitzedeaktiviert.

3.4.5 Effizienzprüfung der Adaptorligation

Master-Mix: 0,5 μ l 50x Advantage cDNA-Polymerase Mix, 0,5 μ l dNTP-Mix (10 mM)
18,5 μ l steriles Wasser, 2,5 μ l 10x PCR-Reaktionspuffer

Für die Effizienzprüfung der Adaptorligation wurden für jede adaptorligierte Probe (*Tester* 1-1, *Tester* 1-2) zwei PCR-Amplifikationen durchgeführt. Für die erste PCR-Amplifikation der *Tester*-cDNAs wurden die Primer so gewählt, dass ausschließlich cDNA-Fragmente amplifiziert wurden, die die G₃PDH-Adaptor-Verbindung überspannen. Die zweite Amplifikation der *Tester*-cDNA erfolgte mit zwei genspezifischen Primern (G₃PDH-3' und G₃PDH-5'). Für die Durchführung der Effizienzprüfung der Adaptorligation wurde 1 μ l jeder Ligation in 200 μ l H₂O aufgenommen und nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
<i>Tester</i> 1-1 (ligiert mit Adaptor 1)	1 μ l	-	1 μ l	-
<i>Tester</i> 1-2 (ligiert mit Adaptor 2)	-	1 μ l	-	1 μ l
G ₃ PDH-3'-Primer	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
G ₃ PDH-5'-Primer	-	-	1 μ l	1 μ l
PCR-Primer 1	1 μ l	-	-	-
PCR-Primer 2	-	1 μ l	-	-
Endvolumen	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l

Ein Gesamtvolumen von 25 μ l pro Ansatz wurde durch die Addition von 22 μ l Master-Mix erzielt. Zur Auffüllung „überhängender“ Enden der Adaptoren wurden die Proben für 5 min bei 75° C inkubiert. Insgesamt wurden 24 PCR-Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Die Denaturierungszeit betrug 30 sek und erfolgte bei 94° C; die Annealing-Reaktion fand für 30 sek bei 65° C statt und die Elongationsreaktion benötigte 2,5 min bei 68° C. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die cDNA-Mengen miteinander verglichen.

3.4.6 Subtraktive Hybridisierung

In der ersten Hybridisierung wurden die adaptorligierte *Tester-1-1*-cDNA und die *Tester-1-2*-cDNA mit denaturierter, überschüssiger *Driver*-cDNA hybridisiert. Für jede Hybridisierungsprobe wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

	Hybridisierungsprobe 1	Hybridisierungsprobe 2
<i>Driver</i> -cDNA	1,5 µl	1,5 µl
<i>Tester-1-1</i> -Adaptor 1	1,5 µl	-
<i>Tester-1-2</i> -Adaptor 2	-	1,5 µl
4x Hybridisierungspuffer	1 µl	1 µl
Endvolumen	4,0 µl	4,0 µl

Die Proben wurden durchmischt, mit Mineralöl überschichtet, bei 98° C für 1,5 min denaturiert und bei 68° C acht Stunden hybridisiert. Im Anschluss wurde direkt die zweite Hybridisierung ohne initiale Denaturierung durchgeführt. Hierzu wurden beide *Tester*-Proben vereint und mit 4 µl frisch denaturierter *Driver*-cDNA angereichert. Damit nicht eine *Tester*-Probe vorzeitig mit der frisch denaturierten *Driver*-cDNA in Berührung kam, wurden eine *Tester*-Probe und die *Driver*-cDNA mit einem dazwischenliegenden Luftpolster in der Pipettenspitze aufgenommen und in die andere *Tester*-Probe überführt. Für die Denaturierung der *Driver*-cDNAs wurden 1 µl *Driver*-cDNA, 1 µl 4x Hybridisierungspuffer und 2 µl steriles Wasser gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Denaturierung erfolgte bei 98° C für 1,5 min. Der Ansatz wurde durchmischt und bei 68° C über Nacht (16 Stunden) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl Verdünnungspuffer und der Inkubation für weitere 7 min bei 68° C gestoppt. Zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -20° C gelagert.

3.4.7 Erste und zweite PCR-Amplifikation

Die weitere Anreicherung der potenziell differentiell exprimierten Gene wurde durch zwei suppressive PCR-Amplifikationen erzielt. Eine im PCR-Select™ Kit enthaltene Control-subtracted cDNA wurde in beiden Reaktionen analog amplifiziert. Der Master-Mix für die erste Amplifikation enthielt folgende Komponenten:

H ₂ O	18,5 µl
10x PCR-Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP-Mix (10 µM)	0,5 µl
PCR-Primer 1 (10 µM)	1,0 µl
PCR-Primer 2 (10 µM)	1,0 µl
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl
Endvolumen	24,0 µl

Die 24,0- μ l-Master-Mixe wurden mit 1 μ l verdünnter cDNA aus der 2. Hybridisierung vermischt und mit 50 μ l Mineralöl überschichtet. Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Perkin-Elmer-PCR-System 480. Zunächst fand die Auffüllung der komplementären Adaptorsequenzen am 3'-Ende statt. Hierzu wurden die Proben 5 min bei 75° C inkubiert. Insgesamt wurden 30 PCR-Zyklen durchgeführt, wobei die Proben 30 sek bei 94° C denaturiert wurden. Nach einer Annealing-Reaktion bei 66° C für 30 sek wurden die Proben 90 sek bei 72° C inkubiert. Nach 27 und 30 Zyklen wurden jeweils 8 μ l des PCR-Produkts für die gelelektrophoretische Kontrolle separiert und 3 μ l für die zweite PCR-Amplifikation im Verhältnis 1 : 10 mit sterilem Wasser verdünnt.

Für die zweite PCR-Amplifikation wurden 1 μ l der verdünnten PCR-Probe (27 Zyklen) und 24 μ l Master-Mix eingesetzt. Der Master-Mix wurde wie in der ersten PCR-Reaktion hergestellt, enthielt jedoch 1 μ l (10 μ M) Nested-Primer 1 und Nested-Primer 2. Die Nested-PCR umfasste 12 PCR-Zyklen und erfolgte unter folgenden Parametern: Nach einer Denaturierung für 30 sek bei 94° C und einem 30 sek dauernden Annealing bei 66° C, erfolgte die Elongationsreaktion für 1,5 min bei 72° C. Nach 10 und 12 Zyklen wurden jeweils 8 μ l der PCR-Produkte entnommen und in einem 2%igen Agarose-Ethidiumbromid-Gel überprüft.

3.5 Klonierung der subtrahierten cDNAs

3.5.1 Adenylierung und Reinigung der cDNAs

Da die PCR-Produkte bisher ausschließlich mit Klen-Taq-Polymerase amplifiziert worden waren, erfolgte eine Adenylierung mit Taq-Polymerase, um die Insertion der PCR-Produkte in einen pCP[®] II-Vektor mit „überhängenden“ T-Enden zu ermöglichen. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente mit Phenol extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in 20 μ l TE-Puffer resuspendiert.

3.5.2 Vorbereitung der Agar-Platten

X-Gal: 6 mg X-Gal wurden in 120 μ l Dimethyl-Formamid aufgelöst

LB-Agar: 2,5 g bacto-trypton, 1,7 g bacto-Yeast, 2,5 g NaCl, 3,5 g bacto-agar,
50 μ g/ml Ampicillin

Die Petrischalen wurden mit 25 ml LB-Agar beschichtet, über Nacht bei 37° C inkubiert und 48 Stunden auf Sterilität geprüft. Vor der weiteren Benutzung wurden auf die Platten 35 μ l X-Gal und 50 μ l Ampicillin, in einer Konzentration von 50 μ g/ml, aufgetragen und bei 37° C für 30 min inkubiert.

3.5.3 Ligation und Transformation der cDNAs

LB-Medium: 15 g bacto-trypton, 10 g bacto-Yeast und 10 g NaCl in 1,5 l H₂O

SOC-Medium: 2 % bacto-trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 mM NaCl, 2,5 mM KCl,
10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose

Die in 20 µl TE-Puffer resuspendierten cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) in Plasmide (pCP[®]II-Vektor) ligiert und in kompetente *E.-coli*-Top10-Zellen transformiert. Ein lacZ-Operon gab durch eine Blau-Weiß-Färbung der Kolonien Aufschluss über die positive Klonierung. Positive Kolonien waren weiß, weil sie durch Einbau des Inserts in das lacZ-Operon die Fähigkeit zur Farbentwicklung verloren hatten. Für die Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1 : 2 gewählt. Folgende Komponenten wurden für den Ligationsansatz gemischt:

PCR-Produkt (25 ng/µl)	4 µl
10x Ligations-Puffer	1 µl
PCR-Vektor (25 ng/µl)	2 µl
H ₂ O	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl

Endvolumen 10 µl

Die Ligation erfolgte bei 14° C über Nacht.

Nachfolgend wurde direkt die Transformation durchgeführt. Um die rekombinierten Plasmide in *E.-coli*-Zellen zu befördern, musste die Bakterienmembran durchlässig gemacht werden. Hierzu wurde für jede Ligation 50 µl Bakteriensuspension aufgetaut und mit 2 µl 0,5 mM β-Mercaptoethanol vorsichtig gemischt. Zu den so vorbereiteten, kompetenten Bakterienzellen wurde 2 µl Ligationsansatz für die Transformationsreaktion zugegeben und die Probe 30 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde für 30 sek im 42°-C-Wasserbad hitzegeschockt und für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 250 µl SOC-Nährmedium angereichert und im Schüttelinkubator bei 37° C für eine Stunde bei 225 rpm inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann auf die LB/X-Gal/ampicillinhaltige Platte mit einem Drygalski-Spatel ausplattiert. Die Platte wurde für 18 Stunden bei 37° C und danach 4 Stunden bei 4° C inkubiert, um eine optimale Farbentwicklung zu gewährleisten.

Die weißen Kolonien wurden in 100 µl LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin auf eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte überführt und über Nacht bei 37° C im Schüttelinkubator für die Plasmidpräparation angezüchtet.

3.5.4 Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation wurde die Methode nach Sambrook et al., 1989, angewandt und 5 ml Bakterien einer Übernachtskultur präpariert.

Übernachtskultur: 5 ml LB-Medium und 50 µg Ampicillin wurden mit 5 µl Bakterien beimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt.

Folgende Puffer wurden eingesetzt:

Puffer A:	2 ml 0,5 M Glukose (Endkonzentration 0,05 M), 2 ml 0,1 M EDTA (Endkonzentration 0,01 M), 1 ml 1 M Tris-Cl, pH 8 (Endkonzentration 0,05 M), 15 ml H ₂ O
Puffer B:	2,5 ml: 500 µl 1 M NaOH, 125 µl SDS 20 %, 1875 µl H ₂ O
Puffer C:	6,15 g 82,03 M Na-Acetat (Trihydrat), 7 ml Eisessig, 9,75 ml H ₂ O
TE-Puffer:	10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 15 mM NaCl

Die Übernachtskultur wurde für 20 min bei 10 000 g zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Puffer A vollständig resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl SDS-haltigen Puffer (Puffer B) erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Neutralisierungspuffer (Puffer C) gestoppt. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Proteine, SDS, chromosomale DNA und weitere Zelltrümmer durch 20-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm sedimentiert.

Der Überstand wurde für 30 min bei 37° C mit 25 µl RNase (10 mg Ribonuklease A/ml TE-Puffer) inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA mit einem Volumen Phenol/Chloroform 5 min bei RT extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation wurde der Überstand separiert und mit zwei Volumen Ethanol bei -70° C gefällt. Der Überstand wurde nach 10 min Zentrifugation verworfen. Das Pellet wurde zunächst luftgetrocknet und anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen.

3.5.5 PCR-Kontrolle der Klonierung

Um festzustellen, ob die klonierten Plasmide tatsächlich ein Insert aufweisen, und um einen Überblick über deren Größe zu erhalten, wurde für jede Plasmid-DNA eine Nested-PCR durchgeführt. Die PCR erfolgte unter Verwendung von 1 µl (0,1 ng) Plasmid-DNA, 1 µl (10 µM) Nested-Primer 1 und Nested-Primer 2. Die Nested-PCR umfasste 30 PCR-Zyklen und fand unter folgenden Parametern statt: Nach der Denaturierung für 30 sek bei 94° C und 30 sek Annealing bei 68° C erfolgte die Elongationsreaktion für 1,5 min bei 72° C. Die Analyse der PCR-Produkte

wurde in einem 2%igen Ethidiumbromid-Gel durchgeführt. Zur Abschätzung der Größe der Inserts wurde der *Phi-x-HaeIII-Marker* eingesetzt.

3.6 Bereitstellung der Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Um die gewünschte Ausgangskonzentration zu erzielen, wurde die Plasmid-DNA gefällt. Je 50 µl Plasmid-DNA wurden mit 20 µl 5 M Ammoniumacetat (NH₄Ac), pH 6,7–7,5, und 175 µl 100%igem Ethanol gut gemischt, 5 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4° C und 12 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das gereinigte Pellet zunächst luftgetrocknet und anschließend in 10 µl H₂O aufgenommen. Die Sequenzierung wurde in Auftrag gegeben. Die ermittelten Sequenzen wurden über die Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) unter Verwendung des BLASTSearch-Programmes ausgewertet.

3.7 Northern-Blot-Analyse

3.7.1 RNA-Elektrophorese

Proben-Puffer: 500 µl Formamid, 10 mg Bromphenolblau, 2 µl 1 M EDTA, pH 8,
4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

RNA-Laufpuffer: 1x MOPS

Jeweils 10 µg Gesamt-RNA von sieben verschiedenen RNA-Populationen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde 10 min bei 65° C inkubiert, in 10 µl RNA-Laufpuffer aufgenommen, weitere 2 min bei 65° C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gelagert. Die Agarose (0,9 %) wurde in 1x MOPS-Puffer (25x MOPS: 1 M MOPS, pH 7, 250 mM NaAc, 25 mM EDTA) aufgeköcht, auf 55° C abgekühlt und nach Zugabe des Formaldehyds (Endkonzentration: 9 %) auf den Gelträger gegossen. Die RNA-Proben wurden auf das ausgekühlte Gel aufgetragen und bei 60–80 Volt innerhalb von 45–60 min aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel unter dem UV-Transilluminator fotodokumentiert und zweimal für 20 min in Aqua bidest. gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen.

3.7.2 Northern-Blotting

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde die RNA durch sogenanntes „Kapillarblotting“ auf eine Nylonmembran (Hybond™-N, Porengröße 0,45 µm, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) übertragen. Als Transferpuffer diente eine 20x-Standard-

Salz-Citrat-Lösung (SSC = 3 M NaCl, 0,3 M Tri-NaCitrat, pH 7), die den Transfer der RNA aus dem Gel auf die Nylonmembran fördert. Zunächst wurde eine Kapillarbrücke hergestellt. Über eine mit 20x SSC gefüllte Glasschale wurde quer eine Glasplatte als Träger der Blotapparatur platziert. Ein mit 20x SSC getränktes Filterpapier (Whatmanpapier) wurde so auf die Glasplatte gelegt, dass beide Enden im Transferpuffer eintauchten. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gebettet und mit einer mit 10x SSC angefeuchteten Nylonmembran und zwei 10x SSC-getränkten Filterpapieren luftblasenfrei bedeckt. Danach wurde ein Stapel trockenes, saugfähiges Papier auf die bisherigen Schichten gesetzt und der Blotaufbau mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht. Unter UV-Licht wurde die Effizienz des Transfers kontrolliert, die 18S- und 28S-Banden der RNA auf der Nylonmembran markiert und fotodokumentiert. Durch 3-minütige UV-Fixierung bei 125 mJoule wurde die RNA an die Nylonmembran kovalent gebunden („Cross-Linking“). Nach kurzem Waschen in 2x SSC wurde die Membran luftgetrocknet und in PVC-Folie eingeschweißt. Der fertige Blot wurde bis zur weiteren Verwendung bei -4° C gelagert.

3.7.3 Herstellung der Gensonden

Als Sonden für die radioaktive Hybridisierung wurden Nested-PCR-Produkte der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Nested-PCR wurde wie unter 3.6.5 beschrieben durchgeführt. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Amplifikate in einem 2%igen Ethidiumbromid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Integrität der cDNA-Banden unter UV-Licht geprüft.

3.7.4 Extraktion der Gensonden aus dem Agarosegel und Reinigung

Für die cDNA-Extraktion aus dem Agarosegel wurde nach dem Protokoll des QIAquick PCR Purification Kits von QIAGEN verfahren. Das Prinzip der DNA-Extraktion und die Reinigung basieren auf der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an eine Silica-Membran in einem hochmolaren Salzpuffer. Die Bindungen können zur Eluierung der Nukleinsäuren durch Wasser wieder aufgelöst werden.

Zunächst wurden die cDNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgelöst, in einem 1,5-ml-*Tube* separiert und mit 5 Volumen Bindungspuffer gut vermischt. Danach wurden die Proben auf Säulen überführt, die die Silica-Membran enthalten, und 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden die Proben durch Zugabe von 0,75 ml Waschpuffer und Zentrifugation gereinigt. Der Durchfluss wurde abermals verworfen. Die aufgereinigte cDNA wurde durch Zugabe von 30 μ l H₂O und anschließender Zentrifugation eluiert.

3.7.5 Radioaktive Markierung und Hybridisierung der Gensonden

Waschlösung I: 2x SSC/0,1 % SDS

Waschlösung II: 0,1x SSC/0,1 % SDS

Der Nachweis spezifischer RNA-Transkripte auf den Blots erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde. Zunächst wurden die Blots in H₂O bidest. gewaschen und bei 58° C für 45 min mit Prähybridisierungs-Puffer (ExpressHyb) von Clontech im Hybridisierungssofen inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die radioaktive Markierung der aufgereinigten PCR-Produkte durchgeführt.

Entsprechend den Herstellerangaben des Megaprime-Kits (Amersham, Braunschweig) wurde zunächst 25 ng der jeweiligen Gensonde mit 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5) auf ein Gesamtvolumen von 28 µl verdünnt. Anschließend erfolgte der Einbau radioaktiver Nukleotide ([α -³²P]dCTPs) mit dem Klenow-Fragment der cDNA-Polymerase I in einer Zweitstrang-synthese. Die radioaktiven Sonden wurden mit einem Kit von QIAGEN (QIAquick Nucleotide Removal) gereinigt, in 100 µl Elution Buffer aufgefangen, 5 min bei 95° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Prähybridisierungslösung überführt. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 58° C statt. Anschließend wurden die Filter bei 58° C zweimal 15 min lang mit Waschlösung I und, je nach Stärke der Radioaktivität, 15–45 min lang mit Waschlösung II gewaschen und in eine Folie eingeschweißt.

Für die Auswertung der Hybridisierung wurden die Blot-Signale im Phosphorimager dokumentiert. Anschließend wurden die Blots zwischen 8 Stunden und 7 Tagen in einer Filmkassette mit einem Film (Hyperfilm-MP, Amersham, Braunschweig) bei –80° C exponiert. Zur weiteren Analyse der Hybridisierungsmuster wurden die Filter 15 min lang mit Waschlösung II bei 100° C gewaschen und mit G₃PDH, einem Housekeeping-Gen, rehybridisiert.

3.7.6 Auswertung der Northern Blots

Mittels des Programms Molecular Analyst von (BioRad, München) wurden die Signale densitometrisch ausgewertet. Je nach vorgefundener Signalstärke wurden entweder die Filme der Northern Blots oder die Fotodensitometerbilder abgeglichen. Jedes Signal wurde in einem gleich großen Feld für die spezifischen Gensonden und den zugehörigen G₃PDH-Sonden bestimmt. Nach Abzug der Leerwerte wurden die Werte der spezifischen Gensonden durch die Werte der G₃PDH-Sonden dividiert, um eine ungleiche RNA-Menge auszugleichen. Damit die Änderung der Signale besser abgeschätzt werden konnte, wurden diese auf einen neutralen Ausgangswert bezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH)

Eine differentielle, PTHrP-induzierte Genexpression auf der Ebene der Translation wurde bereits von Bunge 1997 nachgewiesen. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, Gene zu selektieren, die durch PTHrP auf der Ebene der Transkription reguliert werden.

Hierzu wurde eine Zelllinie eingesetzt, von der bekannt war, dass sie sowohl PTHrP als auch den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) koexprimiert und autokrin durch PTHrP reguliert wird (Bunge 1997).

Zur Untersuchung der transkriptionellen Genregulation wurde die subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH) (Diachenko et al. 1996) eingesetzt. Die SSH-Technik ermöglicht die Selektion differentiell exprimierter Gene durch Hybridisierung zweier cDNA-Subpopulationen (*Tester* und *Driver*).

Um nur diejenigen Gene zu selektieren, die durch PTHrP (1–34) differentiell hochreguliert werden, wurden die Zellen zur Isolation der *Tester*-cDNAs für zwei Stunden mit dem Rezeptoragonisten PTHrP (1–34) und die Zellen für die Isolation der *Driver*-cDNA-Bibliothek für zwei Stunden mit dem Rezeptorantagonisten PTHrP (7–34) wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt.

Die Inkubation mit dem Rezeptoragonisten PTHrP (1–34) stimulierte die Expression potenziell PTHrP-abhängig regulierter Gene. Um auch diejenigen Gene zu erfassen, die durch die zelleigene PTHrP-Sekretion bereits ohne externe PTHrP-Zugabe maximal reguliert waren, wurde die mRNA der Vergleichs-cDNA-Bibliothek aus Zellen isoliert, die mit dem Rezeptorantagonisten PTHrP (7–34) vorbehandelt worden waren. So wurde die autokrine Schleife unterbrochen und auch die Wirkung der endogenen PTHrP-Produktion unterbunden.

Im Anschluss daran wurden mit der subtraktiven Suppressionshybridisierung die in der *Tester*-cDNA-Bibliothek aufregulierten Gene durch PCR selektiert und amplifiziert. Die Gene wurden anschließend in Plasmide eingebracht, kloniert und deren tatsächliche differentielle Expression in Northern-Blot-Untersuchungen überprüft und mittels Sequenzierung identifiziert.

4.2 Kontrolluntersuchungen

4.2.1 Kontrolle der Gesamt-RNA und der Poly-A⁺-mRNA für die SSH-Technik

Um Zufallseffekte auszuschließen, erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA für die *Tester*- und die *Driver*-cDNAs jeweils aus sechs Kulturflaschen. Zur Überprüfung der Integrität der Gesamt-RNA und der Poly-A⁺-mRNA wurden die Proben auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetragen (Abb. 3, 4 und 5). Die Integrität der Gesamt-RNA ist erkennbar an den typischen Banden der 28S- und 18S-Fraktion, die der ribosomalen RNA (rRNA) entsprechen. Gemäß der Größe der verschiedenen mRNAs wiesen die Bahnen nach der mRNA-Isolation eine mRNA-Population mit einer Maximallänge von mehreren Kilobasen (kb) auf, die schwach erkennbare Banden in Höhe der 28S- und 18S-Fraktion als Restkontamination durch die rRNA beinhalteten.

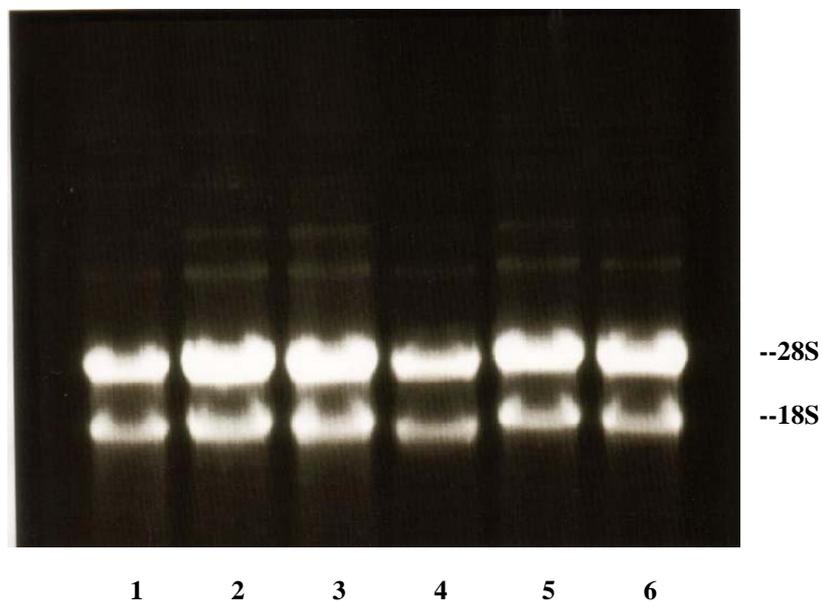


Abb. 3: Kontrolle der Gesamt-RNA-Isolation der *Tester*-cDNAs. 2%iges denaturierendes Agarosegel, 1–6: Gesamt-RNA aus 6 verschiedenen Kulturansätzen, bevor diese vereint wurden.

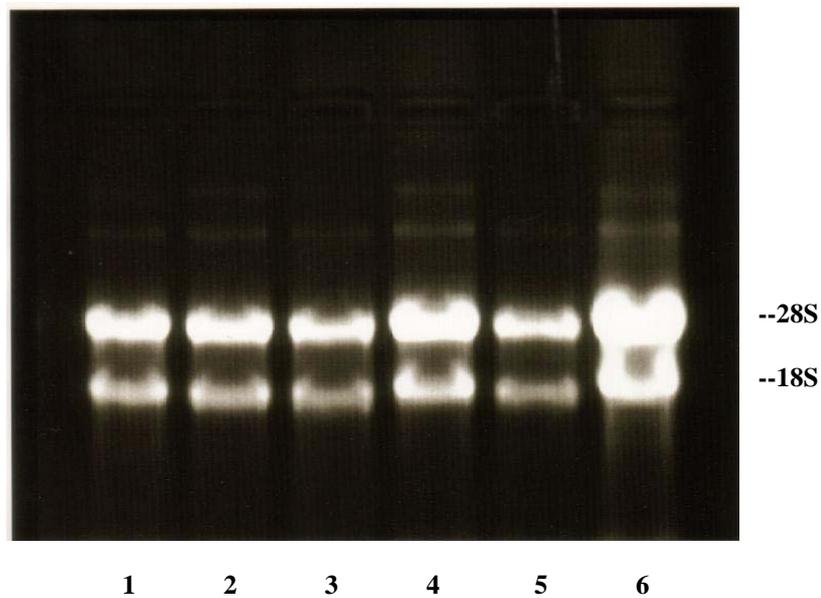


Abb. 4: Kontrolle der Gesamt-RNA-Isolation der *Driver*-cDNAs. 2%iges denaturierendes Agarosegel, 1–6: Gesamt-RNA aus 6 verschiedenen Kulturansätzen, bevor diese vereint wurden.

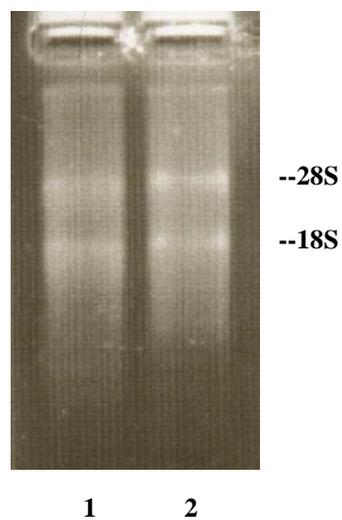


Abb. 5: Kontrolle der Poly-A⁺-RNA-Isolation der *Tester*- und *Driver*-cDNAs nach Vereinigung der Gesamt-RNA-Isolation aus 6 verschiedenen Kulturansätzen. 2%iges denaturierendes Agarosegel, 1: mRNA der *Tester*-cDNAs, 2: mRNA der *Driver*-cDNAs.

4.2.2 Kontrolle des RsaI-Verdau der *Tester*- und *Driver*-cDNAs

Nach der cDNA-Synthese aus der Poly-A⁺-RNA wurden *Tester*- und *Driver*-cDNAs getrennt voneinander mit dem Restriktionsenzym RsaI verdaut. RsaI erkennt und schneidet eine Sequenz von 4 Nukleotiden (GTAC), sodass kurze doppelsträngige cDNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) ohne überstehende Einzelnukleotide resultieren.

Laut der Versuchsanleitung von PCR-Select beträgt die durchschnittliche doppelsträngige cDNA-Größe vor dem RsaI-Verdau 0,5–10 kb und nach dem RsaI-Verdau 0,1–2 kb. In der Kontrolle zeigten sich erwartungsgemäß in beiden unverdauten cDNA-Bibliotheken Fragmentlängen größer ~0,5 kb und in den beiden RsaI-verdauten cDNA-Bibliotheken überwiegend Fragmentlängen unter ~0,5 kb (s. Abb. 6). Laut der Versuchsanleitung von PCR-Select repräsentiert dies auf dieser Stufe ein wesentliches Kriterium für die Qualität des RsaI-Verdau.

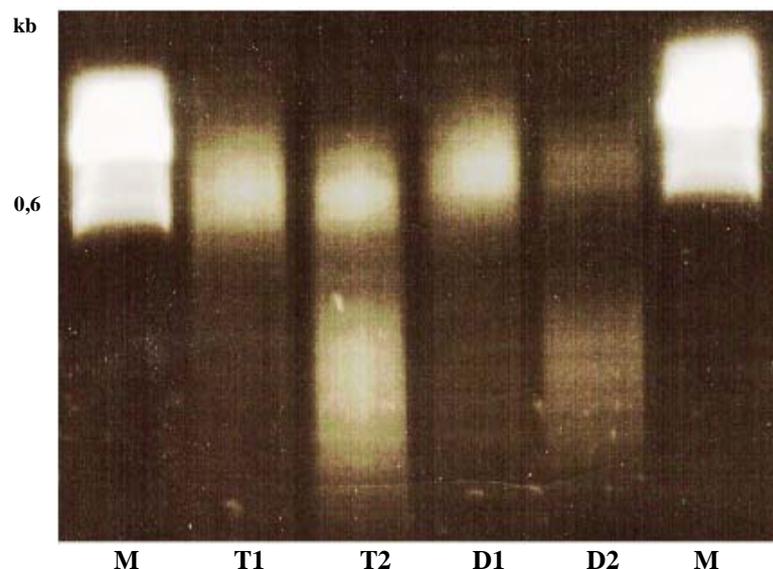


Abb. 6: RsaI-Verdau der *Tester*- und *Driver*-cDNAs. M: *PhiX174/HaeIII*, T1: unverdaute *Tester*-cDNAs, T2: verdaute *Tester*-cDNAs, D1: unverdaute *Driver*-cDNAs, D2: verdaute *Driver*-cDNAs. Nach dem RsaI-Verdau sind sowohl in der *Tester*-Population als auch in der *Driver*-Population Fragmente unter 0,5 kb zu erkennen, die für einen suffizienten Restriktionsverdau der cDNA-Bibliotheken sprechen.

4.2.3 Kontrolle der Adaptorligation

Für die Kontrolle der Adaptorligation wurde die *Tester*-cDNA (*Tester*-1-1-Adaptor 1 und *Tester*-1-2-Adaptor 2) in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde mit dem Primer-Paar (PCR-Primer 1 oder 2/ G_3PDH-3'), die die G_3PDH -Adaptor-Verbindung überspannen amplifiziert, die andere Fraktion mit zwei spezifischen Primern (G_3PDH-3' und G_3PDH-5') amplifiziert (s. Tab. 1).

Die Ligation der Adaptoren gilt laut der Versuchsanleitung von PCR-Select als effizient, wenn die Intensität der Banden mit einem spezifischen Primer (G_3PDH-3') den Faktor 4 im Vergleich zur Benutzung von zwei spezifischen Primern (G_3PDH-3' und G_3PDH-5') nicht unterschreitet. Zur Abschätzung der Effizienz der Adaptorligation diente ein Beispielbild aus der Versuchsanleitung von PCR-Select. Das Ergebnis der Adaptorligation erwies sich als effizient, da die Intensitäten der einzelnen Banden in beiden Abbildungen vergleichbar waren.

Die Fragmentgröße von 1,2 kb der adaptorligierten G_3PDH-3' -Amplifikate weist darauf hin, dass es sich bei der hier eingesetzten Zelllinie um eine Nagetierzelllinie handelt (s. Abb. 7).

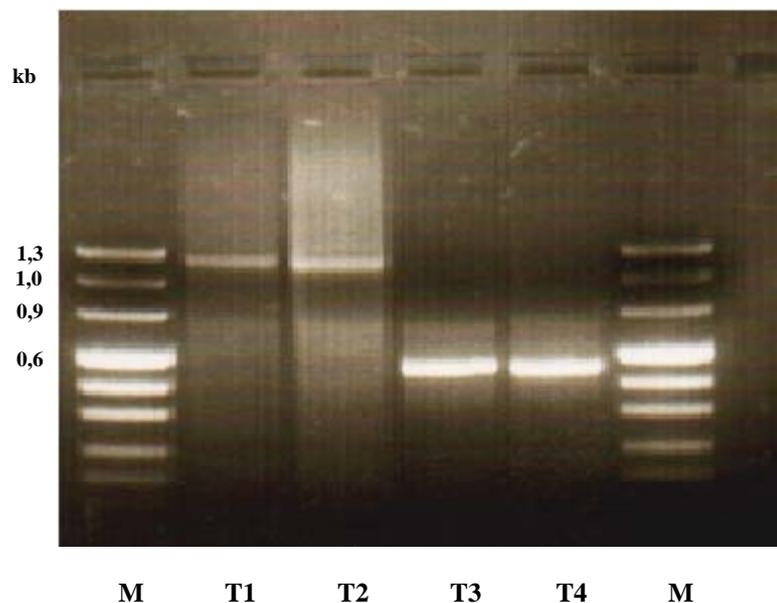


Abb. 7: PCR-Kontrolle der Adaptorligation der *Tester*-1-1-Adaptor 1 und *Tester* 1-2-Adaptor 2 mit einem spezifischen Primer (G_3PDH-3') und mit zwei spezifischen Primern (G_3PDH-3' und G_3PDH-5'). M: *PhiX174/HaeIII*-Marker, T1: *Tester* 1-1 mit Adaptor 1 und T2: *Tester* 1-2 mit Adaptor 2, Amplifikation mit einem spezifischen Primer (G_3PDH-3'), T3: *Tester* 1-1 mit Adaptor 1 und T4: *Tester* 1-2 mit Adaptor 2, Amplifikation mit zwei spezifischen Primern (G_3PDH-3' und G_3PDH-5').

Tab. 1: Übersicht der Primerwahl für die PCR-Kontrolle der adaptorligierten *Tester*-Populationen. *Tester* 1-1 und 1-2 mit Adaptor 1 oder 2 (T1–4), die mit einem spezifischen Primer (G₃PDH-3') und mit zwei spezifischen Primern (G₃PDH3' und G₃PDH5') amplifiziert wurden.

T1: <i>Tester</i> 1-1	Adaptor 1	PCR-Primer 1/G ₃ PDH-3'-Primer
T2: <i>Tester</i> 1-2	Adaptor 2	PCR-Primer 2/G ₃ PDH-3'-Primer
T3: <i>Tester</i> 1-1	Adaptor 1	G ₃ PDH3'-Primer/G ₃ PDH-5'-Primer
T4: <i>Tester</i> 1-2	Adaptor 2	G ₃ PDH3'-Primer/G ₃ PDH-5'-Primer

4.2.4 Kontrolle der PCR-Amplifikation I und II

Zur exponentiellen PCR-Amplifikation der potenziell differentiell exprimierten Fragmente wurden zwei PCR-Amplifikationen mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. In der ersten Amplifikation wurden unter Verwendung der PCR-Primer 1 und 2 die komplementären äußeren Adaptorsequenzen am 3'-Ende aufgefüllt, sodass nur die ds-cDNAs mit verschiedenen Adaptoren an beiden Enden amplifiziert wurden. Die zweite PCR-Amplifikation wurde als geschachtelte PCR (Nested-PCR) durchgeführt, um gezielt nur die potenziell differentiell exprimierten Sequenzen zu amplifizieren. Beide Amplifikationen wurden durch eine im PCR-Select™-Kit enthaltene Kontroll-cDNA-Bibliothek überprüft.

Laut Herstellerinformation des PCR-Select™-Kits sollte die Anzahl der PCR-Zyklen danach bemessen werden, ab wann man in der PTHrP-abhängigen cDNA-Bibliothek ein ähnliches Bandenmuster wie in der Kontroll-cDNA-Bibliothek sieht. Für die erste PCR wurde eine Zykluszahl von 27 oder 30 und für die zweite PCR von 10 oder 12 empfohlen.

In der ersten PCR war nach 27 Zyklen sowohl in der PTHrP-abhängigen als auch in der Kontroll-cDNA-Bibliothek kein Bandenmuster erkennbar. Erst nach 30 Zyklen zeigten sich in beiden Bibliotheken vergleichbare Bandenmuster, weshalb für die zweite PCR (Nested-PCR) der Ansatz nach 30 Zyklen verwandt wurde (s. Abb. 8). In der zweiten PCR waren weitere 12 PCR-Zyklen mit den geschachtelten Primern (Nested-Primer 1 und Nested-Primer 2) notwendig, bis sich in der PTHrP-abhängigen cDNA-Bibliothek ein ähnliches Bandenmuster ergab wie in der Kontroll-cDNA-Bibliothek aus dem PCR-Select™-Kit (s. Abb. 9). Somit ließ sich die SSH-Technik bis zu diesem Schritt erfolgreich durchführen.

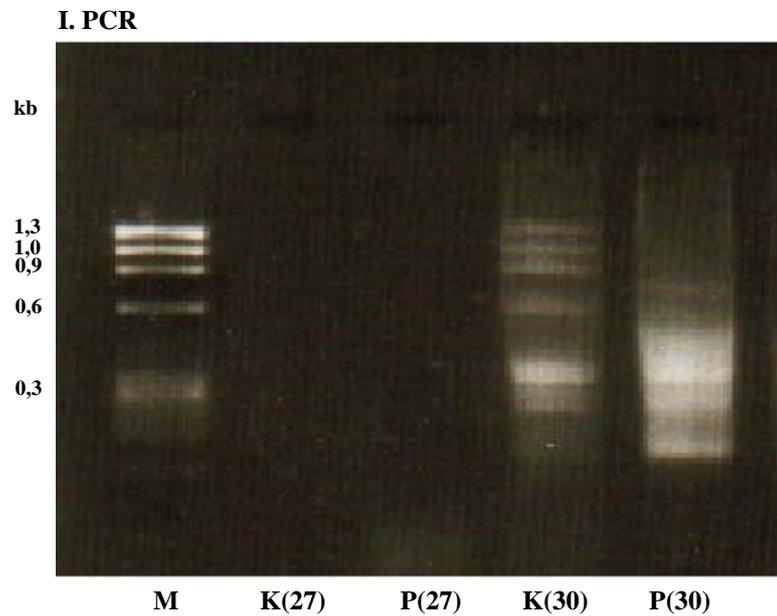


Abb. 8: Kontrolle der I. PCR-Amplifikation mit dem PCR-Primer 1. M: *PhiX174/HaeIII*-Marker, K (27) und K (30): Amplifikationsergebnisse der Kontroll-cDNA-Bibliothek aus dem PCR-Select™-Kit nach 27 und 30 PCR-Zyklen. P(27) und (P30): Amplifikationsergebnisse der PTHrP-abhängigen cDNA-Bibliothek nach 27 und 30 PCR-Zyklen.

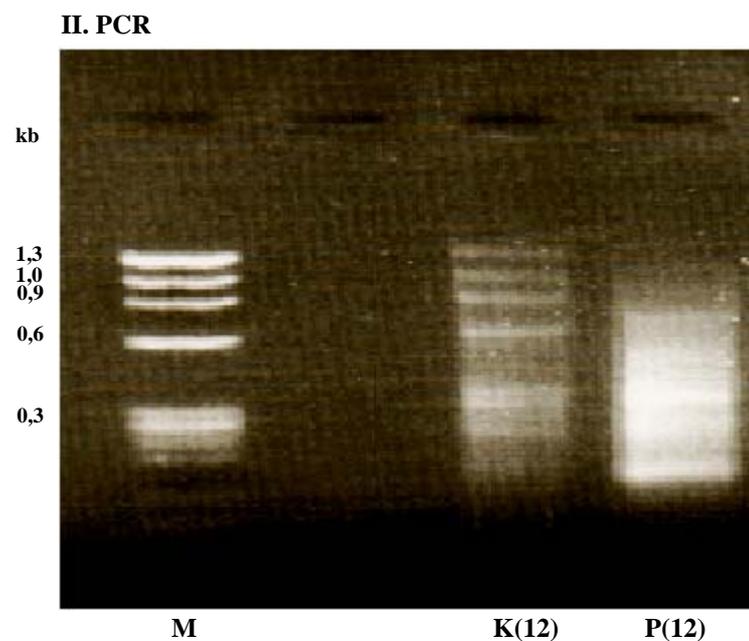


Abb. 9: Kontrolle der II. PCR-Amplifikation mit Nested-Primern. M: *PhiX174/HaeIII*-Marker, K (12) zeigt die Amplifikationsergebnisse der Kontroll-cDNA-Bibliothek aus dem PCR-Select™-Kit nach 12 PCR-Zyklen. P (12): Amplifikationsergebnisse der PTHrP-abhängigen cDNA-Bibliothek nach 12 PCR-Zyklen.

4.2.5 PCR-Kontrolle der Klonierung

Die Amplifikate der PTHrP-abhängigen cDNA-Bibliothek wurden in Plasmide (pCP[®]II-Vektor) ligiert und in kompetente *E.-coli*-Bakterien transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Selektivnährboden, der das Antibiotikum Ampicillin enthielt, ausplattiert und bei 37° C inkubiert. Das Ampicillin bewirkt, dass nur transformierte Bakterienkolonien heranwachsen, weil nur sie die plasmidkodierte Ampicillinresistenz ausprägen.

Um nun Klone mit Insert von solchen ohne Insert unterscheiden zu können, bedient man sich der Blau-Weiß-Selektion. Das Prinzip der Blau-Weiß-Selektion beruht auf der sogenannten Komplementation der β -Galactosidase, die auf Medien mit einem chromogenen Substrat (X-Gal = 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid) eine Blaufärbung der Bakterienkolonien bewirkt, die kein Insert beinhalten. Sowohl die Plasmide als auch die Wirtsbakterien kodieren inaktive DNA-Regionen der β -Galactosidase. Die Plasmide enthalten die für das α -Peptid kodierende DNA-Region (*lacZ'*) der β -Galactosidase und die Wirtsbakterien eine verkürzte Form der β -Galactosidase (kodiert als LacZ-Gen mit Deletion M15). Durch Einbringen der Plasmide in Bakterien kann eine intakte α -Peptid-kodierende DNA-Region mit der verkürzten Form der β -Galactosidase im Wirtsbakterium zu einer biologisch aktiven Form der β -Galactosidase reassoziieren (α -Komplementation). Die β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol. Durch Luftsauerstoff oxidiert das 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol zu einem tief blauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo). Wird nun die α -Peptid-kodierende DNA-Region der Plasmide durch eine Insertligation unterbrochen, so geht die Fähigkeit zur Komplementation und folglich die enzymatische Aktivität der β -Galactosidase verloren. Bakterienkolonien mit Insert bleiben daher weiß und können selektiert werden.

Von insgesamt 88 auswertbaren Bakterienkolonien waren 82 weiß und nur 6 blau eingefärbt, was auf eine hohe Effektivität der Insertligation hinwies. In dieser Arbeit wurden alle 82 positiven Kolonien gepickt und mit Hilfe einer Minipräpkultur in 5 ml LB-Medium kultiviert. Für die weiteren Analysen, und um die Größe der Inserts zu kontrollieren, wurde für jedes isolierte Plasmid eine Nested-PCR durchgeführt und die Amplifikate in einem 2%igem Agarosegel überprüft. Unter den cDNA-Amplifikaten befanden sich sowohl Klone, die Plasmide mit nur einem Insert beinhalteten, als auch solche Klone, in denen sich kein Insert nachweisen ließ. Schließlich fanden sich nach der Plasmidpräparation auch Plasmidisolate, in denen offensichtlich mehrere Inserts enthalten waren. In Abbildung 10 und 11 sind jeweils 6 Plasmid-Inserts beispielhaft abgebildet.

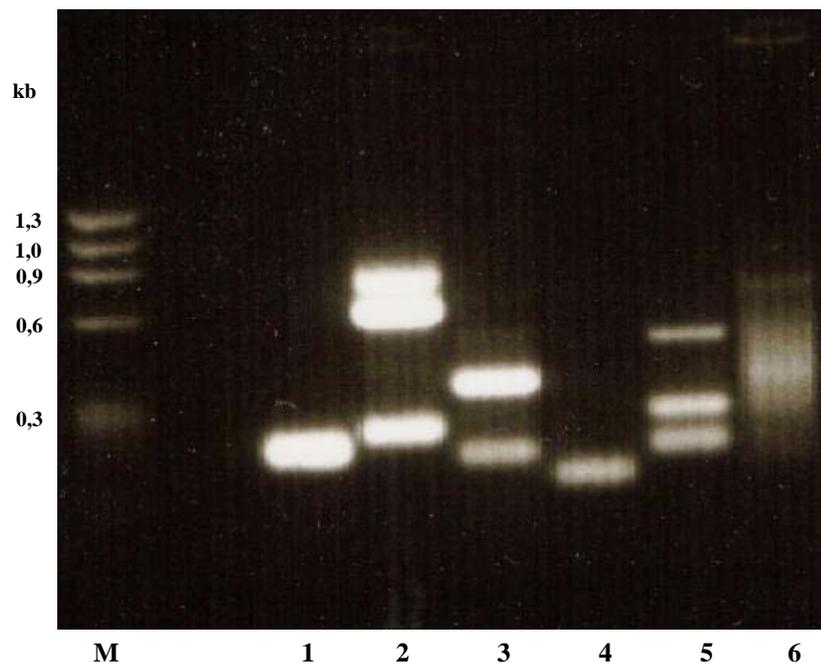


Abb. 10: PCR-Kontrolle der Klonierung. M: *PhiX174/HaeIII-Marker*, 1-6: Amplifikate der Plasmid-Inserts (1, 4: jeweils ein Amplifikat; 2, 3, 5: mehrere Amplifikate; 6: Insert nicht nachweisbar).

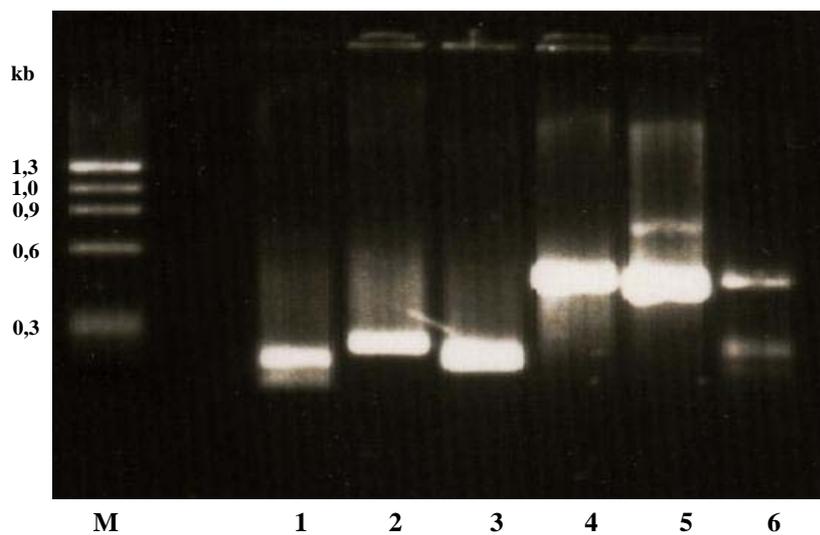


Abb. 11: PCR-Kontrolle der Klonierung. M: *PhiX174/HaeIII-Marker*, 1-6: Amplifikate der Plasmid-Inserts (1, 5, 6: mehrere Amplifikate; 2, 3, 4: jeweils ein Amplifikat).

4.3 Überprüfen der differentiellen Expression durch Northern Blot

Zur Überprüfung der differentiellen Expression wurden die Zellen mit PTHrP (1–34) in unterschiedlichen Ansätzen von 30 Minuten bis 8 Stunden behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen einer Kontrollflasche nicht behandelt und eine Zellkulturflasche mit PTHrP (7–34) für 2 Stunden inkubiert (s. Tab. 2).

Tab. 2: Reihenfolge der 7 Zellkulturen für die Northern-Blot-Analyse mit Angabe der Inkubationszeiten für PTHrP in min. (Ø) keine Inkubation mit PTHrP, (+) Inkubation mit PTHrP (1–34) oder PTHrP (7–34).

Zellkultur 1–7:	1	2	3	4	5	6	7
Inkubationszeit:	Ø	30	60	120	240	480	120
PTHrP (1–34):	Ø	+	+	+	+	+	Ø
PTHrP (7–34):	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+

Aus den 7 verschiedenen Zellkulturansätzen wurde die RNA isoliert, jeweils 10 µg in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und die Integrität unter UV-Licht überprüft. Die mRNA wurde dann auf Nitrocellulosemembranen geblotted und jeder Filter mit einer vorwärts subtrahierten (FS) und Phosphor-32-markierten cDNA-Sonde unter hochstringenten Bedingungen hybridisiert. Die Hybridisierungssignale wurden mittels Röntgenfilmen und Fotodensitometer dokumentiert.

Nach der Entfernung der Sonden von den Filtern (Strippen der Membranen) wurden die Filter mit einer radioaktiven G₃PDH-Sonde als Housekeeping-Gen rehybridisiert. Die Signale dieser Kontrollhybridisierungen dienten als Normalisierungsgrundlage.

Für die Northern-Blot-Untersuchung wurden 22 Klone ausgewählt. Hierbei konnten 2 Klone als differentiell exprimiert bestätigt werden (s. Abb. 12–19). Beide Klone wurden mit zwei unabhängigen RNA-Isolaten (Blot 1 und Blot 2), die jeweils aus 7 separat vorbehandelten Zellkulturen reproduziert wurden, hybridisiert (s. Abb. 12 und 17). Die Quantifizierung der differentiell exprimierten Signalstärken erfolgte durch autoradiografische Auswertung mit Hilfe eines Phosphorimagers.

Die zwei bestätigten Klone waren schwach differentiell exprimiert, d. h., das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den RNA-Mengen auf dem Filter lag zwischen 1,8 und 4,7 (s. Abb. 13–16 und Abb. 18–19). Nachfolgend werden die beiden differentiell exprimierten Klone dargestellt.

4.3.1 Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)

Die Gensonde mit Ähnlichkeit zum „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“, *Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1)*, mRNA mit der Identifikationsnummer (Accession-Nummer, Acc.: NM 008143.3) wies zwei mRNA-Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht unterhalb der 28S- und 18S-RNA auf. Beide mRNA-Banden zeigten in der Zeitreihe einen parallelen Anstieg der Signalstärke. Es könnte sich hier um zwei verschiedene Spleißingprodukte handeln. Die Behandlung der Zellen mit PTHrP (7–34) hatte keinen Einfluss auf die Expressionsstärke dieses Gens. Die Zielsequenz mit dem höheren Molekulargewicht wies nach Behandlung mit PTHrP (1–34) einen Anstieg um den Faktor 3,7 nach 120 Minuten beziehungsweise um den Faktor 3 nach 60 Minuten auf. Die Zielsequenz mit dem kleineren Molekulargewicht zeigte nach Behandlung mit PTHrP (1–34) im ersten Versuch eine Steigerung um den Faktor 4,2 nach 120 Minuten, während in dem Wiederholungsversuch eine Steigerung um 1,8 nach 60 Minuten gefunden wurde. Nach längerer Inkubation nahm die Expressionsstärke beider Zielsequenzen wieder ab, erreichte aber nach 8 Stunden noch nicht den Ausgangswert. Aus der Zeitreihe ist zudem ersichtlich, obwohl es sich hierbei jeweils um Einzelexperimente handelt, dass die Expressionsstärke für beide Zielsequenzen im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigt und abfällt.

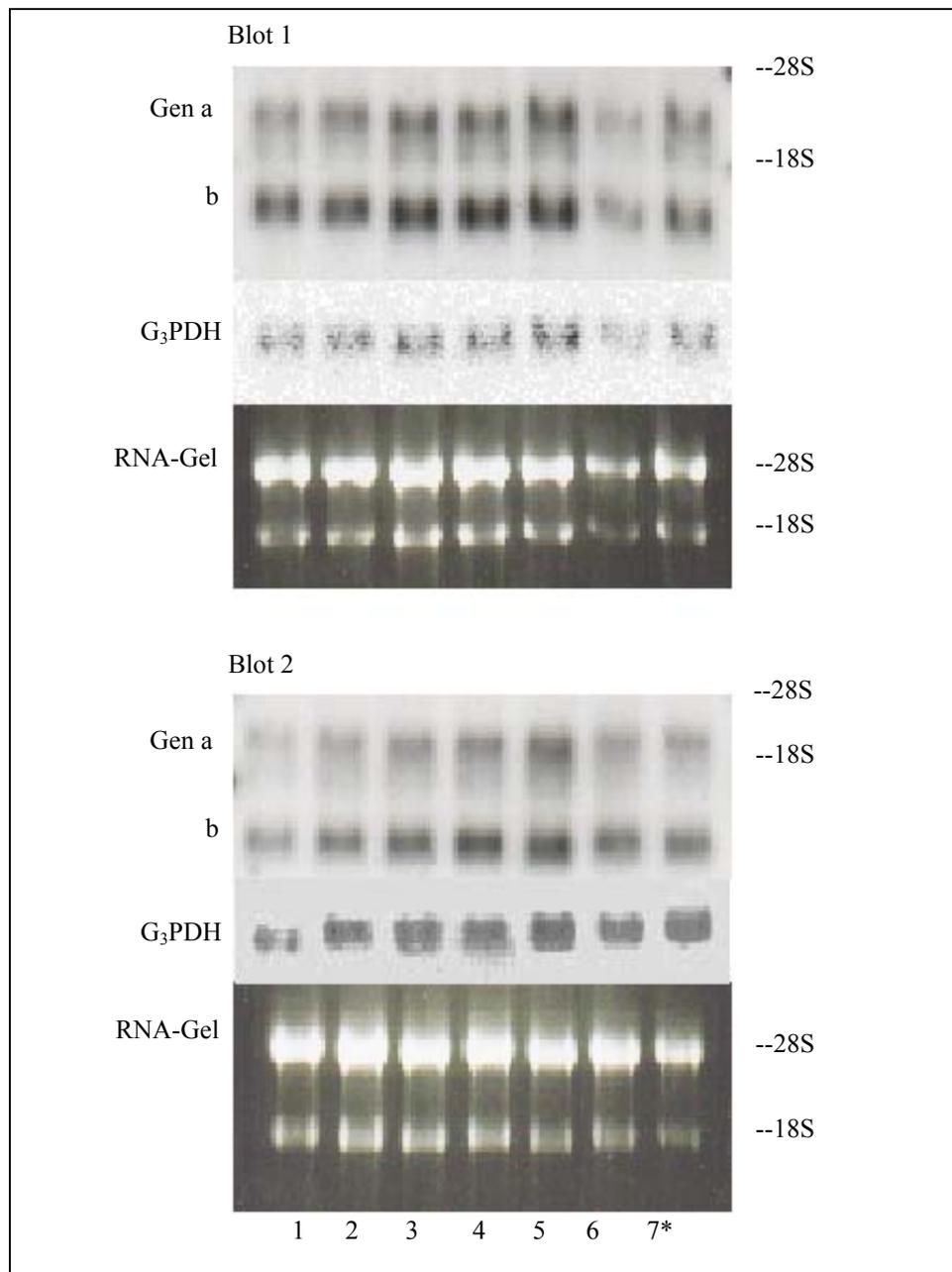


Abb. 12: Radioaktive Northern-Blot-Sonde „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“, *Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1)*, mRNA (Acc.: NM 008143.3) auf zwei verschiedenen Blots (Blot 1 und Blot 2), jeweils mit der zugehörigen G₃PDH-Sonde und dem mRNA-Gel. Die Gensonde wies zwei mRNA-Banden (a, b) unterhalb der 28S- und 18S-RNA auf. Behandlungszeiten in min mit PTHrP (1–34): 1: keine Behandlung, 2: 30, 3: 60, 4: 120, 5: 240, 6: 480, 7*: Behandlung mit PTHrP (7–34) für 120 min.

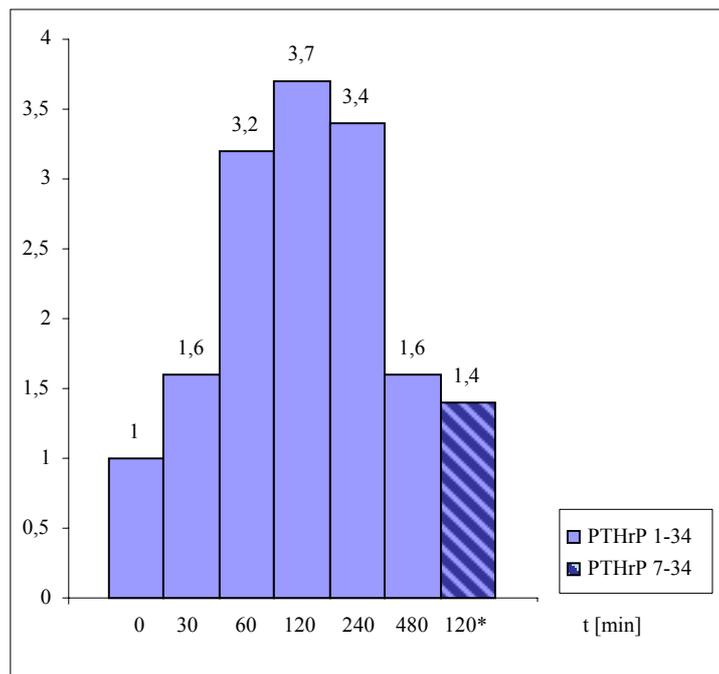


Abb. 13: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale für die Sonde mit dem größeren Molekulargewicht, für den „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“, auf Blot 1. x-Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120* Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen auf dem Filter ab.

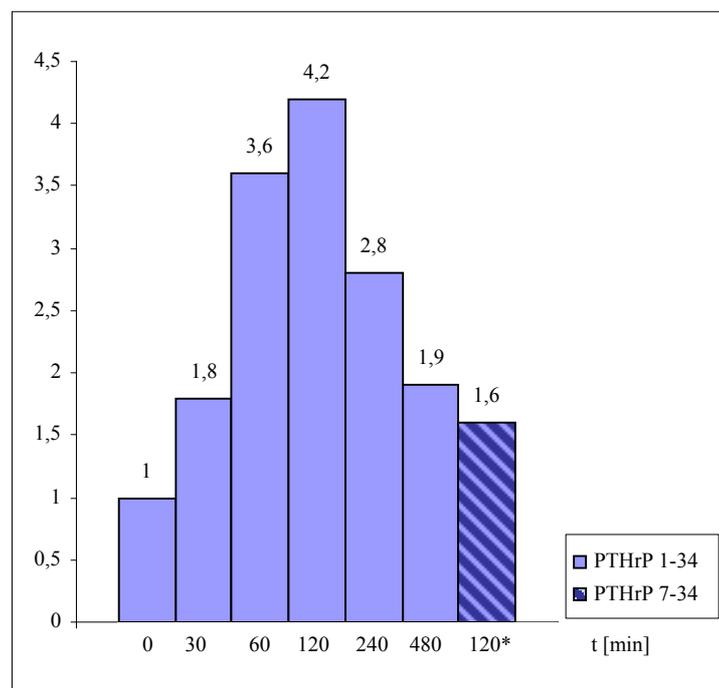


Abb. 14: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale für die Sonde mit dem kleineren Molekulargewicht, für den „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“, auf Blot 1. x-Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120* Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen auf dem Filter ab.

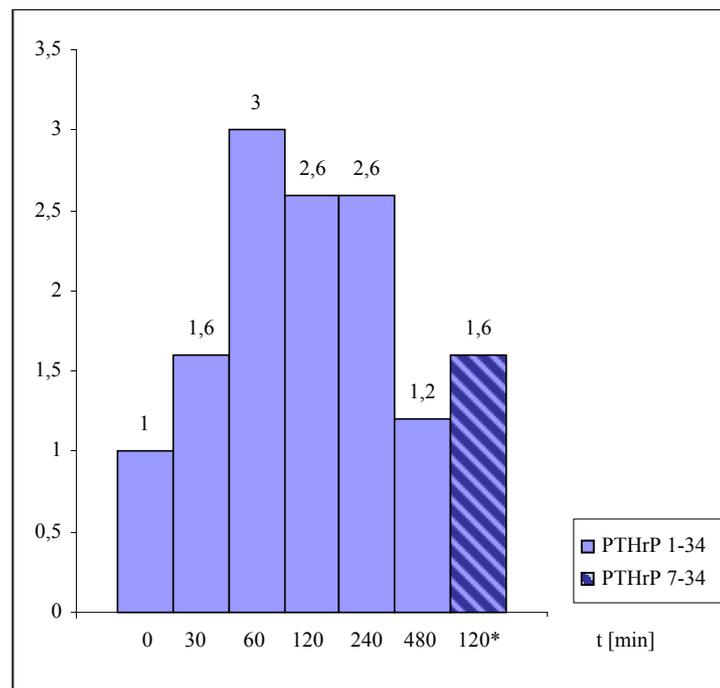


Abb. 15: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale für die Gensonde mit dem größeren Molekulargewicht für den „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“ auf Blot 2. x- Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120* Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen dem Filter ab.

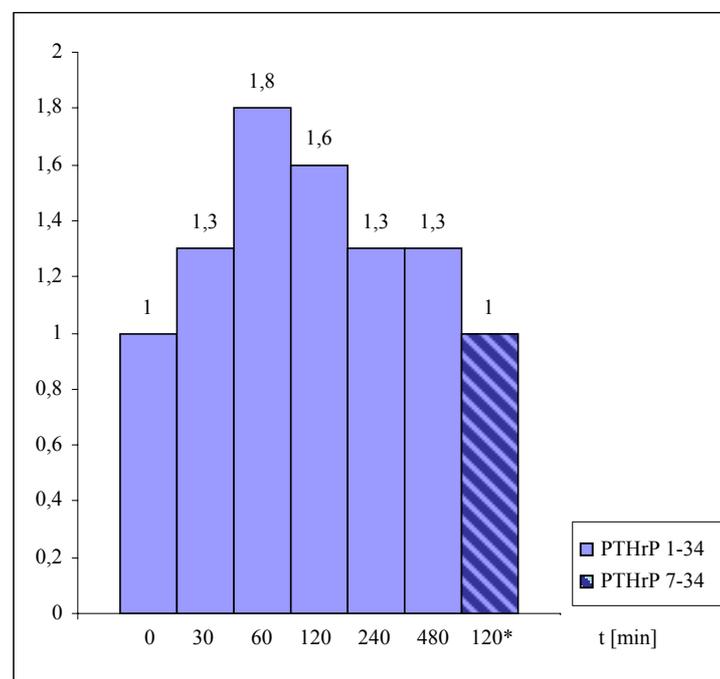


Abb. 16: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale für die Gensonde mit dem kleineren Molekulargewicht für den „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“ auf Blot 2. x-Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120*. Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen auf dem Filter ab.

4.3.2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9

Die mRNA-Signalstärken des Gens mit Ähnlichkeit zum „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“, *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA* (Acc.: NM 011665.3) waren auf zwei verschiedenen Filtern (Blot 1 und Blot 2) nach 4 Stunden Behandlung mit PTHrP (1–34) um den Faktor 4,4 und 4,7 erhöht (s. Abb. 17–18). Die Behandlung der Zellen mit PTHrP (7–34) zeigte auch hier keine signifikante Änderung der mRNA-Signalstärke gegenüber der unbehandelten Kontrolle, wobei auf dem Blot 2 diese Spur nicht auswertbar war, da das spezifische Signal von einem stärkeren unspezifischen Signal überlagert war.

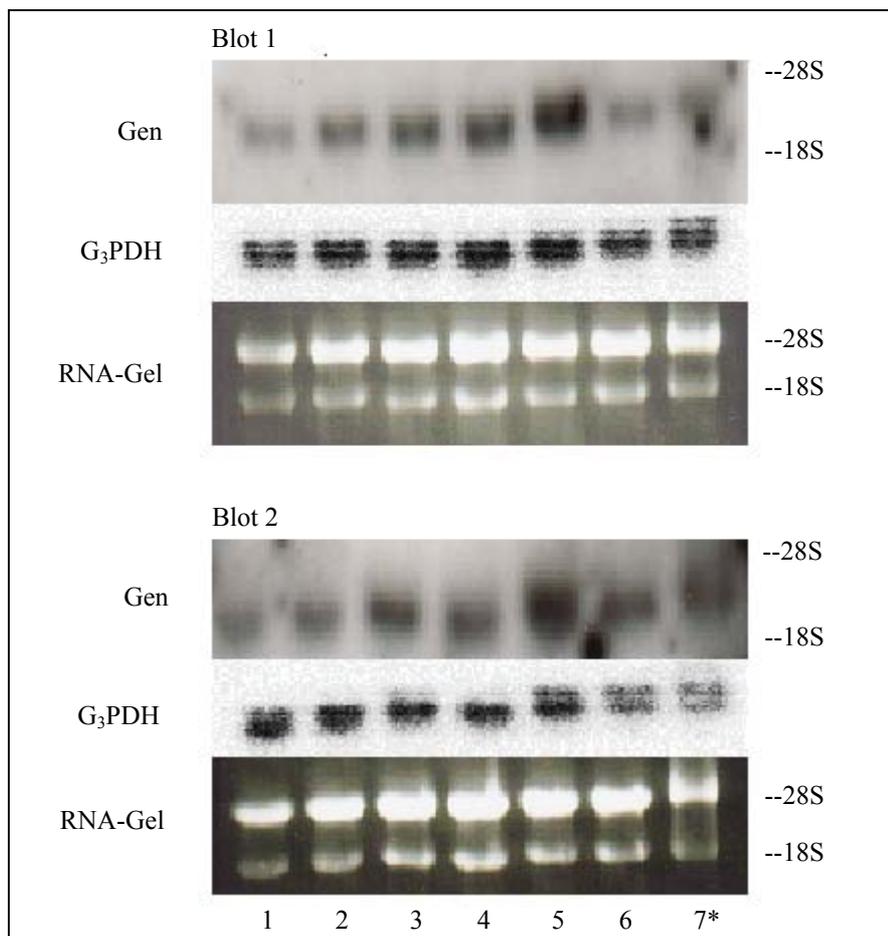


Abb. 17: Radioaktive Northern-Blot-Sonde „Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9“, *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA* (Acc.: NM 011665.3) auf zwei verschiedenen Filtern (Blot 1 und Blot 2), jeweils mit der zugehörigen G₃PDH-Sonde und dem mRNA-Gel. x-Achse: Behandlungszeiten in min mit PTHrP 1–34: (1: keine Behandlung, 2: 30, 3: 60, 4: 120, 5: 240, 6: 480, 7*: Behandlung mit PTHrP (7–34) für 120 min). Auf Blot 2 sieht man in Spur 7* eine radioaktive Kontamination, die einen Artefakt darstellt.

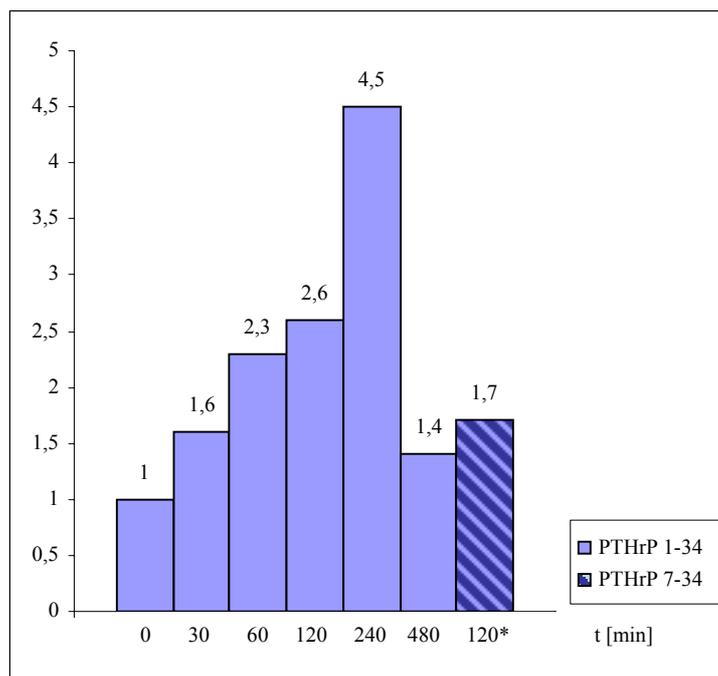


Abb. 18: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale des „Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc9“ auf Blot 1. x- Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120* Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen auf dem Filter ab.

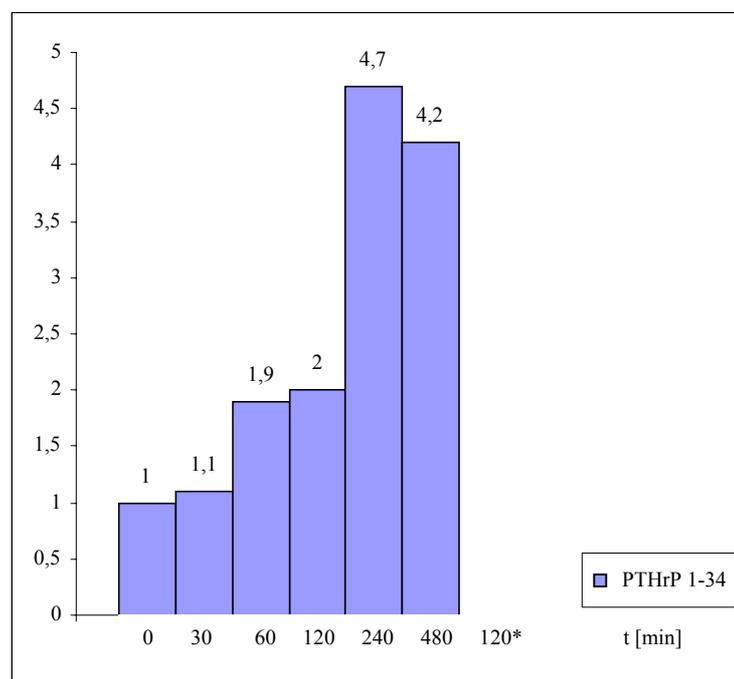


Abb. 19: Autoradiografische Auswertung der mRNA-Hybridisierungssignale des „Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc9“ auf Blot 2. x-Achse: 0: keine Behandlung, 30–480: Behandlungszeit mit PTHrP (1–34) in min, 120* Behandlungszeit mit PTHrP (7–34) in min, wobei die Signalstärke dieser Bande aufgrund einer radioaktiven Kontamination nicht bestimmt werden konnte. Die Grafik bildet auf der y-Achse das auf gleiche Mengen normalisierte Verhältnis zwischen den FS-Hybridisierungssignalen und den mRNA-Mengen auf dem Filter ab.

Während für die Gensonde mit Ähnlichkeit zum „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“ (Acc.: NM 008143.3) nach 1 bis 2 Stunden die maximalen Signalstärken nachweisbar waren, wurden für das Gen mit Ähnlichkeit zum „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“ (Acc.: NM 011665.3) erst nach 4 Stunden die maximalen Expressionsstärken nachgewiesen. Diese zeitlich versetzte Genexpression lässt vermuten, dass die beiden gefundenen Gene einer unterschiedlichen Kinetik unterliegen.

4.4 Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene

Die Sequenzierung wurde in Auftrag gegeben. Die Sequenzen der beiden differentiell exprimierten Gene, „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“ und das „Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc9“, sind in Tabelle 3 abgebildet. Bei beiden Genen wurden die Nested-Primer 1 und Nested-Primer 2 als mögliche Flanken der Inserts gefunden. Die Länge der cDNA-Inserts wurde in allen Fällen aus der Sequenz abgeleitet.

Tab. 3: Ergebnisse der Sequenzierung der zwei differentiell exprimierten Gene. Erste Zeile: jeweils Bezeichnung der Gene, zweite Zeile: jeweils vollständige Sequenz der Gene. Die Sequenzbereiche, aus denen die differentiell exprimierten Gene abgeleitet wurden, sind unterstrichen. Fett gedruckte Sequenzbereiche an den Enden entsprechen den Sequenzen von Nested-Primer 1 oder Nested-Primer 2.

Gen 1	„Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)“
Sequenz	Nested-Primer 1 <u>TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTACCAATAGTTACCTGCCATACT</u> <u>CGCACCAAGTTGTCTGTATAGCCAGCAAACAGAGTCTGGCCATCA</u> <u>GCANACCATGCCAAAGAGGTACCGCCCTCCGCACCACGCCCTA</u> Nested-Primer 2
Gen 2	„Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9“
Sequenz	Nested-Primer 2 <u>AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTACCTGGAAGAGGCAGCTCTGC</u> <u>CACCGGCCCGGGCAAACCTCGGGTCCTCTAGAGCACCTGAGCACAC</u> <u>AGCTCCTACACCTCCTGACCTGCATTCAACTCTGCCCTACGGCCCA</u> <u>GGAGACCAGCCTGCTGTGGCCTCGGCACAGGATGACCTCAGGTAC</u> <u>CTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA</u> Nested-Primer 1

4.5 BLASTSearch-Ergebnisse der differentiell exprimierten Gene

Die Identifizierung der zwei unbekannt Sequenzen erfolgte durch Vergleich bereits bekannter Sequenzen unter Verwendung des BLAST-Search Programms des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Angaben zum Auswertungsergebnis der BLASTSearch-Datenbank:

- **Accession:** Identifikationsnummer des entsprechenden Gens.
- **Score:** Der Score errechnet sich aus den Sequenzübereinstimmungen der Anfrage mit den in der Datenbank befindlichen Sequenzen und wird mit statistischen Parametern abgeglichen. Er ermöglicht es, verschiedene Suchanfragen zu vergleichen.
- **Identities:** Angabe, wie viele Basenpaare in der Suchanfrage mit der gefundenen Sequenz übereinstimmen.

Für jeden cDNA-Homologiepartner wurden die wahrscheinlichsten BLASTSearch-Ergebnisse aufgelistet. Um eine Aussage zur Zellspezies treffen zu können, wurden die wahrscheinlichsten BLASTSearch-Ergebnisse jeweils auch für humane Genprodukte ermittelt. Für den Klon mit Ähnlichkeit zum „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“ (Acc.: NM 011665.3) beträgt die Übereinstimmung mit einem humanen Genprodukt zwar 100 %. Da die Übereinstimmung sich aber auf einen sehr kurzen Sequenzabschnitt von nur 21 Basenpaaren bezieht, ist eine Zuordnung zu einer humanen Zelllinie jedoch unwahrscheinlich. Die wahrscheinlichsten BLASTSearch-Ergebnisse der Genom-Datenbankanalyse sind aus Tab. 4 ersichtlich.

Tab. 4: BLASTSearch-Ergebnisse der differentiell exprimierten Gene. Um eine Aussage zur Zellspezies treffen zu können, wurden die wahrscheinlichsten BLASTSearch-Ergebnisse auch für humane Genprodukte ermittelt.

Gen	Accession (Acc.)	Genbezeichnung (Name/Art)	Score	Identities (Bp; %)
Gen 1	NM008143.3	<i>Mus musculus guanine nucleotide-binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), mRNA.</i> Synonyme Bezeichnung: <i>Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1), mRNA.</i>	167	91/92, 98
	NM 006098.4	<i>Homo sapiens guanine nucleotide-binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), mRNA.</i> Synonyme Bezeichnung: <i>Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1), mRNA.</i>	106	76/86, 88
Gen 2	NM 011665.3	<i>Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA.</i>	294	159/159, 100
	AL358593	<i>Human DNA sequence from clone RP11-473A10 on chromosome 1, complete sequence.</i>	42.1	21/21, 100

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zelllinie verwandt, die aus einem Nierenzellkarzinom nach Langzeitpassage auf der Nacktmaus generiert wurde. Diese Tumorzelllinie fiel dadurch auf, dass sie auf der Nacktmaus eine Hyperkalzämie verursacht hat und eine PTHrP-Produktion aufwies. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass diese Zelllinie den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I (PTH/PTHrP1R) exprimiert, womit die Möglichkeit einer autokrinen Schleife gegeben war (Bunge 1997). Laut dieser Voruntersuchungen wird die Sekretion invasionsassoziiierter Enzyme durch diese autokrine PTHrP-vermittelte Schleife reguliert, ohne allerdings den mRNA-Spiegel innerhalb der Zelle zu verändern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mittels subtraktiver Suppressionshybridisierung (SSH) (Diatchenko et al. 1996) zu eruieren, ob es Gene gibt, deren mRNA-Spiegel über PTHrP hochreguliert wird, und um welche Gene es sich dabei handelt. Die Untersuchungen wurden wie im Flussdiagramm (s. Abb. 2) dargestellt durchgeführt. Initial wurden für die SSH-Technik zwei Zellkulturansätze angelegt. Ein Zellkulturansatz wurde zum Nachweis der PTHrP-vermittelten autokrinen Schleife für zwei Stunden mit dem Rezeptoragonisten PTHrP (1–34) inkubiert. Als Gegenkontrolle wurde die autokrine Schleife mittels des Rezeptorantagonisten PTHrP (7–34) unterbrochen. Hierzu wurde ein weiterer Zellkulturansatz für zwei Stunden mit dem Rezeptorantagonisten PTHrP (7–34) wie unter 3.2.1 beschrieben behandelt. Die Zeitvorgabe von zwei Stunden für die Stimulation mit PTHrP wurde gewählt, um sowohl früh als auch spät regulierte Gene detektieren zu können. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den jeweils gleich behandelten 6 verschiedenen Zellkulturen isoliert, vereint und die Poly-A⁺-mRNA aus der Gesamt-RNA isoliert. Mit der SSH-Technik und der Klonierung wurden die potenziell PTHrP-abhängig hochregulierten Gene durch PCR selektiert und amplifiziert. Alle methodischen Qualitätskontrollen der SSH-Technik entsprachen der Versuchsanleitung von PCR-Select. Allerdings ergab sich bei der Adaptorligation ein Hinweis darauf, dass es sich bei der vorliegenden Zelllinie nicht wie vermutet um eine humane Nierenzellkarzinomlinie handelt, sondern um eine Nagerkarzinomzelllinie. Zur Überprüfung der tatsächlichen differentiellen Expression wurden 22 Klone in Northern-Blot-Untersuchungen analysiert.

Für 2 Gene wurde die PTHrP-(1–34)-induzierte differentielle Expression durch Northern-Blot-Untersuchungen bestätigt und deren Identität mittels Sequenzierung und BLASTSearch-Analyse identifiziert. Auch die Sequenzanalysen dieser beiden Gene wiesen darauf hin, dass es sich bei der eingesetzten Zelllinie um eine Nagerzelllinie handelt, da die Sequenzen eine höhere

Homologie zu Genen der entsprechenden Nager aufwiesen als zu humanen Sequenzen. Demzufolge liegt eine Nagertumorzelllinie vor, die eine PTHrP-vermittelte autokrine Schleife aufweist.

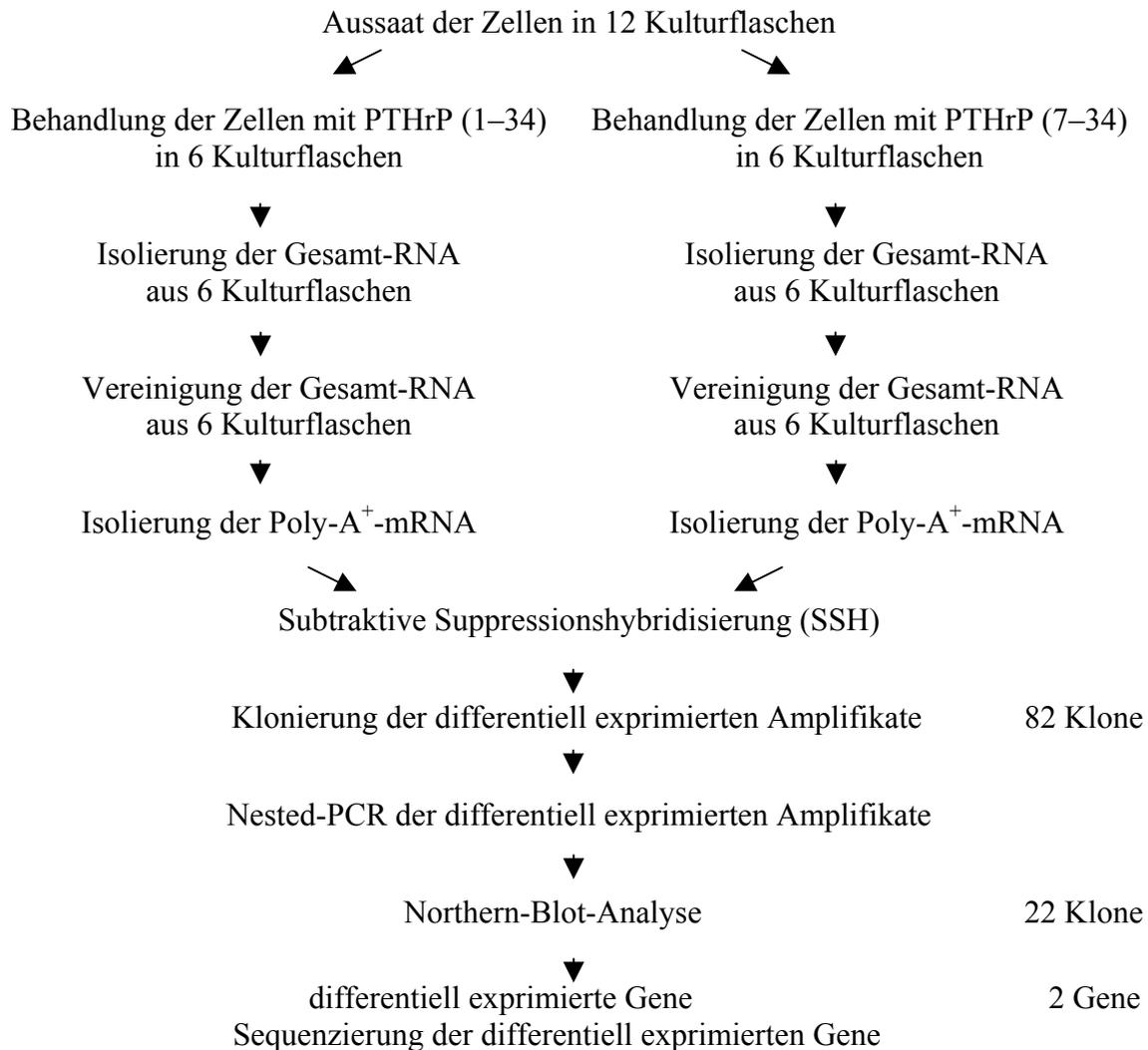


Abb. 20: Flussdiagramm der experimentellen Vorgehensweise. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 12 Kulturflaschen. Die Zellen von jeweils 6 Kulturflaschen wurden entweder mit PTHrP (1–34) oder mit PTHrP (7–34) vorbehandelt. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA, der Vereinigung der Gesamt-RNA und Isolierung der Poly-A⁺-mRNA erfolgte die subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH). Anschließend wurden die Klonierung, die Nested-PCR, die Northern-Blot-Analyse und die Sequenzierung der differentiell exprimierten Gene durchgeführt.

5.2 Zelllinie

Die hier eingesetzte Tumorzelllinie stammt aus einer Serie von 30 langzeitpassagierten humanen Nierenzellkarzinomen, die von Knöfel et al. 1987 und Klöppel et al. 1988 untersucht wurden. Alle 30 xenotransplantierten Tumorkolonien entsprachen im histologischen und morphologischen Erscheinungsbild den Primärtumoren. Die Tumorkolonien wurden mindestens 10- und maximal 50-mal passagiert und nach jeder Passage auf Stabilität des histologischen Bildes, der Mitoserate und des DNA-Gehalts geprüft. Untersuchungen zum Genotyp wurden nicht durchgeführt. Bei fünf der Tumoren änderte sich die Mitoserate signifikant, wobei in jedem der Fälle auch eine gleichzeitige Änderung des DNA-Gehaltes beobachtet wurde. Die Änderung der Mitoserate wurde bei vier Tumoren nach der 13. und 17. Passage und bei einem Tumor nach der 28. und 29. Passage beobachtet. Ein Tumor zeigte zusätzlich ein verändertes histologisches Bild. Ein weiterer Tumor mit veränderter Mitoserate zeigte ein beschleunigtes Wachstum und eine Vergrößerung der Kerne, einhergehend mit einer Abrundung der ursprünglich spindeligen Zellform. Eine Wachstumsbeschleunigung ließ sich aufgrund der Schwankungsbreite der gemessenen Tumorkolonien für die anderen 29 Tumorkolonien nicht sicher bestimmen (Klöppel et al. 1988).

Knöfel 1987 und Klöppel 1988 deuteten die Instabilität bei den fünf Tumoren als spontane Genmutation. Da die Veränderungen erst in höheren Passagen auftraten, wurde eine spontane Mutation im Transplantattumor ursächlich für wahrscheinlicher erachtet als eine bereits im Primärtumor vorhandene Heterogenität. Eine phänotypische Veränderung ging nur aus einem Tumor hervor. Deshalb wurde vermutet, dass die meisten Mutationen sich in einer veränderten Tumorbiologie manifestieren.

Da 25 von 30 Nierenzellkarzinomen nach mindestens 10 und maximal 50 Passagen hinsichtlich des histologischen Bildes, der Mitoserate und des DNA-Gehalts eine Konstanz zeigten, wurde angenommen, dass etwa 80–85 % der Nierenzellkarzinome nach serieller Passagierung auf der Nacktmaus stabil bleiben (Klöppel et al. 1988).

Der Patient, dem ursprünglich das Nierenzellkarzinom für die hier eingesetzte Tumorzelllinie entnommen wurde, wies eine Normokalzämie auf. Ausgewählt wurde dieses Nierenzellkarzinom, weil nach der 13. Passage auf der Nacktmaus eine tumorassoziierte Hyperkalzämie bestand und keine PTH-Produktion, sondern eine PTHrP-Produktion nachgewiesen wurde. Diese Untersuchungsbefunde wurden von Zabel et al. 1990 erhoben.

Nach 30 Passagierungen auf der Nacktmaus wurde dieses Nierenzellkarzinom als humane Nierentumorzelllinie 94/92 etabliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen schlussfolgern, dass es sich bei dieser Zelllinie nicht um eine humane Nierentumorzelllinie,

sondern um eine Nagerzelllinie handelt. Den entscheidenden Beweis lieferte die Analyse der Adaptorligation mit dem Housekeeping-Gen G_3PDH nach Verdau mit *RsaI*, da die Größe der amplifizierten G_3PDH -Abschnitte, wiederholt nach Verdau mit *RsaI*, dem *RsaI*-Schnittmuster einer Zelllinie von Maus oder Ratte entsprach. Die adaptorligierten Fragmente in den *Tester*-cDNAs wiesen eine Größe von 1,2 kb auf (s. Abb. 7 unter 4.2.3). Diese Fragmentgröße entsprach dem *RsaI*-Schnittmuster einer Zelllinie von Maus oder Ratte und nicht, wie erwartet, einer humanen Zelllinie. Humane Zelllinien weisen nach Verdau mit *RsaI* Fragmentgrößen von 0,75 kb auf. Die Größendifferenz beruht darauf, dass humane Zelllinien gegenüber Zelllinien von Maus oder Ratte eine zusätzliche *RsaI*-Schnittstelle besitzen.

Da die Fragmentlängenänderung nach Verdau mit *RsaI* auch durch eine Genmutation bedingt sein könnte und die Zelllinie humanen Ursprungs ist, wurden die Versuche an dieser Stelle nicht abgebrochen.

Nachdem auch die Sequenzanalyse der beiden differentiell exprimierten Gene eine höhere Homologie zu Genen der entsprechenden Nager aufwies als zur humanen Zelllinie, erhärtete sich der Verdacht, bei der hier eingesetzten Zelllinie handle es sich möglicherweise um eine Nagerzelllinie. Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurden für weitere sieben nicht differentiell exprimierte Gene der cDNA-Bibliothek auch die wahrscheinlichsten BLASTSearch-Ergebnisse eines humanen Genproduktes ermittelt (nicht dargestellt). Für alle Sequenzen wurden primär Gene einer Mauszelllinie ermittelt.

Um die Verwechslung von Zellkulturen während der laufenden Arbeiten auszuschließen, wurde nach Abschluss der molekularbiologischen Analysen eine 94/92-Kultur aus der ältesten Sammlung der im Institut befindlichen Kryokultur neu gestartet. Die Zellen wurden nach Auftauen kurzzeitig kultiviert, fixiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Höchst 33258“ gefärbt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA, insbesondere in die subcentromerischen AT-reichen Regionen der acrozentrischen Chromosomen der Maus. Im Interphase-Kern werden daher fluoreszenzmikroskopisch nach UV-Anregung helle Flecken sichtbar, die an den Spitzen der nicht kondensierten Chromosomen lokalisiert sind. Zufällig aufgefundene Metaphase-Stadien weisen ebenfalls helle Bereiche an den Chromosomen auf. Die Methode wurde ursprünglich zur einfachen Unterscheidung von Chromosomen des Menschen und der Maus in somatischen Zellhybriden verwendet. Humane Chromosomen besitzen die AT-reichen Regionen nicht und werden daher homogen über den gesamten Interphasekern angefärbt (Kozak et al. 1977). Das Bild der 94/92-Zellen entsprach vollständig dem einer Nagerzelllinie (Schäfer, persönliche Mitteilung).

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass es in diesen Zellen zu einer neoplastischen Transformation kam und das Genom dem einer Mauszelllinie entspricht. Grundsätzlich ist aber auch eine Mischkultur, bestehend aus einem Maus-Mensch-Genom, nicht auszuschließen. Zur eindeutigen Bestimmung des Genoms der Zellen bedarf es weiterer Untersuchungen, wie die Southern-Blot-Hybridisierung repetitiver DNA-Sonden.

Die Untersuchungsbefunde von Klöppel et al. 1988 lassen vermuten, dass die neoplastische Transformation der Tumorzelllinie bereits während der 30 Passagen auf der Nacktmaus stattfand.

In der Literatur wird die Instabilität xenotransplantierte Tumorlinien nach Langzeitpassage auf der Nacktmaus ursächlich kontrovers diskutiert. Gupta et al. 1987 beschrieben die Transformation eines Lungentumors, der als Xenotransplantat humanen Ursprungs auf der Nacktmaus etabliert wurde. Die transformierte Mauszelllinie exprimierte sowohl maus- als auch humanspezifische Histokompatibilitätskomplexe. Die durch die transformierten Mauszellen gebildeten Tumoren waren fibroblastischer oder epithelialer Herkunft. Phänotypisch ähnelten sie dem humanen Originaltumor. Die Untersuchungen ergaben, dass humangenetische Informationen auf Mausfibroblasten übertragen worden waren und daraus differenzierte Phänotypen resultierten.

Weitere Studien zeigten, dass humane Tumorlinien verschiedener Histologien, xenotransplantiert auf Nacktmäuse, eine Transformation von Mausfibroblasten in Gang setzten und in Fibrosarkome umgewandelt wurden. Die transformierten Fibroblasten fanden sich *in vitro* und *in vivo* (Beattie et al. 1982; Costa et al. 1984; Stark und Schlipkoter 1984; Sparrow et al. 1986).

Als mögliche Ursache wird auch der Transfer humaner DNA (Goldenberg et al. 1974; Kompf et al. 1984; Gupta et al. 1987 und 1990), eine viral (Beattie et al. 1982; Tralka et al. 1983) oder durch transformierte Wachstumsfaktoren (Sherwin et al. 1981; Twardzik 1985) bedingte Genese der Zelltransformation in Betracht gezogen. Die Gesamtheit der zellulären Mechanismen, welche die tumorige Transformation in der Nacktmaus bedingen, ist aber bisher noch unbekannt.

5.3 Diskussion der gefundenen Gene

Obwohl nach der Sequenzanalyse davon ausgegangen wurde, dass es sich bei der eingesetzten Zelllinie genomisch um eine Mäusezelllinie handelte, wurden die Untersuchungen fortgeführt. Zum einen waren die Untersuchungen bereits annähernd abgeschlossen, zum anderen exprimierte diese Zelllinie den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I und produzierte PTHrP, womit alle Voraussetzungen zum Nachweis einer PTHrP-vermittelten autokrinen Regulation erfüllt waren. Für zwei Gene, die ebenfalls mäusepezifische Sequenzen aufwiesen, wurde nach PTHrP-Behandlung eine Expressionssteigerung nachgewiesen. Die Transkriptakkumulation wurde für beide Gene wiederholt im Northern Blot belegt (s. 4.3 und Abb. 12–19). Nachfolgend werden die zwei differentiell exprimierten Gene erörtert.

5.3.1 Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1 (RACK1)

Durch BLASTSearch-Analyse wurde eine Sequenz identifiziert, die für 95 Basenpaare eine 98%ige Homologie zu dem „G-Protein-beta-Polypeptid 2-like 1“, *Mus musculus guanine nucleotide-binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1 (GNB2L1), mRNA* der Hausmaus aufweist (Acc.: NM 008143.3). „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1“, *Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1), mRNA* ist eine synonyme Bezeichnung für dieses Gen. Die Fähigkeit dieses Proteins, aktivierte PKC spezifisch zu binden, führte zu der Bezeichnung RACK1 (Mochley-Rosen 1991). Daher wird GNB2L1 in der vorliegenden Arbeit als RACK1 bezeichnet.

Die Aminosäuresequenz von RACK1 weist eine Homologie von 42 % zur β -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine (G β -Untereinheit) auf (McCahill et al. 2002) und gehört ebenso wie die G β -Untereinheit zur Familie der WD40-Proteine. Merkmal dieser Proteine ist eine 40-mal wiederholte, hochkonservierte Sequenzabfolge von Tryptophan und Asparaginsäure, die sogenannte WD40-Domäne (Steele et al. 2001). Die Tertiärstruktur von RACK1 bildet eine siebenblättrige Propellerstruktur aus, wobei jedes Blatt eine WD40-Domäne beinhaltet (s. Abb. 21) (McCahill et al. 2002; Sklan et al. 2006).



Abb. 21: Aufsicht auf ein RACK1-Modell, modifiziert nach McCahill et al. 2002. Die sieben Blätter der Propellerstruktur sind farbig markiert und nummeriert.

RACK1 ist ein 36 kDa großes Protein, welches erstmals 1989 kloniert wurde (Guillemot et al. 1989). Ursprünglich wurde dieses Protein als spezifisches Ankerprotein für die Translokation der aktivierten Proteinkinase C (PKC) innerhalb der Zelle identifiziert (Mochly-Rosen et al. 1991). RACK-Proteine erhöhen auch die Substratphosphorylierung der PKC durch Stabilisierung der aktiven Form (Mochly-Rosen et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass RACK1 ein Teil der kleinen ribosomalen Untereinheit ist (Link et al. 1999; Nilsson et al. 2004). Daher wird vermutet, dass RACK1 als sogenanntes Chaperon verschiedene Proteine in räumliche Nähe zueinander bringt und somit beispielsweise die Phosphorylierung von mRNA durch die PKC ermöglicht (Nilsson et al. 2004).

Neben der Interaktion mit Serin/Threoninkinasen wie der PKC bindet RACK1 auch Tyrosinkinasen der Src-Familie (Chang et al. 1998) und andere Signalproteine wie die Phosphodiesterase (PDE4D5) (Yarwood et al. 1999; Bolger 2006). Es werden stetig Proteine identifiziert, mit denen RACK1 bindet. Inzwischen sind fast sechzig Protein-Protein-Interaktionen für RACK1 bekannt (Egidy et al. 2008). Die funktionellen Bedeutungen dieser Protein-Protein-Interaktionen konnten im biologischen Kontext bisher nur in wenigen Fällen geklärt werden.

Gegenwärtig wird RACK1 als ein multifunktionelles Gerüstprotein (scaffold protein) beschrieben (McCahill et al. 2002; Sklan et al. 2006), das durch Protein-Protein-Interaktionen zahlreiche Signalwege beeinflusst (Sengupta et al. 2004; Chen et al. 2006; Guo und Chen 2008). Dadurch ist RACK1 an der Regulation einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen einschließlich der Signaltransduktion (McCahill et al. 2002; Nakashima 2008), der Translation (Link et al. 1999; Sengupta et al. 2004; Nilsson et al. 2004), der Apoptose (Kiely et al. 2002; Fomenkov et al. 2004), der Angiogenese (Berns et al. 2000) und der Kontrolle des Zellwachstums (Chang et al. 1998; Buensuceso et al. 2001; McCahill et al. 2002; Nilsson et al. 2004; Guo und Chen 2008), beteiligt.

Eine vermehrte Expression der mRNA von RACK1 wurde während der Geweberegeneration nach ischämischen Nierenschädigungen (Padanilam and Hammerman 1997) in Geweben, die mit der Angiogenese assoziiert sind (Berns et al. 2000), und verschiedenen Tumorentitäten (Berns et al. 2000; Saito et al. 2002; Egidy et al. 2008) nachgewiesen. Über die funktionelle Bedeutung von RACK1 in Tumorzellen ist wenig bekannt. Vermutlich begünstigt RACK1 die zelluläre Transformation auf mehreren Ebenen durch Zunahme der Proliferationsrate oder der Migrationsfähigkeit, durch anheftungsunabhängiges Wachstum (anchorage independent growth) oder Resistenz gegen Apoptose (McCahill et al. 2002).

Nachweise dafür, dass RACK1 anheftungsunabhängiges Wachstum und somit eine zelluläre Transformation induzieren könnte, belegen Untersuchungen von Zhang et al. 2006. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass RACK1 den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert, für den eine wichtige Rolle bei der Regulierung des anheftungsunabhängigen Wachstums nachgewiesen worden war (Uttamsingh et al. 2003). RACK1 rekrutiert STAT3 zum Insulin- und zum Insulin-like-growth-factor-1-Rezeptor (IR/IGF-1R), wodurch STAT3 phosphoryliert wird.

Hierdurch ist RACK1 ein wichtiger Faktor für anheftungsunabhängiges Wachstum in Zellen bestimmter Ovarialkarzinome (Zhang et al. 2006). Für die Assoziation von RACK1 mit IR und IGF-1R reichte bereits eine Stimulation auf niedrigem Niveau durch RACK1 aus (Hermanto et al. 2002). Daher ist anzunehmen, dass der hier nachgewiesene mRNA-Anstieg von RACK1 um den Faktor 1,8 bis 3 eine zellbiologische Wirkung haben könnte.

5.3.2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym Ubc9

Eine Transkriptakkumulation nach Behandlung mit PTHrP konnte für eine weitere putative Sequenz nachgewiesen werden. Diese Sequenz zeigte für 159 Basenpaare eine 100%ige Homologie zu dem „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“, *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA* (Acc.: NM 011665.3) der Hausmaus.

Das humane Ubc9-Gen wurde 1996 in verschiedenen Laboren gleichzeitig entdeckt und auf Chromosom 16p13.3 lokalisiert (Yasugi und Howley 1996; Wang et al. 1996; Watanabe et al. 1996). Interessanterweise weist die Aminosäuresequenz von Ubc9 eine 100%ige Homologie zwischen Mensch und Maus auf (Kovalenko et al. 1996; Hateboer et al. 1996). Die DNA-Sequenz beinhaltet 6–7 Exons, die in ihrer Gesamtheit etwa 4,9 kb betragen. Vier Spleißvarianten mit einer Größe von 1,1–1,4 kb wurden für Ubc9 in verschiedenen humanen Geweben und Zelllinien gefunden. Diese vier Varianten besitzen in den kodierenden Sequenzabschnitten identische Aminosäuresequenzen, da sie nur in den nicht kodierenden Regionen abweichende Sequenzabfolgen aufweisen (Mo und Moschos, 2005). Das Ubc9-Gen wurde in allen humanen Organen und Geweben analysiert. In einigen Organen wie Hoden, Thymus (Kovalenko et al. 1996), Herz und glatter Muskulatur (Wang et al. 1996) befanden sich höhere RNA-Mengen. Möglicherweise variiert die Expression von Ubc9 in verschiedenen Geweben.

Die Gendelektion von Ubc9 ist in Hefen und höheren eukariontischen Zellen letal (Seufert et al. 1995), was auf eine große physiologische Bedeutung dieses Proteins hinweist. Es wird vermutet, dass Ubc9 in der Tumorgenese bedeutsam sein könnte (Mo et al. 2005; Moschos et al. 2007; Wu et al. 2009). Hierfür spricht die vermehrte Expression von Ubc9 in einigen Tumorentitäten

(McDoniels-Silvers et al. 2002; Mo und Moschos 2005; Moschos et al. 2007; Wu et al. 2009). Eine Expressionssteigerung von Ubc9 wurde beispielsweise für Mammakarzinome um den Faktor 5,7 gegenüber dem Normalgewebe durch Western-Blot-Untersuchungen bestätigt (Wu et al. 2009).

Ubc9 wurde ursprünglich als ein E2-konjugierendes Enzym bekannt, das sowohl im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) als auch im SUMO-System wirksam ist. Einigen Untersuchungen zufolge, vermittelt Ubc9 die Degradation von Proteinen durch Konjugation von Ubiquitin (Tashiro et al. 1997; Firestein und Feuerstein 1998). Andere Untersuchungen belegten, dass Ubc9 die Konjugation von SUMO katalysiert (Desterro et al. 1997; Saitoh et al. 1998).

In der posttranslationalen Proteinmodifikation nimmt das Ubiquitin-System im proteasomalen Abbau von Proteinen eine bedeutende Funktion ein (Hershko und Ciechanover 1998; Laney und Hochstrasser 1999). Neben dem Ubiquitin-System wurden zahlreiche Ubiquitin-ähnliche Systeme entdeckt, die nicht dem Abbau von Proteinsubstraten durch das Proteasom dienen. Das bekannteste Ubiquitin-ähnliche System ist der sogenannte „small ubiquitin-like modifier“ (SUMO) (Müller et al. 2001; Melchior 2000). In Säugerzellen sind bisher vier Isoformen identifiziert worden, die SUMO-1 bis SUMO-4 genannt werden (Melchior 2000; Hay 2001; Guo et al. 2004; Zhao 2007). Alle vier SUMO-Polypeptide weisen eine hohe Struktur- und Sequenzhomologie auf (Johnson 2004; Guo et al. 2004). Ob sie jedoch unterschiedliche Funktionen bewirken, ist bisher noch unklar (Johnson 2004).

1997 wurde nachgewiesen, dass Ubc9 nicht mit Ubiquitin, sondern spezifisch mit SUMO eine Thioesterbindung ausbildet (Johnson und Blobel 1997; Desterro et al. 1997; Schwarz et al. 1998). Die Spezifität von Ubc9 für SUMO wird mit unterschiedlichen elektrostatischen Ladungen der Moleküloberflächen begründet. Ubc9 ist an der Oberfläche positiv geladen und kann mit dem im Gegensatz zu Ubiquitin negativ geladenen SUMO interagieren (Giraud et al. 1998). Demgegenüber weisen Enzyme der E2-Enzymfamilie, die mit Ubiquitin interagieren, eine negative oder keine Ladung auf.

Die Konjugation von SUMO, auch SUMOylierung genannt, erfolgt enzymatisch analog zur Ubiquitinierung. Die katalytischen Prozesse erfolgen jedoch über einen SUMO-spezifischen Enzymapparat, der von dem klassischen Ubiquitin-Enzymapparat abweicht (Hochstrasser 1996; Jentsch und Pyrowolakis 2000; Verger et al. 2003).

Das bisher am besten charakterisierte SUMO-1 besteht aus 101 Aminosäuren und ist wie Ubiquitin ein inaktives Vorläuferprotein. Durch die spezifische Hydrolase Ulp (Ubiquitin-like protease) wird SUMO-1 am C-terminalen Ende durch Abspaltung der vier endständigen Aminosäuren prozessiert, sodass ein Di-Glycin-Motiv für die Konjugationsreaktion frei

exponiert ist (Li und Hochstrasser 1999). Anschließend erfolgt die SUMOylierung des Zielproteins in einer dreistufigen Enzymkaskade (s. Abb. 22) (Hochstrasser 2000; Müller et al. 2001).

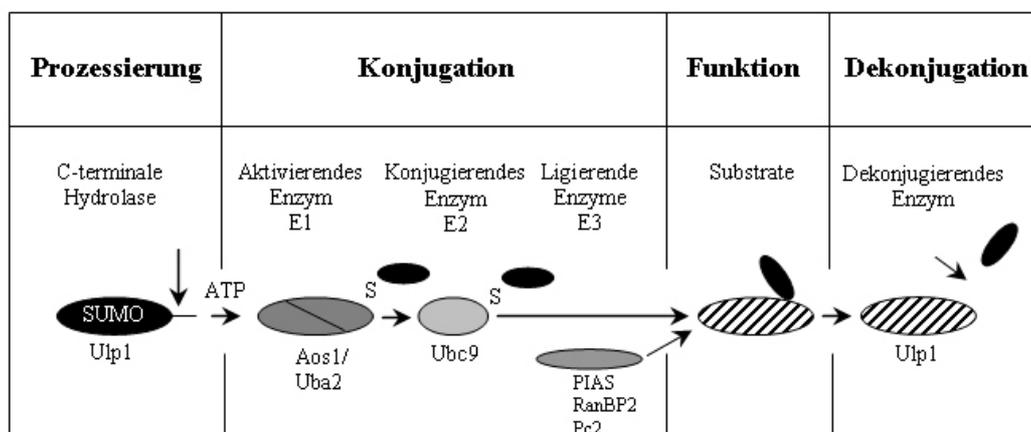


Abb. 22: Schematische Darstellung der SUMOylierung. Initial wird die Vorläuferform von SUMO am C-terminalen Ende von einer Hydrolase (Ulp1) prozessiert. Danach erfolgt die SUMOylierung über eine dreistufige Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen (E1, E2 und E3). Das „S“ symbolisiert eine Thioesterbindung zwischen Enzym und SUMO. Die SUMOylierung kann aber auch direkt ohne ligierende Enzyme erfolgen. Abschließend erfolgt die DeSUMOylierung. Hierbei wird das Substrat durch eine Hydrolase (Ulp1) wieder vom SUMO-Protein abgespalten.

Zunächst wird das SUMO-1-Protein in einer ATP-abhängigen Reaktion durch ein heterodimeres E1-Enzym Aos1/Uba2 aktiviert. Hierbei bildet das E1-Enzym eine Thioesterbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO-1 und einem internen Cystein (Johnson et al. 1997), wodurch ein E1-SUMO-1-Komplex entsteht.

Im zweiten Schritt wird SUMO-1 von dem E1-Enzym auf das E2-Enzym übertragen, wobei SUMO-1 eine spezifische Thioesterbindung mit dem aktiven Cystein in Ubc9 bildet. An dem Transfer vom E1-aktivierenden Enzym ist eine Sequenzabfolge von Ubc9 beteiligt, die auch SUMO-1 bindet (Tatham et al. 2003). In einem weiteren Schritt wird SUMO-1 direkt oder mittels verschiedener E3-Ligasen auf das Zielprotein übertragen.

Für einige SUMO-1-Zielproteine, wie beispielsweise für den Kernimportfaktor RanGAP1, konnte in rekonstruierten In-vitro-Systemen gezeigt werden, dass das SUMO-1-aktivierende Enzym Aos1/Uba2 und das E2-konjugierende Enzym Ubc9 für die Modifikation ausreichen (Okuma et al. 1999; Melchior 2000). Daher war lange unklar, ob E3-Ligasen für die SUMOylierung erforderlich sind. In den folgenden Jahren wurden verschiedene SUMO-E3-Ligasen, Mitglieder der PIAS-Familie (protein inhibitors of activated STAT), RanBP2 (Ran binding protein 2) und Pc2 (poly comb protein 2) für SUMO identifiziert (Jackson 2001; Pichler et al. 2004). Diese verstärken die SUMO-Modifikation spezifischer Substrate in Analogie zum Ubiquitin-System (Melchior 2003; Johnson 2004).

SUMO-1-Zielproteine werden häufig an einem Lysinrest innerhalb einer sogenannten Konsensussequenz (Ψ KXE) modifiziert (Rodriguez et al. 2001). Hierbei symbolisiert (Ψ) eine hydrophobe Aminosäure, (K) den zu modifizierenden Lysinrest, (X) eine beliebige Aminosäure und (E) Glutaminsäure. Diese Konsensussequenz wird von Ubc9 im SUMO-1-Substrat erkannt. Ubc9 bindet über den aktiven Cysteinrest (Cys 93), der für die Thioesterbildung mit SUMO-1 erforderlich ist, direkt an dieses Motiv (Sampson et al. 2001; Bernier-Villamor et al. 2002). Neben der Konsensussequenz Ψ KXE wurden auch einige andere Motive (TKXE, TKED, AKCP, VKYC, VKFT) für die SUMOylierung aufgefunden (Johnson 2004). Es gibt aber auch Beispiele dafür, dass Substrate über ein oder mehrere Akzeptorlysine verknüpft werden, die nicht Bestandteil einer Konsensussequenz sind (Hoegge et al. 2002; Zhou et al. 2004). Wie Ubiquitin können auch SUMO-2 und SUMO-3 über interne Lysine zu Ketten verknüpft werden (Tatham et al. 2001; Bylebyl et al. 2003).

SUMOylierung ist ein reversibler Prozess. Dieselben SUMO-spezifischen Proteasen der Ulp-Familie, die das Prä-SUMO-Protein C-terminal prozessieren, katalysieren auch als Isopeptidasen die DeSUMOylierung (Seeler und Dejea 2003). Sie zeichnen sich durch die namensgebende Ulp-Domäne aus, die die katalytisch aktive Region enthält. Zwei Mitglieder der Ulp-Familie, Ulp1 und Ulp2, die SUMO von Substraten abspalten, wurden in Hefen identifiziert (Li und Hochstrasser 1999; Li und Hochstrasser 2000; Schwienhorst et al. 2000). Obwohl sie beide zur Ulp-Familie gehören, weisen sie unterschiedliche Eigenschaften auf. So ist Ulp1 an den Kernporen lokalisiert und Ulp2 im Kern. Ferner prozessiert Ulp1 im Gegensatz zu Ulp2 auch das Prä-SUMO-Protein. Darüber hinaus ist das Gen Ulp1 für Hefen essenziell (Li und Hochstrasser 1999; Li und Hochstrasser 2000).

Auch in menschlichen Zelllinien existieren mindestens 6 SUMO-spezifische Ulps. Diese werden SENPs oder SUSPs (SUMO/sentrin specific proteases) genannt. Viele dieser Ulps haben in der Zelle ebenfalls unterschiedliche Wirkorte (Gong et al. 2000; Nishida et al. 2000; Nishida et al. 2001; Hang und Dasso 2002) und weisen überlappende Funktionen in der Prozessierung und DeSUMOylierung auf (Yeh et al. 2000).

Im Gegensatz zu dem Ubiquitin-System existiert für die SUMO-Konjugation nur Ubc9 als einziges E2-Enzym (Seufert et al. 1995; Johnson und Blobel 1997; Desterro et al. 1997; Mo und Moschos 2005). Obwohl SUMO strukturell mit Ubiquitin verwandt ist, entfalten SUMO-Modifikationen in der Zelle andere Funktionen als die der Proteindegradation (Hershko and Ciechanover 1998; Melchior 2000; Pichler und Melchior 2002; Melchior et al. 2003; Johnson 2004; Hay 2005; Besnault-Mascard 2005).

Durch die SUMOylierung werden die funktionellen Eigenschaften eines Substrates wie beispielsweise die Aktivität, die Lokalisation, die Stabilität und die Protein-Protein-Interaktion moduliert (Melchior et al. 2003). Dadurch ist sie an der Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt. Diese sind in ihren zellbiologischen Effekten zumeist noch nicht befriedigend geklärt. Häufig zitierte Prozesse sind in Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Auflistung häufig zitierter zellbiologischer Funktionen der SUMO-Modifikation.

Genexpression	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
Transkription	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Gill 2005; Hay 2005; Anckar und Sistonen 2007; Zhao 2007; Sapetschnig et al. 2008; Stielow et al. 2008
Kerntransport	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
DNA-Reparatur	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
Signaltransduktion	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
Zellzyklusprogression	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
genomische Stabilität	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
chromosomale Stabilität	Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Zhao 2007
Antagonist zu Ubiquitin	Desterro et al. 1998; Hoege et al. 2002; Lin et al. 2003

Die primäre Bedeutung von Ubc9 resultiert aus der Eigenschaft als E2-Enzym im SUMO-System. Einige Einzelbefunde belegen aber auch eine SUMO-unabhängige Wirkungsweise für Ubc9 (Mo und Moschos 2005). Demnach kann Ubc9 beispielsweise als Kofaktor die Transkription beeinflussen (Kobayashi et al. 2004; Kurihara et al. 2005). Häufig konnte aber für Zielproteine, die als Interaktionspartner für Ubc9 identifiziert wurden, in nachfolgenden Untersuchungen eine SUMOylierung bestätigt werden (Melchior 2000).

Bereits 2004 waren über hundert SUMO-Substrate bekannt (Li et al. 2004; Panse et al. 2004; Vertegaal et al. 2004; Wohlschlegel et al. 2004; Zhao et al. 2004). Im gleichen Maß wächst auch die Liste SUMO-bedingter Eigenschaften und zellulärer Prozesse. Eine Darstellung aller SUMO-bedingten zellulären Zusammenhänge würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Die meisten SUMO-Modifikationen stehen im Zusammenhang mit der Transkription (Zhao 2007; Anckar und Sistonen 2007). So wurde für verschiedene Transkriptionsfaktoren oder Faktoren, die mit der Transkription assoziiert sind, eine SUMOylierung nachgewiesen (Zhao 2007).

Beispiele für Transkriptionsfaktoren sind Sox9 (Oh et al. 2007), CREB (Kuo et al. 2005), Ets1, Sp1, Sp3, Smad3/4, und Mitglieder der AP1-Familie wie c-Jun (Zhao 2007).

„Von wenigen Ausnahmen abgesehen“ (Sapetschnig et al. 2008), führt die Modifikation von Transkriptionsfaktoren durch SUMO in den meisten Fällen zur Repression der Transkription (Mo und Moschos 2005; Gill 2005; Kuo et al. 2005; Hay 2005; Zhao 2007; Sapetschnig et al.

2008). Bereits eine geringe SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Sp3 von 10 % reichte aus, um die Expression eines Gens vollständig zu reprimieren (Sapetschnig et al. 2008).

Dieser Befund liefert ein starkes Indiz dafür, dass der hier nachgewiesene mRNA-Anstieg von Ubc9 um den Faktor 4,5 bis 4,7 pleiotrope Effekte durch SUMOylierung auslöst. Somit könnten durch die PTHrP-vermittelte Regulation der Ubc9-Expression die intrazelluläre Konzentration zahlreicher Proteine und damit zahlreiche zelluläre Prozesse reguliert werden. Effekte von Ubc9 im Zusammenhang mit SUMOylierung sind in Abbildung 23 modellhaft dargestellt.

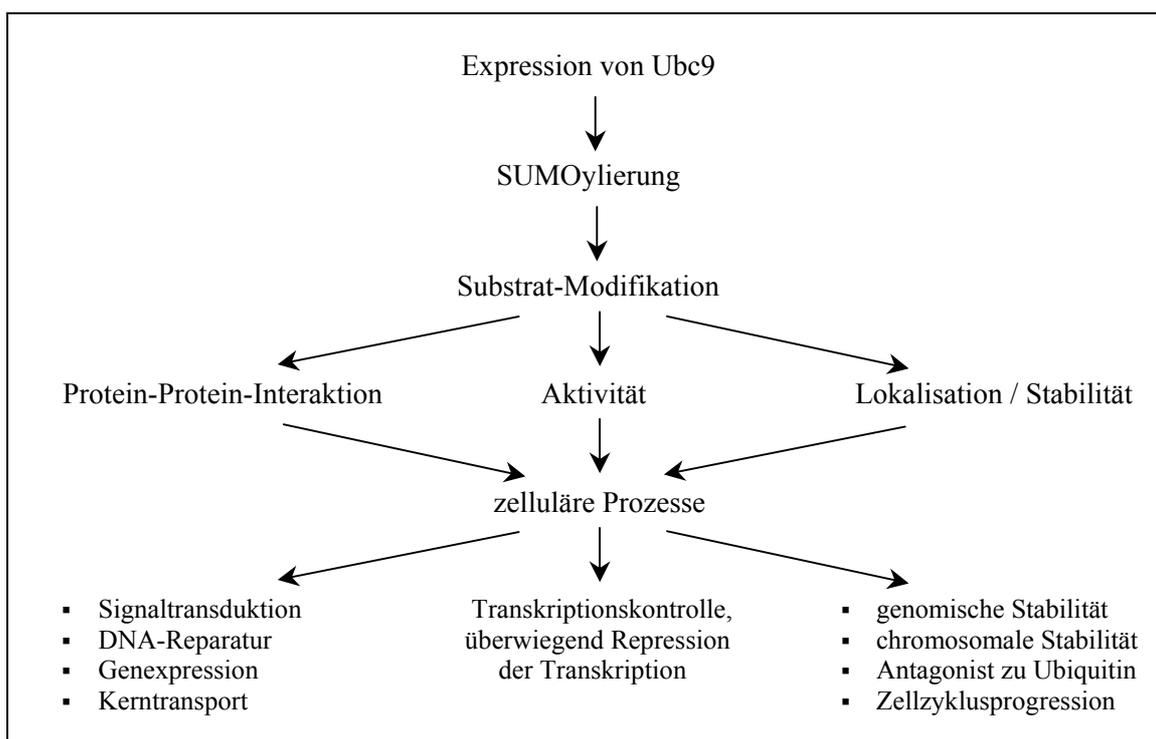


Abb. 23: Effekte von Ubc9 im Zusammenhang mit SUMOylierung. Ubc9 ermöglicht die SUMOylierung, die die funktionellen Eigenschaften von Substratproteinen im Zusammenhang mit der Protein-Protein-Interaktion, der Aktivität, der Lokalisation und Stabilität ändert und dadurch Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse nimmt. Am häufigsten wird die Transkription beeinflusst. Überwiegend resultiert daraus die Repression der Transkription.

Der hier dokumentierte mRNA-Anstieg von RACK1 und Ubc9 ist als PTHrP-induzierte Wirkung auf der Ebene der Transkription zu deuten. Hierbei kann die PTHrP-Wirkung aus der zelleigenen PTHrP-Sekretion der Zellen selbst oder durch die exogene Stimulation der Zellen mit PTHrP (1–34) verursacht sein. Wie bereits erwähnt, wurde durch Voruntersuchungen für die hier eingesetzte Zelllinie eine PTHrP-vermittelte autokrine Regulierung über den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I bereits nachgewiesen (Bunge 1997). Folglich könnte auch die Hochregulation von RACK1 und Ubc9 über diesen Rezeptor induziert worden sein.

Trotz eines genomweiten Ansatzes konnten nur zwei mäßig hochregulierte Gene gefunden werden. Dies könnte die PTHrP-(1–34)-Wirkung in der Nagertumorzelllinie als eher schwach

charakterisieren. Hierbei dürfte bedeutsam sein, dass es sich bei der hier eingesetzten Tumorzelllinie um eine ältere, langzeitpassagierte Zelllinie handelt. Möglicherweise befanden sich in diesem Genom auch mehrere spät regulierte Gene, die aufgrund der hier gewählten Inkubationszeit von zwei Stunden für PTHrP (1–34) unentdeckt blieben. Hierfür spricht der eher späte mRNA-Anstieg beider Gene mit einer maximalen Transkriptakkumulation nach 1 bis 4 Stunden.

Ein weiterer ursächlicher Zusammenhang vermag auch in der transkriptionsrepressiven Eigenschaft von Ubc9 durch SUMOylierung begründet sein. Entscheidend für diese Annahme ist eine durch SUMOylierung verursachte Hemmung solcher Transkriptionsfaktoren, wie CREB (Kuo et al. 2005) und Sox9 (Oh et al. 2007), die durch PTHrP aktiviert werden. Die Hemmung dieser PTHrP-vermittelten Transkriptionsfaktoren hat möglicherweise auch in der hier eingesetzten Zelllinie die Transkriptakkumulation zahlreicher Gene unterbunden.

Geschlussfolgert werden darf auch, dass sich in dem Genom mehrere Gene befinden, die durch PTHrP reprimiert werden. Diese Vermutung hätte Aufschluss erbracht, sofern die SSH-Technik nicht nur in eine Richtung (vorwärts) sondern auch in die Gegenrichtung (rückwärts), durch Vertauschen der *Tester-* und *Driver-cDNA*-Bibliothek, durchgeführt worden wäre. Gestützt wird die Hypothese durch Untersuchungen von McDoniels-Silvers et al. 2002, an Lungenkarzinomen. In dieser Studie wurden verschiedene Lungenkarzinome auf eine Änderung der Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe untersucht. Für 68 Gene wurde eine Abnahme und für 4 Gene eine Zunahme der Expression nachgewiesen. In einem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom befanden sich unter 10 differentiell exprimierten Genen 8 herabregulierte und nur 2 hochregulierte Gene. Eines der beiden hochregulierten Gene war Ubc9. Eine Dysregulation der Genexpression wurde in Tumoren häufig beobachtet (Varmus 1989; Liang und Pardee 1992). Eine überwiegende Hemmung der Transkription scheint dabei aber kein generelles Phänomen zu sein.

Vermutlich beeinflusst die PTHrP-induziert Hochregulierung von Ubc9 und RACK1 zelluläre Prozesse, die den Stoffwechsel maligner Zellen begünstigt. Funktionelle Eigenschaften, die diese Proteine zusammenhängend im biologischen Kontext beschreiben, finden sich in der gegenwärtigen Literatur jedoch nicht. Unklar ist auch, welchen Vorteil Tumorzellen durch die überwiegend repressive Wirkung von Ubc9 auf die Transkription haben.

Sapetsching et al. 2008 erwägen für die SUMO-bedingte Repression der Transkription einen transienten und schwachen Wirkmechanismus. Diese Hypothese impliziert, dass PTHrP, welches die Expression der mRNA von Ubc9 steigert, selbst herunterreguliert wird. Interessanterweise befinden sich unter den Transkriptionsfaktoren, die durch SUMOylierung reprimiert werden,

auch Ets1, Sp1 und Smad3/4 (Zhao 2007), die die Transkription von PTHrP induzieren. Somit könnte die zelleigene PTHrP-Sekretion durch die Hochregulierung von Ubc9 reprimiert werden und die verminderte Sekretion von PTHrP wiederum zu einer Reduktion der mRNA von Ubc9 und konsekutiv zur Aktivierung der Transkription führen.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, ob PTHrP auf der Ebene der Transkription Gene hochreguliert und um welche Gene es sich dabei handelt. Hierzu wurde eine auf Nacktmäusen langzeitpassagierte Tumorzelllinie humanen Ursprungs, ein Nierenzellkarzinom 94/92, eingesetzt. Ausgewählt wurde diese Zelllinie, weil aus Voruntersuchungen bekannt war, dass sie sowohl PTHrP als auch den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ I koexprimiert und autokrin durch PTHrP reguliert wird.

Zur Selektierung potenziell differentiell exprimierter Gene wurde die subtraktive Suppressionshybridisierung (SSH) in eine Richtung (vorwärts) durchgeführt. Diese Untersuchungstechnik ermöglichte die Selektion potenziell hochregulierter Gene durch Hybridisierung zweier cDNA-Subpopulationen (*Tester* und *Driver*). Die Zellen der *Tester*-Population wurden zum Nachweis der PTHrP-vermittelten autokrinen Schleife für zwei Stunden mit dem Rezeptoragonisten PTHrP (1–34) stimuliert. Die *Driver*-Population diente als Gegenkontrolle. In diesen Zellen wurde die autokrine Schleife durch eine zweistündige Behandlung mit dem Rezeptorantagonisten PTHrP (7–34) unterbrochen. Die SSH-Technik lieferte 82 Klone, von denen 22 Klone im Northern Blot auf tatsächliche differentielle Expression untersucht wurden. Für zwei Gene wurde im Northern Blot über eine Zeitreihe ein 2- bis 5-facher mRNA-Anstieg nachgewiesen. Die Sequenzanalyse dieser Gene ergab eine Homologie zu dem „Rezeptor für aktivierte C-Kinase 1“, *Mus musculus receptor for activated C-kinase 1 (RACK1), mRNA* (Acc.: NM 008143.3) und dem „Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9“ *Mus musculus ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9, mRNA* (Acc.: NM 011665.3).

Die Transkriptakkumulation beider Gene wies nach 1 bis 4 Stunden ein Maximum auf. Dieser eher späte mRNA-Anstieg ist als PTHrP-induzierte Wirkung auf der Ebene der Transkription zu deuten, die entweder auf der zelleigenen PTHrP-Sekretion der Zellen selbst oder auf der exogenen Stimulation der Zellen mit PTHrP (1–34) beruht. Da eine autokrine PTHrP-induzierte Wirkungsweise für die hier eingesetzte Zelllinie in Voruntersuchungen bereits nachgewiesen worden war, könnte auch die Hochregulation von RACK1 und Ubc9 über den PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1 induziert worden sein.

Neben RACK1 und Ubc9 wurden weitere 7 nicht differentiell exprimierte Gene (nicht dargestellt) mittels Sequenzierung identifiziert. Die Sequenzierung ergab für alle Gene eindeutige Hinweise darauf, dass es sich bei der zur RNA-Isolierung verwendeten Zelllinie nicht um eine humane Nierenzellkarzinomlinie, sondern um eine Nagerzelllinie handelt. Voruntersuchungen zu dieser Zelllinie lassen vermuten, dass die neoplastische Transformation dieser Tumorzelllinie bereits während der Langzeitpassage auf der Nacktmaus stattfand und am ehesten auf eine spontane Mutation im Transplantattumor zurückzuführen ist.

Die geringe Ausbeute von nur zwei eher mäßig hochregulierten Genen könnte auf eine eher schwache PTHrP-Wirkung in der hier eingesetzten Nagerzelllinie hindeuten. Darüber hinaus sind aber auch andere Ursächlichkeiten für eine zusammenhängende Beurteilung zu berücksichtigen: Zum einen könnten spät regulierte Gene aufgrund der hier gewählten Inkubationszeit von zwei Stunden unentdeckt geblieben sein. Zum anderen beinhaltet das Genom möglicherweise auch Gene, die durch PTHrP herunterreguliert werden. Letztere wurden aber in dieser Arbeit nicht gesucht.

Für die Möglichkeit einer PTHrP-vermittelten Repression der Genexpression spricht die hier nachgewiesene Hochregulierung von Ubc9, weil Ubc9 die SUMOylierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren bewirkt. SUMOylierte Transkriptionsfaktoren wiederum führen meistens zu einer Repression der Transkription. Bereits eine geringe SUMOylierung eines Transkriptionsfaktors (Sp3) von 10 % reicht aus, um die Expression eines Gens vollständig zu reprimieren. Die funktionelle Bedeutung der transkriptionsrepressiven Eigenschaft von Ubc9 für Tumorzellen ist nicht bekannt. Vermutlich handelt es sich bei der SUMO-bedingten Repression der Transkription um eine transiente Interaktion, die durch PTHrP und Ubc9 reguliert wird. Möglicherweise ist auch RACK1, das durch Protein-Protein-Interaktion zahlreiche Signalwege beeinflusst, an diesem Prozess beteiligt.

Sowohl PTHrP als auch RACK1 und Ubc9 werden in verschiedenen Tumorentitäten vermehrt exprimiert. Funktionelle Eigenschaften, die diese drei Proteine zusammenhängend im biologischen Kontext beschreiben, finden sich in der gegenwärtigen Literatur jedoch nicht. Die hier nachgewiesene PTHrP-induzierte Transkriptakkumulation von RACK1 und Ubc9 deutet auf eine bedeutende Rolle von PTHrP in der Regulation der Transduktions- und der Transkriptionskontrolle transformierter Zellen hin.

6 Literaturverzeichnis

- Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T et al.:** Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:2732–2736.
- Anckar J, Sistonen L:** SUMO: getting it on. *Review Biochem Soc Trans*. 2007; 35(6):1409–1413.
- Barlet JP, Champredon C, Coxam V et al.:** Parathyroid hormone-related peptide might stimulate calcium secretion into the milk of goats. *J Endocrinol*. 1992; 132 (3):353–359.
- Beattie GM, Knowles AF, Jensen FC et al.:** Induction of sarcomas in athymic mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1982; 79:3033–3036.
- Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ et al.:** Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*. 2002; 108:345–356.
- Berns H, Humar R, Hengerer B et al.:** RACK 1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *FASEB J*. 2000; 14:2549–2558.
- Besnault-Mascard LC, Leprince MT, Auffredou B et al.:** Caspase-8 sumoylation is associated with nuclear localization. *Oncogene*. 2005; 24:3268–3273.
- Bolger GB, Baillie Gs Li X, Lynch MJ et al.:** Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Biochem J*. 2006; 398(1):23–36.
- Buensuceso CS, Woodside D, Huff JL et al.:** The WD kinase C-alpha beta in brain of heroin addicts and morphine-dependent rats. *J Neurochem*. 2001; 64:247–252.
- Bunge A:** Autokrine Effekte von Parathormon-verwandtem Protein (PTHrP) auf invasions-assoziierte Proteasen in Tumorzellen. *Diss*. 1997; Berlin, HB 2548.
- Burtis WJ, Wu T, Bunch C et al.:** Identification of a novel 17,000 dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem*. 1987; 262:7151–7156.
- Burton PB, Moniz C, Knight DE:** Parathyroid hormone-related peptide can function as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 167:1134–1138.
- Burton PB, Knight DE:** Parathyroid hormone-related peptide can regulate the growth of human lung cancer cells, and may form part of an autocrine TGF-alpha loop. *FEBS Lett*. 1992; 305(3):228–3.

- Bylebyl GR, Belichenko I, Johnson ES:** The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem.* 2003; 278:44113–44120.
- Care AD, Abbas SK, Ousey J et al.:** The relationship between the concentration of ionised calcium and parathyroid hormone-related protein (PTHrP 1-34) in the milk of mares. *Equine Vet J.* 1997; 29 (3):186–189.
- Carney SL, Ray C, Ebeling PR et al.:** Synthetic human Parathyroid hormone-related protein and rat renal electrolyte transport. *Miner Electrolyte metab.* 1991; 17 (1):41–45.
- Cataisson C, Lieberherr M, Cros M et al.:** Parathyroid hormone-related peptide stimulates proliferation of highly tumorigenic human SV40-immortalized breast epithelial cells. *J Bone Miner Res.* 2000; 15:2129–2139.
- Chang BY, Conroy KB, Machleder EM et al.:** RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinase and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:3245–3256.
- Chen C, Koh AJ, Datta NS, Zhang J et al.:** Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2004; 279 (28) 29121–29129.
- Chen JG, Ullah H, Temple B et al.:** RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 2006; 57: 2697–2708.
- Chenchik A, Moqadam L & Siebert PD.** in *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis*, ed. Krieg, P. (Wiley, New York) 1996; pp. 273–321.
- Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA et al.:** Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Bio.* 2003; 257:292–301.
- Clohisy JC, Scott DK, Brakenhoff KD et al.:** Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol Endocrinol.* 1992; 11:1834–1842.
- Cornish J, Callon KE, Lin C et al.:** Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res.* 1999; 14 (6): 915–922.
- Costa J, Yee C, Rabson A:** *In vivo* transformation of mesenchymal murine cells in immune suppressed animals bearing human xenograft. *Immune-deficient Animals.* 1984; 230–234.
- Dahong Yu, Seitz PK, Selvanayagam P et al.:** Effects of parathyroid hormone-related peptide on adenosine 3',5'-monophosphate and ornithine decarboxylase in a human colonic cell line. *Endocrinology.* 1992; 130:1993–2003 .
- Datta NS, Chen C, Berry JE et al.:** PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J Bone Miner Res.* 2005; 6:1051–1064.
- Datta NS, Abou-Samra AB:** PTH and PTHrP signalling in osteoblasts. *Cellular Signaling.* 2009; 21:1245–1254.

- Dean T, Vilardaga JP, Potts JT et al.:** Altered selectivity of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) for distinct conformations of the PTH/PTHrP receptor. *Mol Endocrinol.* 2008; 1:156–166.
- Desterro JM, Thomson J and Hay RT:** Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett.* 1997; 417:297–300.
- Desterro JM, Rodriguez MS, Hay RT:** SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell.* 1998; 2:233–239.
- Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP et al.:** Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1996; 93:6025–6030.
- Dittmer J, Gégonne A, Gitlin SD et al.:** Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem.* 1994; 269 (34):21428–21434.
- Dittmer J:** The importance of PTHrP for cancer development. *Gene Ther Mol Biol.* 2004; 8:451–464.
- Dittmer J:** Mechanisms involved in the Regulation of PTHrP Expression. In: C. Luparello (Ed.): Novel Aspects of PTHrP Physiopathology. *Nova Science Publishers Inc Hauppauge USA.* 2007.
- Egidy G, Julé S, Bossé P et al.:** Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. *Mol Cancer.* 2008; 7: 34.
- Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG et al.:** A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of parathyroid hormone - related protein: PTHrP(107-111) *Endocrinology.* 1991; 129 (6):3424–3426.
- Firestein R, Feuerstein N:** Association of Activating Transcription Factor 2 (ATF2) with the Ubiquitin-conjugating Enzyme hUBC9. *J Biol Chem.* 1998; 273:5892–5902.
- Fomenkov A, Zangen R, Huang YP et al.:** RACK1 and Stratifin target Δ Np63 α for a proteasome degradation in head and neck squamous cell carcinoma cells upon DNA damage. *Cell Cycle.* 2004; 3:1285–1295.
- Gensure R.C, Gardella TJ, Jüppner H et al.:** Parathyroid hormone and parathyroid hormone - related peptide, and their receptors. *Biochemicaland Biophysical Research Communications.* 2005; 328:666–678.
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E et al.:** Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2006; 281:10856–10864.
- Gill G:** Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15:536–541.

- Giraud MF, Desterro JM, Naismith JH:** Structure of ubiquitinconjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitinconjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1998; 54 (5):891–898.
- Goldenberg DM, Pavia RA, Tsao MC:** *In vivo* hybridisation of human tumour and normal hamster cells. *Nature.* 1974; 250:649–651.
- Goltzman D, Hendy GN, Banville D:** Parathyroid hormone-like peptide – molecular characterization and biological properties. *Trends Endocrino.* 1989; 1:39–44.
- Gong L, Millas S, Maul G et al.:** Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem.* 2000; 275:3355–3359.
- Guillemot F, Billault A, Auffray C:** Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:4594–4598.
- Gujral A, Burton DW, Terkeltaub R et al.:** Parathyroid hormone-related protein induces Interleukin-8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence. *Cancer Res.* 2001; 61:2282–2288.
- Guo J, Iida Klein A, Huang X et al.:** Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor density modulates activation of phospholipase C and phosphate transport by PTH in LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol.* 1995; 136:3884–3891.
- Guo D, Li M, Zhang Y et al.:** A functional variant of SUMO4, a new I κ B α modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2004; 36: 837–841.
- Guo J, Chen JG:** RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology.* 2008; 8:108.
- Gupta V, Rajaraman S, Gadson P et al.:** Primary transfection as a mechanism for transformation of host cells by human tumor cells implanted in nude mice. *Cancer Res.* 1987; 47:5194–5201.
- Gupta V, Rajaraman S, Eberle R:** Spontaneous induction of malignancy in mouse cells by a human small cell lung cancer implanted in nude mice. *Carcinogenesis.* 1990; 11:713–722.
- Hang J, Dasso M:** Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem.* 2002; 277:19961–19966.
- Hateboer G, Hijmans EM, Nooij JB et al.:** mUBC9, a novel adenovirus E1A-interacting protein that complements a yeast cell cycle defect. *J Biol Chem.* 1996; 271 (42):25906–25911.
- Hay RT:** Protein modification by SUMO. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 322–323.
- Hay RT:** SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 2005; 18:1–12.

- Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H et al.:** Nucleolar localisation of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under condition that promote apoptotic cell death. *Mol Cell Biol.* 1995; 15 (8):4064–4075.
- Hermanto U, Zong CS, Li W et al.:** RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:2345–2365.
- Hershko A, Ciechanover A:** The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67:425–479.
- Hochstrasser M:** Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet.* 1996; 30:405–439.
- Hochstrasser M:** Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nature Cell Biol.* 2000; 2:E153–E157.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL et al.:** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 2002; 419:135–141.
- Horiuchi N, Caulfield MP, Fisher JE et al.:** Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro. *Science.* 1987; 238:1566–1568.
- Huang W, Chung UI, Kronenberg HM et al.:** The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:160–165.
- Iwamura M, Abrahamsson PA, Foss KA et al.:** Parathyroid hormone-related protein: a potential autocrine growth regulator in human prostate cancer cell lines. *Urology.* 1994; 43:675–679.
- Jackson, P. K:** A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* 2001; 15:3053–3058.
- Jentsch S, Pyrowolakis G:** Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* 2000; 10:335–342.
- Johnson ES, Blobel G:** Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26799–26802.
- Johnson ES, Schwienhorst I, Dohmen RJ et al.:** The ubiquitinlike protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J.* 1997; 16:5509–5519.
- Johnson ES:** Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:355–382.
- Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M et al.:** A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science.* 1991; 254:1024–26.
- Jüppner H:** Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone - related peptide: Exploration of their biological importance. *Bone* 1999; 25: 87–90.

- Karaplis AC, Luz A, Glowacki J et al.:** Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes and Development*. 1994; 8:277–289.
- Kiely PA, Sant A, O'Connor R:** RACK1 Is an Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Receptor-interacting Protein That Can Regulate IGF-1-mediated Akt Activation and Protection from Cell Death. *J Biol. Chem.* 2002; 277:22581–22589.
- Klein M, Weryha G, Dousset B et al.:** Physiological role of PTHrP. *Ann Endocrinol.* 1995; 56:193–204.
- Klöppel G, Otto U, Baisch H et al.:** Differenzierung, Wachstum, Stabilität und experimentelle Behandlung von menschlichen Tumoren nach Transplantation auf die thymusaplastische Nacktmaus. *Verh Dtsch Ges Path.* 1988; 72:188–203.
- Knöfel WT, Otto U, Baisch H, Klöppel G:** Stability of human renal cell carcinomas during long term serial transplantation into nude mice: histopathology, nuclear grade, mitotic rate and DNA content in thirty tumors. *Cancer Res.* 1987; 47:221–224.
- Kobayashi S, Shibata H, Kurihara I et al.:** Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2004; 32:69–86.
- Kompf J, Staab HJ, Heilbronner H et al.:** Cell fusion responsible for horizontal oncogenesis by human tumors in nude mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 124:933–938.
- Kovacs CS, Chik CL, Li B, Karpinski E, Ho AK.** Inhibition of serine/threonine protein phosphatases enhances agonist-stimulated cAMP accumulation in UMR 106 osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 110:9-16.
- Kovalenko OV, Plug AW, Haaf T, et al.:** Mammalian ubiquitin-conjugating enzyme UBC9 interacts with Rad 51 recombination protein and localizes insynaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93 (7):2958–2963.
- Kozak CA, Lawrence JB, Ruddle FH:** A sequential staining technique for the chromosomal analysis of interspecific mouse/hamster and mouse/human somatic cell hybrids. *Exp Cell Res.* 1977; 105:109–117.
- Kuo HY, Chang CC, Jeng JC et al.:** SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 (47):16973–16978.
- Kurihara I, Shibata H, Kobayashi S et al.:** Ubc9 and Protein Inhibitor of Activated STAT 1 Activate Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I-mediated Human *CYP11B2* Gene Transcription, *J Bio Chem.* 2005; 280 (8):6721–6730.
- Laney JD, Hochstrasser M:** Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell.* 1999; 97:427–430.

- Lezzoni JC, Bruns ME, Frierson HF et al.:** Coexpression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in breast carcinoma: a potential autocrine effector system. *Mod Pathol.* 1998; 11:265–270.
- Li SJ, Hochstrasser M:** A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature.* 1999; 398:246–251.
- Li SJ, Hochstrasser M:** The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:2367–2377.
- Li T, Evdokimov E, Shen RF et al.:** Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:8551–8556.
- Liang P, Pardee AB:** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science (Wash. DC).* 1992; 257: 967–971.
- Lin X, Liang M, Liang YY et al.:** SUMO-1/Ubc9 promotes nuclear accumulation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem.* 2003; 278 (33):31043–31048.
- Link AJ, Eng J, Schieltz DM et al.:** Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1999; 17:676–682.
- Macisaac RJ, Heath JA, Rodda CP et al.:** Role of the fetal parathyroid glands and parathyroid hormone-related protein in the regulation of placental transport of calcium, magnesium and inorganic phosphate. *Reprod Fertil Dev.* 1991; 3 (4):447–457.
- Martin TJ, Suva LJ:** Parathyroid hormone-related protein: a novel gene product. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1988; 2:1003–1029.
- Martin TJ, Moseley JM, Gillespie MT:** Parathyroid hormone - related protein: biochemistry and molecular biology. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1991; 26 (3-4):377–395.
- Martin TJ:** Parathyroid hormone-related protein. *J Intern Med.* 1993; 233:1–4.
- Massfelder T, Dann P, Wu TL et al.:** Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: A critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:13630–13635.
- McCahill A, Warwicker J, Bolger GB et al.:** The RACK1 Scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol.* 2002; 62:1261–1273.
- McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA et al.:** Proto-Oncogene c-fos is Transcriptionally Regulated by Parathyroid Hormone (PTH) and PTH-Related Protein in a Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Manner in Osteoblastic Cells. *Endocrinology,* 1997; 138 (12):5427–5433.
- McCauley LK, Koh-Paige AJ, Chen H et al.:** Parathyroid hormone stimulates fra-2 expression in osteoblastic cells in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 2001 142 (5):1975–81.

- McDoniels-Silvers AL, Nimri CF, Stoner GD et al.:** Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:1127–38.
- Melchior F:** SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:591–626.
- Melchior F, Schergaut M, Pichler A:** SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28:612–618.
- Mo YY, Moschos SJ:** Targeting UBC9 for cancer therapy. *Rev Expert Opin Ther Targets.* 2005; 9 (6):1203–1216.
- Mo YY, Yu Y, Theodosiou E, et al.:** A role for Ubc9 in tumorigenesis. *Oncogene.* 2005; 24:2677–83.
- Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J:** Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:3997–4000.
- Mochly-Rosen D, Smith BL, Chen CH et al.:** Interaction of protein kinase C with RACK1, a receptor for activated C-kinase: a role in beta protein kinase C mediated signal transduction. *Biochem Soc Trans.* 1995; 23:596–600.
- Moschos SJ, Smith AP, Mandic M, et al.:** SAGE and antibody array analysis of melanoma-infiltrated lymph nodes: identification of Ubc9 as an important molecule in advanced-stage melanomas. *Oncogene.* 2007; 26:4216–4225.
- Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H et al.:** Parathyroid hormone - related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc natl Acad Sci USA.* 1987; 84:5048–5052.
- Müller S, Hoegge C, Pyrowolakis G et al.:** SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:202–210.
- Nakashima A, Chen L, Thao NP, et al.:** RACK1 Functions in Rice Innate Immunity by Interacting with the Rac1 Immune Complex^{[W][OA]}. *Plant Cell.* 2008; 20 (8):2265–2279.
- Nilsson J, Sengupta J, Frank J et al.:** Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Reports.* 2004; 5:1137–1141.
- Nishida T, Tanaka H, Yasuda H:** A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem.* 2000; 267:6423–6427.
- Nishida T, Kaneko F, Kitagawa M et al.:** Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat Axam, which is an Axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem.* 2001; 276:39060–39066.
- Oh HJ, Kido T, Lau YF:** IAS1 interacts with and represses SOX9 transactivation activity. *Mol Repord Dev.* 2007; 74 (11):1446–1455.
- Okuma T, Honda R, Ichikawa G et al.:** In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:693–698.

- Orloff JJ, Soifer NE, Fodero JP et al.:** Accumulation of carboxyl - terminal fragments of parathyroid hormone – related protein in renal failure Kidney. *International*. 1993; 43:1371–1376.
- Orloff JJ, Reddy D, de Papp AE et al.:** Parathyroid hormone-related protein as a prohormone: posttranslational processing and receptor interactions. *Endocr Rev*. 1994; 15:40–60.
- Orloff JJ, Kats Y, Urena P et al.:** Further evidence for a novel receptor for amino-terminal parathyroid hormone-related protein on keratinocytes and squamous carcinoma cell lines. *Eur J Pharmacol*. 1995; 136:3016–3023.
- Padanilam BJ, Hammerman MR:** Ischemia-induced receptor for activated C kinase (RACK1) expression in rat kidneys. *Am J Physiol*. 1997; 272 (2 Pt 2):F160–166.
- Panse VG, Hardeland U, Werner T et al.:** A proteome-wide approach identifies sumoylated substrate proteins in yeast. *J Biol Chem*. 2004; 279:41346–41351.
- Pearman AT, Chou WY, Bergman KD et al.:** Parathyroid hormone induces c-fos promoter activity in osteoblastic cells through phosphorylated cAMP response element (CRE)-binding protein binding to the major CRE. *J Biol Chem*. 1996; 271 (41):25715–25721.
- Philbrick WM, Wysomerski JJ, Galbraith S et al.:** Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev*. 1996; 76:127–173.
- Pichler A, Melchior F:** Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*. 2002; 3:381–387.
- Pichler AP, Knipscheer H, Saitoh TK et al.:** The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11:984–991.
- Potts JT Jr, Gardella TJ, Jüppner H et al.:** The history of parathyroid hormone and its receptor: structure-based design of parathyroid hormone analogues. *Osteoporos Int*. 1997; Suppl. 3:169–173.
- Richard V, Rosol TJ, Foley J:** PTHrP gene expression in cancer: do all paths lead to Ets? *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2005; 15:115–32.
- Rodriguez MS, Dargemont C, Hay RT:** SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem*. 2001; 276:12654–12659.
- Rubin DA, Jüppner H:** Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone – related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone - related peptide. *J Biol Chem*. 1999; 274 (40): 28185–28190.
- Saito A, Fujii G, Sato Y et al.:** Detection of genes expressed in primary colon cancers by in situ hybridisation: overexpression of RACK 1. *Mol Pathol*. 2002; 55:34–39.
- Saitoh H, Sparrow DB, Shiomi T et al.:** Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol*. 1998; 8:121–124.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, N. Y.) 1989.

Sampson DA, Wang M, Matunis M.J: The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SURIO-1 modification. *J Biol Chem.* 2001; 276:21664–21669.

Sapetsching A, Stielow B, Suske G: Wie hemmen SUMOylierte Transkriptionsfaktoren die Genaktivität? *BIOspektrum.* 2008; 14:362–364.

Schlüter KD: PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions. *News Physiol Sci.* 1999 14:243–249.

Schunke D: Die Bedeutung der Ets-regulierten Proteine RhoGDIβ und PTHrP für die Biologie des invasiven Mammakarzinoms. *Diss.* 2008; urn:nbn:de:gbv:3-000014037.

Schwarz SE, Matuschewski K, Liakopoulos D et al.: The ubiquitinlike proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:560–64.

Schwienhorst I, Johnson ES, Dohmen RJ: SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet.* 2000; 263, 771–786.

Seeler JS, Dejean A: Nuclear and unclear functions of sumo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:690–699.

Seitz PK, Cooper KM, Ives KL et al.: Parathyroid hormone-related peptide production and action in a myoepithelial cell line derived from normal human breast. *Eur J Pharmacol.* 1993; 133:1116–1124.

Sengupta J, Nilsson J, Gursky R et al.: Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural and Mol Biology.* 2004; 11:957–962.

Seufert W, Futcher B, Jentsch S : Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature.* 1995; 373:78–81.

Shaulian E, Karin M: AP1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002; 4 (5):131–136.

Sherwin SA, Minna JD, Gazder AF et al.: Small cell and nonsmall cell lung cancer differ in the expression of epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Cancer Res.* 1981; 41:3538–3542

Singer FR: Parathyroid hormone-related protein. *Mayo Clin.* 1990; 65:1502–1508.

Sklan EH, Podoly E, Soreq H: RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2006; 78:117–134.

Sparrow S, Jones M, Billington S et al.: The *in vivo* malignant transformation of mouse fibroblasts in the presence of human tumour xenografts. *Br J Cancer.* 1986; 53:793–797.

- Stark M, Schlipkoter HW:** Xenotransplants of human carcinomas, change of properties in short-term and long-term passages. B. Sordat (ed.) *Immune-deficient Animals* 1984; 250–255.
- Steele MR, McCahill A, Thompson DS et al.:** Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal.* 2001; 13:507–513.
- Stewart AF, Broadus AE:** Parathyroid hormone-related proteins: coming of age in the 1990s. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990; 71:1410–1414.
- Stielow B, Sapetsching A, Wink C et al.:** SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep.* 2008; 9:899–906.
- Strewler GJ, Stern P, Jacobs J et al.:** Parathyroid hormone - like protein from human renal carcinoma cells structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1987; 80:1803–1807.
- Strewler GJ, Nissenson RA:** Peptide mediators of hypercalcemia in malignancy. *Annu Rev Med.* 1990; 41:35–44.
- Strewler GJ:** The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med.* 2000; 342(3):177–185.
- Struckhoff G, Turzynski A:** Demonstration of parathyroid hormone-related protein in meninges and its receptor in astrocytes: evidence for a paracrine meningo-astrocytic loop. *Brain Res.* 1995; 676:1–9.
- Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL et al.:** Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *Biol Chem.* 2001; 276:7586–7592.
- Tashiro K, Pando MP, Kanegae Y et al.:** Direct involvement of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9/Hus5 in the degradation of I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1997; 94:7862–7867.
- Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA et al.:** Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001; 276:35368–35374.
- Tatham MH, Chen Y, Hay RT:** Role of two residues proximal to the active site of Ubc9 in substrate recognition by the Ubc9.SUMO-1 thiolester complex. *Biochemistry.* 2003; 42:3168–3179.
- Tralka TS, Yee CL, Rabson AB et al.:** Murine type C retroviruses and intracisternal A-particles in human tumors serially passaged in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 1983; 7:591–599.
- Turzynski A, Struckhoff G, Colangelo D et al.:** Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) a paracrine factor in astrocytes and an autocrine factor in astrocytomas. *The Peptidergic Neuron.* 1996; 343–351.

- Twardzik DR, Kimball ES, Sherwin SA et al.:** Comparison of growth factors functionally related to epidermal growth factor in the urine of normal and human tumor-bearing athymic mice. *Cancer Res.* 1985; 45:1934–1939.
- Tyson DR, Swarthout JT, Jefcoat SC et al.:** PTH induction of transcriptional activity of the cAMP response element-binding protein requires the serine 129 site and glycogen synthase kinase-3 activity, but not casein kinase II sites. *Endocrinology.* 2002; 143 (2):674–682.
- Usdin TB, Gruber C, Bonner TI:** Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem.* 1995; 270 (26):15455–15458.
- Usdin TB:** Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology.* 1997; 138:831–838.
- Uttamsingh S, Zong CS, Wang LH:** Matrix-independent activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Stat3, and cyclin A-associated Cdk2 is essential for anchorage-independent growth of v-Ros-transformed chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:18798–18810.
- van de Stolpe A, Karperien M, Lowik CW et al.:** Parathyroid hormone-related peptide as an endogenous inducer of parietal endoderm differentiation. *J Cell Biol.* 1993; 120:235–243.
- Varmus H:** Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer. *Cold Spring Harbor, N. Y.* 1989; 3–44.
- Verger A, Perdomo J, Crossley M:** Modification with SUMO. *EMBO Rep.* 2003; 4:137–42.
- Vertegaal AC, Ogg SC, Jaffray E et al.:** A proteomic study of SUMO-2 target proteins. *J Biol Chem.* 2004; 279:33791–33798.
- Wagner EF:** Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum.* 2002; *Diss.* 61 Suppl 2:ii40–2.
- Wang ZY, Qiu QQ, Seufert W, et al.:** Molecular cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human ubiquitin-conjugating enzyme 9. *J Biol Chem.* 1996; 271 (40):24811–24816.
- Watanabe TK, Fujiwara T, Kawai A, et al.:** Cloning expression, and mapping of UBE2I, a novel gene encoding a human homologue of yeast Ubiquitin-conjugating enzymes which are critical for regulating the cell cycle. *Cytogenet Cell Genet.* 1996; 72 (1):86–89.
- Wohlschlegel JA, Johnson ES, Reed SI et al.:** Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2004; 279:45662–45668.
- Wu F, Zhu S, Ding Y et al.:** MicroRNA-mediated Regulation of Ubc9 Expression in Cancer Cells. *Clin Cancer Res.* 2009; 15 (5):1550–1557.
- Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G et al.:** The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J Biol Chem.* 1999; 274:14909–14917.

-
- Yasugi T , Howley PM.** Identifikation of the structural and functional human homolog of the yeast Ubiquitin conjugating enzyme UBC9. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24 (11):2005–2010.
- Yeh ET, Gong L, Kamitani T:** Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene.* 2000; 248:1–14.
- Zabel M, Sieck M, Arps H et al.:** Expression of parathyroid hormone-related protein in malignant human tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1990; 116 (suppl I):635.
- Zhang W, Zong CS, Hermanto U et al.:** RACK1 Recruits STAT3 Specifically to Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptors for Activation, Which Is Important for Regulating Anchorage-Independent Growth. *Mol Cell Biol.* 2006; 26 (2):413–424.
- Zhao Y, Kwon SW, Anselmo A et al.:** Broad spectrum identification of cellular small ubiquitin-related modifier (SUMO) substrate proteins. *J Biol Chem.* 2004; 279:20999–21002.
- Zhao J:** Sumoylation regulates diverse biological processes. *Rev, Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (23):3017–33.
- Zheng F, Liang H, Liu R et al.:** Parathyroid hormone-related protein regulates osteoclast inhibitory lectin expression via multiple signaling pathways in osteoblast-like cells. *Endocr.* 2008; 35:47–56.
- Zhou W, Ryan JJ, Zhou H:** Global analyses of sumoylated proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of protein sumoylation by cellular stresses. *J Biol Chem.* 2004; 279:32262–32268.
- Zondek H, Petrow H, Siebert W:** Die Bedeutung der Kalziumbestimmung im Blute für die Diagnose der Niereninsuffizienz. *Z Klin Med.* 1924; 99:129–132.

7 Anhang

7.1 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Elke Heinrich, die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „Nachweis regulierter Gene nach Behandlung mit dem Parathormon-verwandten Protein (PTHrP)“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Weder gegenwärtig noch in der Vergangenheit habe ich anderwärts ein Promotionsverfahren beantragt. Auch erkläre ich die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ferner versichere ich, dass die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten enthält.

Datum:

Unterschrift:

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Manfred Dietel und Dr. Andreas Turzynski, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können, für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel.

Des Weiteren danke ich vielmals Dr. Andreas Turzynski für die Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen und den molekularbiologischen Arbeitstechniken, für die Betreuung während der experimentellen Phase und die Korrekturlesung der Promotionsschrift.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre stets verfügbaren konstruktiven fachlichen Diskussionen und Hilfestellungen. Hervorheben möchte ich Prof. Dr. Dr. Hermann Lage, Prof. Dr. Reinhold Schäfer, PD Dr. Christine Sers, PD Dr. Kai Wiechen und Dr. Simone Petersen.

Ganz besonders großen Dank schulde ich Dr. Martin Schultz für seine kontinuierlich freundliche, sachbezogene Diskussionsbereitschaft und die unermüdliche Hilfe bei Problemen der Computertechnik.

7.3 Lebenslauf:

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“