

Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Bedeutung von Insulin-like growth Factor II (IGF-II) und
IGF-Bindungsprotein-4 in der Kolonkarzinogenese:
In vitro und *in vivo* Studien**

Daniela Diehl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel
2. Univ.-Prof. Dr. E. Wolf (Ludwig-Maximilians-Universität München)
3. Priv.-Doz. Dr. A. Rühl

Die Dissertation wurde am 01.07.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.10.2004 angenommen.

Erklärung

Die vorliegende Dissertation „**Bedeutung von Insulin-like growth Factor II (IGF-II) und IGF-Bindungsprotein-4 in der Kolonkarzinogenese: *In vitro* und *in vivo* Studien**“ wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

München, den 01.07.2004

Daniela Diehl

Frau Prof. Dr. H. Daniel danke ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.

Herrn Prof. Dr. E. Wolf danke ich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung während der Promotionszeit und für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. H. D. Meyer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Priv.-Doz. Dr. A. Rühl danke ich für die Übernahme des Koreferates

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E., and Lahm, H., (2004) Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Research* 64 (March 1): 1600-1603 (Originalarbeit)

Zhou, R., **Diehl, D.,** Hoeflich, A., Lahm, H. and Wolf, E. (2003) IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *Journal of Endocrinology* 178(2): 177-193 (Review)

Diehl, D., Bauersachs, S., Blum, H., Wolf, E. and Lahm, H. (2002) Effects of IGFBP-4 overexpression on proliferation, colony formation, invasive activity and gene expression patterns in LS1034 human colorectal cancer cells. *Hormone Research*, 58 (5): 260 (Abstract)

Diehl, D., Schönfeld, R., Wolf, E., Lahm, H. and Oesterle, D. (2002) Development of 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic aberrant crypt foci in PEPCK-IGF-II transgenic mice. *Arch. Pharmacol.*, 365 S1: R130 (Abstract)

Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E. and Lahm, H. (2001) Role of insulin-like growth factor II and IGF-binding proteins for growth and tumorigenesis of colorectal carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. Eli Lilly International Foundation, 2nd Workshop, Hamburg, June 28: pp. 32–33.(Artikel)

Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E. and Lahm, H. (2001) Expression and biological function of insulin-like growth factor-binding protein-4 in human colorectal carcinoma cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 127 S1: 54.(Abstract)

Diehl, D., Hoeflich, A., Sordat, B., Wolf, E. and Lahm, H. (2000) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of human colorectal carcinoma cells. *Growth Horm. IGF Res.*, 10: A25. (Abstract)

Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E. and Lahm, H. (2000) Expression of insulin-like growth factor-binding proteins by human colorectal cancer cell lines. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 108 S1: 87.(Abstract)

Eingereichte Originalarbeiten:

Diehl, D., Lahm H., Wolf E., Bauersachs S. (2004) Transcriptome analysis of a human colorectal cancer cell line reveals molecular targets of insulin-like growth factor-binding protein 4 overexpression. *Int. J. Cancer*, zur Publikation angenommen.

in Vorbereitung:

Diehl, D., Kunder, S., Oesterle, D., Quintanilla-Martinez-Fend, L., Wolf, E and Lahm, H. (2004) Incidence and size of colonic aberrant crypt foci and size of adenomas induced by 1,2-dimethylhydrazine is augmented in PEPCK-IGF-II transgenic mice.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	II
Abbildungen und Tabellen.....	III
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Das Kolonkarzinom.....	2
2.1.1 Wachstumsregulation der Zelle.....	2
2.1.2 Zellreifung im Kolon	3
2.1.3 Mutationen	4
2.1.4 Mechanismus der chemisch induzierten Karzinogenese	5
2.1.4.1 Das Karzinogen 1,2-Dimthylhydrazin (DMH).....	6
2.1.4.2 DMH induziertes CRC in Nagern: Zeitlicher Ablauf der Tumorentstehung	7
2.1.5 Das Modell der kolorektalen Karzinogenese.....	8
2.1.5.1 Die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz.....	9
2.1.5.1.1 <i>Atypische Kolonkrypten: Aberrant Crypt Foci (ACF)</i>	9
2.1.5.1.2 <i>Adenome</i>	10
2.1.5.1.3 <i>Karzinome</i>	10
2.1.5.2 An der Tumorenstehung im Kolon beteiligte Gene.....	11
2.1.5.2.1 <i>Protoonkogene</i>	11
2.1.5.2.2 <i>Tumorsuppressorgene</i>	11
2.1.5.2.3 <i>DNA-Mismatch-Reparaturgene (DNA-MMR-Gene)</i>	12
2.1.5.2.4 <i>Weitere beteiligte Gene</i>	13
2.1.5.3 CRC-relevante Gene und ihre Bedeutung für die ACF-Adenom- Karzinom-Sequenz.....	13
2.1.5.3.1 <i>K-ras- und APC-Mutationen</i>	14
2.1.5.3.2 <i>Mutationen in DNA-MMR Genen</i>	15
2.1.5.3.3 <i>Mutationen in p53</i>	16
2.2 Das Insulin-like-growth-factor System.....	18
2.2.1 Allgemeine Wirkungsmechanismen von Wachstumsfaktoren	18

2.2.2	Liganden des IGF-Systems: IGF-I und IGF-II	19
2.2.2.1	Genlokalisierung von IGF-II	19
2.2.2.2	Struktur des <i>IGF2</i> -Gens und -Proteins	19
2.2.2.3	IGFs: Wirkung und Expression.....	20
2.2.2.4	Bedeutung von IGF-II in der Tumorgenese	21
2.2.3	Rezeptoren des IGF-Systems: IGF-IR und IGF-IIR	24
2.2.3.1	IGF-I-Rezeptor (IGF-IR)	24
2.2.3.2	IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR)	27
2.2.4	Bindungsproteine für IGFs	29
2.2.4.1	Genlokalisierung der IGFBPs	29
2.2.4.2	Struktur der IGFBP-Gene und -Proteine	29
2.2.4.3	Posttranslationale Modifikationen und Bindungsmotive	30
2.2.4.4	Expression und Serumspiegel.....	32
2.2.4.5	Wirkungen der IGFBPs: IGF-abhängige und IGF-unabhängige Effekte	33
2.2.5	Proteasen der Bindungsproteine.....	35
2.2.6	Das IGF-Bindungsprotein-4 (IGFBP-4).....	37
2.2.6.1	Genomische Lokalisation und Promotorregion.....	37
2.2.6.2	cDNA und Protein.....	37
2.2.6.3	IGFBP-typische Domänen: Aufteilung und Eigenschaften im IGFBP- 4-Protein.....	38
2.2.6.3.1	<i>Die N-terminale Domäne: IGF-Bindung</i>	38
2.2.6.3.2	<i>Die Linker-Region: Glykosylierung</i>	39
2.2.6.3.3	<i>Die C-terminale Domäne: Lokalisation von Bindungsmotiven...</i>	40
2.2.6.4	Regulation von IGFBP-4 auf Transkriptionsebene	42
2.2.6.5	Regulierung von IGFBP-4 durch Proteolyse.....	45
2.2.6.6	Expression und Wirkung von IGFBP-4	48
2.2.6.7	Expression und Wirkung von IGFBP-4 in Tumorzelllinien und Tumorgeweben	51
2.2.6.7.1	<i>IGF-bindungsabhängige Effekte</i>	52
2.2.6.7.2	<i>IGF-bindungsunabhängige Effekte</i>	53
3	Problemstellung und Zielsetzung.....	54
4	Material.....	56

4.1	Versuchstiere	56
4.2	Verwendete Zelllinien	57
4.2.1	LS1034.....	57
4.2.2	Isreco-1, -2, -3.....	58
4.2.3	Co115	59
4.2.4	NCOL-1.....	59
4.3	pCI-neo-miGFBP-4 Konstrukt	60
4.4	Chemikalien und sonstige Materialien.....	60
4.4.1	Antikörper.....	60
4.4.2	Chemikalien	61
4.4.3	Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie.....	62
4.4.4	Geräte	63
4.4.5	Molekulargewichtstandards für DNA und Protein	64
4.4.6	Radiochemikalien.....	65
4.4.7	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial	65
4.5	Zusammensetzung der Puffer.....	66
4.5.1	Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur	66
4.5.1.2	Fötales Kälberserum (FKS).....	66
4.5.1.3	Nährmedium für Co115- und LS1034-Zellen.....	66
4.5.1.4	Nährmedium für Isreco-1-Zellen.....	66
4.5.1.5	Nährmedium für Isreco-2- und Isreco-3-Zellen.....	66
4.5.1.6	Nährmedium für NCOL-1-Zellen.....	66
4.5.1.7	Methylcellulose (Stocklösung).....	67
4.5.1.8	MTT (Stocklösung).....	67
4.5.1.9	Trypanblaulösung.....	67
4.5.1.10	PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4).....	67
4.5.2	Puffer für molekularbiologische Methoden.....	67
4.5.2.1	DEPC-H ₂ O (0,1 %).....	67
4.5.2.2	10x DNase I-Puffer.....	68
4.5.2.3	Kawasaki-Puffer	68
4.5.2.4	Proteinase K-Lösung.....	68
4.5.2.5	TE-Puffer	68

4.5.3	Puffer für Agarosegele	68
4.5.3.1	Laufpuffer	68
4.5.3.1.1	50x TAE-Puffer	68
4.5.3.1.2	10x TBE-Puffer	69
4.5.3.2	Probenpuffer	69
4.5.3.2.1	6x Probenpuffer für DNA	69
4.5.3.2.2	2,5x Probenpuffer (HSE)	69
4.5.4	Puffer für SDS-Page und Westernblot	69
4.5.4.1	Puffer A	69
4.5.4.2	5x Equilibrierungspuffer	69
4.5.4.3	10x Laufpuffer	70
4.5.4.4	10x Transferpuffer	70
4.5.4.5	Ponceau-Lösung	70
4.5.4.6	TBS (Tris gepufferte Salzlösung, Tris-Saline)	70
4.5.5	Puffer für subtraktive cDNA-Banken und cDNA-Arrays	70
4.5.5.1	4x Hybridisierungspuffer für die subtraktive Hybridisierung	70
4.5.5.2	Stopp-Puffer zum Beenden der subtraktiven Hybridisierung	70
4.5.5.3	LB-Medium	71
4.5.5.4	LB-Agar-Platten	71
4.5.5.5	SOC-Medium	71
4.5.5.6	1,2x PP-Puffer für die Herstellung von cDNA-Arrays	71
4.5.5.7	10x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,5)	72
4.5.6	Puffer und Lösungen für die Sektion und Histochemie	72
4.5.6.1	Injektions-Puffer	72
4.5.6.2	Färbelösungen	72
4.5.6.2.1	DAB-Farbstoff (Stocklösung)	72
4.5.6.2.2	DAB-Farbstoff (Färbelösung)	72
4.5.6.2.3	Eosin-Lösung, gelblich (0,5 %)	72
4.5.6.2.4	Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung	73
4.5.6.2.5	Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich	73
4.5.6.2.6	Methylenblaulösung	73
4.5.6.2.7	Methylengrünlösung	73
4.5.6.3	Fixierlösungen	74
4.5.6.3.1	Formalinlösung	74
4.5.6.3.2	Paraformaldehydlösung	74

4.5.6.4	Puffer und Waschlösungen	74
4.5.6.4.1	<i>Borsäure-Borat-Puffer (pH 7,6)</i>	74
4.5.6.4.2	<i>0,1 M Citratpuffer (pH 4,8)</i>	74
4.5.6.4.3	<i>0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5)</i>	74
4.5.6.4.4	<i>0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5)</i>	75
4.5.6.4.5	<i>0,01 M PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,5)</i>	75
4.5.6.4.6	<i>0,05 M Tris-Puffer (pH 7,6)</i>	75
4.5.6.4.7	<i>0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) für Immunhistochemie</i>	75
4.5.6.5	Reaktionslösungen.....	76
4.5.6.5.1	<i>Antikörper-Stocks</i>	76
4.5.6.5.2	<i>Hexosaminidase-Substratlösung</i>	76
4.5.6.5.3	<i>Hexosaminidase-Gebrauchlösung</i>	76
4.5.6.5.4	<i>Trypsinlösung</i>	76
4.5.6.6	Sonstige Lösungen.....	76
4.5.6.6.1	<i>BSA-Lösung</i>	76
4.5.6.6.2	<i>Essigsäure (0,1 %)</i>	77
4.5.6.6.3	<i>H₂O₂-Lösung (3 %)</i>	77
4.5.6.6.6	<i>Polyvinylalkohollösung</i>	77
4.5.6.6.7	<i>Salzsäure-Ethanol-Lösung</i>	77
4.5.6.6.8	<i>Saccharoselösung</i>	77
4.6	Primer, Nukleotide und Oligonukleotide.....	78
5	Methoden	80
5.1	Methoden der Zellkultur	80
5.1.1	Kultivierung der Zellen	80
5.1.2	Kryokonservierung von Zellen	80
5.1.3	Re-Passagierung der Zellen	80
5.1.4	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest.....	81
5.1.5	Proliferationsmessung	81
5.1.6	Koloniebildung in semi-soliden Medien.....	82
5.1.7	Messung der Invasion	83
5.1.8	Stabile Transfektion der Kolonkarzinomzelllinien.....	84
5.1.9	Herstellung konditionierter Medien.....	85
5.2	Methoden zur Proteinanalyse	85

5.2.1	Proteinfällung aus serumfreien Überständen.....	85
5.2.2	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	85
5.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	86
5.2.3.1	Herstellung der analytischen Gele.....	86
5.2.3.2	Vorbereitung der Proben	87
5.2.3.3	Beladen des Gels und Elektrophoresebedingungen	88
5.2.3.4	Westernblot	88
5.2.3.5	Ponceau-S-Färbung.....	89
5.2.4	Immunoblot	89
5.2.5	Ligandenblot	90
5.3	Methoden der Molekularbiologie	90
5.3.1	Verdau mit Restriktionsenzymen	90
5.3.2	Kawasakiverdau.....	91
5.3.3	Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen und Organen	91
5.3.4	Bestimmung der Qualität der isolierten RNA	92
5.3.5	DNase-Verdau	93
5.3.6	Reverse Transkription (RT) für Standard-PCR	93
5.3.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	94
5.3.7.1	Kontrolle der Transfektion	94
5.3.7.2	Expressionsanalyse von IGF-BPs und IGF-II	94
5.3.7.3	Identifikation von PEPCK-IGF-II transgenen Mäusen	95
5.3.7.4	Nachweis der mRNA von hIGF-II und mIGF-II im Kolongewebe DMH-behandelter und unbehandelter Mäuse.....	95
5.3.7.5	PCR-Reaktion	96
5.3.8	Agarosegelelektrophorese	97
5.3.8.1	TAE-Agarosegele	98
5.3.8.2	TBE-Agarosegele	98
5.4	Untersuchung der Genexpression	99
5.4.1	Theorie der Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken.....	99
5.4.2	Komponenten der subtraktiven cDNA-Banken	101
5.4.3	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	101
5.4.4	Phenolextraktion von cDNA.....	101
5.4.5	Fällung von cDNA oder RNA	102

5.4.6	cDNA-Synthese für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank und cDNA-Hybridisierungssonden	102
5.4.6.1	Erststrangsynthese.....	102
5.4.6.2	Zweitstrangsynthese	103
5.4.6.3	cDNA für subtraktive Bank	104
5.4.6.4	cDNA-Sonden für die Hybridisierung.....	104
5.4.7	Spaltung mit <i>RsaI</i>	104
5.4.8	Adaptorligation an die cDNA.....	105
5.4.9	Subtraktive Hybridisierung	106
5.4.10	Suppressor-PCR.....	106
5.4.10.1	Erste PCR-Amplifizierung.....	107
5.4.10.2	Zweite PCR-Amplifizierung.....	107
5.4.11	Klonierung der cDNA-Fragmente in ein geeignetes Plasmid.....	108
5.4.11.1	Fällung der PCR-Produkte	108
5.4.11.2	Spaltung der cDNA mit BssH II	108
5.4.11.3	Größenfraktionierung der cDNA.....	109
5.4.11.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	109
5.4.11.5	Ligation der cDNA in ein Plasmid	110
5.4.12	Mikrodialyse	110
5.4.13	Elektroporation	110
5.4.14	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	111
5.4.14.1	Ausplattierung auf LB-Platten.....	111
5.4.14.2	Abschwemmen der Kolonien und Isolierung der Plasmid-DNA.....	111
5.4.15	Herstellung von cDNA-Arrays	112
5.4.15.1	PCR-Amplifizierung von cDNA-Fragmenten aus Bakterienzellen .	112
5.4.15.1.1	Vorbereitung der PCR-Proben.....	112
5.4.15.1.2	Amplifizierung der Klone mit PCR.....	112
5.4.15.1.3	Herstellung von cDNA-Arrays mit 192 oder 1536 Proben.....	113
5.4.15.1.4	Herstellung von cDNA-Arrays mit einem Replikationssystem per Hand.....	114
5.4.15.1.5	Vollautomatische Herstellung von cDNA-Mikroarrays mit bis zu 1536 Proben mit einem Spot-Roboter.....	115
5.4.15.1.6	DNA-Bindung an die Membran	116
5.4.15.2	Herstellung von radioaktiv markierten cDNA-Sonden für die Hybridisierung	116

5.4.15.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden.....	117
5.4.15.4	Auswertung der Signale	118
5.5	<i>In vivo</i>-Untersuchung zur Karzinogenese im Kolon der Maus	118
5.5.1	Erzeugung von aberranten Krypten (AC) und Tumoren	118
5.5.2	Gewinnung der Blutproben	119
5.5.3	Bestimmung der IGF-II-Spiegel im Serum mittels Radioimmunoassay	119
5.5.4	Organentnahme	120
5.5.5	Präparation der Därme zur Auswertung von ACF und Tumorpräparation	120
5.5.5.1	ACF	120
5.5.5.2	Sichtbare Tumore	120
5.5.6	Bestimmung von ACF am ungeschnittenen Kolon.....	121
5.5.6.1	Methylenblaufärbung.....	121
5.5.6.2	Bestimmung der β -Hexosaminidase Aktivität	122
5.5.7	Paraffineinbettung.....	123
5.5.8	Entparaffinierung und Rehydratisierung von Paraffinschnitten	124
5.5.9	Histopathologische Bewertung von ACF und Tumoren	124
5.5.9.1	Färbung mit Hämalaun und Eosin (H&E)	124
5.5.10	Identifikation von S-Phase-Zellen mit Bromdesoxyuridin (BrdU)	124
5.5.10.1	Immunhistologie	125
5.6	Statistik	126
5.6.1	Statistische Datenauswertung Zellkultur.....	126
5.6.2	Statistische Datenauswertung Genexpression	126
5.6.3	Statistische Datenauswertung des <i>in vivo</i> Versuchs.....	126
6	Ergebnisse	127
6.1	Expression von IGF-Bindungsproteinen und IGF-II in Kolonkarzinomzelllinien	127
6.1.1	Nachweis der Expression mittels RT-PCR in 22 Karzinomzelllinien des Kolons	127
6.1.2	Nachweis der Expression IGF-II-bindender Proteine mittels Ligandenblot in einigen ausgewählten Zelllinien des Kolons	128

6.2	Überexpression von mIGFBP-4 durch Transfektion verschiedener humaner Kolonkarzinomzelllinien	130
6.2.1	Überprüfung der sense- und antisense-Richtung der mIGFBP-4 cDNA im Transfektionsvektor pCI-neo mittels Restriktionsanalyse.....	130
6.2.2	Selektion der Klone mit G418	131
6.2.3	Expression von mIGFBP-4 und IGF-II auf mRNA-Ebene in Mutterlinie und Zellklonen.....	133
6.2.4	Expression des mIGFBP-4-Proteins in Mutterlinie und transfizierten Zellklonen von LS1034-, Isreco-1- und Isreco-2-Zellen	135
6.3	Funktionelle Analyse von IGFBP-4	136
6.3.1	Wirkung von IGFBP-4 auf die Proliferation	136
6.3.2	Wirkung von IGFBP-4 auf die Koloniebildung.....	139
6.3.3	Wirkung von IGFBP-4 auf die Invasion	142
6.4	Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken aus nicht-transfizierten und mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellen unter Verwendung der „Suppression-Subtractive-Hybridization“-Methode	144
6.4.1	Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA.....	144
6.4.2	cDNA-Synthese und Spaltung mit <i>RsaI</i>	146
6.4.3	Ligation der Adaptoren an <i>RsaI</i> -gespaltene cDNA-Fragmente.....	146
6.4.4	Subtraktive Hybridisierung und Suppressor-PCR	147
6.4.5	Klonierung der subtrahierten cDNA	149
6.4.6	Amplifizierung der cDNA-Insertionen mittels PCR	151
6.4.7	Herstellung von cDNA-Arrays und anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden.....	151
6.5	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	154
6.5.1	Durch mIGFBP-4-Expression hochregulierte Transkripte.....	155
6.5.2	Durch mIGFBP-4 Expression verminderte Transkripte.....	158
6.5.3	Transkripte, deren Menge durch die Transfektion beeinflusst wurde	164
6.6	Wirkung von IGF-II auf die chemisch induzierte kolorektale Karzinogenese <i>in vivo</i>	166

6.6.1	Identifikation von PEPCK-IGF-II-transgenen Tieren	166
6.6.2	Einteilung der Versuchsgruppen	166
6.6.3	Wirkung der DMH-Behandlung auf die Expression von IGF-II im Kolon	167
6.6.4	Wirkung der DMH-Behandlung auf die Gewichtsentwicklung	168
6.6.5	Quantifizierung von ACF im Kolon nach Initiation mit DMH	169
6.6.6	Quantifizierung von IGF-II im Serum	172
6.6.7	Korrelation der Serum-IGF-II-Spiegel mit der Anzahl von entwickelten ACF	173
6.6.8	Darstellung von ACF im histologischen Schnitt	174
6.6.9	Tumorentwicklung in der späten Phase der Karzinogenese	176
6.6.10	Korrelation der IGF-II-Spiegel im Serum mit der Anzahl und dem Volumen der entwickelten Tumore	177
7	Diskussion	179
7.1	IGFBP-4 und Kolonkarzinogenese	179
7.1.1	Expressionsmuster der IGFBPs in Kolonzelllinien	180
7.1.2	Expression von mIGFBP-4	180
7.1.3	Effekte von mIGFBP-4 auf Proliferation, Transformation und Invasion	182
7.2	Genexpressionsanalyse	185
7.2.1	Effekte von mIGFBP-4 auf die Transkript-Spiegel Proteolyse- relevanter Gene	186
7.2.2	Effekte von IGFBP-4 auf mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Gene und von Wachstumsfaktor-Genen	187
7.2.3	Wirkung von IGFBP-4 auf mRNA-Spiegel von Signaltransduktions- relevanten Genen	188
7.2.4	Wirkungen von IGFBP-4 auf Tumormarker	189
7.2.5	Wirkung von IGFBP-4 auf Gene, die am Elektronen- oder Anionen- Transport beteiligt sind	191
7.2.6	IGFBP-4-Wirkung auf Gene des Metabolismus	192
7.3	Wirkungen von IGF-II im sporadischen CRC <i>in vivo</i>	193

7.3.1	DMH-induzierte Kolonkarzinogenese versus APC-Mutationsmodelle	193
7.3.2	IGF-II und spontane Tumorenstehung	194
7.3.3	Wirkung von IGF-II auf frühe Stadien und späte Stadien der chemisch-induzierten Karzinogenese	195
7.3.4	IGF-II und Initiation	197
8	Zusammenfassung	198
9	Summary	201
10	Literaturverzeichnis.....	203

Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
AS	Aminosäuren (amino acids)
Abb.	Abbildung
AC	abnormale Krypte (aberrant crypt)
ACF	abnormaler Krypten Focus (aberrant crypt foci)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AK	Antikörper
APS	Ammonium Peroxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare (base pairs)
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CDK	cyklinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
CEA	carcinoembryonales Antigen (carcinoembryonic antigen)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CpG island	Zytosin paart Guanin-Insel (Cytosin pairs Guanin)
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
CRC	Kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma)
CRF	Chronisches Nierenversagen (chronic renal failure)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EB1089	Vitamin D Analog

ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii
FKS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
<i>g</i>	relative centrifugal force (RCF) ($= 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$)
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GHRA	Antagonist des GH-Rezeptors (GH receptor antagonist)
GHRP-2	GH releasing peptide-2
G-Proteine	Guanosin-Triphosphat bindende Proteine
H&E	Hämatoxylin und Eosin
h	Stunde
hCG	menschliches Choriongonadotropin (human chorion gonadotropin)
Hepes	(N-2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
ICM	innere Zellmasse (inner cell mass)
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IGFBP-rPs	IGFBP-related proteins
IGFBPs	IGF-Bindungsproteine (IGF binding proteins)
IGF-I, II	Insulin-like growth factor-I bzw. II
<i>IGF2</i>	IGF-II-Gen
IGF-IIR	IGF-Rezeptor Typ II
IGF-IR	IGF-Rezeptor Typ I
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Kontr.	Kontrolle
l	Liter

LOH	Verlust des zweiten Alles (loss of heterozygosity)
LOI	Verlust der Geninaktivierung durch Methylierung (loss of imprinting)
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
Min	multiple intestinale Neoplasien
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
mRNA	messenger RNA
MTT	(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5, diphenyl tetrazolium bromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OP-1	Osteogenic Protein-1
<i>P</i>	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAPP-A	Schwangerschaft-assoziiertes-Plasmaprotein-A (pregnancy-associated-plasma protein-A)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PDGF-BB	Wachstumsfaktor aus Blutplättchen-BB (platelet derived growth factor-BB)
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pg	Picogramm
PHA	Phytohemagglutinin
PMSG	Serumgonadotropin (pregnant mare's serum gonadotropin)
POD	Peroxidase
PTH	Parathormon (parathyroid hormone)
RA	Retinolsäure (retinoic acid)
RB	Retinoblastom Protein (Regulatorprotein im Zellzyklus)
RIA	Radioimmunoassay

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
R-Punkt	Restriktionspunkt
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin (Tetraiodthyronin)
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tg	Transgen
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultra-Violett
V	Volt
wt	Wildtyp
WT-1	Wilms Tumor-1 Protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungen

Abb. 1: Zellzykluskontrolle.....	3
Abb. 2: Mehrstufenmodell der chemisch induzierten Karzinogenese.....	6
Abb. 3: Metabolische Aktivierung von 1,2-Dimethylhydrazin.....	7
Abb. 4: Wechselwirkungen verschiedener, an der Entstehung des sporadischen CRC beteiligter Gene.....	17
Abb. 5: Strukturhomologie zwischen Insulin und IGFs.....	20
Abb. 6: Struktur des IGF-IR und einige seiner Signaltransduktionswege.....	26
Abb. 7: Struktur und Wirkung des IGF-IIR.....	28
Abb. 8: Schematische Darstellung der Gen- und Proteinstruktur der IGFBPs.....	32
Abb. 9: Schematische Darstellung von IGFBP-4.....	42
Abb. 10: Schematische Darstellung des pCI-neo-Expressionsvektors und des pCI-neo-mIGFBP-4-Konstrukts.....	60
Abb. 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Methode.....	100
Abb. 12: Beispiel für die Anordnung von Proben auf einer 384-well-Platte.....	114
Abb. 13: Beispielhafter Ausschnitt von der Probenaufteilung auf einer handgespotteten Membran.....	115
Abb. 14: Schema zur Vermessung eines Tumors.....	121
Abb. 15: Autoradiographische Identifizierung IGF-II-bindender Proteine aus conditionierten Medien.....	129
Abb. 16: Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA von pCI-neo, pCI-neo-mIGFBP-4 antisense und pCI-neo-IGFBP-4 sense.....	131
Abb. 17: Hemmung der Proliferation von LS1034-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.....	132
Abb. 18: Hemmung der Proliferation von Isreco-1-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.....	132
Abb. 19: Hemmung der Proliferation von Isreco-2-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.....	132
Abb. 20: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten mIGFBP-4 sowie von IGF-II und β -Aktin mittels RT-PCR in LS1034-Zellen und den korrespondierenden Klonen.....	134
Abb. 21: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten mIGFBP-4 und von β -Aktin mittels RT-PCR in Isreco-1-Zellen und den korrespondierenden Klonen.....	134
Abb. 22: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten mIGFBP-4 und von β -Aktin mittels RT-PCR in Isreco-2-Zellen und den korrespondierenden Klonen.....	134
Abb. 23: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie LS1034.....	135
Abb. 24: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie Isreco-1.....	136
Abb. 25: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie Isreco-2.....	136
Abb. 26: Wirkung von mIGFBP-4 auf die basale und IGF-II-stimulierte Proliferation in LS1034-	

Zellen.	137
Abb. 27: Wirkung von mIGFBP-4 auf die Proliferation in Isreco-1-Zellen mit und ohne IGF-II.	138
Abb. 28: Wirkung von mIGFBP-4 auf die basale und IGF-II-stimulierte Proliferation in Isreco-2-Zellen.	139
Abb. 29: Koloniebildung in LS1034-Zellen.....	140
Abb. 30: Koloniebildung in Isreco-1-Zellen.	141
Abb. 31: Koloniebildung in Isreco-2-Zellen.	141
Abb. 32: Wirkung von mIGFBP-4 auf die Invasionsrate von LS1034-Zellen mit und ohne IGF-II als „Chemotaxin“	143
Abb. 33. Wirkung von mIGFBP-4 auf die Invasionsrate von Isreco-1-Zellen mit und ohne IGF-II als „Chemotaxin“	143
Abb. 34: Gelanalyse der angereicherten poly (A) ⁺ -RNA und der poly (A) ⁻ -RNA.	145
Abb. 35: Gelanalyse der cDNA vor und nach <i>RsaI</i> -Spaltung.	146
Abb. 36: Gelanalyse der Kontrolligation der Adaptoren 1 und 2 an einen DNA-Längenstandard (BM-IX).	147
Abb. 37: Suppressor-PCR.....	149
Abb. 38: Größenfraktionierung der subtrahierten und <i>Bss</i> HII-gespaltenen cDNA von LS1034- und CI15-Zellen.....	150
Abb. 39: Isolierung der Plasmid-DNA aus abgeschwemmten <i>E. coli</i> -Kolonien.....	150
Abb. 40: PCR-Amplifizierung der cDNA-Insertionen aus <i>E. coli</i>	151
Abb. 41: Beispiel verwendeter cDNAs für die radioaktive Markierung.....	152
Abb. 42: Größenvergleich eines Makroarrays (A) zu einem Mikroarray (B).	153
Abb. 43: Durch mIGFBP-4 Expression hochregulierte mRNAs.....	156
Abb. 44: Durch mIGFBP-4 in ihrer Menge reduzierte Transkripte.....	159
Abb. 45: Transkripte, die in ihre Menge durch mIGFBP-4 und durch die Transfektion beeinflusst wurden.....	162
Abb. 46: mRNA-Spiegel, die durch den Transfektionsprozess und/oder die G418-Selektion verändert wurden.	164
Abb. 47: PCR-Analyse der PEPCK-hIGF-II-transgenen (tg)- und Wildtyp (wt)-Tiere nach Kawasakiverdau der Schwanzprobe.	166
Abb. 48: Expression von hIGF-II und mIGF-II im Kolongewebe DMH-behandelter und unbehandelter Tiere.	168
Abb. 49: Wachstumskurven von PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen (tg) und nicht transgenen Wurfgeschwistern (wt) mit oder ohne DMH-Behandlung.	169
Abb. 50: Methylenblau-gefärbte Kolonmukosa des frischen ungeschnittenen Kolons aus DMH-behandelten und unbehandelten Tieren.	170
Abb. 51: Nachweis der β -Hexosaminidase-Aktivität am frischen ungeschnitten Kolon von DMH-behandelten und unbehandelten Tieren.	170
Abb. 52: Anzahl von ACFs mit unterschiedlicher Anzahl ACs im Focus in IGF-II-transgenen Mäusen (tg) oder ihren Wildtyp Wurfgeschwistern (wt).....	171
Abb. 53: Gesamtanzahl an ACF in DMH-behandelten Mäusen.....	172
Abb. 54: Effekte von DMH und Alter auf die Serum-IGF-II-Spiegel von IGF-II-transgenen und	

nicht-transgenen Mäusen.....	173
Abb. 55: Korrelation von Serum-IGF-II und der Anzahl gebildeter ACF.....	174
Abb. 56: ACF im H&E-Schnitt und nach Immunhistochemischerfärbung des inkorporierten BrdU.....	175
Abb. 57: Sichtbare Tumore auf der Darmmukosa 34 Wochen nach der letzten DMH-Injektion.	176
Abb. 58: Effekt von IGF-II auf die Anzahl der Tumore.....	177
Abb. 59: Effekt von IGF-II auf das Tumolvolumen.....	177
Abb. 60: Korrelation von Serum-IGF-II mit Tumoranzahl und TumorgroÙe.....	178

Tabellen

Tab. 1: Charakteristika transgener IGF-II-Mausmodelle modifiziert nach Wolf <i>et al.</i> 1998 [632].	23
Tab. 2: IGFBP-4-regulierende Substanzen: <i>in vitro</i> und/oder <i>in vivo</i>	43
Tab. 3: Expressionsmuster der mRNAs von IGF-II und den IGFBP-4 in 22 verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien und einer Zelllinie aus normalen Kolonozyten.....	128
Tab. 4: Nomenklatur der Gene, deren Transkripte durch mIGFBP-4 Expression in LS1034-Zellen hochreguliert wurden.....	157
Tab. 5: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch mIGFBP-4 Expression in LS1034-Zellen vermindert wurden.....	160
Tab. 6: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch mIGFBP-4 Expression, aber auch durch die Transfektion in LS1034-Zellen beeinflusst wurden.....	163
Tab. 7: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch den Transfektionsprozess und/oder die G418-Selektion verändert wurden.....	165
Tab. 8: Inzidenz, Verteilung und Gesamtanzahl der Tumore.....	176

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen in der westlichen Welt [1]. Es entsteht in einem schrittweisen Prozess aus morphologisch unauffälliger Kolonschleimhaut über die Bildung aberranter Krypten, adenomatöser Polypen hin zum invasiven und metastasierenden Karzinom [109,394]. Eine genetische Prädisposition erhöht das relative Risiko an CRC zu erkranken, allerdings liegt der Anteil des erblich bedingten CRC nur bei 10 %. Der größte Anteil der diagnostizierten Kolontumoren ist auf das sporadische CRC (90 %) zurückzuführen. Die Genese der sporadisch auftretenden Tumore im Kolon wird durch exogene Faktoren gefördert. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass insbesondere Ernährungsfaktoren (beispielsweise heterozyklische Amine, N-Nitrosoverbindungen, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) und Umweltbelastungen (z.B. Karzinogene der Umwelt) die Entstehung fördern [208,394].

Eine veränderte Proliferation, Differenzierung und die Bereitschaft zur Metastasierung sind wichtige Parameter bei der Tumorgenese im Kolon. Diese Vorgänge werden grundlegend von Wachstumsfaktoren gesteuert. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass es durch den Verlust des Imprintings des *IGF2-Gens* im menschlichen Kolon zu erhöhter Bildung des Wachstumsfaktors IGF-II, verbunden mit verstärkter Tumorbildung, kommt [145].

Das IGF-System besteht aus mehreren Komponenten. Dies sind zum einen die Peptidhormone IGF-I und IGF-II, welche in der Lage sind, mitogene Signale durch Rezeptorbindung auszulösen. Zum anderen sind zwei IGF-Rezeptoren zu nennen IGF-IR, der die Vermittlung von mitogenen Signalen steuert, und IGF-IIR, der die IGF-II-Konzentration kontrolliert und an der Steuerung lysosomaler Enzyme beteiligt ist. Darüber hinaus spielen die sechs hochaffinen IGF-Bindungsproteine IGFBP-1 bis IGFBP-6 eine wichtige Rolle, da sie neben der Bindung von IGFs auch IGF-unabhängige Funktionen besitzen, welche die Tumorgenese beeinflussen. Proteasen der Bindungsproteine nehmen ebenfalls Einfluss auf die Tumorgenese durch den Abbau der Bindungsproteine [184], auch wenn sie nicht direkt dem IGF-System zugeordnet werden.

Die Untersuchung grundlegender Mechanismen des IGF-Systems im Rahmen der Kolonkanzerogenese ist eine Voraussetzung für das Verständnis der Genese der Erkrankung, als auch für die Entwicklung zielgerichteter Therapien.

2 Literatur

2.1 Das Kolonkarzinom

2.1.1 Wachstumsregulation der Zelle

Teilungsfähige Zellen durchlaufen einen Teilungsprozess von vier Phasen. Durch DNA-Replikation in der S-Phase wird der diploide Chromosomensatz verdoppelt. Daraufhin erfolgt eine prämitotische Ruhephase, welche als G_2 -Phase bezeichnet wird. Anschließend entstehen durch Mitose in der M-Phase zwei Tochterzellen mit diploiden Chromosomensatz. In der darauffolgenden Ruhephase G_1 entscheidet es sich, ob eine erneute DNA-Replikation erfolgt oder ob die Zelle in einer Ruhephase (G_0) auf unbestimmte Zeit verbleibt. Aus diesem Zellarrest kann die Zelle bei Überschreiten des sogenannten Restriktionspunktes (R-Punkt) wieder in den Proliferationszyklus eintreten. Zellzykluslänge und Phasendauer hängen vom jeweiligen Zelltyp ab [337,389]. Die Zellteilung wird bevorzugt an den G_2 /M- und G_1 /S-Phasenübergängen durch Zykline (A, B, D, E), zyklinabhängige Kinasen (CDK 2, 4, 6) sowie deren Inhibitoren (p16, p21, p27) reguliert [626]. Nach Ablauf einer bestimmten Periode tritt in einer normalen Zelle der natürliche Zelltod, die Apoptose, ein [306]. Der Ablauf des natürlichen Zellzyklus ist schematisch in Abbildung 1 zusammengefasst. Der Prozess der Apoptose wird komplex reguliert und durch spezifische zelluläre Genprodukte eingeleitet oder verhindert. Innerhalb des Zellzyklus führt eine Hochregulierung von p53 zunächst zu einem Zellarrest in der G_1 -Phase, was zur Apoptose führen kann [342]. Durch Mutationen kann eine Zelle die Fähigkeit zur Apoptose verlieren und zur Krebszelle werden. Maligne Zellen können die Fähigkeit der Differenzierung noch besitzen, sie kann aber auch verloren gehen, so dass diese Zelle nur noch proliferiert [459]. Die Zellproliferation kann besonders durch externe Stimuli modifiziert werden. Diese Faktoren binden an Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind [222]. Die Wachstumsfaktorrezeptoren sind zumeist Transmembranproteine, die ein intrazelluläres Signal erzeugen. Diese intrazellulären Signale können die Transkription im Zellkern modifizieren. Tyrosinphosphorylierung, Serin/Threoninphosphorylierung, Entstehung von zyklischen Nukleotiden (cAMP) nach Bindung an G-Proteine (GTP-bindende Proteine) oder auch Calcium-Phosphoinositol-Produktion sind Mechanismen der Signaltransduktion und spielen

eine Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums. Darüber hinaus können Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion über Integrine, Cadherine, Selektine sowie Proteoglykane das Zytoskelett und die Zellproliferation beeinflussen [3,297,427].

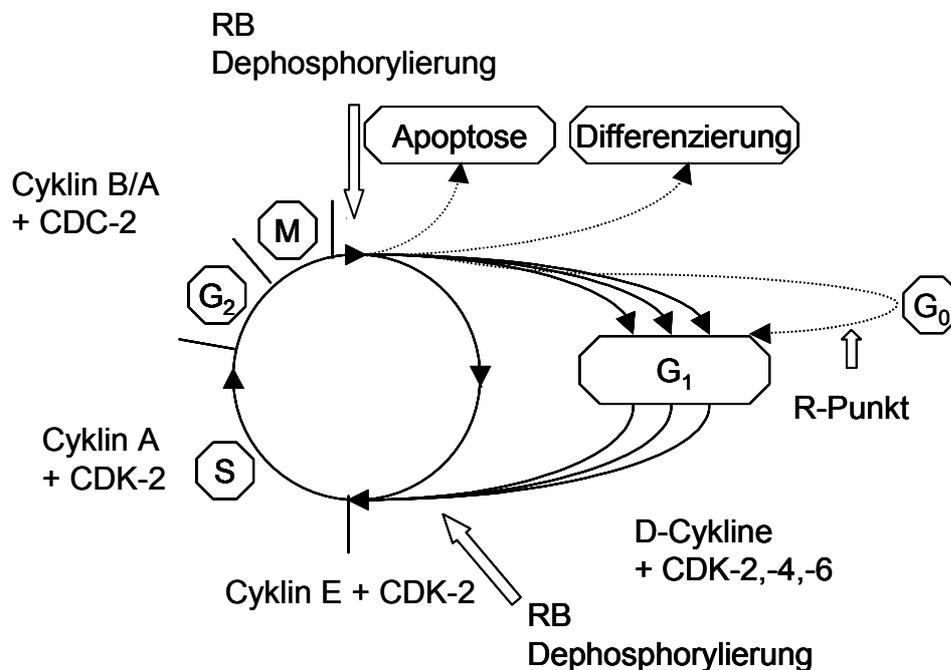


Abb. 1: Zellzykluskontrolle.

Die Abbildung wurde in Anlehnung an Schipper *et al.* 1998 [533] und Weinstein 2000 [626] erstellt. Durch die Cyclin-CDK Verbindung kommt es zur Phosphorylierung von Proteinen, die den Eintritt in die S-Phase bzw. M-Phase des Zellzyklus erlauben. Zielprotein ist u.a. das RB-Protein, das im dephosphorylierten Zustand Transkriptionsfaktoren bindet und sie so inaktiviert. Durch Phosphorylierung von RB durch Cyclin-CDK löst sich die Bindung der Transkriptionsfaktoren, die dadurch aktiviert werden. M = Mitose, S = Synthese, G = „gap“.

2.1.2 Zellreifung im Kolon

Das Mukosaepithel des menschlichen Dickdarms ist durch einen lebenslangen raschen Zellumsatz mit nahezu komplettem Austausch der intestinalen Epithelzellpopulation innerhalb von sechs bis acht Tagen gekennzeichnet [80,542]. Das proliferationsaktive Kompartiment ist normalerweise auf das untere Drittel der Krypten begrenzt. Dort sind neben Stammzellen auch undifferenzierte Kryptenepithelien vorhanden. Von der Kryptenbasis rücken die proliferierenden Zellen, vermittelt durch Zelladhäsionsmoleküle, zur luminalen Oberfläche. Während der Migration unterliegen Epithelzellen einer zunehmenden Differenzierung und Spezialisierung. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht

zwischen der Neubildung von intestinalen Epithelzellen durch Zellproliferation und dem Verlust von Epithelzellen durch Apoptose und mechanische Abschilferung [80,505,542]. Während eine verminderte Zellproliferation zu Ulzerationen oder Atrophie führen kann, ist eine gesteigerte Zellproliferation oder eine verlängerte Lebensdauer intestinaler Zellen für Hyperplasie und daraus resultierende Neoplasie verantwortlich. Neoplasien und Tumore entstehen also aufgrund von Veränderungen, bei denen die normale Zellzyklusregulation außer Kraft gesetzt wird [80,505,542,626].

2.1.3 Mutationen

Mutationen können auf allen Ebenen der Genomstruktur auftreten und entweder ganze Chromosomen, Chromosomenabschnitte oder einzelne Basen (Punktmutationen) betreffen. Ändert sich die Zahl oder die Position von Nukleotiden spricht man von einer Rekombinationsmutation. Eine Rekombinationsmutation kann durch Deletion, Insertion, Duplikation, Inversion, Translokation oder Transposition entstehen [271].

Mutationen, können in Folge von äußeren Einwirkungen (Fremdstoffe, reaktive Sauerstoffmediate, UV- oder ionisierende Strahlung) [232,271,396] auftreten oder durch die natürlichen Instabilität des Genoms sowie Fehler bei der DNA-Replikation entstehen [273,274]. Keimbahnmutationen sind Defekte, welche vererbt werden [314,315,369]. Welche Auswirkungen eine Mutation auf die Syntheserate, Aminosäuresequenz oder Struktur eines Genproduktes hat, hängt von ihrer Lokalisation ab. Eine Mutation bleibt ohne nachteilige Folgen für einen Organismus, wenn die Proteinfunktion nicht beeinträchtigt wird oder der Defekt kompensiert werden kann. Eine Mutation wirkt sich oft nicht aus, wenn der Träger heterozygot ist und noch über ein zweites Allel verfügt. Darüber hinaus können DNA-Schäden durch die zelleigenen Reparatursysteme behoben werden oder zum Zelltod führen [52,198]. In der Karzinogenese tragen besonders ein Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen („*loss-of-function*“ Mutationen) bzw. die Erlangung einer Funktion („*gain-of-function*“ Mutationen) bei Onkogenen zum malignem Phänotyp einer Zelle bei. Bis heute geht man davon aus, dass für alle umgebungsbedingten oder angeborenen Mutationen gilt, dass einzelne diskrete Mutationen sich bei der Tumorenstehung addieren und letztendlich nach der multiplen Alteration zu einer malignen Transformation der Zelle führen können [52,424].

Um die Auswirkung bestimmter Faktoren in der Karzinogenese *in vivo* zu untersuchen, werden Mutationen in Nagern chemisch induziert oder Tiermodelle mit einer bestimmten Keimbahnmutation, eingesetzt.

2.1.4 Mechanismus der chemisch induzierten Karzinogenese

Chemische Karzinogene induzieren Tumore, indem sie das Genom einer Zelle modifizieren, was wiederum eine Veränderung des Zellphänotyps nach sich ziehen kann. Der veränderte Phänotyp einer Zelle äußert sich beispielsweise im Verlust der Differenzierung, im abnormalen proliferativen Verhalten und erhöhter Invasivität [521].

Die Entstehung von Krebs durch chemische Kanzerogene wurde durch Untersuchungen von Isaac Berenblum schon im Jahre 1947 beschrieben. Das Modell, welches bis heute Gültigkeit hat, erklärt die Entstehung von Krebs in zwei unterschiedlichen Stufen, der Initiation und der Promotion [51]. Die Initiation ist eine kurzfristige und unwiderrufliche Wechselwirkung zwischen dem Karzinogen und dem Genom [395]. Der durch chemische Induktion entstandene Schaden wird durch die DNA-Replikation und Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben [8]. Durch einen promovierenden Stimulus können die initiierten Zellen stärker proliferieren. Der Promotor allein ist zwar nicht mutagen oder karzinogen, kann aber durch die Beschleunigung der Proliferation die Zeit für Reparaturprozesse der DNA vermindern und dadurch die Wahrscheinlichkeit für Mutationen erhöhen [413,465,558]. Die Mutationen akkumulieren welches schließlich zur Bildung von Tumoren führen kann. Überdies muss der Promotor eine gewisse Zeit vorhanden sein, um eine biologisch nicht mehr umkehrbare Wirkung zu entfalten [58,371]. Das 2-Phasenmodell von Berenblum *et al.* 1947 [51] welches zunächst die Tumorentstehung in der Haut erklärte, wurde durch Untersuchungen an weiteren Organen, wie Leber [456], Lunge [631], Blase [127] und Kolon [491], bestätigt. Mittlerweile wurde dieses Modell noch durch eine dritte Stufe ergänzt. Die Progression, welche den Übergang zur Malignität beschreibt, stellt ebenfalls ein irreversibles Ereignis dar und ist mit weiteren Mutationen sowie einer zunehmenden Instabilität des Genoms assoziiert [461,621,622].

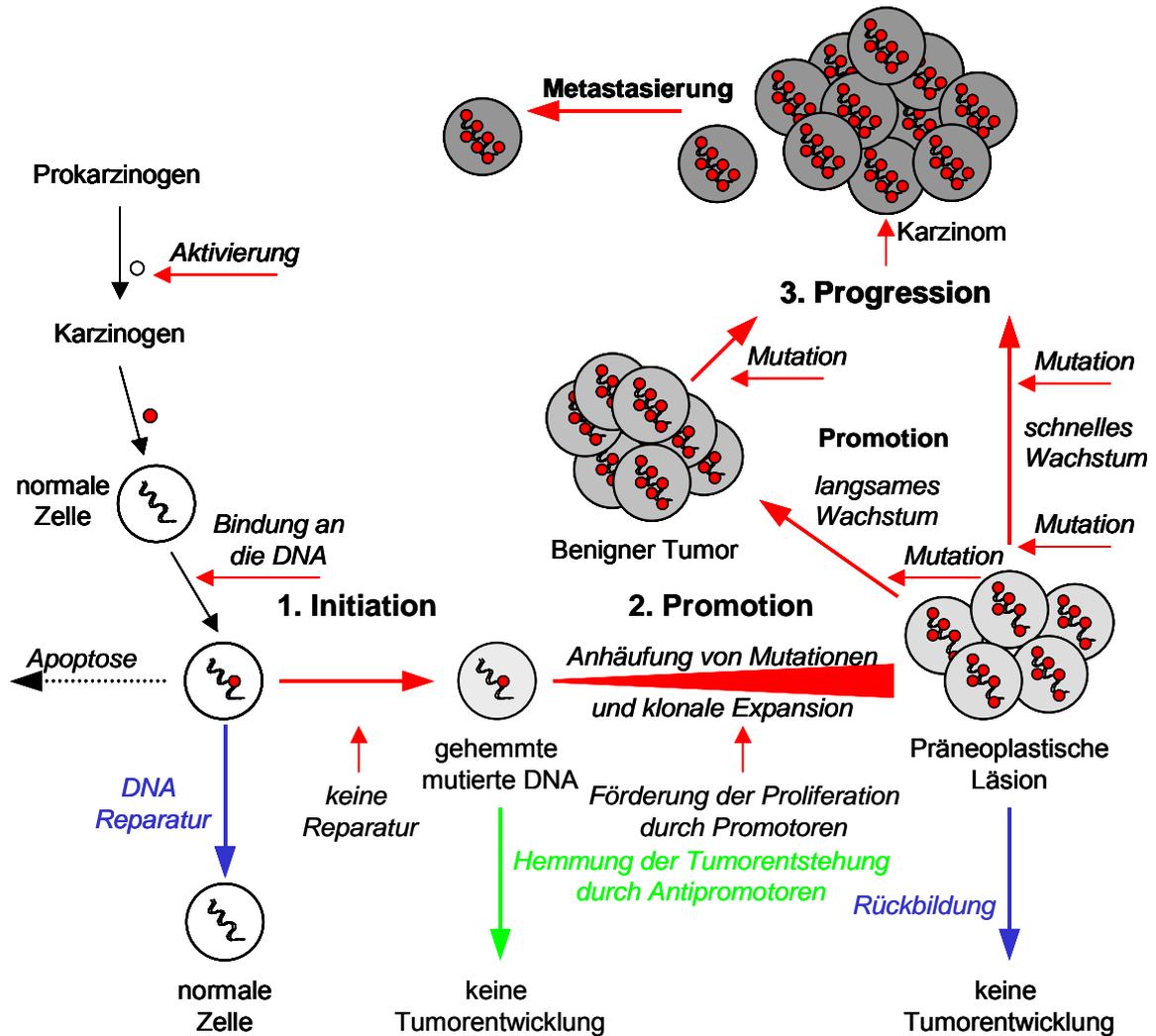


Abb. 2: Mehrstufenmodell der chemisch induzierten Karzinogenese.

Normalerweise besitzen Zellen mehrere Genprodukte, die verhindern, dass Zellen zu Krebszellen entarten. Ein bösartiger Tumor entsteht erst dann, wenn sich innerhalb einer Zelllinie Mutationen in mehreren dieser Gene angehäuft haben. Die Mutationen (dargestellt als rote Punkte an der DNA im Zellkern) werden unter anderem durch Karzinogene ausgelöst. Eine chemisch induzierte Krebsvorstufe bildet sich in vielen Fällen zurück oder wächst nur sehr langsam. Auch kann die Tumorentstehung durch Antipromotoren verhindert werden. Antipromotoren sind Substanzen, die in der Lage sind, eine Tumorentstehung zu hemmen. In einigen Fällen kommt es allerdings zur Ausbildung eines invasiven und Metastasen-bildenden Tumors, der Tochtergeschwülste an anderen Stellen des Organismus bildet.

2.1.4.1 Das Karzinogen 1,2-Dimthylhydrazin (DMH)

Eine Reihe chemischer Kanzerogene erzeugt nach Verabreichung in Nagern benigne (gutartige) und maligne (bösartige) Neoplasien im Kolon, welche in vieler Hinsicht den Kolontumoren von Menschen gleichen. Dazu gehört das

1,2-Dimethylhydrazin (DMH), das in der Maus eine ausgeprägte Organotropie zeigt und ausschließlich Kolonkarzinome verursacht.

DMH ist ein Prokarzinogen, das durch metabolische Aktivierung seine karzinogene Eigenschaft entwickelt (Abbildung 3). DMH wird zu Azoxymethan oxidiert und anschließend zu Methylazoxymethanol N-hydroxyliert. Methylazoxymethanol, das bei Körpertemperatur instabil ist und spontan in H₂O, Formaldehyd (CH₂O) und Stickstoff (Nitrogen) zerfällt, kann auch durch die Alkoholdehydrogenase zu Methylazoformaldehyd verstoffwechselt werden. Das Kolon als Zielorgan von DMH weist hohe Spiegel dieses Enzyms auf. Während des Zerfalls von Methylazoxymethanol wird der alkylierende Stoff Methyl Diazonium gebildet, der reaktive Carboniumionen generiert. Diese sind fähig, RNA, DNA oder Proteine zu methylieren.

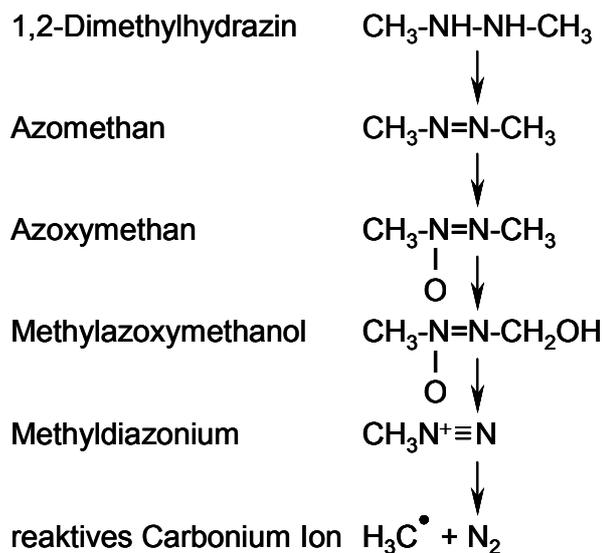


Abb. 3: Metabolische Aktivierung von 1,2-Dimethylhydrazin.

1,2-Dimethylhydrazin wird in die alkylierende Substanz Methyldiazonium umgewandelt, die bei ihrem Zerfall hoch reaktive Carboniumionen bildet [340].

DMH ist aufgrund seiner hohen Spezifität und Effektivität im Kolon Tumore zu erzeugen, im Tiermodell das bis heute meist verwendete Kolon-Karzinogen [58,340].

2.1.4.2 DMH induziertes CRC in Nagern: Zeitlicher Ablauf der Tumorentstehung

Die Entwicklung kolorektaler Karzinome durch DMH in Nagern gleicht der Entwicklung eines sporadischen CRC beim Menschen (siehe 2.1.5) [93,103,109,448]. Nach Verabreichung von DMH erscheinen abhängig von der Dosis zehn bis 15 Wochen nach der ersten Injektion atypische Krypten, sogenannte

„*Aberrant Crypt Foci*“ (ACF). Zwischen zwölf und 18 Wochen treten im Mikroskop sichtbare Adenome/Adenokarzinome (Mikroadenome) auf und nach 24 bis 36 Wochen sichtbare Tumore [534,535]. Gutartige adenomatöse Polypen sowie benigne und maligne Neoplasien treten in den meisten Tieren gleichzeitig auf [534,620]. Diese neoplastischen Veränderungen der Kolonschleimhaut erscheinen am häufigsten im mittleren und im distalen Bereich des Kolons sowie im Rektum, während im caecalen Bereich kaum oder keine Abnormalitäten gefunden wurden [595]. Unterschiedliche Mausstämme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber chemischen Karzinogenen. Die Anzahl der auftretenden Neoplasien hängt somit auch vom genetischen Hintergrund und der Dosis ab [328,588,595].

2.1.5 Das Modell der kolorektalen Karzinogenese

90 % der kolorektalen Karzinome im Menschen treten sporadisch auf und nur 10 % sind durch Keimbahnmutationen bedingt [209,394]. Das sporadische CRC tritt vermehrt im hohen Lebensalter auf, während Genträger mit prädisponierenden Mutationen in der Keimbahn ein höheres Risiko tragen, in relativ jungen Jahren am CRC zu erkranken. Dies ist durch den Zeitraum zwischen einem Initiationsereignis und dem Auftreten eines sichtbaren Tumors, der Latenzzeit, zu erklären. Die Latenzzeit beider Formen des CRC kann beim Menschen bis zu 20 Jahre betragen. Im Falle des erbten CRC bedeutet dies, dass aufgrund von Keimbahnmutationen eine Transformation leicht durch wenige neue Mutationen ausgelöst werden kann. Sowohl beim sporadischen als auch bei den erblichen Formen, der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), gehen Kolonpolypen um etwa zehn bis 15 Jahre einer Karzinomentstehung voran [394]. Aus der exponentiellen Zunahme der Fälle von Kolonkarzinomen mit steigendem Lebensalter wurde berechnet, dass etwa fünf Mutationen zur Entstehung eines Tumors notwendig sind [86,114]. Weiterhin ist die Prävalenz von Adenomen in der Bevölkerung weitaus höher als die Anzahl der CRC Erkrankungen, was darauf hinweist, dass nicht alle Adenome im Laufe der Zeit zu Tumoren werden [488]. Diese epidemiologischen Daten bestätigen einerseits die Notwendigkeit der Akkumulation verschiedener Mutationen für die CRC-Entstehung und weisen andererseits auch auf eine Rückbildung bestehender Adenome durch Reparaturmechanismen hin [179,180,314,488].

2.1.5.1 Die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Identifizierung und Charakterisierung atypischer Krypten (ACF), sowohl in Karzinogen-behandelten Nagern als auch im Kolon von Patienten mit Dysplasien, bewies, dass es sich um präkanzerogene Stadien des CRC handelt. Aus diesem Grund wurde die traditionelle Adenom-Karzinom-Sequenz im Kolon zur „ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz erweitert“ [109].

2.1.5.1.1 Atypische Kolonkrypten: *Aberrant Crypt Foci (ACF)*

ACF wurden erstmals durch Bird *et al.* 1987 [57] im Kolon von Mäusen beschrieben, die mit einem Karzinogen behandelt worden waren. Vier Jahre später wurden ACF auch im menschlichen Kolon entdeckt [469,513]. Nach der Färbung des Kolon mit Methylenblau [385] erscheinen ACF unter dem Mikroskop größer als die normalen umliegenden Krypten und zeichnen sich durch ein eher elipsenförmiges Lumen gegenüber dem runden Lumen der normalen umliegenden Krypten aus. Weiterhin besitzen sie eine verdickte epitheliale Linie. Mehrere aneinander liegende abnormale Krypten (AC) bilden eine Focus (ACF) [385,440,469,513]. Die Vergrößerung von ACF wird durch den Prozess der Kryptenteilung bestimmt. Dieser Vorgang beginnt an der Kryptenbasis und verläuft lumenwärts, bis aus einer zwei Krypten entstanden sind. Die Kryptenteilung ist assoziiert mit der „*crypt multiplicity*“, die die Anzahl der aberranten Krypten per Focus angibt. Die „*crypt multiplicity*“ scheint mit der Malignität eines ACF in Verbindung zu stehen [598]. Im menschlichen Kolon treten ACF bevorzugt im distalen Teil des Kolons auf [549] und sind am häufigsten im Sigmoidum und Rektum zu finden. Die Lokalisation der präneoplastischen Foci stimmt damit mit der Lokalisation eines späteren CRC überein [469,512]. Die Disposition der auftretenden ACF bezüglich der Kolonlokalisation bestätigte sich auch in Nagern [200]. Die Charakterisierung menschlicher ACF als auch chemisch induzierter ACF in Nagern zeigte, dass sich die ACF der verschiedenen Spezies sehr stark im Wachstumsverhalten, der Morphologie und auch in molekularen Merkmalen gleichen. ACF können durch unabhängige Initiationsprozesse entstehen [398,470,557,560] und weisen histologisch unterschiedliche Grade in ihrem malignen Potential auf, die von einer milden Hyperplasie bis zu einer starken Dysplasie reichen. ACF mit Dysplasie sind meist mit einer neoplastischen Progression assoziiert, während hyperplastische Krypten oder ACF mit einer milden Dysplasie

einher gehen und eher gutartig sind [280,473,473,511,556]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass der Grad der Dysplasie von ACF nicht nur zunehmen, sondern auch abnehmen kann [164,423,556].

2.1.5.1.2 Adenome

Adenomatöse Polypen sind neoplastische Veränderungen des Epithels der Kolonschleimhaut [415]. Sie werden histologisch als tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome klassifiziert [394]. Beim Menschen sind ca. 80 % der Adenome tubulär, villöse Adenome treten dagegen weniger häufig auf. Darüber hinaus werden auch Mischformen beschrieben, welche als tubulovillöse Adenome bezeichnet werden [143]. Tubuläre Adenome wachsen gestielt und besitzen meist nur eine niedriggradige Dysplasie [147,501]. Villöse Adenome enthalten dagegen zu etwa 20 % Areale mit hochgradiger Dysplasie [499]. Kolonpolypen können neben den adenomatösen Arealen auch nicht-invasive *karzinomatöse* Anteile enthalten. Das Karzinom reicht hier nur bis in die Lamina propria. Bei dieser Form treten keine Fernmetastasen auf [185,316].

2.1.5.1.3 Karzinome

Kolorektale Karzinome entwickeln sich wahrscheinlich ausschließlich aus adenomatösen Polypen. Aus diesem Grund kommt diesen Neoplasien, welche im allgemeinen nur selten Symptome verursachen, eine klinische Bedeutung zu [47,72,139,312]. Von einem *invasiven* Karzinom spricht man, wenn neoplastische Zellen die Lamina propria überschreiten und die Muscularis mucosae durchsetzen [77,262,475]. Ein Adenom mit einem invasiven Karzinom wird auch als maligner Polyp bezeichnet. Das Risiko einer malignen Entartung hängt von der Größe des Polypen, dem Grad der Dysplasie und vom histologischen Typ ab [499]. Sind Polypen kleiner als 1 cm, enthalten sie in weniger als 1 % ein Karzinom. Bei einer Größe zwischen 1 und 2 cm erhöht sich die Anzahl auf 5 %. Polypen größer als 2 cm enthalten zu etwa 10 % ein Karzinom. Das Risiko, ein invasives Karzinom zu enthalten, ist bei villösen bzw. tubulovillösen Adenomen höher als bei tubulären [394,488,499].

2.1.5.2 An der Tumorenstehung im Kolon beteiligte Gene

2.1.5.2.1 Protoonkogene

Als Protoonkogene werden Gene bezeichnet, aus denen sich Onkogene ableiten. Zelluläre Onkogene sind aufgrund ihrer essentiellen Funktion meist evolutionär konserviert. Mittlerweile sind mehr als 70 Onkogene identifiziert worden. Onkogene kodieren für Proteine, welche die Zellproliferation fördern bzw. die Apoptose hemmen.

- Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- α , TGF- β , IGF-I, IGF-II, EGF und FGF).
- Wachstumsfaktor-Rezeptoren und/oder Proteinkinasen (z.B. Tyrosinkinasen, c-erb B, src-Familie)
- Monomere G-Proteine, die bei der Signaltransduktion an der inneren Zellmembran wirken (z.B. H-ras, K-ras, N-ras)
- Transkriptionsfaktoren (z.B. c-myc, fos, jun)

Onkogene entstehen aus Protoonkogenen beispielsweise durch Gentranslokation, Geninsertion, Genrearrangement oder Genamplifikation. Schon die Veränderung eines Allels führt in der Regel bereits zu Störungen der normalen Funktion. Häufig findet man aktivierte Onkogene in Kombination mit Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen in Tumoren verschiedenster Art [300,378,453,624].

2.1.5.2.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene bilden eine Gruppe von Genen, die normalerweise die Zellteilung unterdrücken und somit *in vitro* als auch *in vivo* vor einer Transformation und dem Entstehen eines malignen Phänotyps schützen. In der kolorektalen Karzinogenese sind Tumorsuppressorgene von zentraler Bedeutung. Die am häufigsten beschriebenen Tumorsuppressorgene sind:

- APC („adenomatosis polyposis coli“):
Regulation der Zellprogression/Zellproliferation im Zellzyklus, kontrolliert den Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase.

- DCC („deleted in colon cancer“):
Regulierung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, ein Verlust des Gens führt zu Zellwachstum und Zellmetastasierung.
- p53:
„Wächter des Genoms“, Regulation der Zellproliferation, indem es bei DNA-Schäden einen Zellzyklusarrest vor der S-Phase induziert. Fördert die Differenzierung und induziert Apoptose.
- MCC („mutated in colon cancer“):
Zellzykluskontrolle.

Im Gegensatz zu den Onkogenen führt meist erst eine Veränderung oder ein Verlust von beiden normalen Allelen von Tumorsuppressorgenen zum Funktionsverlust in der Zelle. Eine Ausnahme hiervon bilden Proteine, die als Multimere wirken, wie z.B. p53 (Tetramer). Enthält ein solcher Komplex ein mutiertes und somit inaktives Protein, wird der ganze Komplex inaktiv [279,508]. Relativ häufig ist der Verlust von Tumorsuppressorgenen mit dem Verlust eines gesamten Chromosoms durch mitotische Fehlverteilung („*non-disjunction*“) oder mit mitotischer Rekombination mit Genkonversion verbunden. Allelische Deletionen oder der Ausfall des zweiten Allels d.h. ein LOH („*loss of heterozygosity*“) sind ebenfalls an dem Verlust der Funktionsfähigkeit eines Proteins beteiligt [225,267,424,466,569,607,608,625].

2.1.5.2.3 DNA-Mismatch-Reparaturgene (DNA-MMR-Gene)

Wird die zelluläre DNA durch Strahlung, chemische Karzinogene oder durch spontane Mismatch-Bildungen während der normalen DNA-Replikation in ihrer Integrität verändert, ist ein spezielles DNA-Mismatch-Reparatursystem der Zelle in der Lage, DNA-Fehler oder Basenfehlpaarungen zu korrigieren. Identifiziert wurden bisher sechs Reparaturgene (z.B. hMSH2, hMLH1) [403].

Die Produkte dieser Gene sind Bestandteil eines Proteinkomplexes, der essentiell für eine effiziente Korrektur von DNA-Replikationsfehlern ist. In Tumorzellen, die Defizite in diesen Reparaturgenen aufweisen, geht diese Kontrollfunktion verloren. Infolgedessen treten Längenpolymorphismen auf, die beispielsweise im Bereich repetitiver DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten-DNA) nachgewiesen werden können. Die Mikrosatelliten-Analyse macht es daher möglich, Tumore in einen RER⁺ („*replication-error-positive*“)- bzw. einen RER⁻ („*replication-error-negative*“)-

Phänotyp einzuteilen. Der RER⁺-Phänotyp ist assoziiert mit multiplen Replikationsfehlern, die sich als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ubiquitär im Genom von Tumorzellen manifestieren [175,196,314,319].

2.1.5.2.4 Weitere beteiligte Gene

Die Zyklooxygenase COX-2 spielt in der Karzinogenese des Kolon eine zentrale Rolle. Dieses am Arachidonsäurestoffwechsel beteiligte Enzym wird durch Entzündungsmediatoren, Wachstumsfaktoren und Tumorpromotoren aktiviert. Tumorprotektive Substanzen, wie Acetylsalicylsäure oder Sulindac (nicht steroidale entzündungshemmende Substanz), vermitteln ihre Wirkung beispielsweise durch die Hemmung COX-2-induzierter Prostaglandin E₂ Bildung. Hierdurch werden Effekte wie die Induktion von Apoptose und eine verminderte Angiogenese erklärt. Weiterhin werden die Zellproliferation und die Metastasierung inhibiert [406]. Bei etwa 90 % der sporadischen CRC-Fälle sowie in prämaligen und auch malignen Läsionen weiterer Tumorarten wurde eine Erhöhung der COX-2-Spiegel festgestellt. Aus diesem Grund gilt COX-2 auch als Tumormarker [406,630]. Das Carcinoembryonic Antigen (CEA), dessen Expressionshöhe negativ mit der Überlebensrate des CRC-Patienten korreliert, besitzt ebenfalls einen hohen prognostischen Wert [48,368,651]. Weiterhin ist bekannt, dass das Glykoprotein CD44, die Metastasierung begünstigt [532,573], und das Produkt des DPC4 („*deleted in pancreatic cancer locus 4*“) Gens, den proliferationsinhibierenden Effekt von TGF- β beeinflusst [88,577].

2.1.5.3 CRC-relevante Gene und ihre Bedeutung für die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz

Sporadisch entstehende adenomatöse Polypen weisen ein Risiko für eine maligne Transformation von 5 % auf [394]. Für die Entstehung kolorektaler Tumore wurde eine schrittweise Akkumulation von Mutationen in Protoonkogenen (K-ras, c-myc etc.), Tumorsuppressorgenen (APC, DCC, p53, MCC, DPC4), Mismatch-Reparaturgenen (hMSH2, hMLH1, hPMS2 etc.) und in sogenannten modifizierenden Genen (COX-2, CD44 etc.) beschrieben. Alle Mutationen tragen zur Tumorinitiation und/oder Progression bei und begünstigen die Entstehung von unkontrolliert proliferierenden Zellen [256,314,315]. Die individuelle Konstellation von verschiedenen Defekten bildet das genotypische bzw. ein phänotypisches

Erscheinungsbild [422]. Das Zusammenspiel molekularer Mechanismen, wird im Folgenden anhand einiger für die Entstehung des sporadischen CRC relevanter Gene näher beschrieben und in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

2.1.5.3.1 *K-ras- und APC-Mutationen*

K-ras nimmt eine wichtige Position in der Vermittlung der Signale von Wachstumsfaktoren ein [69,256]. Da mutiertes ras seine GTPase-Aktivität verliert, wird GTP nicht mehr zu GDP hydrolysiert. Dadurch wirkt ras als permanent aktiviertes Molekül in der Signaltransduktion [52]. Folgen eines hyperaktivierten K-ras sind die Induktion der Zellproliferation und die Unterbindung der Apoptose [92]. Über die Aktivierung unterschiedlicher cis- und trans-Elemente des Cyclin D1-Promotors bewirkt K-ras in Verbindung mit β -Catenin eine Erhöhung der Cyclin D1-Expression, [584]. D-Cykline agieren in der G₁-Phase und sind zusammen mit CDK-4 für die Phosphorylierung verschiedener Proteine verantwortlich, die den Eintritt der Zelle in die S-Phase erlauben [626].

Das multifunktionelle APC-Protein ist an der basolateralen Membran des Kolonepithels lokalisiert und bindet neben anderen Proteinen β -Catenin [269]. β -Catenin hat eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, die in APC mutierten Zellen gestört ist [228,438,438,462]. Eine β -Catenin-Akkumulation bzw. eine abnormale β -Catenin-Expression wurde in ACF nachgewiesen [199,238] und gilt als immunhistochemischer Marker für das maligne Potential eines ACF [199]. In nicht-transformierten Kolonozyten kontrolliert das Protein des APC-Gens durch Bindung und Spaltung die Aktivität von β -Catenin [243]. Durch die Mutation verliert das APC-Protein diese Fähigkeit, was in einer abnormalen Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs resultiert [463], der wiederum eine vermehrte Bildung von Transkriptionsfaktoren (z.B. Tcf4) zur Folge hat [414]. Die konstitutive Aktivierung bestimmter Zielgene, wie z.B. Cyclin D1 [550,584] und c-myc [243], durch einen β -Catenin-Tcf/Lef-Komplex, liefert einen Wachstumsvorteil für Zellen und führt zur Anschaltung der Onkogenese [130]. So wird z.B. die durch c-myc gesteuerte Expression des CDK-4-Gens erhöht, dessen Produkt für das Durchlaufen der G₁-Phase verantwortlich ist [244].

K-ras-Mutationen treten in mehr als 60 % der dysplastischen ACF auf [70,367,398,470,560,580,638] und die Inzidenz von K-ras-Mutationen in nicht-dysplastischen ACF liegt sogar bei 82 % [580]. Im sporadischen CRC finden

sich in ca. 50 % der Fälle Punktmutationen des K-ras-Protoonkogens bei mindestens einem der beiden Allele. Die Rate der K-ras-Mutationen im sehr frühen Stadium (ACF) übersteigt somit noch die Häufigkeit von K-ras-Mutationen des sporadischen CRC.

Auch Mutationen im APC-Gen sind, wie im Fall von K-ras, ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese [402,466]. APC-Mutationen, die zu 100 % die ACF in Patienten mit familiärer Polyposis (FAP) charakterisieren [423], sind auch in ACF des sporadischen CRC häufig zu finden [280,367,440,513,580]. APC-Mutationen sind generell mit einer stärkeren Dysplasie assoziiert [423,513], während dies für K-ras Mutationen nicht gilt [590]. Die Bedeutung einer verstärkten Dysplasie für die Entstehung des CRC wird schließlich dadurch deutlich, dass 2/3 der sporadischen CRCs Mutationen im APC-Gen aufweisen [141].

Obwohl K-ras und APC-Mutationen zu einer gesteigerten Cyklin D1-Aktivierung führen, scheint für die maligne Progression eines ACF die zeitliche Reihenfolge der Mutationen einen entscheidenden Einfluss zu besitzen [280]. Anhand von Untersuchungen präneoplastischer Läsionen im Kolon zeigte sich, dass ACF, in denen zuerst eine K-ras-Mutation auftritt, weniger mit einer malignen Progression assoziiert sind als ACF in denen zuerst eine Mutation im APC-Gen auftritt [280].

2.1.5.3.2 Mutationen in DNA-MMR Genen

DNA-MMR-Gene verhindern aufgrund ihrer DNA-Reparaturfunktion die Entstehung von Mutationen bzw. deren Weitergabe an die Tochterzellen. Ihr Funktionsverlust kann dementsprechend zu Mutationen und zu neoplastischen Transformationen führen. Solche Mutationen aufgrund eines Funktionsverlustes von DNA-MMR-Genen können auch im sporadischen CRC vorkommen und dort z.B. eine repetitive Sequenz in der kodierenden Region des TGF- β -Rezeptor-II-Gens sowie des IGF-II-Rezeptor-Gens betreffen [422].

Funktionsverluste von DNA-MMR-Genen sind nicht nur durch Mutationen bedingt, sondern können auch durch eine verstärkte Methylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion und ein damit verbundenes „*silencing*“ des Gens verursacht sein. Insgesamt weisen ca. 10 bis 15 % der sporadischen CRCs Funktionsverluste in DNA-MMR-Genen (hMSH2, hMLH1) auf, die dann zum RER⁺-Phänotyp führen, d.h. mit gesteigerter Mutationsrate bzw. Mikrosatelliteninstabilität (MSI) assoziiert sind [363,527]. Die MSI tritt sowohl in dysplastischen als auch in hyperplastischen ACF

auf und ist nicht an die Größe eines ACF gebunden [16,452]. Kolonkarzinomzellen, die eine hohe MSI-Rate aufweisen, besitzen Mutationen im TGF β -Rezeptor II (TGF β -RII)-Gen [451]. Diese Inaktivierung des TGF β -RII ist die Ursache für eine TGF β -Resistenz im Kolonkarzinom [376]. Da TGF β -Signale über eine vermehrte Expression von p15 einen Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase bedingen und damit eine Hemmung der Proliferation auslösen, besitzen Defekte im TGF β -Signalweg eine wichtige Rolle in der Tumorgenese [376]. Darüber hinaus ist TGF β 1 in der Lage, die Expression von c-myc und dem Wachstumsfaktor IGF-II in kolorektalen Karzinomzellen zu unterdrücken [333]. C-myc aktiviert die Dissoziation des p27^{kip1}-Cyklin E-CDK-2-Komplexes und vermittelt so den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, während IGF-II in kolorektalen Tumorzellen ein autokriner Wachstumsfaktor ist [332]. Ein Gen, das auch durch den TGF β -Signalweg aktiviert wird, ist das Tumorsuppressorgen Smad4. Defekte im Smad4-Gen bewirken einen verstärkten Abbau von TGF- β . Durch eine Inaktivierung des TGF- β -Signalwegs läuft die Proliferation ungebremst weiter und kann so die Entwicklung des CRC fördern. Die Bedeutung des TGF- β -Signalwegs in der ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz zeigt sich zusätzlich darin, dass die Kombination von Smad4- und APC-Mutationen zu einem rapiden Anstieg der Karzinombildung führt, ohne dass es weiterer Mutationen bedarf [579].

2.1.5.3.3 Mutationen in p53

Veränderungen im Tumorsuppressorgen p53 findet man bei 75 % der CRCs. Trotz dieser hohen Inzidenz finden sich Mutationen, Deletionen bzw. LOH, die einen Funktionsausfall von p53 bedingen, erst in späteren Stadien der kolorektalen Karzinogenese. Dementsprechend scheinen Mutationen von p53 auch wichtig für das Auftreten von Fernmetastasen zu sein [439]. Die Aufgabe von p53 liegt u.a. darin, den CDK-Inhibitor p21 zu induzieren und nach eingeleitetem Zellzyklusarrest seine DNA-Proofreading-Funktion wahrzunehmen [173,613]. Darüber hinaus kann p53 als Antwort auf einen DNA-Schaden die Expression des APC-Gens erhöhen [277,278,421]. Falls dadurch keine Behebung des DNA-Schadens erfolgt, kann p53 u.a. über die Hemmung der antiapoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-xL, die Apoptose in der Zelle einleiten [33,318,342,543].

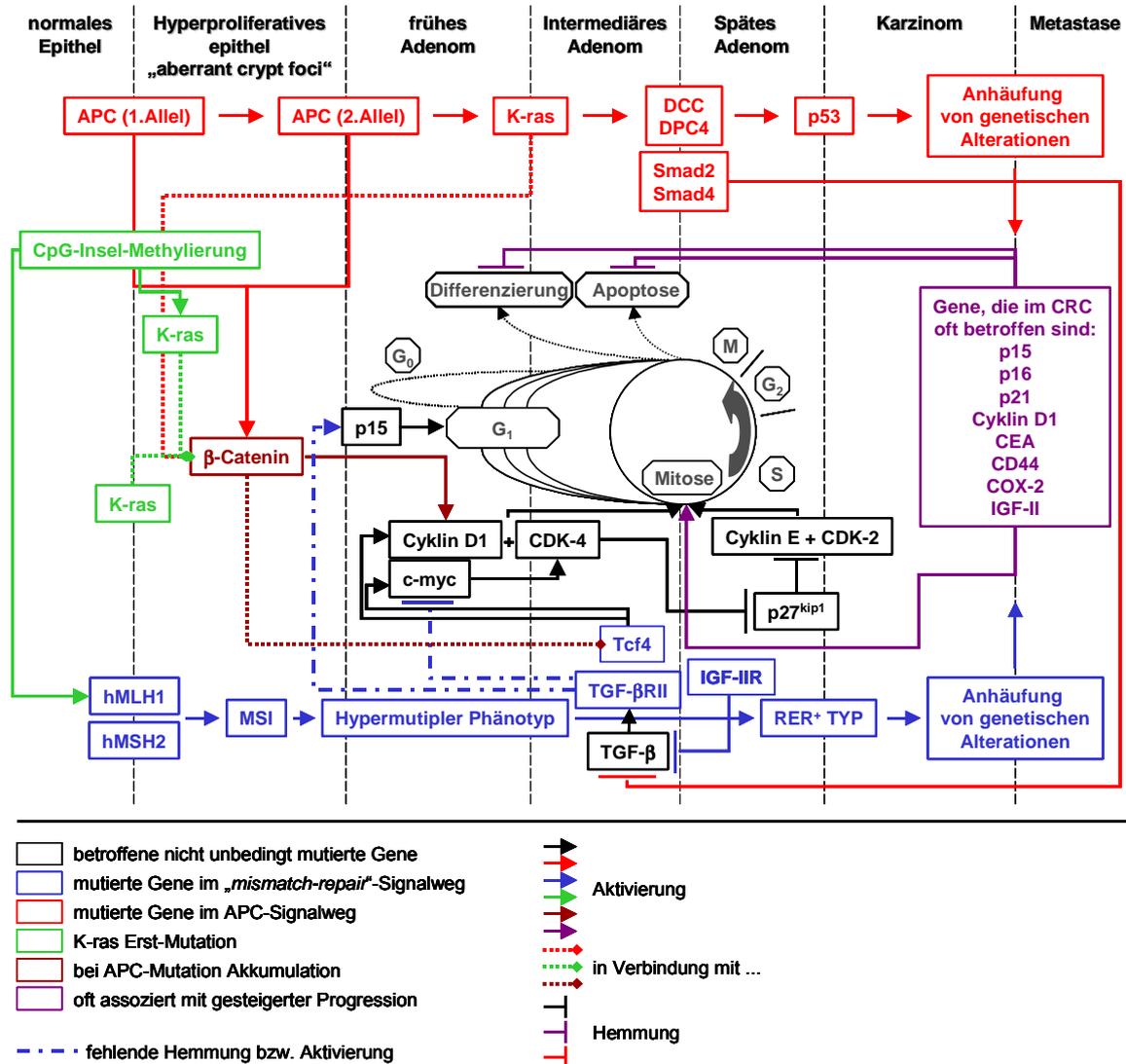


Abb. 4: Wechselwirkungen verschiedener, an der Entstehung des sporadischen CRC beteiligter Gene.

Die Abbildung wurde in Anlehnung an das von Vogelstein *et al.* entwickelte [314] und das von Fearnhead *et al.* erweiterte Modell der CRC-Entstehung [178] erstellt. Der Beginn einer neoplastischen Läsion im sporadischen CRC schließt neben einer APC-Mutation als Erst-Mutation, auch K-ras Mutationen und Mutationen in den DNA-MMR Genen ein. Die Signalwege der CRC-relevanten Gene überlappen sich oft in der Regulation Mitose-aktivierender Gene. K-ras bewirkt z.B. in Verbindung mit β-Catenin eine Aktivierung von Cyclin D1. Eine APC-Mutation hingegen bewirkt eine Akkumulation von β-Catenin. β-Catenin wiederum bildet mit Tcf-4, das im Verlaufe des DNA-MMR-Signalweg verändert sein kann, einen Komplex, der zum einen eine Aktivierung von c-myc und zum andern eine Aktivierung von Cyclin D1 bewirkt. Die komplette Stilllegung des TGF-β-Signalweges wird aufgrund der Mutationen im IGF-IIR und TGF-βRII erreicht. Ein veränderter IGF-IIR führt zum einen zur Hemmung von aktivem TGF-β1 und bewirkt eine Akkumulation von IGF-II. Darüber hinaus werden TGF-β-Signale durch die Mutation im TGF-βRII nicht weitergegeben.

2.2 Das Insulin-like-growth-factor System

2.2.1 Allgemeine Wirkungsmechanismen von Wachstumsfaktoren

Regulatorische Peptide gehören zu den wichtigsten Modulatoren von Wachstum im Intestinaltrakt. Zu ihnen gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine, Interleukine, Interferone und Stammzellfaktoren. Die Mitglieder dieser heterogenen Gruppe regulatorischer Peptide besitzen in der Regel ein niedriges Molekulargewicht (<25 000 Dalton) und unterscheiden sich in ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Werden regulatorische Peptide als Wachstumsfaktoren bezeichnet, besitzen sie in der Regel als charakteristische Eigenschaft einen wachstumsmodulierenden Effekt. Darüber hinaus zeigen fast alle Wachstumsfaktoren weitere biologische Eigenschaften, wie z.B. Modulation von Zellmigration, Chemotaxis, Zytokinexpression, Proteinsynthese und anderen Zellfunktionen. Wachstumsfaktoren wird ein autokriner, juxtakriner und parakriner Wirkmechanismus zugeschrieben. Beim autokrinen Wirkungsmechanismus handelt es sich um die Interaktion eines regulatorischen Peptides mit der Zelle, die es unmittelbar gebildet hat. Es werden ein intern (Bindung des Peptides direkt an einen intrazellulären Rezeptor) und ein extern (Sekretion des Peptides in den Extrazellulärraum mit direkter Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor auf der sezernierenden Zelle) -autokriner Mechanismus unterschieden. Der juxtakrine Mechanismus beschreibt die Sekretion eines regulatorischen Peptides, welches an direkt benachbarte Zellen bindet und damit eine spezifische Reaktion auslöst. Bei einem parakrinen Wirkmechanismus diffundiert das regulatorische Peptid noch über eine kurze Distanz und moduliert daher auch Zellpopulationen welche geringgradig weiter entfernt liegen. Diese drei Wirkmechanismen unterscheiden sich deutlich von dem klassischen endokrinen Wirkmechanismus der Peptidhormone, wo sezernierte regulatorische Peptide über den Blutweg zu weiter entfernten Zielzellen transportiert werden und dort ihre Wirkung entfalten [222,566,567].

2.2.2 Liganden des IGF-Systems: IGF-I und IGF-II

IGF-I und IGF-II wurden zunächst unter dem Synonym Somatomedin bekannt und galten als Vermittler der Wachstumshormonwirkung [153]. Aufgrund der molekularen Charakterisierung dieser Vermittler wurde festgestellt, dass es sich um zwei miteinander verwandte Peptidhormone mit einer Homologie von 62 % handelt [352,502,503,528]. Durch ihre Strukturverwandtschaft mit Insulin (Abbildung 5), welche durch die Konservierung von Cystein- und Glycinresten bedingt ist [246], erhielten diese Wachstumsfaktoren schließlich den bis heute gültigen Namen Insulin-like growth factor (IGF).

2.2.2.1 Genlokalisierung von IGF-II

Das 30 kb lange *IGF2*-Gen [254] befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 11 und liegt in unmittelbarer Nähe zum Insulin- und zum Tyrosinhydroxylasegen [592]. Bei Nagetieren befindet sich das 12 kb lange *IGF2*-Gen [254] ebenfalls in der Nähe des Insulingens und ist bei Ratten auf dem Chromosom 1 [564] und bei Mäusen auf dem Chromosom 7 lokalisiert [519].

2.2.2.2 Struktur des *IGF2*-Gens und -Proteins

Das menschliche *IGF2*-Gen besteht aus neun Exons (E1-E9), vier Promotoren (P1-P4) und besitzt zwei Polyadenylierungssignale. Während E1 bis E6 nicht-kodierende Exons darstellen, kodieren E7, E8 und der erste Abschnitt von E9 für das präpro-IGF-II-Protein. Die *IGF2*-Gene von Ratte und Maus, die aus drei Promotoren sowie sechs Exons bestehen, besitzen drei nicht-kodierende (E1 bis E3) und drei kodierende (E4 bis E6) Exons [254]. Der Promotor P1, welcher dem Exon 1 vorgeschaltet ist, kontrolliert zum größten Teil die postnatale Expression von IGF-II in der Leber, während P2, P3 und P4, die den Exons E4, E5 und E6 vorrangestellt sind, die wichtigsten Promotoren in fetalen nicht-hepatischen Geweben sind [444,445]. P2 bis P4 sind im Erwachsenenalter nur noch in nicht-hepatischen Geweben aktiv und werden in der Leber abgeschaltet [444,445,610]. Da der Promotor P1 in Ratten und Mäusen fehlt, wird die Transkription des *IGF2*-Gens postnatal eingestellt [519]. Eine Ausnahme bilden einige neuronale Gewebe [417,518], die aber wahrscheinlich für die Bereitstellung von systemisch verfügbarem

IGF-II keine Rolle spielen.

Die Struktur der *IGF2*-Gene der verschiedenen Spezies hat auch zur Folge, dass verschiedene IGF-II-mRNAs mit einer Länge von 1,8 bis 7,5 kb transkribiert werden können [517,575]. Darüber hinaus können durch differentielles Spleißen in einer Zelle gleichzeitig mehrere Transkripte von IGF-II produziert werden. Dies wurde anhand der kolorektalen Karzinomzelllinie LS1034 gezeigt [332].

Das hauptsächlich vorkommende leicht saure IGF-II-Peptid besteht aus 67 Aminosäuren und wird wie IGF-I und Insulin aus einem aus mehreren Domänen bestehenden Vorläufermolekül prozessiert. Neben dieser Hauptform wurden zusätzlich noch mehrere Varianten mit unterschiedlicher Länge beschrieben [154,246].

Neben den A- und B-Domänen, die sowohl in Insulin als auch den IGFs enthalten sind, besitzen prozessierte IGFs noch eine C-Domäne, die im Pro-Insulin vertreten ist, allerdings im Reifungsprozess vom Pro-Insulin zum Insulin herausgeschnitten wird. Ein weiteres gemeinsames Merkmal von Insulin und IGFs sind die N-terminalen Signalpeptide prä- und die C-terminalen E-Peptide, welche postranslational bei allen drei Hormonen abgespalten werden [246]. Im Gegensatz zum Insulin enthalten reife IGFs zusätzlich noch eine D-Domäne [352,490] am C-terminalen Ende, in der zwischen den verschiedenen Spezies die größte Variabilität herrscht [517].

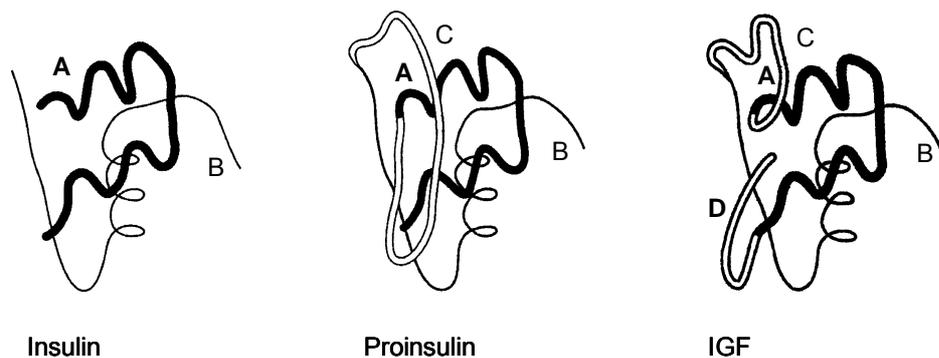


Abb. 5: Strukturhomologie zwischen Insulin und IGFs.

Schematische Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von Insulin, Proinsulin und IGFs [246].

2.2.2.3 IGFs: Wirkung und Expression

Die Ähnlichkeit der IGFs mit Insulin existiert nicht nur auf struktureller, sondern auch auf funktioneller Ebene. So stimulieren die IGFs, ähnlich wie Insulin, die Glukoseaufnahme in Fett- oder Muskelzellen [563,602] und gelten daher auch als

pluripotente Wachstumsfaktoren mit insulinähnlicher anabol-mitogener Wirkung *in vitro* als auch *in vivo*. Trotz der strukturellen und funktionellen Homologie mit Insulin werden IGFs von den meisten Zelltypen und Geweben produziert [82,128,571]. Die im Blut zirkulierenden IGFs werden hauptsächlich von der Leber gebildet und wirken endokrin [637]. Parakrine und autokrine Mechanismen werden durch die im Gewebe direkt gebildeten IGFs ausgelöst [82,128,261,528,571].

Die Expression von IGF-II ist im Gegensatz zur IGF-I Expression GH-unabhängig, wird aber auch über Hormone und Wachstumsfaktoren gesteuert. Postnatal ist nur das paternale *IGF2*-Gen aktiv. Das sogenannte „*genomic imprinting*“ des maternalen Allels macht die Regulierung der IGF-II-Expression vergleichsweise kompliziert [636,637,645]. Zusätzlich lässt nach der Geburt beim Menschen im Verlaufe von zwei Jahren das „*imprinting*“ in Organen in denen P1 aktiv ist (Leber, neuronales Gewebe) nach, so dass dann dort eine biallelische Expression von IGF-II stattfindet [155,293,610].

IGF-II wird vor allem in der fetalen Phase bei Nagern [157] und in der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) eine Rolle als Wachstumsfaktor zugesprochen [26,157,311]. Im Gegensatz zu Nagern, die die Expression von IGF-II, bedingt durch das Fehlen des Promotors P1 nach der Geburt in fast allen Geweben einstellen [261], sind die IGF-II-Serumkonzentrationen beim Menschen bei der Geburt niedrig und steigen während der Kindheit an [643].

2.2.2.4 Bedeutung von IGF-II in der Tumorgenese

IGFs wirken stark mitogen. Dieses wurde anhand von Knorpelzellen, Gliazellen Fibroblasten und nicht zuletzt an verschiedenen Tumorzelllinien, wie z.B. Kolonkarzinomzellen, gezeigt [41,332,455,536]. Die postnatale Reexpression von IGF-II in Mäusen, ausgelöst durch ein leberspezifisches Karzinogen in den frühen Stadien der Leberkarzinogenese [334] sowie die Überexpression von IGF-II in kolorektalen Tumoren [195,591] und auch in Tumoren anderer Gewebe (z.B. Leber, Magen, Nebennierenrinde, Brustdrüsen) [37,148,239,257,268] weisen auf eine potentielle Rolle von IGF-II in der Tumorgenese hin. Bei Wilm's-Tumoren wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Verlust des Imprintings („*loss off imprinting*“ = LOI) von *IGF2* und der Entstehung von Tumoren vermutet [433]. Dieses Phänomen wurde in weiteren Karzinomen, z.B. der Lunge [576], des Cervixkarzinoms [167] sowie in Leiomyosarkomen [611], festgestellt. Insbesondere in

der kolorektalen Karzinogenese konnte gezeigt werden, dass der Verlust des *IGF2*-Imprintings eng mit der Entstehung von Neoplasien verbunden ist [145].

Für *in vivo*-Untersuchungen von Faktoren, die an der Tumorenstehung beteiligt sind, eignet sich aufgrund der relativ kurzen Lebenszeit und der damit verbundenen relativ kurzen Latenzzeit bis zur Tumorentstehung die Maus als lebender Organismus. Zur Untersuchung von IGF-II-Effekten wurden bisher fünf verschiedene IGF-II-transgene Mausmodelle beschrieben [632]. In Tabelle 1 sind die mit der postnatalen Überexpression verbundenen Charakteristika der transgenen Mausmodelle zusammengestellt. Anhand dieser Modelle wird deutlich, dass das transgene IGF-II je nach Promotor in verschiedenen Organen exprimiert wird. Eine Überexpression von IGF-II postnatal in Mäusen führt in der Mehrheit der Modelle nicht zu einer Tumorbildung. Zwei IGF-II-transgene Mausmodelle entwickelten allerdings einige Tumore (Tabelle 1). Aus diesem Grund wird die Frage, ob IGF-II eine direkte Transformation von Zellen bewirkt, konträr diskutiert. Im MUP (major urinary protein)-IGF-II-transgenen Modell entwickelten homozygote Tiere mehr Tumore als heterozygote Tiere. Allerdings entwickelten auch 4 von 59 Kontrolltieren Tumore, während es 22 von 101 IGF-II-transgenen Tiere waren [510]. Ausserdem wurden in den MUP-IGF-II-transgenen Mäusen nicht in allen Geweben mit einer IGF-II-Expression Tumore gefunden, wohingegen auch in Geweben ohne postnatale IGF-II-Expression eine Tumorentwicklung stattfand [510]. Diese Resultate sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass IGF-II in der Lage ist, für eine maligne Transformation prädestinierte Vorläuferzellen sowohl über endo- als auch autokrine Mechanismen zu stimulieren. Auch aufgrund der langen Latenzzeit in diesem IGF-II-transgenen Modell und im β -Lactoglobulin-IGF-II-transgenen Modell scheint IGF-II eher als Tumor-Progressions-Faktor zu fungieren und nicht als der eigentliche Initiator der Tumorgenese [632].

Tab. 1: Charakteristika transgener IGF-II-Mausmodelle modifiziert nach Wolf et al. 1998 [632].

Promotor Sequenz	IGF-II kodierende Sequenz	Maus Stamm	Charakteristika der IGF-II-Expression			Proliferative und neoplastische Veränderungen
			Beginn der transgenen IGF-II Expression	Gewebe	Serum IGF-II (im Vergleich zur Kontrolle)	Pathologie, Tumorinzidenz und Beginn des Tumorwachstums
MUP: Mouse major urinary protein (MUP-IGF-II)	human präproIGF-II cDNA	C57BL/6 xCBA	3-4 Wochen nach der Geburt	Leber, Präputialdrüsen, weniger stark in der Nebenniere	20-30-fache Erhöhung	Tiere sind kleiner, magerer und leichter, besitzen verminderte Insulin und Glukosespiegel im Serum nach 18 Monaten, ~20 % der Tiere entwickeln Tumore in verschiedenen Organen, hauptsächlich hepatozelluläre Karzinome und Lymphome mit einer signifikant höheren Frequenz als Kontrolltiere
PEPCK: Rat Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-IGF-II)	human preproIGF-II cDNA	B6D2 xNMRI	um die Geburt	Leber, Niere, Nebenniere, Jejunum, Ileum, Kolon	2-6-fache Erhöhung	erhöhtes Gewicht von Niere und Hoden in vier Wochen alten Mäusen, erhöhtes Gewicht der Nebenniere in zwölf Wochen alten Mäusen; keine Tumorinzidenz
BKV: Bovine keratine 10 (BKVI-IGF-II)	Maus IGF2-Minigen inklusive der kodierenden Exons 4-6	C57BL/6 xCBA	ab Tag 16,5 in der Fetalentwicklung	Haut, Duodenum, Ileum, Appendix, Kolon, Uterus	2-4-fache Erhöhung	Dysproportionales Wachstum der Haut, erhöhte Gewichte von Caecum, Kolon und Uterus, niedrigere Anteile an braunem und weißem Fettgewebe durch gesteigerte Oxidation diätetischer Lipide; keine Tumorinzidenz
Mouse H-2K ^b (H-2K ^b -IGF-II)	human IGF2-Minigen inklusive der kodierenden Exons 7-9, denen ein trunkiertes Exon 5 (Konstrukt II5') vorangestellt wurde	FVB/N	vor der Geburt nur schwach detektierbar, postnatal deutlich	Thymus, Milz; niedrig in Leber und Niere; normaler Weise nicht im Gehirn nachweisbar, einer Linie des Konstruktes II5'	Linien aus II5': 2-3-fach und 7-8-fach	Erhöhtes Thymusgewicht keine Tumorinzidenz
BLG: Sheep β-lactoglobulin (BLG-IGF-II)	Maus IGF2-Minigen inklusive der kodierenden Exons 4-6	C57BL/6 xCBA	postnatal, genauer Zeitpunkt nicht bestimmt	Starke Expression in der laktierenden Brustdrüse und in Brustdrüsentumoren	2-fach in Mäusen ohne, 12-260-fach in Mäusen mit Tumorentwicklung	Innerhalb von 4-12 Monaten entwickelten eine geringe Anzahl der weiblichen Mäuse Brustdrüsentumore mit erhöhter IGF-II Expression

2.2.3 Rezeptoren des IGF-Systems: IGF-IR und IGF-IIR

Peptidhormone üben ihre biologische Wirkung über spezifische Rezeptoren aus. Für die IGFs sind der IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) und der IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR), besser bekannt als IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, in fast allen Geweben nachgewiesen worden. Zusätzlich binden die IGFs mit geringer Affinität an den Insulinrezeptor [27,489,516].

2.2.3.1 IGF-I-Rezeptor (IGF-IR)

Die meisten der biologischen IGF-Signale, wie ihre anabolen und mitogenen Effekte, werden über den IGF-IR vermittelt [83], der IGF-I mit einer 10 bis 15-fach höheren Affinität als IGF-II bindet [204]. Zudem kann er auch Insulin binden, wenn auch mit geringer Affinität [94]. Das Gen des IGF-IR liegt beim Menschen auf dem Chromosom 15 [454], welcher strukturell dem Insulinrezeptor sehr ähnlich ist [516].

Der IGF-IR stellt ein glykosyliertes heterotetrameres Molekül dar, das aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten und zwei transmembranen β -Untereinheiten besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 6). Die β -Untereinheiten besitzen eine Tyrosinkinase-Aktivität [301,600]. Bei Bindung eines Liganden dimerisiert der vorher monomere Rezeptor. Diese Konformationsänderung bewirkt eine Autophosphorylierung der zytosomatischen Domänen und die Phosphorylierung verschiedener zytosomatischer Proteine [194].

Das Signal wird durch eine oder mehrere Signalkaskaden von intrazellulären Faktoren, z.B. dem Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS)-1, SHC („*SH containing*“), ras („*rat sarcoma*“), Raf-1 (Serin/Threonin-spezifische-Proteinkinase) oder der MAP (Mitogen-Aktiviertes-Protein)-Kinase weiter übertragen [353,354]. Die in der Signalkaskade gebildeten Substanzen sind für Zellantworten wie Apoptose oder veränderte Zellmobilität verantwortlich und greifen ebenfalls in die Regulierung des Zellzyklus sowie der Genexpression ein [156]. Dadurch kommt dem IGF-IR eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese zu, die nicht nur mitogene, sondern auch antiapoptotische, transformierende und wachstumsstimulierende Eigenschaften beinhaltet [34,35,83,226].

Die transformierende Eigenschaft des IGF-IR wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in mehreren Studien untersucht. So konnten z.B. normale Fibroblasten durch eine IGF-IR Überexpression transformiert werden [79,291,292,540].

Antiapoptotische Effekte des IGF-IR werden über die Hemmung oder Stimulierung von Proteinen der BCL-2 Familie vermittelt. Dabei wird sowohl die Expression von proapoptotischen (BAX, BCL-x_s) als auch von antiapoptotischen (BCL-2, BCL-x_L) Proteinen beeinflusst und die Einschaltung verschiedener „*survival-pathways*“ bedingt. Die durch den IGF-IR veränderten Signalkaskaden von BAX, BCL-x_s, BCL-2 und BCL-x_L haben zur Folge, dass die Aktivierung der für die Apoptose wichtigen Caspasen verhindert wird [83]. Zusätzlich kann auch indirekt über den dem IGF-IR nachgeschalteten, bisher nicht vollständig aufgeklärten Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)-Weg, die Aktivität von Caspasen gehemmt werden [83]. Die antiapoptotischen Eigenschaften des IGF-IR werden hauptsächlich durch die Repression seiner Liganden IGF-I und IGF-II, aber auch durch die Hemmung des IGF-IR selbst, reduziert. Das Tumorsuppressorgen p53, dessen Funktionsverlust bei der Entstehung und Progression verschiedener Tumoren eine zentrale Bedeutung zukommt [173], hemmt beispielsweise die Transkription des IGF-IR und seiner Liganden. Zusätzlich ist p53 in der Lage, die Expression des IGF-Bindungsproteins-3 zu steigern. Durch die Bindung von IGFs an ihre Bindungsproteine wird die Bioverfügbarkeit der IGFs gehemmt [83]. Möglicherweise, bedingt durch eine p53-Mutation, weisen transformierte Zellen eine vermehrte IGF-IR Expression auf [34] und reagieren deshalb stärker auf exogene Wachstumsfaktoren als normale Zellen [304].

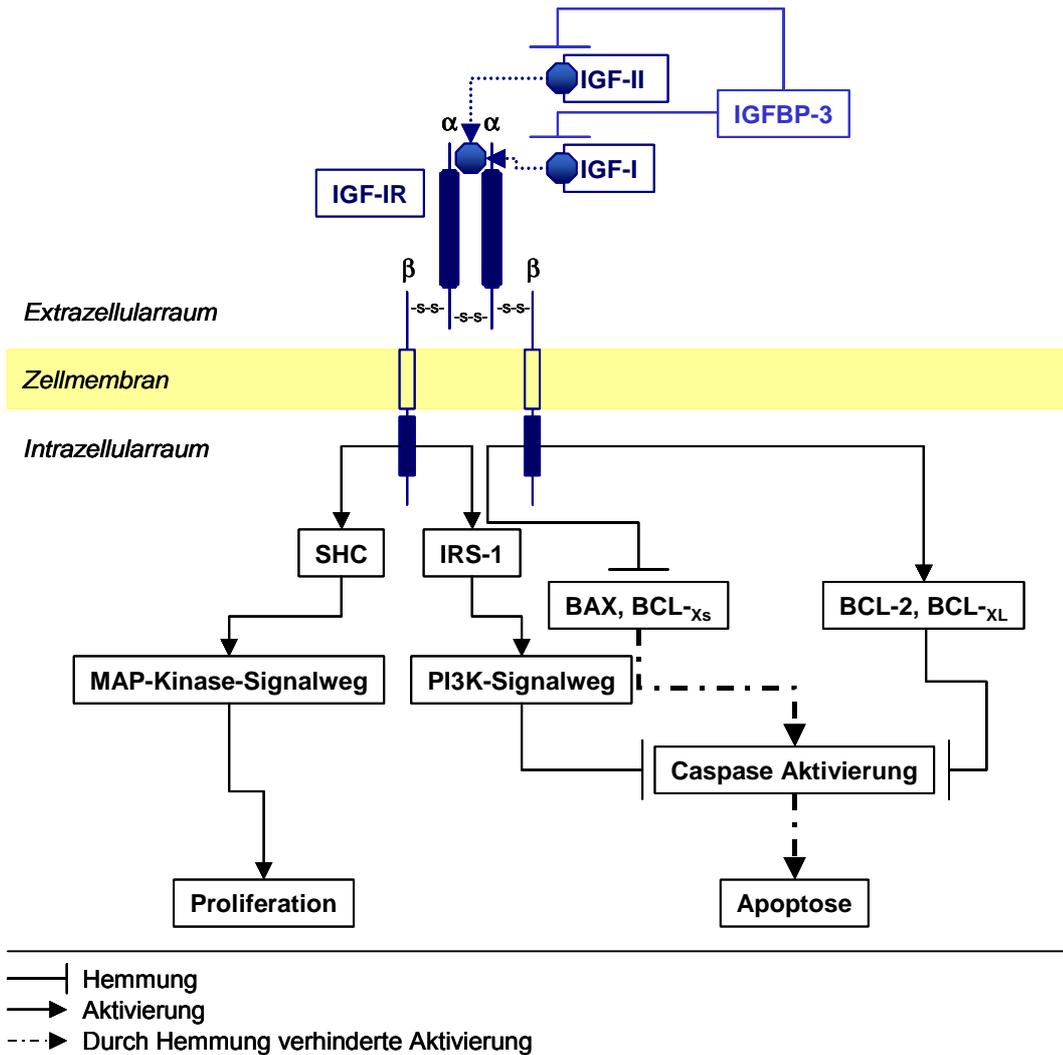


Abb. 6: Struktur des IGF-IR und einige seiner Signaltransduktionswege.

Der IGF-IR gehört zur Klasse der Rezeptortyrosinkinase. Die zwei α -Bindungseinheiten und die zwei β -Tyrosinkinaseeinheiten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die IRS-Proteine verbinden den IGF-IR mit dem PI3K-Signalweg, während über SHC die Verbindung zum MAP-Kinase-Signalweg hergestellt wird. Proteine des PI3K-Signalwegs interagieren mit dem MAP-Kinase-Signalweg und umgekehrt. Die antiapoptotische Eigenschaft des IGF-IR kann entweder durch eine Hemmung des Rezeptors selbst oder durch die Hemmung seiner Liganden IGF-I und IGF-II auf mRNA-Ebene, z.B. durch p53, unterbunden werden. Auch induziert p53 die Bildung von IGFBP-3-mRNA.

2.2.3.2 IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR)

Der IGF-IIR spielt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum, die Überlebensrate und die Differenzierung von Zellen [353,551]. Im Gegensatz zu IGF-II binden IGF-I und Insulin nur mit geringer Affinität an den IGF-IIR [75,321]. Bislang konnte nicht geklärt werden, ob dieser Rezeptor eine Funktion in der IGF-I Signalübertragung besitzt [75,240].

Der IGF-IIR ist ein 230 kDa großes, multifunktionelles, membrandurchspannendes Glykoprotein mit einer hochaffinen Bindungsstelle für IGF-II (Abbildung 7) [75] und zwei Bindungsstellen für Mannose-6-Phosphat (M6P) [284]. Das Gen des IGF-IIR liegt beim Menschen auf dem Chromosom 6 [344] und unterliegt in der Maus dem maternalen Imprinting [31]. Der IGF-IIR ist an der Feinregulierung wachstumsverantwortlicher Signale in der Embryonalentwicklung beteiligt und kontrolliert die extrazelluläre IGF-II Konzentration durch Internalisierung und Degradation [75,240,617,619].

Durch seine Bindungsstellen für M6P ist der IGF-IIR in der Lage, auch lysosomale Enzyme zu binden [523]. Proliferin [351], Retinsäure [294] und möglicherweise Thyreoglobulin [531] binden ebenfalls an diesen Rezeptor. Durch Bindung an den IGF-IIR werden IGF-II und extrazelluläre Enzyme durch Endozytose in die Zelle befördert und dort in den Lysosomen proteolytisch abgebaut [75,240]. Weiterhin ist der IGF-IIR an der Zielsteuerung von lysosomalen Enzymen vom Golgi-Apparat zu prä-lysosomalen Kompartimenten beteiligt [75,240]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass IGF-II die Endozytose lysosomaler Enzyme hemmt [307,310,379].

Die Rolle des IGF-IIR als Tumorsuppressorgen [236,350,432] wird deutlich bei einem Funktionsverlust des IGF-IIR [353,551]. Dieser kommt häufig vor, da das IGF-IIR Gen in seiner kodierenden Region verschiedene Mikrosatelliten beinhaltet, die leicht mutieren [617,642]. Ein funktioneller IGF-IIR bindet nicht nur latentes TGF- β als Substrat [323,432], sondern aktiviert durch eine Plasmin-vermittelte Proteolyse latentes TGF- β [617]. Aufgrund eines Funktionsverlustes des IGF-IIR kann es dementsprechend zu einer Akkumulation von IGF-II und der Herunterregulierung von TGF- β 1 kommen, verbunden mit einer erhöhten Zellproliferation [617,642].

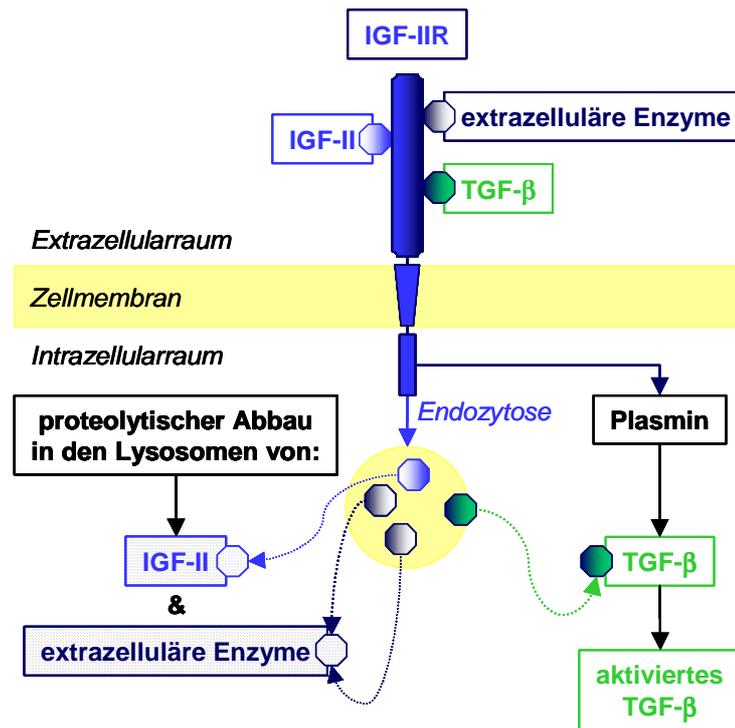


Abb. 7: Struktur und Wirkung des IGF-IIR.

Der IGF-IIR ist ein Glykoprotein mit einer großen extrazellulären Domäne und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne, die durch eine Transmembran-Region miteinander verbunden sind. Der IGF-IIR führt durch Induzierung einer Proteolyse latentes TGF- β in seine aktive Form über und reguliert die extrazelluläre IGF-II-Konzentration.

2.2.4 Bindungsproteine für IGFs

Im Gegensatz zum Insulin zirkulieren die IGFs im Serum nicht frei, sondern sind an spezifische Bindungsproteine gebunden [528]. Zur Zeit sind sechs charakterisierte hochaffine Bindungsproteine für IGFs beschrieben, welche als IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 und -6 bezeichnet werden [266,547].

2.2.4.1 Genlokalisierung der IGFBPs

Die Gene der menschlichen IGFBPs sind auf verschiedenen Chromosomen mit unterschiedlichen Genlängen lokalisiert:

Bindungsprotein	Chromosom	Länge (kb)
• IGFBP-1	7q [172,266]	5,5 [266]
• IGFBP-2	2q [172,266]	32,0 [172,266]
• IGFBP-3	7q [172,266]	8,9 [172,266]
• IGFBP-4	17q [6,266]	15,3 [266,644]
• IGFBP-5	2q [172,266]	33,0 [172,266]
• IGFBP-6	12 [172,266]	4,7 [172,266]

2.2.4.2 Struktur der IGFBP-Gene und -Proteine

Die Gene der IGFBPs setzen sich aus vier Exons (Exon 1-4) zusammen, die durch drei Introns voneinander getrennt sind (Abbildung 8). Eine Ausnahme bildet IGFBP-3, das noch ein zusätzliches untranslatiertes Exon (Exon 5) enthält. Die in den IGFBPs korrespondierenden Exons haben vergleichbare Längen und korrelieren mit den drei Domänen der gebildeten Proteine. Exon 1 kodiert mit einer Länge von ca. 600 bp den 5'-untranslatierten Bereich, die N-terminale Domäne und einige wenige Aminosäuren der Linker-Region. Exon 2 mit weniger als 230 bp kodiert die Linker-Region. Exon 3 und Exon 4 kodieren die C-terminale Domäne des Proteins [266].

Die Länge der gebildeten mRNA unterscheidet sich zwischen den einzelnen IGFBPs und variiert zwischen den verschiedenen Spezies. Die mRNAs der humanen Bindungsproteine besitzen folgende Größen: IGFBP-1, 1,6 kb; IGFBP-2, 1,5 kb; IGFBP-3, 2,4 kb; IGFBP-4, 1,7 kb; IGFBP-5, 1,7 & 6,0 kb und IGFBP-6, 1,1 kb. Die

Translation der entsprechenden mRNAs resultiert in 234 Aminosäuren (AS) für IGFBP-1, in 289 AS für IGFBP-2, in 264 AS für IGFBP-3, in 237 AS für IGFBP-4, in 252 AS für IGFBP-5 und in 216 AS für IGFBP-6 [266]. Daraus ergeben sich für die sechs Bindungsproteine im nativen Zustand Molekulargewichte zwischen 22,8 kDa und 31,4 kDa [266].

Obwohl sich die IGFBPs unter anderem bezüglich ihrer chromosomalen Lokalisation, ihrer Gengröße, ihres Molekulargewichts, ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Gewebsspezifität unterscheiden, gibt es in den Strukturen der sechs Bindungsproteine konservierte Bereiche, welche die Zugehörigkeit zu einer Familie determiniert [266]. In den hochkonservierten N-terminalen und C-terminalen Regionen befinden sich zehn bis zwölf bzw. sechs konservierte Cysteinreste. Studien mit IGFBP-Mutanten lassen vermuten, dass die beiden konservierten Domänen an der hochaffinen Bindung der IGFs beteiligt sind [120]. Die zentrale Linker-Region der IGFBPs ist dahingegen für jedes der sechs Bindungsproteine sehr unterschiedlich und besitzt bis auf IGFBP-4 keine Cysteinreste [266]. Hier können posttranslationale Modifikationen stattfinden [266].

2.2.4.3 Posttranslationale Modifikationen und Bindungsmotive

IGFBP-3 bis -6 kommen in nicht-glykosylierten und in glykosylierten Formen vor. Während IGFBP-3 und -4 N-glykosyliert sind, werden IGFBP-5 und -6 O-glykosyliert [266]. Diese Glykosylierung erhöht beispielsweise das Molekulargewicht von IGFBP-3 in der SDS-Page von 29 kDa auf 40-43 kDa [184]. Darüber hinaus besitzen alle IGFBPs potentielle Phosphorylierungsstellen, welche von Serin/Threonin-Proteinkinasen phosphoryliert werden können [142]. Bisher ist bekannt, dass IGFBP-1, -3, und -5 als Phosphoproteine sezerniert werden [42]. Während die Phosphorylierung von menschlichem IGFBP-1 eine Affinitätserhöhung gegenüber IGF-I [287] bewirkt, konnten für IGFBP-3 und -5 keine eindeutigen Effekte gezeigt werden [42].

Definierte Expressionsmuster von Bindungsproteinen in den verschiedenen Geweben und auch Zellkompartimenten lassen darauf schließen, dass IGFBPs maßgeblich an der gewebespezifischen Regulation der IGFs beteiligt sind. Da die beschriebenen posttranslationalen Modifikationen ebenfalls gewebe- bzw. zellspezifisch sind, scheinen sie die gewebespezifischen Wirkungen der IGFBPs mit zu beeinflussen. Während eine Glykosylierung in Zellinteraktionen eingreift, wirkt sich

eine Phosphorylierung mehr auf die biochemischen Eigenschaften, wie die Affinität zu IGFs, die Membranbindung oder die Empfindlichkeit gegenüber Proteasen aus. Hinweise, dass die in der Aminosäuresequenz existierenden Bindungsmotive mitverantwortlich für zell- und gewebespezifische Effekte sind, existieren ebenfalls [184].

Bindungsmotive, die durch eine bestimmte Aminosäurenabfolge determiniert sind, lokalisieren sich vor allem in der C-terminalen Domäne und sind in der Lage bestimmte Proteine zu binden. So besitzen IGFBP-1 und IGFBP-2 eine RGD-Sequenz als eine potentielle Integrin-Bindungsstelle [288,539]. Für IGFBP-3 und IGFBP-5 wird eine bestimmte Aminosäurenabfolge für den nukleären Import verantwortlich gemacht. Dieser Import wird durch die Importin- β -Untereinheit vermittelt [530]. Weiterhin besitzen IGFBP-3 und -5 eine Heparin-Bindungsstelle in der C-terminalen Domäne, die für die Bindung von vielen unterschiedlichen Molekülen verantwortlich sein kann, wie z.B. von Proteoglykanen der Zelloberfläche [66]. Die Bindung von Heparin, ALS, Plasminogen, Transferrin, Fibrin, Fibrinogen, Osteopontin sowie von verschiedenen weiteren Glykosaminoglykanen wurde in verschiedenen Studien gezeigt [184]. Eine für die Heparin-Bindungsstelle notwendige Aminosäuresequenz liegt ebenfalls in IGFBP-6 vor, das aber nur als unglykosyliertes Protein in der Lage ist Glykosaminoglykane zu binden [375]. Die IGFBP-3, -5 und 6 sind in der Lage, eine Proteolyse von IGFBP-4 zu verhindern. Dieser Proteolyse-inhibierende Effekt scheint mit der Heparin-Bindungsstelle assoziiert zu sein [192]. IGFBP-2 ist ebenfalls in der Lage, auch ohne Heparin-Bindungsmotiv Glykosaminoglykane zu binden [12,520]. Dies lässt darauf schließen, dass auch eine Glykosaminoglykanbindung zusätzlich über andere Bindungsmotive verläuft. Für IGFBP-4 wurden bisher keine solchen Bindungsmotive beschrieben [184].

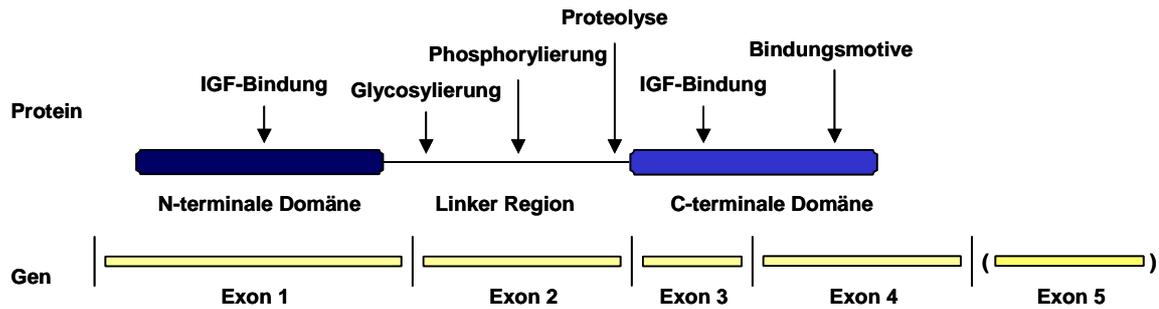


Abb. 8: Schematische Darstellung der Gen- und Proteinstruktur der IGF-BPs.

IGFBPs besitzen vier Exons, welche für die jeweiligen Domänen kodieren. IGFBP-3 enthält als einziges Bindungsprotein noch ein weiteres untranslatiertes Exon (Exon 5). Die N-terminale und C-terminale Domäne sind hochkonserviert und enthalten die IGF-Bindungsstellen. In der kaum konservierten Linker-Region finden die für jedes Bindungsprotein spezifischen posttranslationalen Modifikationen statt. Hier sind auch die Schnittstellen für den proteolytischen Verdau lokalisiert [266].

2.2.4.4 Expression und Serumspiegel

Die Beteiligung der IGF-BPs an der Embryonalentwicklung ist in einigen Studien beschrieben worden. Bindungsproteine sind ab dem 14. Tag der Embryonalentwicklung in Ratte und Maus zu finden [98,603]. Ihre unterschiedliche Expression im Verlauf der pränatalen wie auch der postnatalen Periode weist daraufhin, dass verschiedene Bindungsproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Organen unterschiedliche Aufgaben übernehmen [98,223,603]. So nimmt z.B. die Konzentration von IGFBP-1 im Laufe des Fetalwachstums bis zur Geburt und darüber hinaus bis zur Pubertät ständig ab und steigt danach erst wieder an [233]. Zudem ist IGFBP-1 in den Geweben des Fetus sehr viel höher konzentriert als im Serum [44]. Im menschlichem Serum hängen die Spiegel der verschiedenen IGF-BPs ebenfalls von der jeweiligen Altersstufe ab. IGFBP-3 ist nach der Geburt Hauptträger der IGFs im Serum [43,62]. Seine Serumkonzentration steigt nach der Geburt an und erreicht während der Pubertät die höchste Konzentration [43]. Im Gegensatz dazu ist der Serumspiegel von IGFBP-2 zum Zeitpunkt der Geburt hoch, nimmt während der Pubertät ab und steigt im Alter wieder an [61]. IGFBP-4 ist im Serum nach IGFBP-3 das zweithäufigste Bindungsprotein und steigt mit dem Alter an [296,487].

Bindungsproteine im Serum werden nicht nur mit der normalen Wachstumskontrolle assoziiert, sondern auch mit der Kanzerogenese in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen ergaben, dass hohe IGFBP-3-Spiegel im Serum z.B. das Risiko, an

Brustkrebs zu erkranken senken [237]. Niedrige IGFBP-3-Spiegel scheinen das Risiko, am kolorektalen Karzinom zu erkranken, zu begünstigen [212]. Ein Anstieg von IGFBP-1 im Serum scheint eine protektive Wirkung in Bezug auf die Entwicklung eines Kolonkarzinoms zu haben [290], was allerdings in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden konnte [446]. Hohe IGFBP-2-Spiegel in Tumorgewebe (Prostata, Ovar oder Kolon) korrelieren mit der Malignität dieses Gewebes [184]. Hohe IGFBP-2-Spiegel im Serum sind hingegen mit einem protektiven Effekt auf die Entstehung kolorektaler Karzinome assoziiert [290]. Allerdings konnte in einer anderen Studie kein Zusammenhang zwischen Serum IGFBP-2 und Kolonkrebsentstehung gefunden werden [446]. Bei manifestiertem Kolonkrebs wurden ebenfalls erhöhte IGFBP-2-Spiegel im Serum gemessen [496,497].

2.2.4.5 Wirkungen der IGFBPs: IGF-abhängige und IGF-unabhängige Effekte

IGFBP-1 bis -6 zeichnen sich durch eine hohe Affinität gegenüber IGF-I bzw. IGF-II aus, welche die Affinität der IGFs zum IGF-I Rezeptor noch übersteigt. Dies befähigt diese Bindungsproteine nicht nur als Träger-Proteine zu agieren, sondern sie verlängern auch die Halbwertszeit der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren und gelten als Modulatoren für die Verfügbarkeit und Aktivität von IGFs [286]. Solche Eigenschaften sind in der Kanzerogenese von großer Bedeutung [184]. Ein durch IGFBPs gebundenes IGF ist normalerweise inaktiv, weil es in diesem Zustand keinen Liganden für seine Rezeptoren darstellt und somit auch kein Signal auslöst [305]. Zu dieser hemmenden Funktion sind alle bisher beschriebenen Bindungsproteine in der Lage, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte [42,119,184,552]. Neben der Hemmung der IGF-Aktivität wird aber auch einigen Bindungsproteinen eine Potenzierung der IGF-Wirkung zugeschrieben [121,122,408], an der teilweise posttranslationale Modifikationen beteiligt sind.

Als Vermittler von Effekten, die unabhängig von einer IGF-Bindung sind, werden zur Zeit intakte oder auch proteolytische Fragmente der IGFBPs [184] und das Vorhandensein einer RGD-Sequenz, einer Integrin-Bindungsstelle [288], diskutiert. Darüber hinaus scheinen IGFBP-Rezeptoren [9,348,434], die Lokalisation von IGFBPs im Kern und Interaktionen der IGFBPs mit transkriptionalen Modulatoren [7,364,485] an Effekten von IGFBPs beteiligt zu sein, die unabhängig von einer IGF-Bindung stattfinden.

Wirkungen verschiedener IGFBPs, die abhängig oder unabhängig von einer

IGF-Bindung sind, sollen im folgenden exemplarisch dargestellt werden. IGFBP-1 kann die mitogene Wirkung von IGFs je nach Phosphorylierungszustand inhibieren oder aktivieren [285]. Dephosphoryliertes IGFBP-1 besitzt eine reduzierte Affinität für IGF-I und fördert die IGF-I vermittelte DNA-Synthese, während phosphoryliertes IGFBP-1 IGF-I vermittelte Effekte inhibiert [184]. Eine IGF-unabhängige Wirkung von IGFBP-1 ist die Stimulierung der Zellmigration [288]. IGFBP-2 ist ebenso wie IGFBP-1 in der Lage, bifunktionell zu agieren. In Kolonkarzinomzelllinien wirkt IGFBP-2 auf die durch autokrines IGF-II stimulierte Proliferation hemmend. Da die IGFBP-2-bedingte Hemmung in den IGF-sensitiven Zellen infolge einer Zugabe von exogenem IGF-II wieder aufgehoben werden konnte, lässt dies auf die Beeinflussung IGF-abhängiger Ereignisse in diesen Kolonkarzinomzellen durch IGFBP-2 schließen [253]. Hinweise auf die hemmenden Eigenschaften von IGFBP-2 auf IGF-stimuliertes Wachstum liefern auch *in vivo* erhobene Befunde [249]. IGF-unabhängige mitogene Eigenschaften von IGFBP-2 wurden in verschiedenen Zelllinien, die aus anderen Geweben als dem Kolon entstammen beschrieben [24,248,559] und wurden auch für IGFBP-5 gezeigt. Ausserdem erhöht IGFBP-5 die Proliferation von Zellen unabhängig von der Stimulierung über den IGF-IR [10]. IGF-vermittelte Effekte potenziert IGFBP-5 durch eine Bindung an die extrazelluläre Matrix (ECM) [9]. Liegt IGFBP-5 hingegen ungebunden vor, wirkt es inhibitorisch auf die mitogene Stimulierung durch IGF [270]. Ähnlich verhält sich IGFBP-3, das analog zu IGFBP-5 an Zellmembranen binden kann und dadurch die Wirkung der IGFs ebenfalls moduliert [42,184,286]. Zusätzlich wird für IGFBP-3 noch eine direkte Wechselwirkung mit dem IGF-IR postuliert [411]. Neben seiner Fähigkeit IGFs zu binden, blockiert IGFBP-3 das Wachstum von Fibroblasten IGF-unabhängig [124]. Inhibitorische IGF-unabhängige Effekte sind bisher nur für IGFBP-3 beschrieben worden [184]. IGFBP-6 scheint primär an IGF-abhängigen Wirkungen beteiligt zu sein, über IGF-unabhängige Effekte von IGFBP-6 ist bisher nichts bekannt [184]. Anhand einiger Studien konnte gezeigt werden, dass IGFBP-6 die IGF-II-induzierten mitogenen Signale auf Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion und Koloniebildung in verschiedenen Zellen inhibiert [21,22,302,313,377,568].

2.2.5 Proteasen der Bindungsproteine

Die Schnittstellen für verschiedene Endoproteasen liegen in der Regel im zentralen Bereich des Bindungsproteins, da sich die konservierten Bereiche, d.h. die N-terminale als auch die C-terminale Domäne, relativ resistent gegenüber proteolytischen Angriffen zeigen [42]. Die Proteolyse der Bindungsproteine beeinflusst die Affinität zu ihren Bindungspartnern [42] und trägt somit zur lokalen Verfügbarkeit von IGFs bei [131]. In der Regel führt eine Proteolyse zu IGFBP-Fragmenten die entweder keine oder nur noch eine verminderte Affinität gegenüber IGFs zeigen [184,570]. Die meisten Proteasen sind in der Lage verschiedene Bindungsproteine zu spalten, während einige Proteasen Bindungsprotein-spezifisch sind [372].

In vitro wurden Cathepsin D und L, Matrix-Metalloprotease-11 (MMP-11) und Plasmin als potentielle Proteasen für IGFBP-1 beschrieben [91,118,131,374,652]. Gibson *et al.* 2001 konnten zeigen, dass die unphosphorylierte Form von IGFBP-1 spezifisch durch Proteasen gespalten wird, während die phosphorylierte Form resistent gegenüber dieser Proteolyse ist [206].

Proteolytische Fragmente von IGFBP-2 wurden in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten (Serum, Milch, etc.) detektiert [184]. Als potentielle Proteasen wurden eine Ca^{2+} -abhängige Serinprotease [129,216,450] und Plasmin beschrieben [390,495]. PAPP-A, eine Metalloprotease, welche lange als IGFBP-4-spezifisch galt, spaltet IGFBP-2 ebenfalls [412].

IGFBP-3 und IGFBP-5 werden durch folgende Proteasen gespalten: Plasmin [90,338], Thrombin [648], Matrix-Metalloproteasen (MMP) [125,191,420], Cathepsin D [118,134], Prostate-specific-Antigen (PSA) [123,126] und Serinproteasen [295,381]. Darüber hinaus ist für die Proteolyse von IGFBP-3 noch eine Kation-abhängige Cysteinprotease [525] und der Nerven-Wachstumsfaktor γ -NGF [486] verantwortlich. IGFBP-5 wird zusätzlich von PAPP-A und PAPP-A-2, Metalloproteasen der Metzincin-Familie gespalten. Diese Spaltung ist aber im Gegensatz zur IGFBP-4-Spaltung durch PAPP-A IGF-unabhängig [345,441,504].

Neben der Proteolyse von IGFBP-4 durch γ -NGF („*nerve growth factor*“) [486] wird IGFBP-4 von Cathepsin D [76,118] und den neutrophilen Proteasen Cathepsin G und Elastase gespalten [207]. Die Annahme, dass IGFBP-4 mit dem proteolytischen Plasmin-System interagiert, wird kontrovers diskutiert. Während in einer Kolonkarzinomzelllinie (HT-29-D4) gezeigt werden konnte, dass IGFBP-4 sowohl von

löslichem als auch von oberflächengebundenem Plasmin gespalten wird [495], zeigte sich IGFBP-4 in einer anderen Studie relativ resistent gegenüber der Proteolyse durch Plasmin [68]. Für IGFBP-4 wurde eine Ca^{2+} -abhängige Serinprotease beschrieben [111,113,383,450,493], die sich aber von der bisher am meisten untersuchten IGFBP-4-spaltenden Metalloprotease PAPP-A [135,346] unterscheidet. IGFBP-6 ist unter physiologischen Bedingungen sehr stabil gegenüber Proteolyse. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass IGFBP-6 ein Substrat für den γ -NGF [486] als auch für die lösliche Form des Plasmin ist [495]. Auch Chymotrypsin und Trypsin sind in der Lage, IGFBP-6 zu spalten [375].

2.2.6 Das IGF-Bindungsprotein-4 (IGFBP-4)

2.2.6.1 Genomische Lokalisation und Promotorregion

Neben dem bereits in Kapitel 2.2.4 erwähnten Gen für hIGFBP-4 wurden auch die Gene für IGFBP-4 in Nagetieren identifiziert. Das IGFBP-4 Gen in der Ratte (rIGFBP-4) besitzt eine Größe von 12 kb [202] und das IGFBP-4 Gen in der Maus (mIGFBP-4) besitzt eine Größe von 11,3 kb. In der Maus befindet sich das Gen für IGFBP-4 auf dem Chromosom 11 [650].

Das rIGFBP-4-Gen ist ebenso wie das bereits beschriebene hIGFBP-4 und die anderen fünf Bindungsproteine aus vier Exons und drei Introns aufgebaut [144]. Während die Größe der Introns [202] zwischen dem rIGFBP-4 und dem hIGFBP-4 Gen ein wenig variiert, sind die „*splicing sites*“ in den Genen der beiden Spezies hoch konserviert [644]. Zusätzlich scheint es noch eine Zelltyp-abhängige „*splicing*“-Variante von IGFBP-4 in einer Fibroblastenzelllinie der Maus zu geben, deren Produkt nicht mehr in der Lage ist, IGF zu binden [215].

Bei dem Vergleich der Promotorregion von Mensch, Maus und Ratte wurde festgestellt, dass diese Region bis auf wenige Ausnahmen in allen drei Spezies hoch konserviert ist [150,202,215,644]. Die IGFBP-4-Promotorregion enthält eine typische TATA-Box und in Nagern zusätzlich eine CAAT-Box [150,202,215]. Darüber hinaus sind in der Promotorregion aller drei Spezies potentielle regulatorische Elemente, wie CRE („*cAMP response elements*“), AP-1, SP-1 und SRE („*steroid response elements*“) lokalisiert [150,202,215]. Diese Promotorsequenzen, auch cis-regulatorische Kontrollelemente genannt, stellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren dar.

Auffällig im IGFBP-4-Gen ist die Frequenz der Alu-Repeat-Sequenzen, die im Durchschnitt alle 1000 bp auftreten [644]. Da die Häufigkeit der Alu-Repeats im IGFBP-4-Gen über der normalen Verteilung im menschlichen Genom liegt [258], lässt sich vermuten, dass das IGFBP-4 Gen ein „*Hotspot*“ für Alu-Integrationen ist. Eine hohe Dichte von Alu-Regionen ist oft mit genomischer Instabilität [87] und einer höheren Frequenz an Sequenz-Polymorphismen [38] assoziiert.

2.2.6.2 cDNA und Protein

Die cDNA des humanen IGFBP-4 (hIGFBP-4) besitzt einen ~400 bp großen nicht-translatierten Bereich am 5'-Ende und einen >900 bp untranslatierten Bereich am

3'-Ende. Die cDNA für IGFBP-4 aus der Ratte (rIGFBP-4) besitzt einen ~185 bp großen untranslatierten Bereich am 5'-Ende und einen >318 bp untranslatierten Bereich am 3'-Ende. Der offene Leserahmen kodiert in den cDNAs beider Spezies ein 20 bis 21 bzw. ein 21 Aminosäuren langes Signalpeptid und ein aus 237 Aminosäuren bzw. 233 Aminosäuren bestehendes reifes Protein für hIGFBP-4 bzw. rIGFBP-4 [343,547].

2.2.6.3 IGFBP-typische Domänen: Aufteilung und Eigenschaften im IGFBP-4-Protein

2.2.6.3.1 Die N-terminale Domäne: IGF-Bindung

Die N-terminale Domäne beinhaltet zwölf der 20 Cysteinreste und besitzt einen für die IGF-Bindung wichtigen Sequenzabschnitt (Leu⁷²-Ser⁹¹) [484]. Dies ist für IGFBP-4 die bisher einzige beschriebene Bindungsstelle, mit der IGF-I bzw. IGF-II gebunden werden kann [484]. Dieser Sequenzabschnitt wurde in einer weiteren Studie bestätigt, welche den hydrophoben Sequenzabschnitt (Leu⁷²-Met⁸⁰) für die IGF-Bindung in IGFBP-4 identifizierte. Mutationen innerhalb dieses Sequenzabschnittes (Leu⁷²-His⁷⁴, Gly⁷⁵-Ser⁹¹) führen zu einem völligen Verlust der IGF-Bindungsaktivität, während Deletionen wie (Leu⁷²) und (Met⁸⁰-Ser⁹¹) nur zu einer reduzierten IGF-Bindung führten [84].

Eine Beteiligung der für alle Bindungsproteine konservierten Cysteinreste der konservierten Domänen an der IGF-II Bindung wurde ebenfalls gezeigt. Hierbei scheint die Sekundär-Struktur der IGF-BPs, die durch die Disulfidverbindungen zwischen den Cysteinresten zustande kommt, die IGF-Bindung zu unterstützen. Dies zeigt sich daran, dass Fragmente der IGF-BPs entweder eine reduzierte oder keine Bindungsaktivität aufweisen [341,425,484,570]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Einzelmutationen der Cysteinreste zu einer reduzierten IGF-Bindungsaktivität führen, wobei die Cysteinreste Cys 9 und Cys 12 in der N-terminalen Region eine größere Bedeutung bezüglich der IGF-Bindung einnehmen, als die Cysteinreste Cys 17 und Cys 20 in der C-terminalen Region [84]. Die richtigen Verknüpfungen der Disulfidbrücken dieser Cysteinreste sind ebenfalls essentiell für die biologische Aktivität eines Bindungsproteins und sind für IGFBP-4 in Abbildung 9 dargestellt. Insgesamt wurden acht Disulfidbrücken in IGFBP-4 ermittelt, wovon vier allein in der N-terminalen Domäne lokalisiert sind. Zwei dieser vier

Disulfidbrücken sind in gleicher Form auch in den anderen fünf Bindungsproteinen zu finden [104].

Die Tertiär-Struktur ist für die meisten der Bindungsproteine hingegen noch nicht dargestellt worden [104,266].

2.2.6.3.2 Die Linker-Region: Glykosylierung

Im Gegensatz zu allen anderen Bindungsproteinen besitzt IGFBP-4 in der nicht-konservierten Linker-Region zwei zusätzliche Cysteinreste [546,547], die ebenfalls miteinander verbunden sind [104], aber scheinbar keinen Einfluss auf die IGF-Bindung haben [104,484].

Spezifische Schnittstellen für IGF-abhängige Proteasen liegen in Position Lys¹²⁰-His¹²¹ [492] und Meth¹³⁵-Lys¹³⁶ [135]. Für die durch Proteolyse entstandenen N- bzw. C-terminalen Fragmente von IGFBP-4 werden IGF-abhängige bzw. IGF-unabhängige biologische Funktionen postuliert [570]. Weiterhin befindet sich in der Linker-Region eine potentielle N-Glykosylierungsstelle und zwar an Position Asn¹⁰⁴ [97,266]. Das aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht lässt auf ein ca. 26 kDa großes IGFBP-4-Protein schließen [547]. In der nicht-reduzierenden SDS-PAGE werden zwei für IGFBP-4 spezifische Banden sichtbar. Durch seine N-Glykosylierungsstelle existiert IGFBP-4 nicht nur als 24 kDa großes unglykosyliertes Protein, sondern auch als 28 kDa großes glykosyliertes Protein [97]. Dies wurde durch die Verringerung des Molekulargewichts von 28 kDa auf 24 kDa nach der Behandlung mit Endoglykosidase-F bestätigt, während das 24 kDa-Protein nach dieser Behandlung keine Veränderung seiner molekularen Masse aufwies [97]. Die Zusammensetzung der Glykosylreste in IGFBP-4 ist gewebeabhängig und zusätzlich abhängig vom physiologischen Status des Gewebes [104,320]. Bisher wurden fünf verschiedene Glykosylierungsisoformen für IGFBP-4 beschrieben [105]. Diese identifizierten Glykane sind zwei-antennig („*biantennary*“) und unterscheiden sich in der Anzahl der terminalen Sialinsäurereste und/oder infolge einer Modifikation durch Fukose [104]. Die Aufgaben dieser Oligosaccharideinheiten können in „spezifische“ und „unspezifische“ Funktionen unterteilt werden. „Unspezifische“ Funktionen können unter anderem an der korrekten Proteinfaltung und an der Sekretion des Proteins beteiligt sein. „Spezifische“ Funktionen dieser Glykane beinhalten die Beteiligung an der Zell-Zell-Adhäsion oder auch an der Zell-ECM (Extrazelluläre Matrix)-Adhäsion. Die

spezifische Funktion der Glykane konnte allerdings bislang nur für IGFBP-3 nachgewiesen werden [183]. Wenngleich ein Zusammenhang zwischen IGF-Bindung und der Glykosylierung von IGFBP-4 diskutiert wird [570], so ist doch über die physiologische Bedeutung der IGFBP-4-Glykosylierung bislang nichts konkretes bekannt [104,184].

2.2.6.3.3 Die C-terminale Domäne: Lokalisation von Bindungsmotiven

Neben Sequenzen, die für die IGF-Bindung wichtig sind, findet man in der C-terminalen Domäne sechs der 20 Cysteinreste von IGFBP-4 [266]. Diese sechs Cysteinreste sind durch drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Das gleiche Verknüpfungsmuster in der C-terminalen Region findet sich auch in IGFBP-2 und -6 [104].

Zwar konnte in der Linker-Region und in der C-terminalen Domäne bisher keine direkte IGF-Bindungsstelle gefunden werden, doch sind die Fragmente His¹²¹-Gln¹³⁷ und Arg¹⁴²-Gln²³⁷ trotzdem wichtig für die hochaffine Bindung von IGFs. Ein weiteres, in der C-terminalen Domäne liegendes Fragment (Cys²⁰⁵-Val²¹⁵), scheint zusätzlich die IGF-Bindung zu erleichtern [484]. Es konnte gezeigt werden, dass im Serum zirkulierende N-terminale Fragmente von IGFBP-4 IGF-I und IGF-II mit reduzierter Affinität (5 bzw. 17 nM) und zirkulierende C-terminale Fragmente von IGFBP-4 IGF-I und IGF-II mit sehr geringer Affinität (>60 bzw. 690 nM) binden [570]. Die C-terminale Region, die eine IGF-Bindung fördert, scheint nicht nur für IGFBP-4 [84,484,570], sondern auch für IGFBP-2 [186] und IGFBP-3 [565] eine Bedeutung zu haben. Da IGFBP-2 und IGFBP-6 IGF-II mit höherer Affinität als IGF-I binden, wurde zunächst ein Zusammenhang zwischen der Disulfidbrückenbindung in der C-terminalen Region und der IGF-II-Bindung postuliert [186]. IGFBP-4, das die gleiche Konstellation der Disulfidbrückenbindung wie IGFBP-2 und IGFBP-6 in der C-terminalen Region besitzt [104], bindet allerdings IGF-I und IGF-II mit gleicher Affinität (IGF-II $K_d=1,7$ nM; IGF-I $K_d=1,2$ nM) [570]. Dies bedeutet, dass die C-terminale Domäne der IGFBPs die optimale Bindung von IGFs ermöglicht, dass aber der Einfluss einer Disulfidbrückenbildung für die IGF-Bindung vernachlässigbar ist [570].

Die Bindung an die Zelloberfläche oder an die extrazelluläre Matrix (ECM), die über Bindungsmotive in den C-terminalen Domänen verschiedener Bindungsproteine erfolgt, beeinflusst die Wirkung der IGFBPs auf die IGFs. Bisher konnte für IGFBP-4,

wahrscheinlich wegen des Fehlens solcher Bindungsmotive, keine Assoziation an Membranen nachgewiesen werden. IGFBP-4 scheint also nur in löslicher Form vorzuliegen [184,305]. Das Vorhandensein solcher Bindungsmotive ist ausserdem mitverantwortlich für die Gewebsspezifität eines Bindungsproteins. Perfusionsstudien an Rattenherzen haben gezeigt, dass IGFBP-3 wie auch IGFBP-4 mikrovaskuläres Endothel durchwandern, sie distributieren aber in unterschiedliche Gewebe. Während IGFBP-3 sich in erster Linie im Herzmuskel verteilte, war IGFBP-4 vornehmlich im Bindegewebe zu finden [28,65]. Verantwortlich für die spezifische Bindung von IGFBP-3 an bestimmte Zellen, z.B. Endothelzellen, scheint eine kleine Region in der C-terminalen Domäne, die Heparin-Bindungsstelle zu sein [66,317]. Da IGFBP-4 eine solche Stelle nicht besitzt, bindet es auch nicht an Endothelzellen [66]. Eine Chimäre von IGFBP-4, in der diese Region spezifisch durch die entsprechende Region aus IGFBP-3 ausgetauscht wurde, ist in der Lage, an Endothelzellen zu binden und verhält sich auch in den Perfusionsstudien in seiner Verteilung wie IGFBP-3 [317]. Die Bedeutung des Heparin-Bindungsmotivs wurde schließlich untermauert, indem diese Region als 18-mer-Peptid synthetisiert wurde und gezeigt werden konnte, dass dieses Peptid auch als solches an Endothelzellen bindet [67]. Obwohl IGFBP-6 eine ähnliche Heparin-Bindungsstelle besitzt, bindet es nicht an Endothelzellen. Wird die Heparin-Bindungsstelle in IGFBP-6 durch das 18-mer-Peptid ersetzt, ist IGFBP-6 trotzdem nicht in der Lage an Endothelzellen zu binden [317]. Zusammenfassend belegen diese Studien die Bedeutung von Bindungsmotiven für die Assoziation mit entsprechenden Strukturen, zeigen aber auch, dass in einem Bindungsprotein noch andere Faktoren eine Rolle für die Bindung an Zellen bzw. Proteine spielen. In IGFBP-6 maskiert wahrscheinlich die O-Glykosylierung diese Bindungsstelle [375]. Im Gegensatz zu IGFBP-6 sind IGFBP-3 und IGFBP-4 N-glykosyliert [65].

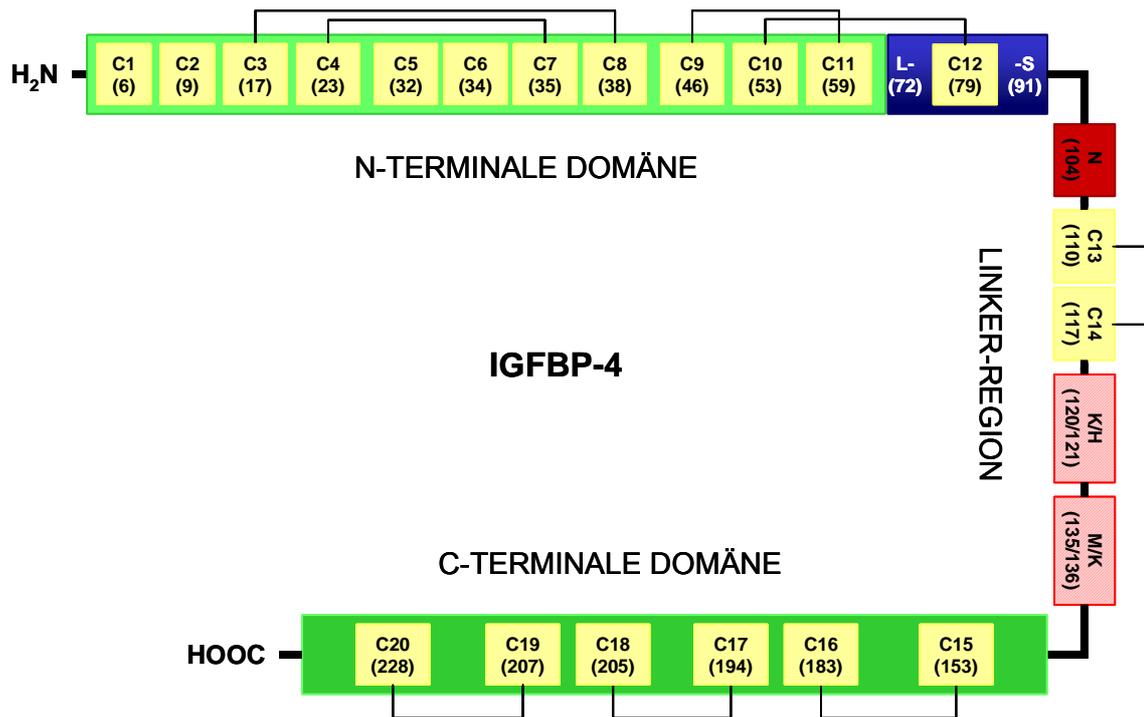


Abb. 9: Schematische Darstellung von IGFBP-4.

Die Abbildung zeigt die bisher bekannten Disulfidbindungen sowie ihre Position. In der Linker-Region sind die Glykosylierungsstelle an Position 104 und die beiden Schnittstellen für einen Proteaseverdau lokalisiert. Die in der N-terminalen Domäne lokalisierte IGF-Bindungsstelle, L(72) bis S(91), ist durchgängig blau unterlegt. Cystein (C), Lysin (K), Histidin (H), Methionin (M), Asparagin (N), Leucin (L) und Serin (S).

2.2.6.4 Regulation von IGFBP-4 auf Transkriptionsebene

Die Promotorregion für die drei Spezies Maus, Ratte und Mensch ist fast über die gesamte Sequenz konserviert, weshalb angenommen wird, dass trans-Elemente die Expression von IGFBP-4 in den drei Spezies ähnlich beeinflussen [215]. Eine Erklärung für einen Spezies-übergreifenden Regulationsmechanismus von IGFBP-4 bietet die Präsenz der CRE-Bindungsstelle in allen drei Spezies. Durch Forskolin [89], einen cAMP-Agonisten, durch PTH (Parathormon) [343], dessen Wirkung cAMP-vermittelt ist und durch cAMP selbst [108] wurde die Expression von IGFBP-4 in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch gesteigert. Darüber hinaus gibt es trotz der starken Konservierung des Promotorbereichs auch verschiedene Stellen, die zwischen den Spezies variieren und so einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Effekte verschiedener Substanzen auf die Expression von IGFBP-4 in unterschiedlichen Spezies bieten. In zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Studien wurde die gewebe- bzw. zellspezifische Einflussnahme auf die

IGFBP-4-Expression durch Hormone, Zytokine sowie verschiedene physiologische Stimuli untersucht und ist in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tab. 2: IGFBP-4-regulierende Substanzen: *in vitro* und/oder *in vivo*.

Wachstumsfaktoren				
Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
bFGF	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
	fötale Lungenfibroblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[476]
EGF	fötale Lungenfibroblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[476]
	Karzinomzellen des Thyroidfollikels	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[23]
GH	β-Zellen des Pankreas (TC3)		<i>in vitro</i> –	[303]
	Serum (Zink Mangel)	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[428]
	Serum (Postmenopause)	Mensch	<i>in vivo</i> ↑	[299]
IGF-I	Serum (bGH transgen)	Maus	<i>in vivo</i> ↑	[60]
	Endothelzellen der Retina	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[205]
	Endothelzellen des Glomerulum	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[205]
	Myometrialzellen		<i>in vitro</i> ↑	[265]
	Zellen der glatten Muskulatur	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[327]
	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[230]
	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Schwein	<i>in vitro</i> ↓	[169]
	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[242]
	Myoblasten (L6)	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[384]
	Fibroblasten	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[133]
	Fibroblasten	Bovine	<i>in vitro</i> ↑	[133]
	Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[20]
	Knochenzellen (TE 89)	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[409]
IGF-II	Knochenmarkzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[586]
	Nebennierenrinenzellen	Bovine	<i>in vitro</i> ↑	[188]
	β-Zellen des Pankreas (TC-3)		<i>in vitro</i> –	[303]
	Non-small cell lung cancer cells		<i>in vitro</i> ↓	[188]
	Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[20]
PDGF-BB	Knochenzellen (TE 89)	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[409]
	fötale Lungenfibroblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[477]
	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
	Chondrozyten des Gelenkknorpels	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[163]
	Osteoblasten (SaOS-2)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[325,326]
TGF-α	Granulosazellen	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[458]
TGF-β1	Endothelzellen der Glomerular	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[205]
	Endothelzellen der Aorta		<i>in vitro</i> ↓	[149]
	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
	Gefäß-Bindegewebszellen	Schwein	<i>in vitro</i> ↑	[500]
Gerinnungsfaktoren				
Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
Thrombin	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Ratte	<i>in vitro</i> ↓	[11]
Interferone				
Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
IFN-γ	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[181]
	Granulosazellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[95]

Interleukine				
Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
IL-1 β	Granulosazellen		<i>in vitro</i> ↓	[102]
	Chondrozyten des Gelenkknorpels	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[163]
	fötale Lungenfibroblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[479]
IL-6	Hepatozyten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[182]
	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
Hormone				
Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
<u>Proteohormone</u>				
ACTH	Nebennierenrindenzellen	Mensch	<i>in vitro</i> –	[187]
ACTH & IGFs	Nebennierenrindenzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[187]
Angiotensin II	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Ratte	<i>in vitro</i> ↓	[11,230]
FSH	Granulosazellen	Ratte	<i>in vitro</i> ↓	[458]
	Ovar	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[481]
GHRA	Serum/Leber	Maus	<i>in vivo</i> ↑	[604]
GHRP-2	Plasma (hohe Dosen)	Bovine	<i>in vivo</i> ↑	[349]
	Plasma (niedrige Dosen)	Bovine	<i>in vitro</i> –	[349]
Glucagon	Thecazellen des Ovars	Bovine	<i>in vitro</i> –	[100]
Insulin	Thecazellen des Ovars	Bovine	<i>in vitro</i> –	[100]
Insulin & Glucagon	Thecazellen des Ovars	Bovine	<i>in vitro</i> ↓	[100]
	Myoblasten (L6)	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[384]
	β -Zellen des Pankreas (TC3)		<i>in vitro</i> –	[303]
	Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[20]
	Granulosazellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[224]
hCG	Brustdrüse	Ratte	<i>in vivo</i> ↓	[264]
	Ovar	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[481]
LH	Granulosazellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[95]
PMSG	Ovar	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[481]
PTH	Osteoblasten (SaOS-2)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[325,326,343]
	Osteoarkomzellen (TE85)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[255]
TSH	Thyroidfollikelkarzinomzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[23]
<u>Steroidhormone</u>				
Androgen	Osteoblasten	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[218]
Dexamethason	Knochenmarkzellen	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[397]
	Knochenmarkzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[110]
	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[242]
	β -Zellen des Pankreas (TC3)		<i>in vitro</i> ↑	[303]
	Fibroblasten	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[133]
Oestrogen	Brustkebszellen (MCF-7)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[482,544]
	Osteoblasten (SaOS-2)	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[325,326]
	hFOB/ER9 Osteoblasten	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[298]
	Knochen	Maus	<i>in vivo</i> ↑	[361]
	Serum (großwüchsiger Frauen)	Mensch	<i>in vivo</i> ↑	[514]
<u>Amine (Schilddrüsenhormone)</u>				
T3	Knochenmarkzellen	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[397]
	Sertolizellen	Schwein	<i>in vitro</i> ↑	[30]

	primäre Hepatozyten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[158,159]
	Hepatomazellen (HepG2)	Mensch	<i>in vitro</i> –	[158]
	Osteoblasten	Maus	<i>in vitro</i> ↑	[214]
	Niere/Serum/Hypothyroid	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[606]
	Leber/Serum/Hypothyroid	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[159]
	Uterus	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[71]
T4	Leber und Brustdrüse	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[515]

Second Messenger

cAMP	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
	Zellen der glatten Gefäßmuskulatur	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[242]
	Osteoblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[108]
	Myoblasten (L6)	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[384]
	Chondrozyten des Gelenkknorpels	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[163]
Forskolin	Fibroblasten	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[89]
	Thyroidfollikelkarzinomzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[23]

Makro- und Mikronährstoffe

Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
Glucose	Endothelzellen der Retina	Mensch	<i>in vitro</i> –	[205]
D3	Knochenmarkzellen	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[329]
EB1089	Prostata	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[426]
Retinolsäure	Brustkebszellen (MCF-7)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[544]
	Sertolizellen	Schwein	<i>in vitro</i> ↑	[30]
	Neuroblastomzellen (Sk-N-SH)	Mensch	<i>in vitro</i> ↓	[19,101]
	Osteoblasten	Maus	<i>in vitro</i> ↑	[214]
	Kolonkarzinomzellen (HT-29)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[140]

Sonstige Faktoren, Rezeptoren und Substanzen

Substanzen	Zelltyp	Spezies	Expression	
TNF-α	multiples Myelom	Mensch	<i>in vitro</i> –	[181]
	fötale Lungenfibroblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[479]
	Cerebellum (TNF- α transgen)	Maus	<i>in vivo</i> ↑	[639]
WT-1	embryonale Stammzellen	Maus	<i>in vitro</i> ↑	[612]
OP-1	Osteoblasten	Ratte	<i>in vitro</i> ↓	[640]
N-myc	Neuroblastomzellen (Sk-N-SH)	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[101]
Aktivin	Granulosazellen	Ratte	<i>in vitro</i> ↓	[115]
Connexin 43	Gliomazellen (C6)	Ratte	<i>in vitro</i> ↑	[74]
Clenbuterol	Soleusmuskel	Ratte	<i>in vivo</i> ↑	[17]
Nandrolon	Diaphragmamuskel	Ratte	<i>in vivo</i> ↓	[355]
PHA	Lymphozyten	Mensch	<i>in vitro</i> ↑	[431]

2.2.6.5 Regulierung von IGFBP-4 durch Proteolyse

Auf Proteinebene wird die Menge von IGFBP-4 in der Hauptsache über die Proteolyse reguliert. Dabei spielen die unter Punkt 2.2.5 beschriebenen Proteasen eine wichtige Rolle. Diese Proteasen werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Stimuli, wie z.B. IGFs, TGF- β , Dexamethason, TNF- α etc. beeinflusst.

Die zunächst in Fibroblasten [137,189] entdeckte und am intensivsten untersuchte IGF-abhängige Protease wurde erst später als Pregnancy-associated-plasma-protein-A (PAPP-A) identifiziert [346]. PAPP-A wurde bereits 1974 aus dem Serum von schwangeren Frauen isoliert und den Proteasen der Metzincin-Familie zugeordnet [360]. PAPP-A benötigt als Metalloprotease Kationen, um proteolytisch aktiv zu sein. Bindet man durch EDTA verfügbare zweiwertige Kationen (z.B. Ca^{2+} , Zn^{2+}) oder durch 1,10-Phenanthrolin verfügbares Zn^{2+} , wird die Proteolyse von IGFBP-4 inhibiert. Dahingegen haben Serinproteaseinhibitoren, wie z.B. PMSF, 3,4-DCI und Benzamide, keine Wirkung [137,138,193,430]. Mittlerweile konnte PAPP-A mittels spezifischer Antikörper in konditionierten Medien von Osteoblasten [483], in der glatten Muskulatur von Gefäßen [46], in Granulosazellen [136], in Trophoblasten, in Zellen des endometrialen Bindegewebes [213] und in der Follikelflüssigkeit des Ovars identifiziert [138] werden.

PAPP-A degradiert von allen IGFBPs bevorzugt IGFBP-4 [85,345,483]. Die Spaltung von IGFBP-4 durch PAPP-A kann durch steigende IGF-II Konzentrationen induziert werden [85]. Die dosisabhängige Spaltung, die primär an der Position Met¹³⁵-Lys¹³⁶ erfolgt, wird nicht durch eine Interaktion von IGF-II mit PAPP-A beeinflusst, sondern vielmehr durch die direkte Bindung von IGF-II an IGFBP-4 [345,483]. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Tatsache, dass IGFBP-4 nur dann IGF-II-abhängig gespalten wird, wenn dessen IGF-Bindungsstelle (Leu⁷²-His⁷⁴) und dessen „Enhancermotiv“ (Cys¹⁸³-Glu²³⁷) für die IGF-Bindung intakt sind [483]. Durch die IGF-abhängige Spaltung von IGFBP-4 durch PAPP-A, wird gleichzeitig biologisch verfügbares IGF freigesetzt [345,483].

Eine Verminderung der proteolytischen Aktivität von PAPP-A liegt vor, wenn es mit proMBP (proForm des „Major Basic Proteins“) einen 500 kDa großen, kovalenten heterotetrameren 2:2 Komplex bildet. Im Serum von Schwangeren zirkuliert diese Form neben sehr geringen Mengen (<1 %) des nicht im Komplex vorliegenden Dimers von 400 kDa, das allerdings eine wesentlich höhere spezifische Spaltungsaktivität als der PAPP-A/proMBP Komplex besitzt [442]. In Fibroblasten, die proMBP normalerweise nicht exprimieren, wird proMBP nach Inkubation mit dem Phorbolster β -PDD induziert. Die Induktion von proMBP in Fibroblasten führt zu einer Verminderung der IGFBP-4-Protease-Aktivität [106]. Eine Hemmung dieser IGF-abhängigen Protease durch Phorbolster wurde ebenfalls in Osteoblasten-ähnlichen Zellen (hOB Zellen) [171,483] beobachtet.

In einer Osteoblasten Zelllinie (MC3T3), die eine IGF-abhängige Protease mit den

Eigenschaften von PAPP-A besitzen, verhindern IGFBP-3, -5 und -6 eine Degradierung von IGFBP-4. Der inhibitorische Effekt dieser drei IGFBPs auf die Proteolyse von IGFBP-4 wird ihrem homologen Heparin-Bindungsmotiv (HBD) im C-Terminus zugeschrieben [190]. Die Vermutung, dass das HBD-Bindungsmotiv der Bindungsproteine die Proteolyse durch Inhibierung der Protease herabsetzt, bekräftigt eine Studie, in der gezeigt wurde, dass ein aus der HBD-Region isoliertes Peptid die Proteolyse von IGFBP-2 durch PAPP-A verhindert [412].

Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und Interleukin- β erhöhen in menschlichen Hautfibroblasten nicht nur die Transkriptmenge von PAPP-A, sondern auch die Expression des Proteins. Damit assoziiert sind die Erhöhung der proteolytischen Aktivität gegenüber IGFBP-4 und der IGF-I-stimulierten Proliferation, die durch Zugabe von Protease-resistentem IGFBP-4 geblockt werden konnte. IFN- γ führte zu einer verminderten PAPP-A-Expression [498].

In Zellen der glatten Muskulatur und neuronalen Zellen wurde noch eine weitere IGF-abhängige Protease mit ähnlichen Eigenschaften wie PAPP-A nachgewiesen [111,113,493]. Diese Serinprotease besitzt eine Größe von 48 kDa [450,493] und unterscheidet sich nicht zuletzt dadurch von PAPP-A, dass sie IGFBP-4 in der Position Lys¹²⁰-His¹²¹ schneidet [493]. Im Gegensatz zu PAPP-A ist diese Serinprotease durch die Serinproteaseinhibitoren PMSF, 3,4-DCI und Benzamide hemmbar [121,275,450]. Ihre proteolytische Aktivität kann auch durch Heparin, Antithrombin III, Heparin Cofaktor II und Alpha 1-Antichymotrypsin reduziert werden [450], während Glukose in der Lage ist, die proteolytische Aktivität zu steigern [275]. Glukokortikoide beeinflussen ebenfalls die Aktivität dieser Serinprotease. Dies führt in der neuronalen Zelllinie B104 zur Dexamethason-induzierten Proteolyse von nativem IGFBP-4, verbunden mit der gleichzeitigen Erhöhung von IGFBP-4-Fragmenten [111,113].

Die Regulierung der Verfügbarkeit von IGFBP-4 in Zellen, Zellüberständen oder Körperflüssigkeiten wurde schon Mitte der 90 iger Jahre untersucht, als die eine der zwei postulierten IGF-abhängigen Proteasen noch nicht als PAPP-A identifiziert worden war [111,113,131,493]. Es stellte sich bereits damals heraus, dass Zytokine Einfluss auf die Regulation der proteolytischen Aktivität gegenüber IGFBP-4 nehmen. TGF- β in Osteoblasten [170], TGF- β 1 in Muskelzellen [383], sowie FSH [272,365], LH [95] und Oestrogen [272] in Granulosazellen bewirken eine Verminderung der IGFBP-4-Proteinspiegel durch Steigerung der IGFBP-4-Proteolyse. Da die Proteolyse-steigernden Substanzen keine direkte Aktivierung der Proteolyse von

IGFBP-4 in zellfreien Medien erzeugten, wurde vermutet, dass diese Substanzen entweder die Expression bzw. Sekretion IGF-abhängiger Proteasen steigern, die IGF-Produktion bzw. -Verfügbarkeit erhöhen oder die verfügbare Menge weiterer regulatorischer Hormone beeinflussen [132].

2.2.6.6 Expression und Wirkung von IGFBP-4

Die cDNA von IGFBP-4 konnte aus vielen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, Osteoblasten, Myoblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und Chondrozyten isoliert werden. Auch die meisten Tumorzelllinien weisen eine IGFBP-4-Expression auf. Darüber hinaus ist das IGFBP-4-Protein oftmals sowohl in der unglykosylierten als auch der glykosylierten Form in konditionierten Medien von Zelllinien zu finden [55,97,343,547,554,650].

In vivo wurden Transkripte für IGFBP-4 im bis zu elf Tage alten Embryo der Maus in unterschiedlichen Regionen wie Telencephalon, Mesencephalon, Schnauze, Zunge und im differenzierten Sklerotom gefunden. Im 14 Tage alten Embryo konnte auf mRNA-Ebene IGFBP-4 deutlich in der Lunge, Leber, Niere, Intestinum, Rippen und den Zahnanlagen detektiert werden, nicht aber im Gehirn [98,538]. In der histochemischen Analyse eines 13,5 Tage alten Mäuseembryos konnte das IGFBP-4-Protein im Telencephalon, Mesencephalon, Herz, Leber, Lunge, Zunge, Blutgefäßen und der Niere detektiert werden [603]. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Expression von IGFBP-4 einer spezifischen Kontrolle im jeweiligen Entwicklungsstadium unterliegt [98,603].

In der adulten Ratte wurde die Expression von IGFBP-4 in fast allen Geweben, inklusive Nebenniere, Niere, Hoden, Herz, Leber, Lunge, Milz, Magen, Hypothalamus, Cortex [547], Intestinum [548], glatter Muskulatur und Skelettmuskulatur [281,561], Pankreas [245], Uterus und Plazenta [99] detektiert. Die Expression von IGFBP-4 wurde weiterhin im Rückenmark der Maus [13], sowie im Thymus von Maus und Mensch [358], in menschlichem Prostatagewebe [585], sowie Knochen [407] und in den Ovarien verschiedener Spezies [174,649] gezeigt. Darüber hinaus wurde IGFBP-4 in allen Körperflüssigkeiten, inklusive Follikelflüssigkeit, Seminalplasma, Gelenkflüssigkeit, interstitieller Flüssigkeit und Serum detektiert [487].

IGFBPs weisen oftmals sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Eigenschaften auf, die wiederum IGF-abhängig als auch IGF-unabhängig sein können. IGFBP-4 ist

das einzige Bindungsprotein für das in *in vitro*-Untersuchungen bislang ausschließlich inhibitorische Eigenschaften in Bezug auf mitogene Signale gefunden wurden. Auch die meisten *in vivo*-Studien zeigen bis auf wenige Ausnahmen inhibitorische Effekte von IGFBP-4 auf mitogene Signale. Dennoch muss eine Unterdrückung von IGFBP-4 nicht zwangsläufig zu einer Steigerung von mitogenen Effekten führen [168,460]. Dies konnte z.B. anhand von IGFBP-4-Knockout-Mäusen *in vivo* gezeigt werden. Homozygote IGFBP-4-Knockout-Mäuse waren wider Erwarten kleiner als der korrespondierende Wildtyp [460]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in der normalen Embryogenese die IGFBP-4-Expression strikt mit der IGF-II-Expression korreliert. Diese Daten deuten darauf hin, dass IGFBP-4 an der Feinregulation von IGF-II in der Fetalentwicklung beteiligt ist [460].

In der Schwangerschaft ist IGFBP-4 das zweithäufigste in der Plazenta vorkommende Bindungsprotein. Gleichzeitig mit IGFBP-4 wird die IGFBP-4-spaltende IGF-abhängige Protease PAPP-A gebildet. Fehlt die Expression von PAPP-A in der Plazenta, wie in Patienten mit dem Cornelia de Lange Syndrom, führt das zu einer inkompletten und deformierten Entwicklung des Fötus [628]. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass die Spaltung von IGFBP-4 eine Freigabe von verfügbarem IGF zur Folge hat, die für die Entwicklung des Fetus wichtig ist.

IGFBP-4 ist weiterhin an der Reifung der Eizelle im Ovar beteiligt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass IGFBP-4 IGF-unabhängig [635] als auch durch Bindung von IGF [464] die Steroidgenese in Ovarien hemmt. Die Inhibierung der Steroidgenese durch IGFBP-4 erfolgt in humanen Ovarien sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des IGF-IR. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einem Überschuss an exogenem IGFBP-3 eine komplette Bindung von verfügbarem IGF erfolgt, IGFBP-4 aber dennoch die Steroidgenese hemmte [635]. Beide Ergebnisse belegen die von einer IGF-Bindung unabhängige Hemmung der Steroidgenese durch IGFBP-4. Darüber hinaus scheint die Freigabe von verfügbarem IGF für die Stimulierung der Proliferation von Granulosazellen während der terminalen Entwicklung der Eizelle im präovulatorischen Stadium durch die Expression von PAPP-A [259,260] und der damit verbundenen Spaltung von IGFBP-4 gesichert zu werden [382]. IGFBP-4 besitzt somit eine wichtige Funktion für die regulierte Freigabe von IGF in der Embryonalentwicklung und für die Reifung einer Eizelle im Ovar.

IGFBP-4 hemmt die durch IGF induzierte Proliferation in Zellen der glatten

Gefäßmuskulatur oder Muskelzellen [151,169,176,229]. *In vivo* führt eine Überexpression von IGFBP-4 in der glatten Muskulatur zu einer Muskelhypoplasie [616,646], wobei die Protease-resistente Form gegenüber der normalen Form von IGFBP-4 einen stärkeren Effekt erzielt [646]. Eine IGF-I-Überexpression in der glatten Muskulatur führt hingegen zu einer Hyperplasie [615]. In IGF-I/IGFBP-4 doppeltransgenen Mäusen wurde ein vermindertes Nassgewicht verschiedener Organe (Aorta, Blase, Magen) im Vergleich zum Wildtyp gemessen [616]. Diese Ergebnisse zeigen, dass IGFBP-4 einen IGF-I-abhängigen Effekt nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* besitzt.

Im Knochen ist IGFBP-4 zusammen mit IGFBP-5 ein wichtiger Regulator des Knochenwachstums [408]. IGFBP-4 inhibiert sowohl die basale als auch die IGF-induzierte Proliferation humaner Osteoblasten [343,408,484] sowie von Chondrozyten der Wachstumsplatte [308]. Die hemmende Wirkung von IGFBP-4 auf das IGF-geförderte Knochenwachstum wurde in *in vivo*-Studien bestätigt [400,401]. Eine lokale Applikation von IGFBP-4 führt zu einer Hemmung des durch IGF-I induzierten Anstiegs der Alkalischen Phosphatase-Aktivität, verbunden mit einer Verminderung der Knochenbildung [400,401]. Im Gegensatz zur lokalen Applikation führt eine systemische Applikation von IGFBP-4 hingegen zu einer gesteigerten Knochenbildung. Der wachstumsstimulierende Effekt des systemisch gegebenen IGFBP-4 wird durch die verstärkte Proteolyse von IGFBP-4 und der damit verbundenen Steigerung der IGF-Bioaktivität erklärt. Die Erklärung basiert auf der Beobachtung, dass nur systemisch injiziertes natives IGFBP-4 und nicht Protease-resistentes IGFBP-4 in der Lage ist, im Serum die Menge an Osteocalcin sowie die Menge der Alkalischen Phosphatase im Serum und im Knochen zu steigern. Gleichzeitig war bei der systemischen Gabe von nativem IGFBP-4, nicht aber von Protease-resistentem IGFBP-4, die proteolytische Aktivität gegenüber IGFBP-4 im Serum erhöht und die Menge an frei verfügbarem IGF-I stieg deutlich an [400]. IGFBP-4 steigt im Serum mit zunehmenden Alter an, während gleichzeitig die IGFBP-5-Spiegel im Serum und in den Knochen abfallen [407]. Da die IGFBP-4-Spiegel positiv mit den Parathyroid-Hormon-Spiegeln (PTH) und die IGFBP-5-Spiegel positiv mit den IGF-Spiegeln im Serum korrelieren [407], werden die veränderten IGFBP-4- und IGFBP-5-Spiegel im Serum im Zusammenhang mit dem Verlust der Knochenmasse (Osteoporose) im Alter diskutiert [404].

IGFBP-4 unterliegt während der Entwicklung der Niere einem Zelltyp-spezifischen Expressionsmuster [380,474]. Im Serum von Patienten, die an chronischem

Nierenversagen (CRF) leiden, ist IGFBP-4 vierfach erhöht und trägt zu einer 4 bis 10-fach stärkeren IGF-Bindungskapazität im Serum bei. Die inverse Korrelation zwischen IGFBP-4-Spiegel im Serum und der Wachstumsrate junger CRF Patienten [599,601] stimmt mit der gezeigten Hemmung auf die Knorpelbildung der Wachstumsplatte durch IGFBP-4 überein [309,599].

2.2.6.7 Expression und Wirkung von IGFBP-4 in Tumorzelllinien und Tumorgeweben

Eine Korrelation von IGFBP-4 im Serum und der Inzidenz, an Krebs zu erkranken, wie sie für verschiedene IGF-BPs gezeigt wurde (Kapitel 2.9.4), ist bislang nicht beschrieben. Trotzdem ist die Rolle von IGFBP-4 in der Kanzerogenese nicht von der Hand zu weisen.

Zu den Tumorzelllinien, die eine Expression von IGFBP-4 aufweisen, gehören unter anderem A549-Lungen-Adenokarzinomzellen [478], Lungenkrebszellen [430,623], MCF-7 Brustkrebszellen [482], Schilddrüsenkarzinomzellen [23], C6-Gliomazellen [73], multiple Myelomzellen [181], B104- und SH-SY5Y-Neuroblastomzellen [19,20,112], TE89-Osteosarkomzellen [343], PC-3- und M12-Prostatakarzinomzellen [152,168,568], PLC-Hepatomzellen [529] Karzinomzellen des Magens [641] sowie Caco-2-, Colo205-, HT29- und SW620-Kolonkarzinomzellen [146,392,449].

Biopsien von Tumoren verschiedener Gewebe wurden ebenfalls hinsichtlich einer veränderten Expression von IGF-BPs untersucht. Bezüglich IGFBP-4 konnte festgestellt werden, dass in Neoplasien der Prostata eine signifikante, wenn auch nur leichte Erhöhung gegenüber benignem Epithel bestand [583].

In isoliertem Tumorgewebe der Lunge sowie normalem Lungengewebe wurde IGFBP-4 ebenfalls detektiert. neun der elf transformierten Biopsien exprimierten weniger IGFBP-4 verglichen mit normalem Lungengewebe. Eine Korrelation der Expressionsmenge von IGFBP-4 mit einem bestimmten Tumortyp war allerdings nicht möglich [623]. Hormonell aktive Karzinome der Nebenniere besitzen im Vergleich zu gesundem Gewebe niedrige IGFBP-4-mRNA-Spiegel mit gleichzeitig erhöhten IGF-II-Spiegeln [268].

Paarweise genommene Biopsien von normalem Gewebe und Tumorgewebe des Kolons wurden ebenfalls auf IGFBP-4 Expression untersucht, wobei in über 50 % der Biopsien beider Gewebetypen IGFBP-4 nachgewiesen werden konnte. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten keinen deutlichen Unterschied in der

Expression von IGFBP-4 in beiden Gewebetypen. Im Northernblot schien die Expression von IGFBP-4-mRNA dagegen im malignen Gewebe niedriger als im normalen Gewebe zu sein [393]. Für das Kolon liegen allerdings bisher kaum Daten bezüglich der Wirkung von IGFBP-4 auf Tumor-relevante Parameter vor.

2.2.6.7.1 IGF-bindungsabhängige Effekte

Antimitogene IGFBP-4-Effekte werden hauptsächlich über die Inhibierung der autokrinen Wirkung von IGF-II erklärt, wie schon unter Punkt 2.2.6.6 erwähnt. Dies zeigt sich insbesondere in *in vitro*-Systemen. IGFBP-4 hemmt die Proliferation in transformierten neuronalen Zellen (B104) [112], in Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) [20], in transformierten menschlichen und murinen Fibroblasten [135] und in zwei Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, Caco-2) [146,449]. Die Transfektion einer Prostatakarzinomzelllinie (M12) mit IGFBP-4 führt zu verminderter Proliferation, die durch Zugabe von exogenem IGF-I kompensiert werden kann [152]. Eine Transfektion mit IGFBP-4 antisense-cDNA führt allerdings in diesen M12-Zellen wider Erwarten ebenfalls zu einer verminderten Proliferation. Dies wird damit erklärt, dass die Unterdrückung von IGFBP-4 mit einer Erhöhung von IGFBP-3 und IGFBP-6 gekoppelt war. Beide IGFBP-3 sind in der Lage, IGF-Wirkungen zu unterdrücken [168].

Neben der Proliferation inhibiert IGFBP-4 auch die Koloniebildung, als Maß einer Transformation, in Chondrozyten aus der Wachstumsplatte und in M12-Zellen. Die antisense-Strategie führt in M12-Zellen allerdings auch zu einer verminderten Anzahl der Kolonien, was aber wiederum auf die Erhöhung von IGFBP-3 und IGFBP-6 zurückgeführt wird [168].

Während der Differenzierung von Zellen steigt IGFBP-4 sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene an. Mit dem Anstieg von verfügbarem IGFBP-4 wurde auch eine Erhöhung von Differenzierungsmarkern, wie z.B. der Saccharose-Isomaltase-Aktivität, festgestellt [140,252,255,370,449,555]. Dies ist insofern von Bedeutung, da mit einer gesteigerten Proliferationsrate von Karzinomzellen oft auch ein Verlust der Differenzierung einhergeht.

IGFBP-4 wirkt ferner auf Apoptoseprozesse. In M12-Zellen erhöht sich die Apoptoserate in IGFBP-4-überexprimierenden Zellklonen. Auch diese Wirkung wird über die Verminderung von bioaktivem IGF erklärt [152]. Allerdings weisen mit IGFBP-4 antisense-cDNA transfizierte M12-Zellen ebenfalls eine erhöhte

Apoptoserate auf. Dies wird in Analogie zur Hemmung der Proliferation und der erniedrigten Koloniebildung ebenfalls auf erhöhte IGFBP-3- und IGFBP-6-Spiegel zurückgeführt [168].

In vivo-Studien unterstützen die *in vitro* gemessenen Daten bezüglich des wachstumsregulierenden Effektes von IGFBP-4 in der Tumorentwicklung. Werden immundefiziente Mäuse mit Prostatakarzinomzellen (M12) injiziert, entwickeln sie Tumore. Eine Überexpression von IGFBP-4 in diesen Zellen verzögert den Zeitpunkt der Tumorbildung [152]. Die Transfektion der Tumorzellen mit IGFBP-4 antisense-cDNA führt auch *in vivo* zu einer verminderten Tumorbildung, einhergehend mit der erhöhten Bildung von IGFBP-3 und IGFBP-6 [168].

Effekte von IGFBP-4, wie die Hemmung von Proliferation und Transformation sowie die Förderung der Differenzierung und Apoptose, werden auf die IGF-Bindungsfähigkeit von IGFBP-4 zurückgeführt [152,405,408]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass IGF-Analoga, die von IGFBP-3 nur mit geringer Affinität gebunden werden, keine Wirkungsverluste in Anwesenheit von IGFBP-4 zeigen [152,405,408].

2.2.6.7.2 IGF-bindungsunabhängige Effekte

Wie bereits unter 2.2.6.6 erwähnt, wirkt IGFBP-4 nicht nur über die Bindung von IGF, sondern besitzt auch Wirkungen, die davon unabhängig sind. Die ersten Hinweise auf die IGF-unabhängige Wirkung von IGFBP-4 lieferten Singh *et al.* 1994 [553]. Sie zeigten, dass endogenes IGFBP-4 die durch exogenes IGF induzierte Proliferation in HT-29 Zellen hemmt und dass dieser antimitogene Effekt nicht vollständig mit einem Überschuss an IGF, sondern nur mit einem IGFBP-4-Antikörper aufgehoben werden kann [553].

Weiterhin hemmt IGFBP-4 in epithelialen Hs578T-Brustkrebs-Zellen, die keinen funktionellen IGF-IR besitzen, über einen IGF-unabhängigen Mechanismus die Ceramid-induzierte Apoptose [457].

Für die Erklärung von IGF-unabhängigen IGFBP-4-Wirkungen kann die Tatsache herangezogen werden, dass IGFBP-4 genau wie IGFBP-3 und -5 in der Lage ist, mit dem TGF β Type V-Rezeptor zu interagieren [347]. Bisher liegen aber keine weiteren Erklärungen für mögliche Mechanismen der IGFBP-4-vermittelten, IGF-unabhängigen Effekte vor [650].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Präsenz der Komponenten des IGF-Systems in verschiedenen Geweben und Zelltypen ist in der Tumorentwicklung von entscheidender Bedeutung, da sie das Wachstum von Zellen maßgeblich beeinflusst. Eine zentrale Rolle im Entwicklungsprozess von Tumoren nehmen die IGFBPs ein, die über die Bindung von IGFs, aber auch davon unabhängig, wirken können. IGFBP-4 besitzt unter den IGFBPs insofern eine Sonderstellung, als dass *in vitro* und *in vivo* ausschließlich inhibitorische Eigenschaften von IGFBP-4 auf Prozesse der Tumorenstehung gefunden wurden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von IGFBP-4 auf Proliferation, Transformation und Invasion in Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, da bislang kaum Daten zur Wirkung dieses IGFBPs auf die kolorektale Karzinogenese vorliegen. Zur Untersuchung der IGFBP-4-spezifischen Effekte auf die Krebs-relevanten Parameter wurde in verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien murines IGFBP-4 (mIGFBP-4) exprimiert. Neben einer IGF-insensitiven Zelllinie wurden zwei Zelllinien transfiziert, von denen eine IGF-II exprimiert, während die andere keine endogene IGF-II-Produktion zeigte. Durch die Auswahl der Zelllinien sollte sicher gestellt werden, Effekte von IGFBP-4, die abhängig von der Bindung von IGF sind, von solchen zu unterscheiden, die unabhängig von der Bindung an IGF verlaufen.

Die Wirkung von IGFBP-4 auf die mRNA-Spiegel sollte in den mIGFBP4-exprimierenden Zellklonen durch Anwendung der von Diatchenko *et al.* 1996 erstmals beschriebenen Methode der „Suppression Subtractive Hybridization“ (SSH) untersucht werden. Mit dieser Methode wurden cDNAs von Genen angereichert, die in mIGFBP-4-transfizierten Zellklonen und der nicht-transfizierten Mutterlinie differentiell exprimiert werden, und subtraktive cDNA-Banken angelegt. Durch anschließende Array-Hybridisierungen sollten Gene, die durch mIGFBP-4 in ihrer Expression verändert wurden gefunden werden und durch Sequenzierung identifiziert werden. Hierdurch sollten mögliche Wirkmechanismen von IGFBP-4 charakterisiert werden.

Neben den IGFBPs spielen IGFs eine wichtige Rolle in der Entwicklung kolorektaler Tumore. So ist z.B. der Verlust des Imprintings im *IGF2*-Gen und die damit verbundene erhöhte IGF-II-Produktion mit der Entwicklung von Neoplasien im Kolon des Menschen assoziiert.

Um *in vivo* die Wirkung erhöhter IGF-II-Spiegel auf frühe und spätere Stadien der Tumorenstehung des Kolons zu untersuchen, wurde ein transgenes Mausmodell verwendet. Hierzu standen PEPCK-IGF-II-transgene Tiere zur Verfügung, die IGF-II in mehreren Organen inklusive des Kolons exprimieren. Diese Tiere verhalten sich normal in ihrer Lebenserwartung und Gewichtsentwicklung, zeigen keine Veränderung der Organe im Alter und entwickeln keine spontanen Tumore. Dies zeigt, dass erhöhte IGF-II-Produktion alleine nicht ausreicht, ein Kolonkarzinom zu induzieren. Deshalb sollten mittels eines organspezifischen chemischen Karzinogens Kolontumoren erzeugt werden, um die Wirkung von IGF-II auf frühe Stadien der Tumorentstehung anhand der Bildung von aberranten Krypten und auf spätere Stadien anhand der Entwicklung von Adenomen und/oder Karzinomen zu beurteilen.

4 Material

4.1 Versuchstiere

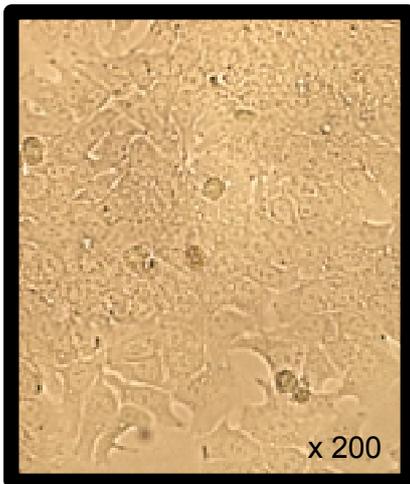


Die Linie der PEPCK-IGF-II-transgenen Mäuse, die für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stand, wurde am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie erstellt. Tiere der ersten Generation wurden durch Mikroinjektion in die Zygoten von superovulierten B6D2F1 Mäusen generiert, indem die injizierten Zygoten in die Eileiter von synchronisierten NMRI Empfängertieren transferiert wurden. Das injizierte Fragment beinhaltet 550 bp des PEPCK-Promotors, welcher die nachgeschaltete aus 768 bp bestehende kodierende Sequenz des humanen IGF-II transkriptionell kontrolliert. Unter diesem Promotor wird humanes IGF-II in verschiedenen Organen, einschließlich des Kolons postnatal exprimiert [633]. Nach dem Nachweis des Transgens wurden positive Tiere kontinuierlich mit NMRI-Tieren angepaart. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammten mindestens der sechsten Generation (G6) und haben einen NMRI-Anteil von mindestens 97,5 %. Alle Tiere wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen gehalten (21°C Raumtemperatur, 55 % relative Luftfeuchtigkeit, Lichtprogramm mit 14 h Hellphase und 10 h Dunkelphase). Die Versuchstiere erhielten V1534-Standardfutter (Ssniff, Soest) Leitungswasser ad libitum. Alle beantragten Experimente wurden nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigungsnummer des Tierversuchantrags: 2112531-37/00). Direkt nach der Geburt wurden die männlichen Mäuse eliminiert bzw. transgene männliche Tiere für die Zucht verwendet. Die weiblichen Mäuse wurden nach drei Wochen entwöhnt und durch Ohrlochen markiert. Zur Analyse des Genstatus diente eine 0,5 cm lange Schwanzprobe in Äthernarkose, entnommen. Die Proben wurden sofort auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach der Genanalyse wurden die Würfe in maximal fünf Tiere pro Käfig aufgeteilt.

4.2 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden 21 verschiedene Kolonkarzinomzelllinien und eine nicht-transformierte Kolonepithelzelllinie auf Vertreter des IGF-Systems mittels RT-PCR untersucht. Für die meisten der Zelllinien lag schon die isolierte Gesamt-RNA vor. Es werden im folgenden nur die Zelllinien beschrieben, die in dieser Arbeit zur Gewinnung von RNA, Protein oder für weitere Experimente kultiviert wurden.

4.2.1 LS1034



LS1034-Zellen stammen ursprünglich aus dem Labor von Dr. L. Suardet, ISREC (Epalinges, Schweiz) und wurden uns für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Die Kolonkarzinomzelllinie LS1034 wurde 1989 aus einer primären Tumorbiopsie als adhärent wachsende epitheliale Zelllinie etabliert. Die Biopsie stammte aus einem sporadischen caecalen Karzinom, das dem Stadium Duke's Typ C zugeordnet war. LS1034-Zellen weisen eine Multiresistenz

gegenüber Cytostatika („multidrug resistance“) und Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p53 und APC auf. Normale LS1034-Zellen differenzieren sich schwach bis moderat und bilden in immundefizienten Mäusen Tumore. In *in vitro*-Untersuchungen bestätigte sich ihre tumorigene Eigenschaft, z.B. die Bildung von Kolonien in semi-soliden Medien. Mehr als 90 % der LS1034-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das CEA. LS1034-Zellen exprimieren Major Histocompatibility Class I (MHC-I)-Moleküle. Die Proliferation der LS1034-Zellen kann durch TGF- β 1, TGF β 2, TGF β 3 und IL-4 inhibiert werden. LS1034-Zellen besitzen Transkripte für IGF-II und weisen einen funktionellen IGF-I-Rezeptor auf [81,141,332,356,574].

4.2.2 Isreco-1, -2, -3

Isreco-1, -2, -3-Zellen stammen ebenfalls ursprünglich aus dem Labor von Dr. L. Suardet und wurden uns für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Die Besonderheit dieser drei Zelllinien liegt darin, dass sie alle aus dem gleichen Patienten stammen. Alle drei Isreco-Zelllinien besitzen keine Transkripte für IGF-II, während für SCF („stem cell factor“) in allen Transkripte gefunden wurden [331].



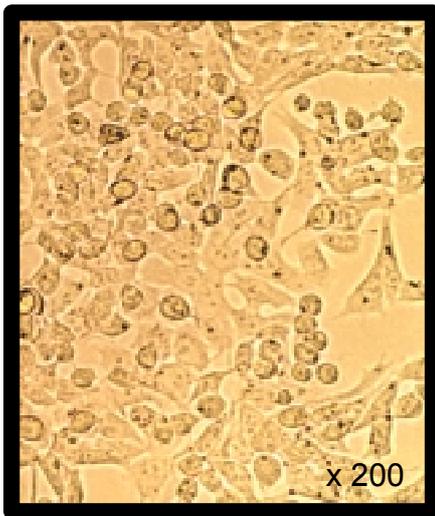
Isreco-1-Zellen wurden aus dem primären Kolontumor etabliert. Das Biopsiematerial der Isreco-1-Zellen entstammte aus dem Kolon ascendens und wurde als Duke's Typ C, Class III klassifiziert. Sie sind schwach bis überhaupt nicht differenziert und bilden in semi-soliden Medien Kolonien sowie Tumore in immundefizienten Mäusen. Obwohl Isreco-1-Zellen den IGF-IR exprimieren, zeigt diese Zelllinie keine Sensitivität gegenüber IGF-II.



Isreco-2-Zellen wurden aus der korrespondierenden Lebermetastase isoliert. Isreco-2-Zellen differenzieren sich im Gegensatz zu den Isreco-1-Zellen moderat und reagieren sensitiv gegenüber exogenem IGF-II. Der auf ihrer Zelloberfläche lokalisierte IGF-IR ist demnach funktionell. Isreco-2-Zellen bilden in immundefizienten Mäusen Tumore, *in vitro* ist die Bildung von Kolonien in semi-soliden Medien eher gering.

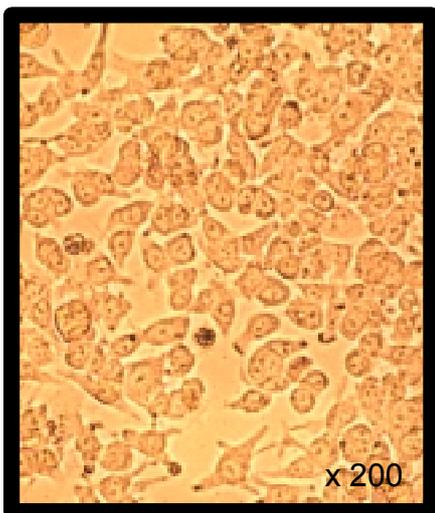
Die dritte Zelllinie, Isreco-3, entstammt der korrespondierenden Lungenmetastase. Isreco-3-Zellen sind sensitiv gegenüber IGF-II und es konnte der IGF-R auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Isreco-3-Zellen teilen sich nur sehr langsam. Sie bilden Tumore in immundefizienten Mäusen, ihre Koloniebildung in semi-soliden Medien ist sehr gering (0,019 %) [331].

4.2.3 Co115



Co115 Zellen wurden bei ATCC (Rockville, USA) bezogen. Sie wurden aus einem menschlichen Kolonkarzinom isoliert, differenzieren schlecht bis überhaupt nicht und zeigen sich insensitiv gegenüber IGF.

4.2.4 NCOL-1



NCOL-1 Kolonepithelzellen stammen ursprünglich aus dem Labor von Prof. C. Deveney von der Oregon Health Sciences University (Portland, USA) und wurden uns von Dr. U. Wenzel von der Technischen Universität München zu Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus gesundem Biopsiematerial isoliert und konnten als humane epitheliale Kolonzellen etabliert werden. Im Gegensatz zu anderen Primärkulturen können diese Zellen

mehrere Monate in Kultur gehalten werden ohne ihre Eigenschaften zu verändern [162]. Dies wurde anhand morphologischer Charakteristika und der Expression von Zytokeratin, einem typischen Zytoskelettmarker für Epithelzellen gezeigt [162]. Zellen wurden zwischen Passagen 80-90 benutzt. Bei einer Passagenummer über 100 bilden sie Kolonien in semi-soliden Medien und verlieren somit ihre nicht-transformierte Eigenschaft (eigene nicht-veröffentlichte Ergebnisse).

4.3 pCI-neo-mIGFBP-4 Konstrukt

Die cDNA vom murinen IGFBP-4 (mIGFBP-4) wurde von Dr. S. Drop, Universität Rotterdam (Niederlanden), zur Verfügung gestellt. Diese cDNA war bereits in den Säugetier-Expressionsvektor pCI-neo Expressionsvektor pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) in die Restriktionsschnittstelle *EcoR* I kloniert worden. Die Expressionskontrolle von mIGFBP-4 unterliegt in diesem Vektor dem CMV-Promotor. Die richtige Klonierung von mIGFBP-4 wurde durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I und *Sma* I vor der Transfektion der Konstrukte überprüft.

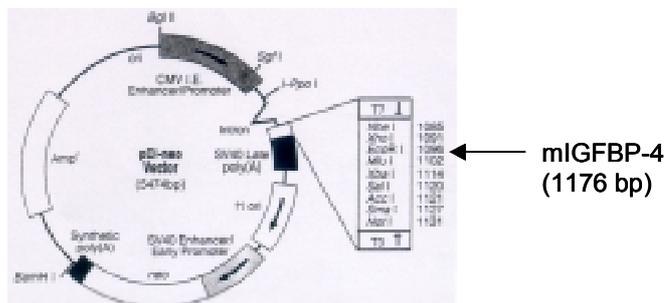
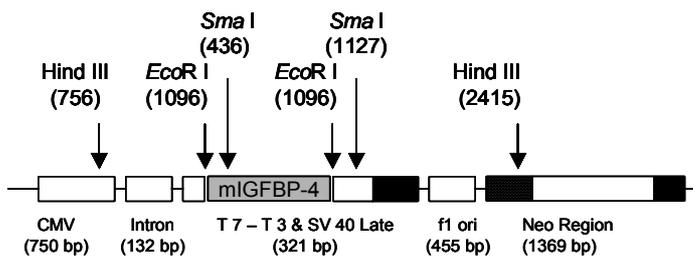


Abb. 10: Schematische Darstellung des pCI-neo-Expressionsvektors und des pCI-neo-mIGFBP-4-Konstrukts.



4.4 Chemikalien und sonstige Materialien

Anmerkung: Als Lösungsmittel diene soweit nicht anders angegeben, durch eine Milliporeanlage vollentsalztes Wasser, bezeichnet als Aqua bidest. Für einige Versuche wurde dieses Milliporewasser zusätzlich steril filtriert und/oder autoklaviert (Aqua bidest. steril).

4.4.1 Antikörper

anti-BrdU (monoclonal mouse)
 anti-Maus IgG-POD (Serum)
 swine anti-rabbit IgG-POD (Serum)
 rabbit anti-IGFBP-4 antiserum

Roche, Mannheim
 Sigma, Deisenhofen
 DAKO, Glostrup, DK
 Biomol, Hamburg

4.4.2 Chemikalien

Alle Chemikalien sind soweit nicht anders angegeben in p.a.-Qualität verwendet worden.

1,2-Dimethylhydrazin	Sigma, Deisenhofen
30 %Acrylamid/Bis Solution (29:1)	BioRad, München
Agarose (15510-027)	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (Typ VII Low Gelling)	Sigma, Deisenhofen
Agarose Seakem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Äther (Narkose)	Merck, Darmstadt
Bicinchoninsäure	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Riedel-de Haen, Deisenhofen
DEPC	Roth, Karlsruhe
Desoxycholinsäure	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid (Lösung: 1 %)	Merck, Darmstadt
Fish gelantine (RPN416)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin (100 %)	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂ (30 %)	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	DIFCO, USA
HEPES	Serva, Heidelberg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaiser's Gelantine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Methylcellulose	Fluka, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Mineralöl (Nujol)	Perkin Elmer, Köln
MTT	Sigma, Deisenhofen
NaOH (2 N)	Merck, Darmstadt
Naphthol AS-BI-N-acetyl-β-glucosaminide	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultrapure	ICN, Irvine, CA, USA
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt
NP-40 (Nonidet P40)	Fluka, Deisenhofen
Polyvinylalkohol	Serva, Heidelberg
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen
p-Rosanilin Base	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (37 %, 25 %)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Temed	Merck, Darmstadt
Toluidine blue	Merck, Darmstadt
Transfection Reagent Selector Kit	Qiagen, Hilden
Trichloressigsäure (TCA) (20 %)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	BD, Heidelberg
Tween-20-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

4.4.3 Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie

Advantage cDNA Polymerase-Mix	BD Clontech, Heidelberg
DNA Ligase (<i>E. coli</i>) (10 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase I (<i>E. coli</i>) (10 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
Erststrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe
High-Prime-Mix (5x)	Roche, Mannheim
Human COT-1 DNA (1 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Ligasepuffer für T4-Ligase (10x)	New England Biolabs

MessageMaker [®] Reagent Assembly	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV-RT (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7.5)	Merck, Darmstadt
Proteinase K (20 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Puffer L	Roche, Mannheim
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Spin Plasmid Mini Kit 250	Qiagen, Hilden
Random Hexamer Primer (600 μg/ml)	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme (<i>Sma</i> I, <i>Eco</i> R I Hind III)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Restriktionspuffer (<i>Y</i> ⁺ /Tango, <i>Eco</i> R I ⁺ , R ⁺)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Ribonuclease H (<i>E. coli</i>) (2 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor (40 U/μl)	Sigma, Deisenhofen
<i>Rsa</i> I (10 U/μl)	Roche, Mannheim
SuperScript [™] II RNaseH ⁻ Reverse	
T4-DNA-Ligase (2000 U/μl)	New England, Biolabs
T4-DNA-Polymerase (1 U/μl)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
TriPure [®] Isolation Reagent	Roche, Mannheim
Zweitstrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe

4.4.4 Geräte

1536 Pin-Replikationssystem	Nunc, Roskilde, DK
ABIPrism 377XL96 Sequencer	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, München
<i>E. coli</i> -Pulser [®]	BioRad, München
Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Gelkammern für Agarosegele	MWG-Biotech, Ebersberg
Gewebe-Homogenisator (Art-Mirco D8)	ART Labortechnik, Mühlheim
Heizplatte mit Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Histo Embedder	Leica, Heidelberg
Invasionskammer	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Microm Einbettautomat HMP 300	Zeiss, Jena
Mikroskop & halbautomatisches Bildanalysegerät	Zeiss, Jena
Milliblot-Graphite Elektrobloetter	Millipore, Bedford, MA, USA
Mini Protein II System	Bio Rad, München
Mini-Hybridisierungssofen	Saur, Reutlingen
Neubauer Zählkammer	MAGV, Rabenau-Londorf

Omnigrid Accent Microarrayer	Gene Machines, San Carlos, CA, USA
Optimas Software	PC-Systeme Stemmer, Puchheim
Powersupply POWER PAC 300	Bio Rad, München
Powersupply PPS 200-1D	MWG-Biotech, Ebersberg
Rotationsmikrotom für Paraffinschnitte	Leica, Heidelberg
Schüttelinkubator KF-4	Infors, Bottmingen
Schüttler IKA-Vibrax	IKA Labortechnik, Staufen
Solid pins (SSP015) für Omnigrid Acc.	Telechem International, Sunnyvale, CA, USA
Spectra Max 250 (ELISA-Reader)	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Storage Phosphor Screen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Storm 860	Amersham Pharmacia, Freiburg
<u>Thermocycler:</u>	
Biometra Uno II Thermoblock	Biometra, Göttingen
Cetus, 480 & Gene Amp 9600	Perkin Elmer, Köln
<u>Zentrifugen:</u>	
GS-15R	Beckman, München
GS-6K	Beckman, München
Sigma 3K-2	Sigma, Osterode am Harz
Tischzentrifugen mit Kühlung (5417R)	Eppendorf, Hamburg

4.4.5 Molekulargewichtstandards für DNA und Protein

Molekulargewichtstandards für DNA:

1 kb DNA Ladder (15615-016)	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenstandard (BM-IX)	Roche, Mannheim
Gene Ruler™ (1 DNA Ladder: SM0311/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder Plus: SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder: SM0241/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
pUC Mix Marker 8 (SM0301/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

Molekulargewichtsmarker für Protein:

Low Molecular Weight Range (M-3913)	Sigma, Deisenhofen
Protein Molecular Weight Marker (SM0431)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

4.4.6 Radiochemikalien

α -[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
α -[³³ P]-dCTP (2500 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
¹²⁵ I-IGF-II (2000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg

4.4.7 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, DK
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
DMEM/NUT MIX F12 (1:1) in Pulverform	Invitrogen, Karlsruhe
ECL „ <i>detection reagent</i> “ (RPN2109)	Amersham Pharmacia, Freiburg
ECL-Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>E. coli</i> SURE™	Stratagene, Heidelberg
Faltenfilter fein	Schleicher & Schüll, Dassel
Faltenfilter grob : 520 b ½	Schleicher & Schüll, Dassel
Gel-Blotting-Papiere (GB001, GB002, GB004)	Schleicher & Schüll, Dassel
Kulturflaschen mit Filter	Nunc, Roskilde, DK
Matrigel	Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia, Freiburg
Mikrotiterplatten 384-well	Nunc, Roskilde, DK
Millex GP (Filter)	Millipore, Schwalbach
Multiwellplatten für die Zellkultur (TBB)	Renner, Darmstadt
Multiwellplatten für die Zellkultur	Nunc, Roskilde, DK
Objektträger (Polylysin Microslides) Menzel	Roth, Karlsruhe
Dako-Zytomation-Pen	DAKO, Glostrup, DK
Parafilm	American National Can Neenah, WI, USA
PCR-Platten 96-well	AbGene, Hamburg
PCR-Reaktiongefäße (G004A) Streifen á 8	Kisker, Steinfurt
PCR-Reaktiongefäße (0,2, 0,5 ml)	Perkin Elmer, Köln
Polykarbonat-Filter	Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA
PVDF-Membran (Immobilon-P Transfermembran)	Millipore, Schwalbach
Qiabrane (neutrale Nylon Membran)	Qiagen, Hilden
Quarzküvette	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße „ <i>safe lock</i> “ (2, 1,5, 0,5, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg

rhIGF-II	Mediagnost, Tübingen
Saran® Wrap-Folie	Dow Chemical Company
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Schubert, Wackersdorf

4.5 Zusammensetzung der Puffer

4.5.1 Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur

Kulturmedien, Zusätze und FKS für die Zellkultur wurden, bis auf angegebene Ausnahmen von Invitrogen oder PAA bezogen. Steril filtriert wurde mit einem Filter GP Express Plus Membran (SCGPT01RE) (0,22 µm) der Firma Millipore, Schwalbach.

4.5.1.2 Fötale Kälberserum (FKS)

FKS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert, steril filtriert und aliquotiert
Lagerung bei -20°C

4.5.1.3 Nährmedium für Co115- und LS1034-Zellen

Dulbecco's MEM/ NUT MIX F-12 (HAM) mit 5 % FKS

4.5.1.4 Nährmedium für Isreco-1-Zellen

Dulbecco's MEM with Glutamax (Low Glucose) mit 5 % FKS

4.5.1.5 Nährmedium für Isreco-2- und Isreco-3-Zellen

Dulbecco's MEM with Glutamax (Low Glucose) mit 10 % FKS

4.5.1.6 Nährmedium für NCOL-1-Zellen

500 ml	Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose/25 mM Hepes)
11,7 ml	MEM Aminosäuren (50x)
5,88 ml	Penicillin/Streptomycin (100x)
5,88 ml	BME Vitamins (100x)
2 ml	Fungizone (250 µg/ml)
10 %	FKS
125 µl	Gentamicin (50 mg/ml)
6 µl/10 ml	rhEGF (10 µg/ml)

4.5.1.7 Methylcellulose (Stocklösung)

Die Stocklösung für Methylcellulose-Assays wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt. 8,8 g Methylcellulose wurden in 208 ml Aqua bidest. unter Rühren aufgekocht und abgekühlt. Dieser Vorgang wurde 3x für 30 min wiederholt. Anschließend wurden 188 ml 2x konzentriertes Kulturmedium zugefügt und 48 h bei 4-8°C gerührt. Bevor die Stocklösung aliquotiert wurde, diente ein Aliquot als Sterilkontrolle, welche bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % H₂O, für drei Tage inkubierte. Die Stocklösung wurde bei -20°C gelagert.

4.5.1.8 MTT (Stocklösung)

5 mg/ml MTT in PBS gelöst, steril filtriert und aliquotiert

Lagerung bei -20°C

Anwendung: 1:10 mit serumfreien DMEM verdünnt

4.5.1.9 Trypanblaulösung

0,5 % Trypanblau in PBS gelöst

4.5.1.10 PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

136 mM NaCl

8,1 mM Na₂HPO₄

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

steril filtriert und autoklaviert

4.5.2 Puffer für molekularbiologische Methoden

4.5.2.1 DEPC-H₂O (0,1 %)

1 ml DEPC wurden in 1000 ml Aqua bidest. für 2 h bei 37°C unter Rühren gelöst und dann autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT.

4.5.2.2 10x DNase I-Puffer

250 mM Tris-HCl, (pH 8,3)

375 mM KCl

15 mM MgCl₂

steril filtriert, autoklaviert und aliquotiert

Lagerung bei –20°C

4.5.2.3 Kawasaki-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 8,3)

1,5 mM MgCl₂

25 mM KCl

0,5 % (v/v) Tween 20

4.5.2.4 Proteinase K-Lösung

20 mg/ml in Aqua bidest. gelöst und aliquotiert

Lagerung bei –20°C

4.5.2.5 TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, (pH 8,0)

1 mM EDTA

4.5.3 Puffer für Agarosegele**4.5.3.1 Laufpuffer****4.5.3.1.1 50x TAE-Puffer**

242 g Tris-Base

57,1 ml Essigsäure (konzentriert)

100 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,0)

mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt, steril filtriert (0,22 µm) und autoklaviert

4.5.3.1.2 10x TBE-Puffer

108 g Tris-Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA, (pH 8,0)

mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt steril filtriert (0,22 µm)

4.5.3.2 Probenpuffer

4.5.3.2.1 6x Probenpuffer für DNA

3 ml Glycerin

7 ml aqua bidest.

1 Spatelspitze Bromphenolblau, aliquotiert

Lagerung bei 4-8°C

4.5.3.2.2 2,5x Probenpuffer (HSE)

2,4 g Harnstoff

5 g Saccharose

1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

1 ml 1 % Bromphenolblau

mit Aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt, aliquotiert

Lagerung bei 4-8°C

4.5.4 Puffer für SDS-Page und Westernblot

4.5.4.1 Puffer A

5 % SDS

0,1 M NaOH

4.5.4.2 5x Equilibrierungspuffer

62,5 ml 1 M Tris (pH 6,8)

100 ml Glycerin 100 %

2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

20 g SDS in 37,5 ml Aqua bidest. gelöst

0,02 % Bromphenolblau

4.5.4.3 10x Laufpuffer

30,3 g Tris
144,0 g Glycin
10,0 g SDS

in 1000 ml Aqua bidest. gelöst

Anwendung: 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt

4.5.4.4 10x Transferpuffer

58 g Tris
29 g Glycin
3,7 g SDS

in 1000 ml Aqua bidest. gelöst

Anwendung: 20 % Methanol zugesetzt und mit Aqua bidest. verdünnt

4.5.4.5 Ponceau-Lösung

0,1 % PonceauS
1 % Essigsäure

4.5.4.6 TBS (Tris gepufferte Salzlösung, Tris-Saline)

0,15 M NaCl
0,01 M Tris pH 7,4 mit HCl

4.5.5 Puffer für subtraktive cDNA-Banken und cDNA-Arrays**4.5.5.1 4x Hybridisierungspuffer für die subtraktive Hybridisierung**

200 mM HEPES (pH 8,3)
2 M NaCl
40 % PEG 8000
0,08 mM EDTA

4.5.5.2 Stopp-Puffer zum Beenden der subtraktiven Hybridisierung

20 mM HEPES (pH 8,3)
50 mM NaCl
0,2 mM EDTA

4.5.5.3 LB-Medium

- 1 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % NaCl gerührt bis sich alles gelöst hatte

mit ca. 0,1 % 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 7 bis 7,5 eingestellt, autoklaviert
Lagerung bei RT

4.5.5.4 LB-Agar-Platten

- 1,2 % Agar
- 1 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % NaCl

Das Gemisch wurde gerührt bis sich alles gelöst hatte und mit ca. 0,1 % 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 7 bis 7,5 eingestellt und autoklaviert. Bei einer Temperatur von 50°C wurde Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und die Lösung auf Petrischalen (12 x 12 cm) ausgegossen. Nach Erkalten des Agars wurden die Petrischalen bei 4°C über Kopf gelagert.

4.5.5.5 SOC-Medium

- 2 % Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,05 % NaCl
- 10 mM MgCl_2
- 10 mM MgSO_4
- 0,4 % Glucose

MgCl_2 , MgSO_4 und Glucose wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt

4.5.5.6 1,2x PP-Puffer für die Herstellung von cDNA-Arrays

- 1,2 M NaCl
- 24 mM Tris
- 1,2 mM EDTA
- 0,1 % Bromphenolblau

4.5.5.7 10x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,5)

250 mM	Na ₂ HPO ₄	
1,25 mM	NaCl	Lösung A
250 mM	NaH ₂ PO ₄	
1,25 mM	NaCl	Lösung B

Lösung B wurde zu Lösung A gegeben bis der PBS einen pH von 7,5 erreichte.

4.5.6 Puffer und Lösungen für die Sektion und Histochemie

Chemikalien wurden von der Firma Merck in p.a.-Qualität bezogen, soweit nicht anders angegeben. Für die Präparation der Mausgewebe wurden alle Puffer auf 4°C gekühlt.

4.5.6.1 Injektions-Puffer

1 mM	EDTA
0,9 %	NaCl

steril filtriert (0,22 µm) und autoklaviert

4.5.6.2 Färbelösungen

4.5.6.2.1 DAB-Farbstoff (Stocklösung)

500 mg	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)
13 ml	0,05 M Tris-HCl-Puffer gelöst, aliquotiert (200 µl Portionen)

Lagerung bei -20°C

4.5.6.2.2 DAB-Farbstoff (Färbelösung)

200 µl	DAB-Stocklösung
10 ml	0,05 M Tris-HCl-Puffer
50 µl	H ₂ O ₂ (3 %)

Lösung wurde vor jeder Färbung frisch angesetzt

4.5.6.2.3 Eosin-Lösung, gelblich (0,5 %)

1 g	Eosin
200 ml	Aqua bidest.
2 ml	Formalin (37 %)

4.5.6.2.4 Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung

p-Rosanilinbase-Lösung: Lösung A

400 mg p-Rosanilinbase
2,96 ml HCl (25 %)
7,07 ml Aqua bidest. → gemischt und filtriert (Faltenfilter fein)

Natriumnitritlösung: Lösung B

4 g Natriumnitrit
100 ml Aqua bidest. lösen
1 ml Lösung A mit 1 ml Lösung B gemischt

Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung wurde immer frisch angesetzt

4.5.6.2.5 Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich

2 g Hämatoxylin
3 g Kalium-Aluminium-Sulfat
0,4 g Natriumjodat
100 ml Ethanol (96 %)
100 ml Aqua bidest.
100 ml Glycerin (87 %)
10 ml Eisessig

zur Umsetzung der Lösung mindestens 1 h gerührt, filtriert (520 b ½ „grobe Filter“)

4.5.6.2.6 Methylenblaulösung

2 g Methylenblau
1000 ml 0.01 M PBS (pH 7,5)

filtriert (520 b ½ „grobe Filter“)

Lösung wurde vor jeder Färbung frisch angesetzt

4.5.6.2.7 Methylengrünlösung

1 g Methylengrün
100 ml 0,1 M Citratpuffer

filtriert (520 b ½ „grobe Filter“)

Lösung wurde vor jeder Färbung frisch angesetzt

4.5.6.3 Fixierlösungen

4.5.6.3.1 Formalinlösung

270 ml Formalin (37 %)

730 ml 0,05 M Phosphatpuffer

Lösung wurde vor jeder Präparation frisch angesetzt

4.5.6.3.2 Paraformaldehydlösung

20 g Paraformaldehyd

1000 ml 0,1 M Phosphatpuffer

gelöst bei 55°C ca. 30 min (im Wasserbad)

4.5.6.4 Puffer und Waschlösungen

4.5.6.4.1 Borsäure-Borat-Puffer (pH 7,6)

6,2 g Borsäure in 500 ml Aqua bidest. lösen: Lösung A

1,9 g Natrium-Borat (Borax) in 100 ml Aqua bidest. lösen: Lösung B

ca. 85 ml Lösung A wurden mit ca. 15 ml Lösung B gemischt

Das Mischungsverhältnis wurde so eingestellt, dass der Borsäure-Borat-Puffer einen pH von 7,6 erreichte

4.5.6.4.2 0,1 M Citratpuffer (pH 4,8)

29,41 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung A

21,01 g $C_6H_6O_7 \cdot H_2O$ in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung B

ca. 851,85 ml Lösung B wurden mit ca. 1000 ml Lösung A gemischt

Das Mischungsverhältnis wurde so eingestellt, dass der Citratpuffer einen pH von 4,8 erreichte.

4.5.6.4.3 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

17,8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung A

13,8 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung B

ca. 800 ml Lösung B wurden mit ca. 200 ml Lösung A gemischt

Das Mischungsverhältnis wurde so eingestellt, dass der Phosphatpuffer einen pH von 7,5 erreichte.

4.5.6.4.4 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

3,4 g KH_2PO_4 in 500 ml Aqua bidest. lösen: Lösung A
17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 2000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung B
ca. 800 ml Lösung B wurden mit ca. 200 ml Lösung A gemischt

Das Mischungsverhältnis wurde so eingestellt, dass der Phosphatpuffer einen pH von 7,5 erreichte.

4.5.6.4.5 0,01 M PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,5)

1,36 g KH_2PO_4
9 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung A
1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
9 g NaCl in 1000 ml Aqua bidest. lösen: Lösung B
ca. 800 ml Lösung B wurden mit ca. 200 ml Lösung A gemischt

Das Mischungsverhältnis wurde so eingestellt, dass der PBS einen pH von 7,5 erreichte.

4.5.6.4.6 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,6)

6,05 g Tris ($\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)
40 ml 1 M HCl

in 900 ml Aqua bidest. gelöst, den pH mit HCl auf 7,6 eingestellt
mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt

4.5.6.4.7 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) für Immunhistochemie

12,1 g Tris ($\text{CH}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)
20,0 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

in 1900 ml Aqua bidest. gelöst, mit 1 N HCl auf pH 7,8 eingestellt (ca. 71,5 ml)
mit Aqua bidest. auf 2000 ml Endvolumen aufgefüllt

4.5.6.5 Reaktionslösungen

4.5.6.5.1 Antikörper-Stocks

Mouse anti-BrdU: 50 µg wurden in 1 ml PBS gelöst (Aliquots zu je 100 µl)

Lagerung bei –20°C

anti-Maus IgG-POD: (Aliquots zu je 100 µl)

Lagerung bei –20°C

Anwendung: 1:10 verdünnt mit 1 % BSA in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (frisch angesetzt)

4.5.6.5.2 Hexosaminidase-Substratlösung

10 mg Naphthol AS-BI-N-acetyl-β-glucosaminide

1 ml 2-methoxy-ethanol (ethylene-glycol-monomethyl-ether)

Lösung frisch angesetzt oder in 1 ml Aliquots eingefroren

Lagerung bei –20°C

4.5.6.5.3 Hexosaminidase-Gebrauchlösung

1 ml Hexosaminidase- Substratlösung

8,1 ml Polyvinylalkohollösung

0,9 ml Hexazonium-p-Rosanilin-Lösung

vermischt und mit 10 N NaOH auf pH 4,5 eingestellt

kurz vor Inkubation angesetzt

4.5.6.5.4 Trypsinlösung

200 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer auf 37°C erwärmen

20 mg Trypsin

kurz vor der Inkubation in den vorgewärmten Puffer gegeben und gut verrührt

4.5.6.6 Sonstige Lösungen

4.5.6.6.1 BSA-Lösung

1 g BSA

100 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer

4.5.6.6.2 *Essigsäure (0,1 %)*

250 µl Eisessig
250 ml Aqua bidest.

4.5.6.6.3 *H₂O₂-Lösung (3 %)*

180 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer
20 ml H₂O₂ (30 %)

4.5.6.6.6 *Polyvinylalkohollösung*

15 g Polyvinylalkohol M=22 000 g/mol (15 % w/v)
0,5 g CaCl₂ (0,5 %)
100 ml 0,1 M Citratpuffer (pH 4,8)

vermischt und unter rühren auf 85°C erhitzt bis sich alles gelöst hatte

Lagerung bei 4°C

Anwendung: Bei 37°C im Wasserbad verflüssigt

4.5.6.6.7 *Salzsäure-Ethanol-Lösung*

320 µl HCl (25 %)
250 ml Ethanol (70 %)

4.5.6.6.8 *Saccharoselösung*

50 g Saccharose
1000 ml 0,1 M Phosphatpuffer

4.6 Primer, Nukleotide und Oligonukleotide

dNTPs

MBI Fermentas, St. Leon Roth

Alle folgenden Primer und Oligonukleotide wurden vom Syntheservice des Genzentrums (Arbeitsgruppe Arnold) synthetisiert.

Oligo-dT (20):	5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3'
hIGFBP-1#1: sense	5' TAA CTG AGG AGG AGC TCC TGG 3'
hIGFBP-1#2: antisense	5' TCT TCC CAT TCC AAG GGT AGA 3'
hIGFBP-2#1: sense	5' GTT GCA GAC AAT GGC GAT GAC 3'
hIGFBP-2#2: antisense	5' GTT TGA GGT TGT ACA GGC CAT 3'
hIGFBP-3#1: sense	5' GCC GCG GGC TCT GCG TCA ACG C 3'
hIGFBP-3#2: antisense	5' CTG GGA CTC AGC ACA TTG AGG AAC 3'
hIGFBP-4#1: sense	5' GCC ATC CAG GAA AGC CTG CA 3
hIGFBP-4#2: antisense	5' TGG AAG TTG CCG TTG CGG TC 3'
hIGFBP-5#1: sense	5' CTG AAG CAG TGA AGA AGG ACC 3'
hIGFBP-5#2: antisense	5' ATC ACT CAA CGT TGC TGC TGT 3'
hIGFBP-6#1: sense	5' AAG CTG AGG GCT GTC TCA GG 3'
hIGFBP-6#2: antisense	5' AGC TTC CAT TGC CAT CTG GAG 3'
IGF-II#5: sense	5' ATG GGA ATC CCA ATG GGG AAG 3'
IGF-II#6: antisense	5' CTT GCC CAC GGG GTA TCT GGG 3'
hIGF-II #10: antisense	5' CGC GGT CTT GGG TGG GTA GAG 3'
mIGF-II #11: antisense	5' CGG GGT CTT TGG GTG GTA ACA3'
mIGFBP-4#1: sense	5' CTG TGC CCC AGG GTT CCT GC 3'
mIGFBP-4#2: antisense	5' CTC CAA GCC AGG TCA ACT CTA CA 3'
pCl-neo#1: sense	5' CCT GAA TGA ACT GCA GGA CGA 3'
pCl-neo#2: antisense	5' TGC GAA TCG GGA GCG GCG ATA 3'
β-Aktin: sense#1	5' GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3'
β-Aktin: antisense#2	5' GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3'
Primer 1:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
"nested"-Primer 1:	5' TC GAG CGC GCC GCA GGG CAG TG 3'
"nested"-Primer 2:	5' AG GGC GTG GTG CGC GCT GCT GG 3'

Adaptor 1:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG <u>CGC GCC</u> GCA GGG CAG TG 3'
Adaptor 2:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAG GGC GTG <u>GTG CGC GCT</u> GCT GG 3'
Adaptor 1XR:	5' CAC TGC CCT GCG GG 3'
Adaptor 2XR:	5' CCA GCA GCG CGC AG 3'
T7ex	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'
T3ex	5' TCA CTA AAG GGA ACA AAA GCT GGA G 3'
cDNA-Synthese-Primer NRAdT:	5' AAC TGC GGC CGC GTA CAG C(T) ₂₀ VN
Sonden-Primer:	5' GAG A(T) ₂₀ VN

V=A, C oder G; N=A, C, G oder T

5 Methoden

5.1 Methoden der Zellkultur

5.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturflaschen oder Schalen durchgeführt. Ein Wechsel des Kulturmediums fand im Abstand von zwei bis drei Tagen statt, indem das alte Medium durch Absaugen entfernt wurde und neues Medium in der entsprechenden Menge zugegeben wurde. Um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

5.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Zelllinien wurden in 25 cm² Flaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. 1 ml 1x Trypsinlösung wurde auf den Zellrasen gegeben, welcher vorher durch zweimaliges Waschen mit PBS vom Kulturmedium gereinigt worden war, und bei 37°C im Brutschrank 3-8 min inkubiert. Lösten sich die Zellen ab, wurde die Proteolyse durch die Zugabe der dreifachen Menge an Kulturmedium abgestoppt. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette homogenisiert und die Zellen anschließend bei 250 x g 5 min zentrifugiert. Zellpellets wurden in 1 ml Kulturmedium mit 10 % FKS und 10 % DMSO suspendiert und in Kryogefäße unmittelbar bei -80°C mindestens 24 h eingefroren, ehe sie zur weiteren Lagerung in Flüssigstickstoff überführt wurden.

5.1.3 Re-Passagierung der Zellen

Alle Zellkulturversuche wurden mit vergleichbaren Zellkulturpassagen durchgeführt, um Abweichungen innerhalb der unabhängig durchgeführten Versuche möglichst gering zu halten. Zu diesem Zweck wurden kryokonservierte Zellen rasch aufgetaut und mit 5 ml Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 250 x g pelletiert, der Überstand verworfen und erneut mit 5 ml Kulturmedium suspendiert und unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Nach diesen

beiden Schritten ist das im Einfriermedium enthaltene DMSO vollständig entfernt. Die Zellen konnten danach in Gewebekulturflaschen in ihren jeweiligen Kulturmedien unter den angegebenen Standardbedingungen angezogen werden. Nach 24 h hatten sich die Zellen in der Regel abgesetzt. Restliche Zelltrümmer und Zellen, die sich nicht abgesetzt hatten, wurden durch einen Medienwechsel entfernt. Um eine kontinuierliche Proliferationsrate der Zellen zu erhalten, wurden die Zellen nach dem Auftauen ein- bis zweimal passagiert, bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden. Für die Subkultivierung der Zellen und die Verwendung für verschiedene Zellkulturuntersuchungen wurde in der Regel von 80-90 % konfluenten Zellen ausgegangen, die trypsinisiert, ausgezählt und erneut ausgesät wurden.

5.1.4 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Die Bestimmung der Zellzahl ist für die Aussaatdichte der Versuchszellen wichtig, damit gleiche Versuchsbedingungen für die Experimente vorliegen und ist ausserdem eine Bezugsgröße für Auswertungen. Mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) konnte die Zellzahl bestimmt werden. 80-90 % konfluente Zellen wurden trypsinisiert und vereinzelt. Für die Zählung wurde eine kleine Menge der zu zählenden Zellsuspension 1:5 mit Trypanblaulösung verdünnt. Da Trypanblau im Gegensatz zu toten Zellen keine lebenden Zellen anfärbt, wird gesichert, dass auch nur lebende Zellen in die Zellzahlermittlung einfließen. Die Zellzahl berechnet sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \emptyset \text{ der Zellen aus 8 großen Quadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

5.1.5 Proliferationsmessung

Der in dieser Arbeit zur Bestimmung der Proliferation verwendete MTT [(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium Bromid]-Nachweis beruht auf einer Enzymreaktion. Die für die Bildung des Farbstoffes verantwortliche, im Mitochondrium lokalisierte Succinat-Dehydrogenase ist nur in lebenden Zellen aktiv. Die optisch erfassbare Konversion des Tetrazoliumsalzes in ein Formazan ist proportional zur Zahl lebender Zellen. Die Kristalle des gebildeten Formazans können mit organischen Lösungsmitteln (DMSO) in Lösung gebracht werden und die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von

570 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen werden [160,416,597]. Zellen wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/well (LS1034, Isreco-1) und 10 000 Zellen/well (Isreco-2) in 96-Multiwellplatten für Zellkultur in ihren jeweiligen Kulturmedien ausgesät. Zur Bestimmung der optimalen Selektionskonzentration von Geneticin (G418) wurde G418 in steigenden Konzentrationen (0, 31,25, 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 µg/ml) zugesetzt. Für die Bestimmung der Proliferation von nicht-transfizierten Zelllinien gegenüber Vektor-transfizierten Kontrollen (mock-Klone) und den mIGFBP-4 sense- bzw. antisense-transfizierten Klonen, wurden die Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von humanem IGF-II (rhIGF-II, 50 ng/ml oder 250 ng/ml) inkubiert. Nach einem Inkubationszeitraum von 72 h unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂, 95 % H₂O) wurde das Medium vollständig entfernt und die MTT-Lösung (0,5 mg/ml) auf die Zellen gegeben. Die Umsetzung von MTT fand unter serumfreien Bedingungen für 2 h statt. Die MTT-Lösung wurde vorsichtig aber vollständig abgesaugt, die Kristalle wurden in DMSO gelöst. Die Adsorption der Lösung wurde bei 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm direkt im Anschluss im ELISA-Reader gemessen.

5.1.6 Koloniebildung in semi-soliden Medien

Semi-solide Medien bieten die Möglichkeit, Zellen, die aufgrund ihrer Transformation fähig sind Kolonien zu bilden, hinsichtlich dieser Eigenschaft genauer zu untersuchen. Die Medien verhindern, dass sich adhärent wachsende Zellen anheften können oder miteinander Kontakt aufnehmen. Nicht-transformierte Zellen gehen unter diesen Bedingungen in Apoptose. Wie stark eine transformierte Zelle in der Lage ist, Kolonien zu bilden, d.h. sich unter diesen erschwerten Bedingungen noch zu teilen, hängt vom Grad ihrer Malignität ab. Als semi-solides Medium wurde in dieser Arbeit Methylcellulose benutzt. Isreco-1- und LS1034-Zellen sowie ihre korrespondierenden Zellklone wurden in einer Dichte von 2000 Zellen/ml und Isreco-2-Zellen sowie die korrespondierenden Zellklone mit 10 000 Zellen/ml in unbeschichtete sterile 35-mm-Petrischalen ausplattiert. Das Volumen des 0,9 % Methylcellulose-enthaltenden Kulturmediums betrug 1 ml. FKS wurde für Isreco-1- und LS1034-Zellen in einer Konzentration von 5 % und für Isreco-2-Zellen in einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Ob rhIGF-II einen Einfluss auf die Koloniebildung hatte, wurde durch exogene Zugabe einer Konzentration von

50 ng/ml getestet. Die ausplattierten Zellen wurden für 14 bis 16 Tage unter den angegebenen Standardbedingungen inkubiert und die Kolonien unter dem Mikroskop über einem Rasterschema ausgezählt.

5.1.7 Messung der Invasion

Der Grad der Invasivität eines Tumors beschreibt neben anderen Kriterien das Stadium in der Karzinogenese. In späteren Stadien bilden sich oft in Leber und Lunge Metastasen, welche Folge eines invasiv wachsenden Tumors sind. *In vitro* kann die Invasionsbereitschaft einer Zelllinie gemessen werden, indem man die Migration von Zellen durch einen mit Matrigel beschichteten Polykarbonat-Filter mit einer Porengröße von 12- μ m bestimmt. Die Porengröße richtet sich nach der Größe der verwendeten Zellen und muss für den jeweiligen Zelltyp ausgetestet werden. Die Migration durch den beschichteten Filter, der eine semipermeable Barriere darstellt, ist ein aktiver Prozess und benötigt einen Gradienten an chemoattraktiven Substanzen. In dieser Arbeit wurde der Gradient mit 10 % FKS generiert. Die Polymerisierung des Matrigels (1 % in PBS) auf dem Filter fand für 2 h statt. Anschließend wurden die Filter luftblasen-frei auf das untere Kompartiment der Invasionskammer gebracht. Im unteren Kompartiment der Invasionskammer befinden sich Vertiefungen, die mit FKS-haltigem Kulturmedium und ohne oder mit rhIGF-II (50 ng/ml; 250 ng/ml) befüllt wurden, bevor der Filter aufgelegt wurde. Auf den Filter wurde ein Silikongummi zum Abdichten aufgelegt und das obere Kompartiment aufgesetzt und festgeschraubt. Im oberen Kompartiment befinden sich Bohrungen, die genau auf die Vertiefungen der unteren Kammer passen. Dadurch, dass die beiden Kompartimente durch die beschichtete Membran getrennt sind, konnte die obere Hälfte des Kompartiments mit 1×10^5 Zellen/Bohrung befüllt werden. Diese Zellzahl wurde für alle Zelllinien und die korrespondierenden Klone benutzt. Die fertig befüllten Systeme wurden 16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Filter in 3,7 %igem Formaldehyd fixiert und für 2 min in 1 % Toluidine-Blau/1 % Borax-Lösung gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden 30 min in Aqua bidest. gewaschen und die Zellen der oberen Seite des Filters entfernt, ausgeschnitten und in 200 μ l 1 %igem SDS gelöst. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden Zellkreise ohne Entfernung der oberen Zellen ausgeschnitten und in 200 μ l 1 %igem SDS gelöst. Nach der vollständigen Solubilisation der gefärbten Zellen bei 37°C für 60 min wurde die Adsorption des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 620 nm im ELISA-Reader gemessen. Der

Anteil der migrierten Zellen wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\% \text{ Invasion} = \text{OD der migrierten Zellfraktion} / \text{OD der Gesamt-Zellen} \times 100$$

5.1.8 Stabile Transfektion der Kolonkarzinomzelllinien

Durch die Transfektion eines in einen Expressionsvektor klonierten Gens kann die Funktion des entsprechenden Gens beispielsweise in einer Zelllinie untersucht werden. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Kolonkarzinomzelllinien mit einem Expressionsvektor, der die cDNA des murinen IGFBP-4 enthielt, transfiziert. Nur in einigen Zellen wird die transfizierte DNA stabil in ein Chromosom eingebaut. Diese Zellen werden mit Hilfe ihrer im Transfektionsvektor kodierten Antibiotikaresistenz isoliert. Diesen Vorgang nennt man eine stabile Transfektion. Für die Transfektion wurden die Zellen in zwei verschiedenen Konzentrationen auf 6-well-Platten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion 40-60 % konfluent waren. Alle Zelllinien wurden mit dem Transfektionsvektor pCI-neo (Transfektionskontrolle (mock)), pCI-neo-mIGFBP-4 sense-Richtung und pCI-neo-mIGFBP-4 antisense-Richtung transfiziert. Für die Transfektion wurde ein Transfektions-Kit von Qiagen benutzt. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Menge der transfizierten DNA betrug für mit Superfekt-Reagens transfizierte Zellen 2,0 µg/well und für mit Effektene-Reagens transfizierte Zellen 0,4 µg DNA/well. Der Transfektionsprozess fand innerhalb eines Zeitraums von 48 h statt, anschließend wurden die Zellen mit G418 mit den vorher ermittelten Konzentrationen selektioniert (LS1034-Zellen mit 1 mg/ml; Isreco-1- und Isreco-2-Zellen mit 2 mg/ml). Das Medium wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen erneuert, und nach 14 Tagen konnten einzelne Klone gepickt und subkultiviert werden. Alle gepickten Klone wurden zunächst in 96-well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend auf 48-well-Platten subkultiviert. In diesem Stadium wurden alle gepickten Klone durch einen Kawasakiverdau mit anschließender PCR auf die Integration der Konstrukte geprüft. Die in der PCR mIGFBP-4 positiven Klone wurden auf 6-well-Platten bis zu einer Konfluenz von 85-90 % subkultiviert und konditioniert. Für die Identifizierung mIGFBP-4-exprimierender Klone auf Proteinebene wurden 10 µl serumfreies Medium in der SDS-Page aufgetrennt und anschließend ein Ligandenblot mit ¹²⁵I-IGF-II durchgeführt. Klone, die unter diesen Bedingungen ein positives Signal ergaben, wurden subkultiviert, kryokonserviert und für weitere Experimente

verwendet.

5.1.9 Herstellung konditionierter Medien

Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 85-90 % kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 72 h unter serumfreien Bedingungen (2 ml Medium/well) inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min 700 x g), der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert. Aus den zurückgebliebenen Zellen wurde entweder RNA gewonnen oder sie wurden in Equilibrierungspuffer (2 ml/well) lysiert. Für die Proteinbestimmung und den anschließenden Westernblot wurde das Protein aus konditionierten Medien, soweit erforderlich, gefällt. Die zu fällende Menge des konditionierten Mediums von LS1034-, Isreco-1-, Isreco-2-Zellen und ihren transfizierten Zellklonen wurde für Liganden- und Westernblots auf die Proteinmenge des gleichzeitig gewonnenen Zelllysates standardisiert.

5.2 Methoden zur Proteinanalyse

5.2.1 Proteinfällung aus serumfreien Überständen

In den konditionierten Medien enthaltene Verbindungen können durch Eigenabsorption oder eigene reduktive Eigenschaften die Proteinmessung stören. Durch eine Fällung der Proteine wurden diese Faktoren entfernt. Darüber hinaus wurde so eine Aufkonzentrierung der Proteine erzielt. Die in den Medien enthaltenen Proteine wurden mit Desoxycholinsäure 10 min bei RT inkubiert, indem 1000 µl Medium mit 50 µl Desoxycholinsäure (0,3 %) versetzt wurden. Anschließend wurden die Proteine durch die Zugabe von 360 µl 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Die Pelletierung des Proteins fand 15 min bei 1700 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei RT statt. Das Pellet wurde nochmals mit 500 µl TCA (20 %) gewaschen und anschließend in 20 µl Puffer A aufgenommen.

5.2.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Das Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA beruht darauf, dass Bicinchoninsäure als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv, spezifisch und stabil mit Cu¹⁺-Ionen

reagiert. Man macht sich hier die Biuret-Reaktion der Proteine zunutze, die Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzieren. Der entstehende BCA- Cu^{1+} -Komplex ist stabil und wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm. Proteine in wässrigen Lösungen können also bei 562 nm im Photospektrometer mit dieser Methode quantifiziert werden. Proteinmessungen erfolgten in 96-well-Platten. Proben wurden in Equilibrierungspuffer in einem Volumen von 50 μl verdünnt und in die Wells gegeben. Aus einer Stocklösung von BSA wurde eine Verdünnungsreihe in Equilibrierungspuffer mit 6 Standards hergestellt. 50 μl je Standard sowie ein Leerwert wurden in die Wells gegeben. Bicinchoninsäure wurde mit 4 %iger CuSO_4 -Lösung (50:1) gemischt und 200 μl dieser Lösung zu jedem Standard und zu jeder Probe gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der gemessenen Eichkurve.

5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel erfolgt in Anwesenheit von einem anionischen Detergenz, SDS (sodium dodecyl sulfate). SDS geht eine Bindung mit hydrophoben Regionen der Proteine ein und bewirkt dadurch eine Denaturierung und eine stark negative Ladung der einzelnen Proteine, welche alle normalerweise vorhandenen Ladungen überdeckt. Gibt man zusätzlich noch reduzierende Agenzien (Mercaptoethanol) hinzu, werden die über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten eines Proteins zusätzlich getrennt. In Anwesenheit von SDS ist die Lauflänge der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte. Um ein besseres Trennergebnis zu erzielen, wird dem eigentlichen Trenngel ein grobmaschiges Sammelgel vorgeschaltet. In diesem Sammelgel werden die Proteine zu einer Bande fokussiert, was die Bandenschärfe im Trenngel verbessert. Die Porengröße eines Trenngels nimmt mit steigender Vernetzung der Acrylamidketten ab.

5.2.3.1 Herstellung der analytischen Gele

Die 15 %igen analytischen Trenngele wurden nach der Methode von Lämmli wie folgt hergestellt:

Trenngel: Angaben für 2 Gele

2,35 ml	Aqua bidest.
2,50 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
5,00 ml	Acrylamid/Bis-Solution (29:1)
100 µl	10 % SDS
50 µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
5 µl	Temed

Dieses 15 %ige SDS-Polyacrylamidgel wurde zwischen die für zwei Minigele vorbereiteten Glasplatten eines Mini Protean II-Systems gegossen und sofort mit Aqua bidest. überschichtet. Nach mindestens 60 minütiger Polymerisation wurde das Aqua bidest. vollständig entfernt und das Trenngel mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet.

Sammelgel: Angaben für 2 Gele

7,00 ml	Aqua bidest.
1,25 ml	1,5 M Tris (pH 6.8)
1,50 ml	Acrylamid/Bis-Solution (29:1)
100 µl	10 % SDS
100 µl	10 % APS
5 µl	Temed

Die Kämme wurden in das flüssige Sammelgel gesteckt. Nach 60 min wurden die polymerisierten Gele entweder gleich verwendet oder in Frischhaltefolie bei 4°C gelagert und am nächsten Tag benutzt.

5.2.3.2 Vorbereitung der Proben

Die aufzutrennenden Proben wurden mit Equilibrierungspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurden Marker mit Molekulargewichten von 66 kDa, 49 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14,2 kDa, 6,5 kDa (Low Molecular Weight Range) der Firma Sigma oder 116 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18,4 kDa, 14,4 kDa (Protein Molecular Weight Marker #SM0431) der Firma MBI Fermentas mit aufgetragen.

5.2.3.3 Beladen des Gels und Elektrophoresebedingungen

Die fertigen Gele wurden in die vorbereitete Gelkammer eingesetzt und das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer so aufgefüllt, dass sich Ober- und Unterkante der Glasplatten im Puffer befanden. Nach dem Ausspülen der Sammelgeltaschen werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurden für 15 min eine Spannung von 100 V und dann für ca. 60 min 160 V angelegt. Um eine bessere Auftrennung der Proteine zu erzielen, wurde nach dem Austritt des Bromphenolblaus aus dem Gel die Elektrophorese um 10 bis 15 min verlängert und dann gestoppt.

5.2.3.4 Westernblot

Der Westernblot beschreibt den Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine inerte Membran mit anschließendem Antigen-Antikörper oder Protein-Liganden-Nachweis. Die im Alkalischen negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld, in Richtung positiv geladener Anode, und werden von der PVDF-Membran gebunden. Dabei werden die Proteine auf der Membran immobilisiert. Für den Transfer wurde unmittelbar nach der Elektrophorese das Sammelgel entfernt und die Gele für 5 min im Transferpuffer leicht geschüttelt. Die ImmobilonP-PVDF-Membranen, die auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten wurden, schüttelten leicht für 10 min in 100 %igem Methanol und equilibrierten nochmals 30 min im kompletten Transferpuffer. Der Aufbau des Blots fand unter Vermeidung von Luftblasen unter „semi-dry“ Bedingungen auf der unteren Graphit-Bloteinheit (Anode) folgendermaßen statt:

Blotsandwich: Angaben für einen Blot

- Lagen (3x 2) in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier (GB002) (in Größe des Gels)
- PVDF-Membran (nochmals mit Transferpuffer überspült)
- Gel
- Lagen (3x 2) in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier (GB002) (in Größe des Gels)

Anschließend wurde die obere Graphit-Bloteinheit (Katode) unter leichtem Druck

aufgebracht. Die Proteine wurden mit 1 mA/cm^2 für 90 min auf die Membran transferiert.

5.2.3.5 Ponceau-S-Färbung

Die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine wurden mit Ponceau S reversibel gefärbt. Diese Färbung diente dazu, die Eichproteine des Markers auf dem Blot zu markieren, um bei nachfolgendem Immuno- oder Ligandenblot eine Molekulargewichtsbestimmung zu ermöglichen. Die Färbung des Blots findet für ca. 2 min in der PonceauS-Lösung statt. Danach wird der Blot bis zur Entfärbung des Hintergrundes mit Aqua dest. gewaschen und die Marker am Rand mit einem wasserfesten Stift markiert. Die Membranen können vor dem Immuno- oder Ligandenblot zwischen Gel-Blotting-Papier (GB002) bis zu 4 Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

5.2.4 Immunoblot

Der Immunoblot beschreibt den Nachweis von spezifischen Proteinen mittels einer Antigen-Antikörper-Kopplung. Auf das Antigen, in diesem Fall das zu untersuchende Protein, wird ein erster Antikörper (AK) gegeben, der das Antigen spezifisch bindet. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym (z.B. Peroxidase) gekoppelt und ist gegen den ersten AK gerichtet.

In TBS welche 0,1 % Tween 20 enthielt (TBS-T) wurde die Blotmembran unter Zusatz von 3 % Milchpulver (w/v) für 60 min bei Raumtemperatur (RT) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Anschließend folgten drei Waschvorgänge mit TBS-T bei RT für 1x 15 min und 2x 5 min. Über Nacht inkubierte der erste Antikörper (Anti-IGFBP-4 „*rabbit polyclonal antiserum*“) in einer Verdünnung von 1:1000 im Blockierungspuffer bei 4°C. Es folgten drei Waschvorgänge bei RT mit TBS-T für 1x 15 min und 2x 5 min und die Zugabe des zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Anti-IgG-Kanichen aus Schwein), in einer Verdünnung von 1:5000 ebenfalls im Blockierungspuffer für 90 min bei RT. Nach erneutem fünfmaligen Waschen für 1x 15 min und 4x 5 min mit TBS-T fand die Detektion der Proteine unter Verwendung einer ECL-(Enhanced chemiluminescence)-Detektionslösung statt. Anschließend wurden die Membranen in Folie verpackt und ein ECL-Detektionsfilm (Röntgenfilm) aufgelegt.

5.2.5 Ligandenblot

Ein Ligandenblot stellt die biologische Funktionalität von Proteinen dar, in dem der radioaktiv markierte Ligand an Proteine (z.B. Bindungsproteine, Rezeptoren) bindet, die eine Affinität ihm gegenüber aufweisen und somit autoradiographisch nachgewiesen werden können. Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte wurden bei einem Ligandenblot bei 4°C durchgeführt. Benötigte Lösungen wurden ebenfalls bei 4°C gelagert und benutzt.

Die Blot-Membranen wurden in TBS unter Zusatz von 3 % NP-40 für 20 min inkubiert, dabei wurden Reste von der PonceauS-Färbung vollständig entfernt. Anschließend wurden die Blot-Membranen in TBS und 1 % Fischgelatine für mindestens 120 min zwecks Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Mit TBS welche 0,1 % Tween 20 enthielt, wurden die Blot-Membranen nochmals für 20 min inkubiert. Über Nacht wurde der mit ¹²⁵[I] markierte IGF-II-Tracer (500 000 cpm/ml) in TBS, 0,1 % Fischgelatine und 0,1 % Tween 20 zugesetzt. Zunächst folgten zwei Waschschrte mit TBS mit 0,1 % Tween 20 als Zusatz für jeweils 30 min, um die überschüssige Radioaktivität zu entfernen, und nochmals drei Waschschrte mit TBS für jeweils 30 min um den Hintergrund zu klären. Anschließend wurden die Membranen luftblasenfrie in Folie verpackt und für ca. 24 h auf einen „Storage Phosphor Screen“ und/oder einen Röntgenfilm aufgelegt. Die absorbierten Signale wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm 860) oder durch die Entwicklung des Films sichtbar gemacht.

5.3 Methoden der Molekularbiologie

5.3.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen werden als Typ I- und Typ II- Enzyme klassifiziert. Während Typ I Enzyme eine Sequenz erkennen, aber in der DNA an beliebiger Sequenz schneiden, erkennt der Typ II palindromische Sequenzen mit 4 bis 8 Basen und schneidet dort spezifisch. In Abhängigkeit vom Restriktionsenzym entstehen beim Schneiden entweder überhängende Enden, sogenannte „*sticky ends*“, mit 3'-oder 5'-Überhang oder glatte Enden, sogenannte „*blunt ends*“. *EcoR* I gehört z.B. zu den Typ II Enzymen und erzeugt 5'-überhängende Enden.

Zur Analyse der Konstrukte wurden (1 µl) 500 ng pCI-neo bzw. pcineo-mIGFBP-4 in

sense- und antisense-Richtung mit 2 µl Reaktionspuffer (10x) des jeweiligen Enzyms und 5 U Enzym in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das Ganze wurde mit sterilem Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und 1 h bei 30°C oder 37°C, je nach Restriktionsenzym, inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem Ethidiumbromid-haltigen TAE-Agarosegel (1,5 %) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Hilfe des Stratagene Eagleeye II dokumentiert.

5.3.2 Kawasakiverdau

Für die Gewinnung der genomischen DNA zur Detektion des Fremdgens in Mäusen oder transfizierten Zellen wurde die Kawasaki-Puffer-Methode [335] angewendet. Während der Vermehrungsphase jedes gepickten Zellklones wurde ein Teil der Zellen in 48-well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % unter den angegebenen Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Medium komplett entfernt und 200 µl Kawasakipuffer und 12 µl Proteinase K-Lösung zugegeben. Die gleiche Menge Kawasakipuffer und Proteinase K-Lösung wurde für 2-3 mm der zu untersuchenden Schwanzprobe angesetzt. Zellen oder Schwanzproben wurden über Nacht bei 56°C im Wasserbad verdaut. Anschließend wurde die Proteinase K 15 min bei 95°C inaktiviert. Die unverdauten Gewebeteile wurden kurz abzentrifugiert und ein Aliquot des Überstandes in eine PCR eingesetzt. Proben wurden bei 4 bis 8°C gelagert.

5.3.3 Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen und Organen

Die Isolierung der RNA erfolgte nach einer optimierten Guanidininisothiocyanat/Phenol-Methode, erstmals beschrieben durch Chomczynski und Sacchi [117]. Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Zellen und Organen wurde ein auf diesem Prinzip beruhendes kommerzielles Reagenz (TriPure[®] Isolation Reagent) der Firma Roche verwendet.

Gesamt-RNA aus Zellen:

Für die RNA-Präparation wurden Zellen einer Konfluenz von 80-90 % benutzt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1,5 ml pro 25 cm² zellbewachsener Fläche des TriPure[®] Isolation Reagent lysiert. Das komplette Zelllysat wurde in Reaktionsgefäße überführt.

Gesamt-RNA aus Organen:

1 ml TriPure[®] Isolation Reagent wurde in sterile 5 ml-Plastikröhrchen vorgelegt. Gewebeproben wurden auf Trockeneis geschnitten und sofort in das TriPure[®] Isolation Reagent überführt und gewogen (50-100 mg Gewebe/ml TriPure[®] Isolation Reagent). Anschließend wurden die Proben mit einem Gewebe-Homogenisator (Art-Mirco D8) auf Stufe D (23500 rpm) 1 min bei Raumtemperatur homogenisiert und vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt.

Die weitere Behandlung der Zell- bzw. Gewebe-Proben, wie Phasen-Separation, Fällung und Waschung der RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die RNA 10-20 min an der Luft getrocknet und je nach Pelletgröße in 20-100 µl DEPC-H₂O gelöst. Bevor die Quantität und Reinheit der RNA bestimmt wurde, denaturierten die Proben 5 min bei 65°C und wurden sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1 µl RNA in Aqua bidest. 1:100 verdünnt und photometrisch unter Verwendung einer Quarzküvette quantifiziert. Der Quotient der OD aus 260 nm/280 nm gibt die Reinheit der RNA an. Die Ratio der in dieser Arbeit verwendeten RNA lag zwischen 1,7 und 1,9 und entspricht dem im Protokoll des Herstellers angegebenen Erwartungsbereich. Die Konzentration der RNA errechnet sich aus der Formel:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ µg RNA/ml}$$

5.3.4 Bestimmung der Qualität der isolierten RNA

Die Qualität der präparierten RNA wurde durch Elektrophorese in einem 1 %igen TAE-Agarosegel überprüft. Die ribosomale RNA, die den größten Teil der RNA ausmacht, trennt sich in Form von zwei klaren Banden auf, wobei die untere Bande der 18S- und die obere Bande der 28S-rRNA (ribosomalen RNA) entspricht. Liegt keine Degradierung der RNA vor, ist das Verhältnis von 28S zur 18S rRNA 2:1. Ab einer Menge von 250 ng ist RNA im Gel deutlich zu sehen. In der Regel wurden Mengen zwischen 500 ng und 2 µg aufgetragen. Nur RNA, welche keine Degradierung aufzeigte, wurde weiter verwendet.

5.3.5 DNase-Verdau

Um evtl. Verunreinigungen der isolierten RNA mit genomischer DNA in der RT-PCR vorzubeugen, wurde die isolierte RNA mit DNase I 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion 10 min bei 70°C beendet und sofort auf Eis gestellt. 10 µg RNA wurden Reaktionsgefäße vorgelegt und mit DEPC-H₂O auf ein bestimmtes Volumen (z.B. 10 µl) aufgefüllt und der Mastermix (10 µl) zugegeben.

Mastermix: Angaben für eine Reaktion

1 µl	DNase I (10 U/µl)
2 µl	DNase I Digest Puffer (10x)
7 µl	DEPC-H ₂ O

Die Menge der einzusetzenden µl von DEPC-H₂O bezieht sich auf ein Endvolumen von 20 µl. Nach dem Verdau wurde die RNA bei -20°C gelagert.

5.3.6 Reverse Transkription (RT) für Standard-PCR

RT für Zellen und Gewebe:

Durch eine Denaturierung werden Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst und der RNA-Strang liegt linear vor, was für eine optimale Funktion der Reversen Transkriptase wichtig ist. Wurde die mit DNase I behandelte RNA sofort in die PCR eingesetzt, war eine Denaturierung der RNA schon durch die Inaktivierung der DNase I gegeben. Gelagerte RNA wurde 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die RT fand in einem Endvolumen von 20 µl statt. 5,0 µl der verdauten RNA (2,5 µg) wurden in Reaktionsgefäße vorgelegt und 15 µl Mastermix zugegeben.

Mastermix für eine Reaktion

1,0 µl	Random Hexamer Primer (600 µg/ml) oder Oligo(dT)-Primer (500 µg/ml)
2,0 µl	dNTPs (10 mM)
2,0 µl	DTT (100 mM)
4,0 µl	First Strand Buffer (5x)
0,1 µl	M-MLV-Reverse Transkriptase (200 Units/µl)
5,9 µl	Aqua bidest.

Nach Zugabe des Mastermixes wurden die Proben 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 95°C inaktiviert und auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Es wurden 2 µl dieser Reaktion für die weitere Amplifizierung in der PCR eingesetzt.

5.3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde entweder genomische DNA aus dem Kawasakiverdau oder cDNA benutzt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Als Kontrolle wurde für jede Probe β-Aktin als konstitutiv exprimiertes Gen analysiert (Primerpaar: β-Aktin#1,β-Aktin#2).

5.3.7.1 Kontrolle der Transfektion

Ob die selektionierten und gepickten Zellklone das transfizierte Konstrukt stabil integriert hatten, wurde mittels PCR geprüft. Für alle Analysen wurden jeweils 5 µl Probe aus dem Kawasakiverdau eingesetzt. Um pCI-neo bzw. mIGFBP-4 in der genomischen DNA nachzuweisen, wurden spezifische Primer für pCI-neo (pcineo#1, pcineo#2) sowie mIGFBP-4 (mIGFBP-4#1, mIGFBP-4#2) ausgewählt.

5.3.7.2 Expressionsanalyse von IGFBPs und IGF-II

Die Analyse der Expression von IGFBP-1 bis 6 und IGF-II in Kolonkarzinomzelllinien sowie von IGFBP-4, mIGFBP-4 und IGF-II in den ausgewählten Zellklonen wurde mit einer RT-PCR überprüft. Die RT erfolgte wie unter 5.3.6 beschrieben. 2 µl cDNA wurden in der sich anschließenden PCR eingesetzt. Transkriptnachweise der

IGFBPs und von IGF-II wurden mit spezifischen Primern (hIGFBP-1#1, hIGFBP-1#2; hIGFBP-2#1, hIGFBP-2#2; hIGFBP-3#1, hIGFBP-3#2; hIGFBP-4#1, hIGFBP-4#2; hIGFBP-5#1, hIGFBP-5#2; hIGFBP-6#1, hIGFBP-6#2; IGF-II#5, IGF-II#6; mIGFBP-4#1, mIGFBP-4#2) durchgeführt.

5.3.7.3 Identifikation von PEPCK-IGF-II transgenen Mäusen

Die Analyse des Genstatus aller Versuchstiere erfolgte im Alter von drei Wochen durch PCR. Für alle Analysen wurden jeweils 2,5 und 5 µl Probe aus dem Kawasakiverdau in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Um das PEPCK-IGF-II Genkonstrukt nachzuweisen, wurden IGF-II-spezifische Primer (IGF-II#5, IGF-II#6) eingesetzt. Im Gegensatz zu allen anderen Reaktionen wurde kein zusätzliches MgCl₂ pro Reaktion im Mastermix zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 1,5 mM MgCl₂ vorlag.

5.3.7.4 Nachweis der mRNA von hIGF-II und mIGF-II im Kolongewebe DMH-behandelter und unbehandelter Mäuse

Die Expression von humanem IGF-II (hIGF-II) und von endogen vorhandenem murinem IGF-II (mIGF-II) auf mRNA-Ebene wurde in einigen Tieren aus jeder der vier im Versuch untersuchten Gruppen mit einer RT-PCR überprüft. Die RT erfolgte wie unter 5.3.6 beschrieben. 2 µl cDNA wurden in der sich anschließenden PCR eingesetzt. Bei dem Nachweis von hIGF-II mit spezifischen Primern (IGF-II#5, hIGF-II#10) wurde die Zyklenzahl der Standard-PCR auf 40 hochgesetzt. Um Signale der endogenen Expression zu erfassen, die unter diesen Bedingungen evtl. unter der Nachweisgrenze lagen, wurde die Sensitivität der PCR erhöht, indem im Anschluss an eine erste PCR mit 25 Zyklen eine weitere PCR mit 20 Zyklen durchgeführt wurde. 2 µl der ersten PCR dienten als Matrize für die zweite PCR. In der ersten PCR wurden immer spezifische Primer für murines IGF-II (IGF-II#5, mIGF-II#11) eingesetzt. Die zweite PCR erfolgte mit dem sense-Primer (IGFII#5) und einem antisense-Primer (IGF-II#6), der als „*nested*“ Primer in weiter innenliegender Position auf dem von IGF-II#5 und mIGF-II#11 gebildeten Produkt hybridisiert. Die Spezifität der verwendeten IGF-II-Primer bezüglich ihrer Spezies waren zuvor getestet worden [334]. Die Endkonzentration von MgCl₂ in der PCR-Reaktion betrug hier ebenfalls nur 1,5 mM.

5.3.7.5 PCR-Reaktion

Die Amplifikation von genomischer DNA oder cDNA fand in einem Endvolumen von 20 µl unter folgenden Bedingungen statt:

Mastermix für eine Reaktion

x µl	cDNA oder genomische DNA
1,00 µl	Primer (sense) (2 µM)
1,00 µl	Primer (antisense) (2 µM)
1,00 µl	dNTPs (1 mM)
2,00 µl	PCR reaction buffer (10x) [15 mM MgCl ₂]
{1,25 µl	MgCl ₂ (25 mM)}
4,00 µl	Q Solution (5x)
0,10 µl	Taq Polymerase (5 Unit/µl)
x µl	Aqua bidest.

Die entsprechende Menge Mastermix wurde zu der in den PCR-Gefäßen (Streifen á 8) vorgelegten cDNA/genomischen DNA oder der Negativkontrolle (Aqua bidest.) gegeben und die anschließende Synthese fand in einem Thermocycler (Biometra Uno II oder Perkin Elmer 9600) statt. Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den Schmelzpunkten der eingesetzten Primer. Das Temperaturprofil der PCR war wie folgt.

Anzahl der Zyklen	Denaturation 94°C	Annealing 63, 60 oder 56°C	Synthese 72°C
1	240 s		
36, 40, 25 oder 20	60 s	60 s	120 s
1			10 min

Nach Durchlaufen der Zyklen wurde das amplifizierte Produkt im Thermocycler auf 4°C abgekühlt und anschließend mit 4 µl 6x Ladungspuffer versetzt und in einem Ethidiumbromid-haltigen TAE-Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

5.3.8 Agarosegelelektrophorese

Durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren nach Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit verhält sich bei linearisierten doppelsträngigen Molekülen im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Zur Bestimmung der Länge der aufgetrennten DNA wurden je nach Größe der aufzutrennenden DNA folgende Molekulargewichtstandards verwendet.

- puc Mix Marker 8 (SM0301/2/3) (1116, 883, 692, 501-489, 404, 331, 242, 190, 147, 111-110 bp);
- 1 kb DNA Ladder (SM0311/2/3) (10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp);
- 1 kb DNA Ladder (15615-016) (12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018 bp);
- 100 bp DNA Ladder (SM0241/2/3) (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp);
- 100 bp DNA Ladder Plus (SM0321/2/3) (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp);
- BM-IX (1353, 1078, 872, 603, 310, 281/271, 234, 194, 118, 72 bp);

Agarosegele wurden zur Auftrennung von DNA und auch zur Kontrolle der Qualität von RNA verwendet. Für die Analyse von RNA wurden Gelträger und Elektrophorese-Apparturen zuvor mit 1 % SDS oder 1 M NaOH gereinigt. RNA wurde zur Kontrolle sowohl in 1 %igen TAE/Agarose- als auch in 1 %igen TBE/Agarose-Gelen aufgetrennt. Während TAE-Agarosegele zur Auftrennung der DNA aus RT-PCR-Analysen verwendet wurden, erfolgte die Auftrennung von cDNA bei der Herstellung von subtraktiven Banken und cDNA-Hybridisierungssonden in TBE-Gelen.

5.3.8.1 TAE-Agarosegele

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Das verdampfte Aqua bidest. wurde aufgefüllt und die Lösung einige Minuten abgekühlt. Die Gellösung und gegebenenfalls der Laufpuffer wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, welche dadurch unter UV-Licht sichtbar wird. Die DNA wurde mit 12 V/cm 30 min oder mit 7,5 V/cm 90 min aufgetrennt.

5.3.8.2 TBE-Agarosegele

Die entsprechende Menge Agarose wurde in Aqua bidest. aufgekocht. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurde das verdampfte Aqua bidest. ersetzt und die entsprechende Menge an 10x TBE-Puffer für eine 1x konzentrierte Gellösung zugesetzt. Fertige Gellösung und Laufpuffer wurden mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente erfolgte bei 3 V/cm für 18 min und 5 V/cm für 30 min bis zu 1,5 h.

Alle Gele wurden unter Verwendung des Stratagene Eagleeye II dokumentiert.

5.4 Untersuchung der Genexpression

5.4.1 Theorie der Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken

Die Methode der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) zur Erstellung subtraktiver Banken wurde erstmals durch Diatchenko *et al.* 1996 [166] beschrieben (Abbildung 11) und durch Bauersachs *et al.* 2003/2004 modifiziert [39,40]. Bei diesem Verfahren wird aus mRNA doppelsträngige cDNA hergestellt und mit einem Restriktionsenzym zur Herstellung kürzerer DNA-Fragmente (600 bp bis zu 2000 bp) verdaut, da sehr lange Fragmente die Effizienz der Hybridisierung beeinträchtigen. Die zu subtrahierende „Tester“-cDNA wird geteilt und jeweils mit einem anderen Adaptor an den 5'-Enden versehen. Es folgt eine erste subtraktive Hybridisierung der beiden „Tester“-cDNAs mit einem 30-fachen Überschuss an „Treiber“-cDNA ohne Adaptoren, mit einer sich anschließenden zweiten Hybridisierung, in der beide Ansätze unter Zugabe von weiterer „Treiber“-cDNA zusammengeführt werden. Im nächsten Schritt werden die einzelsträngigen Enden der Hybride, die Adaptoren besitzen an den Enden aufgefüllt. Zuletzt werden durch eine „Suppressor-PCR“ die doppelsträngigen cDNA-Moleküle exponentiell amplifiziert, die an ihren Enden unterschiedliche Adaptoren tragen. Der erste Schritt erfolgt mit Primern, die an die äußeren Enden der Adaptoren anlagern und der zweite Schritt mit sogenannten „nested“-Primern, die an die innen liegenden Seiten der Adaptoren annealen. Die Amplifikation von Fragmenten, die gleiche Adaptoren an den Enden besitzen wird dadurch unterdrückt, dass nach dem Denaturierungsschritt die komplementären Enden hybridisieren und so die Bindung des Primers unterdrücken (Suppressor-Effekt). Moleküle mit nur einem oder gar keinem Adaptor können nicht exponentiell vermehrt werden. Die erhaltenen PCR-Produkte werden für die Herstellung von cDNA-Banken in einem Plasmid-Vektor kloniert. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Subtraktionsverfahren ist unter anderem die Hybridisierung mit relativ kurzen cDNA-Molekülen, die eine verbesserte Hybridisierungskinetik gewährleisten. Ein weiterer Vorteil ist die Normalisierung der differentiellen cDNAs während der ersten Hybridisierung. Zusätzlich erfolgt die Anreicherung der cDNAs differentiell exprimierter Gene durch eine Suppressor-PCR, wodurch eine physikalische Abtrennung der unerwünschten Hybride umgangen wird. Weiterhin wird vergleichsweise wenig poly(A)⁺-RNA als Ausgangsmaterial benötigt, was von Bedeutung ist, wenn das zu untersuchende Material limitierend ist.

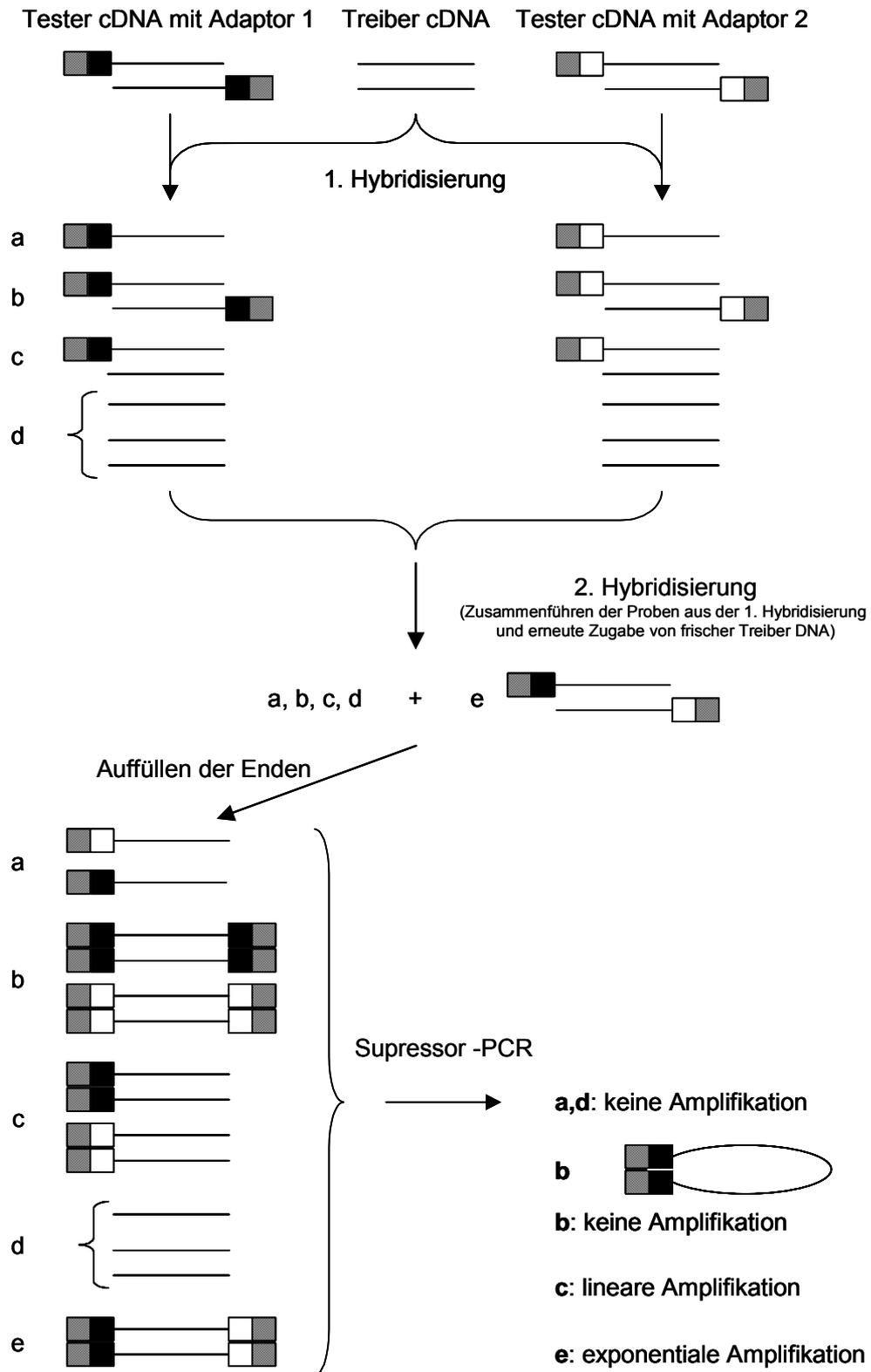


Abb. 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Suppression Subtractive Hybridisation (SSH)-Methode.

Bildliche Darstellung in Anlehnung an das Modell von Diatchenko *et al.* 1996 [166].

5.4.2 Komponenten der subtraktiven cDNA-Banken

Zur Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken wurde die mRNA nicht transfizierter LS1034-Zellen (LS) und die mRNA von Zellen des mIGFBP-4-exprimierenden Klons 15 (CI15) ausgewählt. Es wurden zwei cDNA-Banken hergestellt, indem einmal LS als „*Tester*“ und einmal CI15 als „*Tester*“ verwendet wurde.

5.4.3. Isolierung von poly(A)⁺-RNA

Aus der wie unter Punkt 5.3.3 beschrieben gewonnenen Gesamt-RNA wurde für die Erstellung der subtraktiven cDNA-Banken unter Verwendung des MessageMaker Reagent[®] Assembly Kits poly(A)⁺-RNA angereichert. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der Bindung der poly(A)-Enden der mRNA an Oligo-(dT)-Moleküle, die an Cellulose als festem Trägerstoff gekoppelt sind. Die in 1 ml Aqua bidest. gelöste Gesamt-RNA (550 µg) wurde zur Auflösung der Sekundärstrukturen 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort im Eis/Ethanolbad abgekühlt und mit 110 µl 5 M NaCl versetzt. Anschließend wurden 600 µl Oligo-(dT)-Cellulose zugegeben und durch gleichmäßiges Umdrehen vermischt. Das Gemisch inkubierte 10 min bei 37°C um die Bindung der mRNA zu gewährleisten, und wurde dann in eine Filterspritze umgefüllt. Die anfallende Flüssigkeit, welche die nicht gebundene ribosomale RNA enthielt, wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und diente als Kontrolle. Das Oligo-(dT)-Cellulose/mRNA-Gemisch wurde mit 1,8 ml des im Kit enthaltenen Waschpuffers gespült. Anschließend wurde die poly(A)⁺-RNA mit 2x 300 µl Aqua bidest., das auf 65°C erwärmt wurde, eluiert. Um die restliche Cellulose aus dem Eluat zu entfernen, wurde 3 min bei 4°C und 20 800 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die mRNA wurde wie unter 5.4.5 beschrieben gefällt und in 20 µl Aqua bidest. gelöst.

5.4.4 Phenolextraktion von cDNA

Zum Probenvolumen (150 µl) wurde das gleiche Volumen (150 µl) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1, pH 7.5) gegeben. Die Ansätze wurden durch Vortexen gemischt und 2 min bei 20 800 x g und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur organischen Phase erneut 150 µl TE-Puffer zugegeben und extrahiert. Der wässrige Überstand

wurde dem ersten wässrigen Überstand zugefügt und mit 300 µl Chloroform versetzt. Beide Phasen wurden für 30 Sekunden durch Vortexen gemischt und zentrifugiert (2 min bei 20 800 x g und RT). Anschließend wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wie unter Punkt 5.4.5 beschrieben gefällt.

5.4.5 Fällung von cDNA oder RNA

RNA oder cDNA wurde mit 3 M Natriumacetat pH 5.2 und Isopropanol 15 min bei RT gefällt. Die zugegebene Menge Natriumacetat betrug 1/10 des Volumens an RNA bzw. cDNA, während Isopropanol in der Menge des Ausgangsvolumens zugesetzt wurde. Nach 50 min Zentrifugation bei 18 800 x g bei 15°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75 % EtOH gewaschen. Es wurde nochmals 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Die Pellets wurden an der Luft getrocknet und in entsprechenden Volumina TE-Puffer und/oder Aqua bidest. aufgenommen.

5.4.6 cDNA-Synthese für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank und cDNA-Hybridisierungssonden

5.4.6.1 Erststrangsynthese

Für die cDNA-Erststrangsynthese wurden 2 µg mRNA (Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank) oder 50 µg Gesamt-RNA (Herstellung der cDNA-Sonden für die Hybridisierung) eingesetzt. Die angegebene Menge an mRNA oder Gesamt-RNA wurde in 13,5 µl Aqua bidest. aufgenommen und zu den jeweiligen Proben 0,5 µl cDNA-Synthese-Primer NRAdT (100 pmol/µl) (Herstellung der subtraktiven cDNA-Bank) oder 0,5 µl Sonden-Primer (100 pmol/µl) (Herstellung der cDNA-Sonden für die Hybridisierung) zugegeben und für 10 min bei 65°C denaturiert. Nach dem Abschrecken auf Eis/EtOH wurden 11 µl Mastermix auf Eis zugeben.

Mastermix: Angaben für eine Reaktion

0,5 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)
2,5 µl	100 mM DTT
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM each)
5,0 µl	Erststrang-Puffer (5x)
2,0 µl	Superscript II (200 U/µl)

Die Proben wurden 10 min bei 37°C und weitere 80 min bei 45°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

5.4.6.2 Zweitstrangsynthese

Der Erstrangsynthese schließt sich die Zweitstrangsynthese nahtlos an. Für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde DNA-Polymerase I aus *E. coli* und RNase H eingesetzt. Da RNase H RNA nur degradiert, wenn sie als RNA-DNA Hybrid vorliegt, kann das Verhältnis von RNase H und DNA-Polymerase I so eingestellt werden, dass die RNA nur teilweise abgebaut wird und die verbleibenden RNA-Stücke von der DNA-Polymerase I als Primer benutzt werden. Die *E. coli* DNA-Ligase wird verwendet um die bei der Zweitstrangsynthese auftretenden Einzelstrangbrüche zu beheben. Dadurch erhöht sich die Klonierungseffizienz. Zur Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurden 125 µl des folgenden Mastermixes zugegeben.

Mastermix: Angaben für eine Reaktion

86 µl	Wasser
30 µl	Zweitstrangpuffer (5x)
3 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	<i>E. coli</i> DNA-Ligase (10 U/µl)
4 µl	<i>E. coli</i> -Polymerase (10 U/µl)
1 µl	<i>E. coli</i> RNase H (2 U/µl)

Für die Kontrolle im alkalischen Agarosegel wurden 2,5 µl des Ansatzes entnommen und mit 0,2 µl Dig-11-dUTP (alkalischstabil, 1 nmol/µl) versetzt (wurde nur bei Erstellung der subtraktiven Bank durchgeführt). Alle Reaktionen und die Kontrollen wurden für 2,5 h bei 16°C im Kühlwasserbad inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Die Reaktion wurde 10 min bei 75°C hitzeinaktiviert und wieder sofort auf Eis gestellt.

5.4.6.3 cDNA für subtraktive Bank

Nach der Zweitstrangsynthese wurden die Enden der doppelsträngigen cDNA durch Zugabe von 10 µl T4-DNA-Polymerase (1 U/µl) 5 min bei 16°C geglättet. Die Reaktion wurde mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt und die Polymerase bei 75°C 10 min inaktiviert. Sofort im Anschluss wurde eine Phenolextraktion mit anschließender Fällung durchgeführt. Das cDNA-Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer und 33,3 µl Aqua bidest. gelöst. 0,8 µl dieser gelösten cDNA wurde für die Kontrolle im Agarosegel verwendet.

5.4.6.4 cDNA-Sonden für die Hybridisierung

Bei der Herstellung der cDNA-Sonden für die Hybridisierung wurde keine Glättung der Enden durchgeführt, sondern nach der Zweitstrangsynthese 1 h bei 37°C mit 5 µl RNase (0,5 mg/ml, DNase-frei) inkubiert. Daran schloss sich die Abtrennung überschüssiger Nukleotide unter Verwendung von Microspin G25-Säulen an. Zunächst wurde die Equilibrierungsflüssigkeit des Säulenmaterials durch Zentrifugation für 1 min bei RT und 720 x g entfernt und anschließend die Probe auf das Säulenmaterial gegeben und 2 min bei 720 x g zentrifugiert. Das Proben-Eluat (150 µl) wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und gefällt. Das cDNA-Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer gelöst. 0,75 µl der gefällten cDNA wurde für die Kontrolle im Agarosegel verwendet.

5.4.7 Spaltung mit *RsaI*

Zur doppelsträngigen cDNA von Punkt 5.4.6.3 wurden 5 µl Puffer L, 0,5 µl 100x BSA, und 2 µl *RsaI* (10 U/µl) gegeben. Der Restriktionsverdau der cDNA erfolgte 2 h bei 37°C, wobei nach einer Stunde nochmals 1 µl frisches Restriktionsenzym zugegeben wurde. Das Enzym wurde 20 min bei 65°C inaktiviert und 100 µl TE-Puffer zugegeben. Die gespaltene cDNA wurde gefällt und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen. 0,2 µl wurden für die Kontrolle im Agarosegel verwendet und 1 µl der gespaltenen cDNA für die Adaptorligation eingesetzt.

5.4.8 Adaptorligation an die cDNA

Als Kontrolle der Ligation von Adaptormolekülen wurden zusätzlich eine Ligation an einen DNA-Längenstandard (M-IX) durchgeführt.

Für die Adaptorligation wurden 1 µl cDNA mit 5 µl Aqua bidest. verdünnt und folgende Reaktionen angesetzt:

Reaktion	LS-1	LS-2	CI15-1	CI15-2	BM-IX- 1	BM-IX- 2
Adaptor 1 (40 pmol/µl)	0,5	-	0,5	-	0,5	-
Adaptor 2 (40 pmol/µl)	-	0,5	-	0,5	-	0,5
Adaptor 1 XR (40 pmol/µl)	0,5	-	0,5	-	0,5	-
Adaptor 2 XR (40 pmol/µl)	-	0,5	-	0,5	-	0,5
Ligasepuffer (1x)	4	4	4	4	4	4

Bevor die cDNA und der Mastermix zugeben wurden, inkubierten die Proben 6 min bei 65°C. Im Anschluss wurden die Proben in eine Plastikschiene mit ca. 400 µl auf 65°C erwärmtem Wasser überführt und im Kühlschrank auf ungefähr 14°C abgekühlt. Auf Eis wurden 2 µl verdünnte cDNA bzw. 2 µl BM-IX (Marker) (50 ng/µl) und 3 µl Mastermix zugeben und gut gemischt. Als Kontrolle für die Ligation an die cDNA wurden je 1 µl aus den Ansätzen LS-1/LS-2 bzw. CI15-1/CI15-2) gemischt.

Mastermix: Angaben für eine Reaktion

0,6 µl	Ligasepuffer (10x)
0,2 µl	T4-DNA-Ligase (2000 U/µl)
0,1 µl	<i>RsaI</i> (10 U/µl)
2,1 µl	Aqua bidest. steril

Alle Reaktionen wurden über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend 10 min bei 75°C inaktiviert. Nach der Ligation wurden die 2 µl der Kontrollen mit jeweils 250 µl TE-Puffer verdünnt.

5.4.9 Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung wurde in zwei Schritten durchgeführt (Abbildung 11). Jede „Tester“-cDNA, an die ein bestimmter Adaptor ligiert worden war, wurde mit der entsprechenden „Treiber“-cDNA hybridisiert. Für jeden Adaptor wurde ein getrennter Ansatz hergestellt.

Reaktion	LS-1	LS-2	CI15-1	CI15-2
Driver LS	-	-	1,5 µl	1,5 µl
Driver CI15	1,5 µl	1,5 µl	-	-
Tester LS-1 (Adaptor 1)	1,5 µl	-	-	-
Tester LS-2 (Adaptor 2)	-	1,5 µl	-	-
Tester CI15-1 (Adaptor 1)	-	-	1,5 µl	-
Tester CI15-2 (Adaptor 2)	-	-	-	1,5 µl
Hybridisierungspuffer (4x)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Alle Proben wurden vor Beginn der Hybridisierung mit Mineralöl (Verdampfungsschutz) überschichtet und 1,5 min bei 98°C im Thermocycler denaturiert, in 20 min auf 68°C abgekühlt, und bei dieser Temperatur 10 h hybridisiert. Die zweite Hybridisierung erfolgte unmittelbar. Es wurden die Reaktionen der „Tester“-cDNA/Adaptor-1 mit den Reaktionen „Tester“-cDNA/Adaptor-2 unter Zugabe von 1 µl frischer verdünnter denaturierter "Treiber“-cDNA (1:4 mit 4x Hybridisierungspuffer und Aqua bidest.; 1,5 min bei 98°C) vereinigt und erneut 20 h bei 68°C hybridisiert. Anschließend wurde die Hybridisierung durch Zugabe von 200 µl „Stopp-Puffer“ beendet, und es folgte eine Inkubation für 7 min bei 68°C. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.4.10 Suppressor-PCR

Die Suppressor-PCR bestand aus zwei Schritten. Während beim ersten Schritt zunächst die Auffüllung der Enden bei 75°C und die Amplifizierung mit dem außen liegenden Primer erfolgte, wurde im zweiten Schritt mit den innenliegenden Primern, den sogenannten „nested“-Primern, amplifiziert. Die Suppressor-PCR wurde mit dem „Advantage cDNA Polymerase Mix“ von Clontech durchgeführt, dessen

Polymerase-Gemisch eine besonders sensitive PCR ermöglicht und zusätzlich Taq-Antikörper für einen automatischen „Hot-Start“ enthält.

5.4.10.1 Erste PCR-Amplifizierung

Proben: LS und Cl15 nach der Subtraktiven Hybridisierung

Kontrollen: LS und Cl15 vor der subtraktiven Hybridisierung (1:250 mit TE-Puffer verdünnt).

Je 1 µl Probe bzw. Kontrolle wurden in 0,5 ml PCR-Gefäße vorgelegt. Dazu wurden 24 µl des Mastermixes gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Mastermix für die erste PCR: Angaben für eine Reaktion

19,5 µl	Aqua bidest. steril
2,5 µl	PCR-Puffer (10x)
1,0 µl	Primer 1 (10 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,5 µl	Advantage cDNA Polymerase-Mix (50x)

Die fertigen Ansätze wurden unter folgenden Bedingungen im Thermocycler (Perkin Elmer 480) amplifiziert.

Zyklen	Temperatur/Zeit	Temperatur/Zeit	Temperatur/Zeit
1	75°C/5 min	96°C/1 min	
27	94°C/30 s	66°C/30 s	72°C/1 min 30 s
1	72°C/3 min	4°C/∞	

5.4.10.2 Zweite PCR-Amplifizierung

Alle Reaktionen aus der ersten Amplifizierung wurden 1:10 verdünnt (3 µl aus der ersten PCR-Reaktion + 27 µl Aqua bidest.). Aus dieser Verdünnung werden 1 µl in die zweite PCR eingesetzt.

Mastermix für die zweite PCR: Angaben für eine Reaktion

19,5 µl	Aqua bidest. steril
2,5 µl	PCR-Puffer (10x) (Clontech)
0,5 µl	“ <i>nested</i> “-Primer 1 (10 µM)
0,5 µl	“ <i>nested</i> “-Primer 2 (10 µM)
0,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)
0,5 µl	Polymerase-Mix (50x) (Clontech)

Es wurden je 24 µl des Mastermixes zum vorgelegten Template gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Zyklen der zweiten PCR wurden im Thermocycler (Perkin Elmer 480):

Zyklen	Temperatur/Zeit	Temperatur/Zeit	Temperatur/Zeit
1	96°C/1 min		
12	94°C/30 s	68°C/30 s	72°C/1 min 30 s
1	72°C/3 min	4°C/∞	

8 µl aus der ersten und 5 µl aus der zweiten PCR wurden zur Analyse im Agarosegel aufgetragen.

5.4.11 Klonierung der cDNA-Fragmente in ein geeignetes Plasmid

5.4.11.1 Fällung der PCR-Produkte

Zunächst wurden die Produkte aus vier PCR-Reaktionen der zweiten Runde der Suppressor-PCR für die jeweilige Probe vereinigt und mit TE-Puffer auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt. Die PCR-Produkte wurden Phenol-extrahiert (5.4.4) und anschließend gefällt (5.4.5). Das Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer und 30 µl Aqua bidest. gelöst.

5.4.11.2 Spaltung der cDNA mit BssH II

Die Erzeugung von überhängenden Enden zur Ligation der cDNA in einen Plasmid-Vektor erfolgte durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym BssHIII. Die Erkennungssequenz „GCGCGC“ liegt im Bereich der Adaptorsequenz. Die

entstandenen überhängenden Enden sind mit denen der *Ascl*-Schnittstelle kompatibel, welche sich im Klonierungsvektor pBSIISK⁻M0 befindet. Zur cDNA wurden *Bss*HII (0,5 U/1 µg DNA) und der entsprechende Reaktionspuffer zugegeben und bei 50°C 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung (20 min bei 70°C). Das Plasmid pBSIISK⁻M0 wurde mit *Ascl* unter Verwendung des entsprechenden Reaktionspuffers gespalten und anschließend mit Alkalischer Phosphatase aus dem Intestinaltrakt von Kälbern dephosphoryliert. Das dephosphorylierte Plasmid wurde durch ein präparatives Gel aufgereinigt. Dadurch wurde die bei der Klonierung störende ungespaltenen „*supercoiled*“ Plasmid-DNA entfernt.

5.4.11.3 Größenfraktionierung der cDNA

Zur Abtrennung sehr kleiner DNA-Fragmente wurde vor der Klonierung die gespaltene cDNA Größenfraktioniert. Diese Größenfraktionierung wurde durch Auftrennung in einem „*Low gelling*“ Agarosegel (1 %) erreicht. Nach ca. 1 h und 45 min wurde das Gel unterhalb einer Molekülgröße von 200 bp anhand des mit aufgetrennten Molekulargewichtsstandards abgeschnitten. Anschließend wurde das Gel wieder in die Elektrophoresekammer zurückgegeben und die Elektrophorese bei umgekehrter Polung für ca. 1 h 15 min fortgesetzt. Dies bewirkte, dass aus der aufgetrennten cDNA wieder eine einheitlichen Bande entstand. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA aus dem Gel eluiert.

5.4.11.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit benutzt. Die ausgeschnittenen Gelstücke, die die DNA-Fragmente enthielten, wurden gewogen und mit dem 3-fachen Volumen Reaktionspuffer (QG) versetzt. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurde das Gel 10 min bei 50°C geschmolzen und mit Isopropanol (Menge entspricht eingesetztem Gelvolumen) versetzt. Die DNA wurde an Silicagel-haltige Säulen gebunden und die Agarose durch Waschen der Säulen abgetrennt. Die Waschschrte erfolgten mit den im Kit enthaltenen Puffern durch Zentrifugation für 1 min bei 10 000 x g bei RT. Die Elution der DNA von den Säulen mit dem mitgelieferten Elutionspuffer (30 µl) fand für 2 min bei RT statt mit nachgeschalteter

Zentrifugation für 2 min bei RT. Das aufgefangene Eluat wurde durch Gelelektrophorese eines Aliquots analysiert.

5.4.11.5 Ligation der cDNA in ein Plasmid

Die Ligation der cDNA erfolgte in das wie unter 5.4.11.2 beschrieben vorbereitete Plasmid pBSIISK⁻M0, ein Derivat von pBluescript II SK⁻. Die cDNA und pBSIISK⁻M0 wurden 5 min bei 65°C inkubiert und dann sofort auf Eis abgeschreckt. 1 µl der eluierten cDNA wurde in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 9 µl Mastermix versetzt.

Mastermix für die Ligation: Angaben für eine Reaktion

2,0 µl	Plasmid (pBSIISK ⁻ M0)
1,0 µl	Ligasepuffer (10x)
5,8 µl	Aqua bidest.
0,2 µl	T4-DNA-Ligase (2000 U/µl)

Die Reaktionen wurden über Nacht (ca. 18 h) bei 16°C inkubiert und die Ligase anschließend für 10 min bei 75°C inaktiviert.

5.4.12 Mikrodialyse

Bevor ein Teil der Ligationsreaktion für die Elektroporation in *E. coli* eingesetzt wurde, wurden störende Salze im gesamten Ligationsansatz durch eine Mikrodialyse entfernt. Die Mikrodialyse erfolgte auf einer Kernporenmembran von Millipore (0,025 µm) gegen 30 ml 0,1x TE-Puffer für 30 min bei RT. Die dialysierte Ligationsreaktion wurde wieder von der Membran abgenommen und der Rest mit 3 µl TE-Puffer nachgespült und den Proben beigefügt.

5.4.13 Elektroporation

Bei -80°C gelagerte elektrokompetente *E. coli*-Zellen (5×10^9 cfu/µg Transformationseffizienz bei superspiralierter Plasmid-DNA) wurden auf Eis langsam aufgetaut. 20 µl *E. coli*-Bakterien wurden mit 2 µl des Ligationsansatzes auf Eis versetzt und 2-3 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in auf Eis

vorgekühlte Elektroporationsküvetten (1 mm Spaltbreite) überführt und so schnell wie möglich bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm in einem *E. coli*-Pulser[®] transformiert. Nach dem Spannungspuls wurden die Zellen sofort mit eiskaltem SOC-Medium (840 µl) aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. 30 µl wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten (12 cm x 12 cm) ausgestrichen und der Rest mit Glycerin (Endkonzentration 15 %) versetzt und als Dauerkultur bei –80°C gelagert.

5.4.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der „Qiaprep Spin Plasmid Kit“ verwendet. Die Plasmid-DNA wird gewonnen, indem zuerst durch einen alkalischen Puffer die Zellen lysiert werden und die Plasmid DNA über Silicagel-haltige Säulen aufgereinigt wird.

5.4.14.1 Ausplattierung auf LB-Platten

Auf die Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Platten (12 x 12 cm) wurden 100 ml SOB-Medium vorgelegt. Anschließend wurden 10 bzw. 20 µl der Dauerkulturen zugegeben und ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt. Die anschließend berechnete Kolonienzahl der subtraktiven Banken lag bei 45 000 (LS) bzw. 55 000 (CI15) Kolonien.

5.4.14.2 Abschwemmen der Kolonien und Isolierung der Plasmid-DNA

Die Kolonien wurden anschließend mit insgesamt 15 ml LB-Medium von den zwei Platten (10 µl und 20 µl) pro Bank abgeschwemmt und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. 300 µl der Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 13 000 x g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 250 µl des im Kit enthaltenen P1-Puffers suspendiert. Die weitere Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden mit 250 µl P2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und genau 5 min lysiert. Durch die Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 wurden der Hauptanteil der bakteriellen Proteine und die genomische DNA, die über Proteine, mit der Zellmembran verbunden ist, ausgefällt. Danach wurde für 10 min bei 13 000 x g und

4°C zentrifugiert. Der klare Überstand, wurde auf die Silicagel-haltigen Säulen gegeben und mit den im Kit mitgelieferten Waschpuffern durch 1-minütige Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Die an das Silicagel gebundene Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer (EB) 1 min bei RT abgelöst und anschließend 1 min bei RT durch Zentrifugation (13 000 x g) eluiert. Anschließend wurde ein Aliquot der eluierten Plasmid-DNA im Agarosegel (1 %) analysiert.

5.4.15 Herstellung von cDNA-Arrays

Zur Analyse der cDNA-Klone, der subtraktiven cDNA-Banken wird eine bestimmte Zahl an cDNA-Klonen mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Diese cDNA-Fragmente können dann auf einen festen Träger (z.B. Nylonmembran) übertragen werden und mit Hilfe radioaktiv markierter cDNA-Sonden hergestellt aus den zu vergleichenden Zellen oder Geweben auf differentielle Expression hin untersucht werden.

5.4.15.1 PCR-Amplifizierung von cDNA-Fragmenten aus Bakterienzellen

5.4.15.1.1 Vorbereitung der PCR-Proben

Die PCR-Amplifizierung der cDNA wurde direkt aus den Bakterienzellen durchgeführt. Dazu wurden von der Dauerkultur (4.5.13) entsprechende Mengen auf LB-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen (4.5.14.1) und die Kolonien mit sterilisierten Plastikborsten gepickt. Die Bakterien wurden in 70 µl LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft, das in 96-well-Platten vorgelegt wurde und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (1 000 U/min) und kultiviert. Anschließend wurden 2 µl der Kultur mit 40 µl TE-Puffer verdünnt, 5 min bei 96°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 96-well PCR Platten, die mit selbstklebender Alufolie verschlossen wurden, gelagert.

5.4.15.1.2 Amplifizierung der Klone mit PCR

1 µl der verdünnten Zellen aus der Bakterienkultur wurden auf Eis mit Hilfe einer 12-Kanal-Pipette in 96-well PCR-Platten vorgelegt. Für die PCR wurde der PCR-Puffer und die Taq-DNA-Polymerase von Qiagen benutzt. Die Reagenzien für die PCR wurden als zwei getrennte Mastermixe angesetzt und mit einer

automatischen Dispensor-Pipette an gegenüberliegende Seiten der Probenvertiefung gegeben (je 9,5 µl).

Primer-Mix für PCR aus Bakterienkultur: Angaben für eine Reaktion

7,7 µl	Aqua bidest. steril
1,0 µl	PCR-Puffer (10x)
0,4 µl	T7ex(15 pmol/µl)
0,4 µl	T3ex (15 pmol/µl)

Enzym-Mix für PCR aus Bakterienkultur: Angaben für eine Reaktion

7,9 µl	Aqua bidest. steril
1,0 µl	PCR-Puffer (10x)
0,4 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase

Die Reaktionen wurden bei 4°C kurz zentrifugiert, mit einer hitzstabilen Gummimatte abgedichtet und bei 96°C in den Thermocycler gestellt und für 2 min denaturiert. Das weitere Temperaturprofil der PCR setzte sich folgendermaßen zusammen:

Anzahl der Zyklen	Denaturation 94°C	Annealing 64°C	Synthese 72°C
35	25 s	25 s	90 s
1	25 s		300 s

Anschließend erfolgte eine automatische Kühlung auf 4°C. Von jeder PCR wurden 0,5 µl in einem Agarosegel (1 %) analysiert. Pro Gel wurden 96 Proben mit der 12-Kanal-Pipette und ein DNA-Längenstandard (100 bp Ladder Plus; 100 ng) aufgetragen.

Für jede Bank (LS bzw. CI15) wurden je 864 cDNA-Fragmente amplifiziert, d.h. es wurden insgesamt 1728 Klone analysiert.

5.4.15.1.3 Herstellung von cDNA-Arrays mit 192 oder 1536 Proben

40 µl PP-Puffer (1,2x) wurden in 384-well-Mikrotiterplatten vorgelegt und dann anschließend 10 µl des PCR-Produkts (4.5.15.2) aus den 96-well-Platten zugegeben.

Das restliche PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert. Vor der Herstellung von Membranen mit 1536 Proben wurde die Qualität der Banken durch Array-Hybridisierung von nur 192 Klonen untersucht. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die 1536 Proben, Membranen mit 192 Klonen wurden nach gleicher Methode gehandhabt und hybridisiert. Auf eine 384-well-Platte wurden vier der 96-well-Platten, unter Beibehaltung eines bestimmten Schemas (Abbildung 12), überführt (Platte entspricht LS oder C115).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Platte-1 A/B	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4	A5	B5	A6	B6	A7	B7	A8	B8	A9	B9	A10	B10	A11	B11	A12	B12
Platte-1 C/D	C1	D1	C2	D2	C3	D3	C4	D4	C5	D5	C6	D6	C7	D7	C8	D8	C9	D9	C10	D10	C11	D11	C12	D12
Platte-1 E/F	E1	F1	E2	F2	E3	F3	E4	F4	E5	F5	E6	F6	E7	F7	E8	F8	E9	F9	E10	F10	E11	F11	E12	F12
Platte-1 G/H	G1	H1	G2	H2	G3	H3	G4	H4	G5	H5	G6	H6	G7	H7	G8	H8	G9	H9	G10	H10	G11	H11	G12	H12
Platte-2 A/B	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4	A5	B5	A6	B6	A7	B7	A8	B8	A9	B9	A10	B10	A11	B11	A12	B12
Platte-2 C/D	C1	D1	C2	D2	C3	D3	C4	D4	C5	D5	C6	D6	C7	D7	C8	D8	C9	D9	C10	D10	C11	D11	C12	D12
Platte-2 E/F	E1	F1	E2	F2	E3	F3	E4	F4	E5	F5	E6	F6	E7	F7	E8	F8	E9	F9	E10	F10	E11	F11	E12	F12
Platte-2 G/H	G1	H1	G2	H2	G3	H3	G4	H4	G5	H5	G6	H6	G7	H7	G8	H8	G9	H9	G10	H10	G11	H11	G12	H12
Platte-3 A/B	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4	A5	B5	A6	B6	A7	B7	A8	B8	A9	B9	A10	B10	A11	B11	A12	B12
Platte-3 C/D	C1	D1	C2	D2	C3	D3	C4	D4	C5	D5	C6	D6	C7	D7	C8	D8	C9	D9	C10	D10	C11	D11	C12	D12
Platte-3 E/F	E1	F1	E2	F2	E3	F3	E4	F4	E5	F5	E6	F6	E7	F7	E8	F8	E9	F9	E10	F10	E11	F11	E12	F12
Platte-3 G/H	G1	H1	G2	H2	G3	H3	G4	H4	G5	H5	G6	H6	G7	H7	G8	H8	G9	H9	G10	H10	G11	H11	G12	H12
Platte-4 A/B	A1	B1	A2	B2	A3	B3	A4	B4	A5	B5	A6	B6	A7	B7	A8	B8	A9	B9	A10	B10	A11	B11	A12	B12
Platte-4 C/D	C1	D1	C2	D2	C3	D3	C4	D4	C5	D5	C6	D6	C7	D7	C8	D8	C9	D9	C10	D10	C11	D11	C12	D12
Platte-4 E/F	E1	F1	E2	F2	E3	F3	E4	F4	E5	F5	E6	F6	E7	F7	E8	F8	E9	F9	E10	F10	E11	F11	E12	F12
Platte-4 G/H	G1	H1	G2	H2	G3	H3	G4	H4	G5	H5	G6	H6	G7	H7	G8	H8	G9	H9	G10	H10	G11	H11	G12	H12

Abb. 12: Beispiel für die Anordnung von Proben auf einer 384-well-Platte.

5.4.15.1.4 Herstellung von cDNA-Arrays mit einem Replikationssystem per Hand

Zur Herstellung von identischen Membranen wurde ein Replikationssystem bestehend aus einem 384-Nadel-Replikator, Mikrotiterplatten-Kopierer und „Omnitray“-Kopierer verwendet. Mit dem Nadelreplikator wurden die Proben (PCR-Reaktionen in PP-Puffer) auf die Nylonmembranen überführt, während der Mikrotiterplatten- und der „Omnitray-Kopierer“ durch ihre Führungsbohrungen im Rahmen als Schablonen benutzt wurden. Die Nylonmembranen wurden auf eine Größe von 8,5 x 12 cm zugeschnitten und auf Gel-Blotting-Papier (3x GB002,

8,5 x 12,5 cm) und einer Aluplatte eingespannt. Auf jede Membran wurde 15-mal auf die gleiche Stelle gespottet um eine gleichmäßige DNA-Auftragung zu erreichen. Auf eine Membran wurden die Proben von vier 384-Platten gespottet unter Beibehaltung eines bestimmten Schemas (Abbildung 13). Es wurden in der Regel vier bis sechs Membranen simultan hergestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	...	48
1	LS-1 A1	LS-5 A1	LS-1 B1	LS-5 B1	LS-1 A2	LS-5 A2	LS-1 B2	LS-5 B2	LS-1 A3	LS-5 A3	LS-1 B3	LS-5 B3	LS-1 A4	LS-5 A4	LS-1 B4	LS-5 B4	...	LS-5 B12
2	15-1 A1	15-5 A1	15-1 B1	15-5 B1	15-1 A2	15-5 A2	15-1 B2	15-5 B2	15-1 A3	15-5 A3	15-1 B3	15-5 B3	15-1 A4	15-5 A4	15-1 B4	15-5 B4	...	15-5 B12
3	LS-1 C1	LS-5 C1	LS-1 D1	LS-5 D1	LS-1 C2	LS-5 C2	LS-1 D2	LS-5 D2	LS-1 C3	LS-5 C3	LS-1 D3	LS-5 D3	LS-1 C4	LS-5 C4	LS-1 D4	LS-5 D4	...	LS-5 D12
4	15-1 C1	15-5 C1	15-1 D1	15-5 D1	15-1 C2	15-5 C2	15-1 D2	15-5 D2	15-1 C3	15-5 C3	15-1 D3	15-5 D3	15-1 C4	15-5 C4	15-1 D4	15-5 D4	...	15-5 D12
5	LS-1 E1	LS-5 E1	LS-1 F1	LS-5 F1	LS-1 E2	LS-5 E2	LS-1 F2	LS-5 F2	LS-1 E3	LS-5 E3	LS-1 F3	LS-5 F3	LS-1 E4	LS-5 E4	LS-1 F4	LS-5 F4	...	LS-5 F12
6	15-1 E1	15-5 E1	15-1 F1	15-5 F1	15-1 E2	15-5 E2	15-1 F2	15-5 F2	15-1 E3	15-5 E3	15-1 F3	15-5 F3	15-1 E4	15-5 E4	15-1 F4	15-5 F4	...	15-5 F12
7	LS-1 G1	LS-5 G1	LS-1 H1	LS-5 H1	LS-1 G2	LS-5 G2	LS-1 H2	LS-5 H2	LS-1 G3	LS-5 G3	LS-1 H3	LS-5 H3	LS-1 G4	LS-5 G4	LS-1 H4	LS-5 H4	...	LS-5 H12
8	15-1 G1	15-5 G1	15-1 H1	15-5 H1	15-1 G2	15-5 G2	15-1 H2	15-5 H2	15-1 G3	15-5 G3	15-1 H3	15-5 H3	15-1 G4	15-5 G4	15-1 H4	15-5 H4	...	15-5 H12
9	LS-2 A1	LS-6 A1	LS-2 B1	LS-6 B1	LS-2 A2	LS-6 A2	LS-2 B2	LS-6 B2	LS-2 A3	LS-6 A3	LS-2 B3	LS-6 B3	LS-2 A4	LS-6 A4	LS-2 B4	LS-6 B4	...	LS-6 B12
10	15-2 A1	15-6 A1	15-2 B1	15-6 B1	15-2 A2	15-6 A2	15-2 B2	15-6 B2	15-2 A3	15-6 A3	15-2 B3	15-6 B3	15-2 A4	15-6 A4	15-2 B4	15-6 B4	...	15-6 B12
11	LS-2 C1	LS-6 C1	LS-2 D1	LS-6 D1	LS-2 C2	LS-6 C2	LS-2 D2	LS-6 D2	LS-2 C3	LS-6 C3	LS-2 D3	LS-6 D3	LS-2 C4	LS-6 C4	LS-2 D4	LS-6 D4	...	LS-6 D12
12	15-2 C1	15-6 C1	15-2 D1	15-6 D1	15-2 C2	15-6 C2	15-2 D2	15-6 D2	15-2 C3	15-6 C3	15-2 D3	15-6 D3	15-2 C4	15-6 C4	15-2 D4	15-6 D4	...	15-6 D12
13	LS-2 E1	LS-6 E1	LS-2 F1	LS-6 F1	LS-2 E2	LS-6 E2	LS-2 F2	LS-6 F2	LS-2 E3	LS-6 E3	LS-2 F3	LS-6 F3	LS-2 E4	LS-6 E4	LS-2 F4	LS-6 F4	...	LS-6 F12
14	15-2 E1	15-6 E1	15-2 F1	15-6 F1	15-2 E2	15-6 E2	15-2 F2	15-6 F2	15-2 E3	15-6 E3	15-2 F3	15-6 F3	15-2 E4	15-6 E4	15-2 F4	15-6 F4	...	15-6 F12
...
32	15-4 G1	15-8 G1	15-4 H1	15-8 H1	15-4 G2	15-8 G2	15-4 H2	15-8 H2	15-4 G3	15-8 G3	15-4 H3	15-8 H3	15-4 G4	15-8 G4	15-4 H4	15-8 H4	...	15-8 H12

Abb. 13: Beispielhafter Ausschnitt von der Probenaufteilung auf einer handgespotteten Membran.

Die ersten zwei Stellen der Klon-Identifikationsnummer (ID) entsprechen der cDNA-Bank, dann folgen die Nummer der 96-well-Platte und die Position auf der 96-well Platte (Buchstabe = Reihe, Zahl = Spalte).

5.4.15.1.5 Vollautomatische Herstellung von cDNA-Mikroarrays mit bis zu 1536 Proben mit einem Spot-Roboter

Bei der Herstellung von cDNA-Arrays mit dem Omnigrad Accent Microarrayer verkleinerte sich die Fläche des Arrays bei gleicher Probenzahl auf eine Fläche von 2 x 5 cm. Die Arrays wurden mit sogenannten „solid“ Pins (Größe 0,015 Inches in

Diameter, SSP015) gespottet, wobei jedes PCR-Produkt fünfmal auf die gleiche Stelle aufgetragen wurde. Arrays für den gleichen Hybridisierungsansatz wurden simultan hergestellt. Die Anordnung der Proben, die Abstände der Spots, etc., wurden vorher programmiert und konnten auch in Form einer Excel-Datei in das benutzte Auswertungsprogramm (AIDA Image Analyzer) geladen werden. Damit war die Zuordnung der Spots stets gewährleistet.

5.4.15.1.6 DNA-Bindung an die Membran

Handgespottete oder mit dem Spotter hergestellte Arrays wurden nach dem Auftragen kurz an der Luft getrocknet und anschließend mit 0,4 N NaOH denaturiert. Die Membranen wurden dazu auf NaOH-getränkte Gel-Blotting-Papiere (GB004) gelegt und 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für 30–40 min bei 80°C „gebacken“ und mit UV-Licht (120 mJ/cm²) bestrahlt. Die Arrays können über eine bestimmte Zeit lichtgeschützt gelagert werden.

5.4.15.2 Herstellung von radioaktiv markierten cDNA-Sonden für die Hybridisierung

Die Herstellung doppelsträngiger cDNA erfolgte wie unter 5.4.6 beschrieben. Für die handgespotteten Arrays wurden 6 µl cDNA eingesetzt und für die mit dem Spotter hergestellten Mikroarrays 3 µl cDNA. Die cDNA wurde in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und 10 min bei 96°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Direkt im Anschluss wurde der Mastermix zugegeben und die Reaktionen wurden bei 37°C im Metallblock in einem Hybridisierungsofen 20 h inkubiert.

Mastermix für Hybridisierungssonden (6 µl cDNA): Angabe für eine Reaktion:

0,75 µl	dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dGTP, dTTP, 0.3 mM dCTP)
10,0 µl	α-[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)
4,0 µl	High-Prime-Mix (5x)

Mastermix für Hybridisierungssonden (3 µl cDNA): Angabe für eine Reaktion:

0,375 µl	dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dGTP, dTTP, 0.3 mM dCTP)
10,0 µl	α-[³³ P]-dCTP (3000 Ci/mmol)
4,0 µl	5x High-Prime-Mix (5x)

Nach der Inkubation wurde die Klenow-Polymerase für 20 min bei 65°C inaktiviert und die Ansätze mit 5 µl humaner Cot-1 DNA und 95 µl TE-Puffer versetzt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte über Microspin-G25-Säulen. Zunächst wurde die Equilibrierungsflüssigkeit des Säulenmaterials für 1 min bei RT und 720 x g entfernt und anschließend die Probe auf das Säulenmaterial gegeben und 2 min bei 720 x g zentrifugiert. Das Proben-Eluat wird in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und mit 40 µl TE-Puffer gemischt. Anschließend erfolgte eine Messung der Aktivität pro Sonde, bei starken Schwankungen zwischen den Hybridisierungssonden wurde mit TE-Puffer abgeglichen. In der Regel lag die Markierung der Sonden auf einem vergleichbaren Niveau.

5.4.15.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden

Die Vorhybridisierung aller Membranen fand in Glashybridisierungsröhren (Länge 11 cm, Ø 3.5 cm) in einem Hybridisierungssofen statt. Es wurden entweder ein handgespotteter Array (8,5 x 12 cm) oder 5-6 Mikroarrays (2 x 5 cm) pro Glasröhre hybridisiert. Die Vorhybridisierung diente zur Blockierung der Membranen und fand folgendermaßen statt:

Zeit [min]	Volumen [ml]	Puffer	Temperatur [°C]
4x 10	15	1x PBS/10 % SDS	65
2x 10	15	0,1x PBS/1 % SDS	80
3x 10	15	1x PBS/10 % SDS	65

Die Hybridisierung fand in 1x PBS/10 % SDS (Hybridisierungslösung) für 44 h bei 65°C in einem Hybridisierungssofen statt. Die Hybridisierung handgespotteten Arrays erfolgte in einem Volumen von 7,5 ml weiterhin in den Glashybridisierungsröhren. Die 2 x 5 cm großen Mikroarrays wurden dagegen in Plastikvials überführt und mit einem Volumen von 2 ml hybridisiert. Die radioaktiv markierten Sonden wurden vor der Hybridisierung 10 min bei 96°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und dann zusammen mit der Hybridisierungslösung filtriert (Millex GP 0,22 µm). Zum Beenden der Hybridisierung wurde die radioaktive Lösung abgegossen und die Membranen mit 10 ml 1x PBS/10% SDS gespült. Das Waschen der Mikroarrays fand ebenfalls in Glashybridisierungsröhren statt (siehe Vorhybridisierung). Alle Membranen wurden unter folgenden Bedingungen in einem Hybridisierungssofen gewaschen:

Zeit [min]	Volumen [ml]	Puffer	Temperatur [°C]
3x 5	12	1x PBS/10 % SDS	65
3x 10	12	1x PBS/10 % SDS	65
3x 10	10	0,1x PBS/1 % SDS	65
2x 10	12	1x PBS/1 % SDS/2 mM EDTA	RT

Alle Membranen wurden bei 80°C für 20 min getrocknet und mit einem „Storage Phosphor Screen“ entsprechende Zeiten exponiert. Die gespeicherten Signale wurden mit Hilfe eines Phosphor-Imagers (Storm 860) eingelesen.

5.4.15.4 Auswertung der Signale

Die Auswertung der Arrays erfolgte mit der Software AIDA Image Analyzer Version 3.11 (Raytest). Es wurden zwei Exponierungen pro Hybridisierung analysiert (kurze Exposition für starke und lange Exposition für schwache Signale). Der Signal-Hintergrund wurde mit der Funktion *“weighted background dot”* abgezogen. cDNAs mit differentiellen Hybridisierungssignalen (Kandidatengene) wurden sequenziert. Dazu wurden 5 µl der cDNA-Proben aus den 384-well-Platten zum Spotten der Arrays entnommen und einer Mikrodialyse unterzogen. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung eines ABIPrism 377XL96 Sequenzers vom Sequenzierservice der Arbeitsgruppe Blum (Genzentrum) durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (National Center for Biotechnology Information) mit den Sequenzen öffentlicher Datenbanken (Gen Bank) abgeglichen. Informationen über die identifizierten Gene, cDNAs wurden aus den angegebenen Datenbanken wie z.B. UniGene, OMIM, LocusLink oder PubMed entnommen.

5.5 *In vivo*-Untersuchung zur Karzinogenese im Kolon der Maus

5.5.1 Erzeugung von aberranten Krypten (AC) und Tumoren

Weibliche PEPCK-IGF-II-transgene Mäuse und nicht-transgene Wurfgeschwister wurden zur Untersuchung IGF-II-spezifischer Effekte auf die Tumorgenese im Kolon verwendet. ACF („aberrante crypt foci“), die frühe Stadien der Tumorenstehung darstellen, wurden mit Hilfe des Kolon-spezifischen Karzinogens Dimethylhydrazin

(DMH) erzeugt. DMH wurde in NaCl-EDTA-Puffer in einer Konzentration von 3,2 mg/ml gelöst und IGF-II-transgenen und nicht-transgenen Tieren ab der vierten Lebenswoche einmal pro Woche sechs Wochen lang i.p. gespritzt. Die injizierte Menge betrug 40 mg DMH/kg KG für jede Maus. Beiden Gruppen wurde eine Kontrollgruppe zugeordnet, die das gleiche Volumen NaCl-EDTA-Puffer gespritzt bekam. Zur Untersuchung früher Stadien pathologischer Veränderungen der Darmschleimhaut erfolgte die Sektion der Tiere fünf Wochen nach der letzten Injektion. Die Sektion von Versuchstieren zur Untersuchung späterer Stadien in der Karzinogenese fand 34 Wochen nach der letzten Injektion statt. Alle Versuchstiere wurden jede Woche gewogen und der Gesundheitszustand kontrolliert.

5.5.2 Gewinnung der Blutproben

Die Blutproben wurden vor der Sektion durch Punktion des retrobulbären Venenplexus unter Äthernarkose gewonnen. Die Abtrennung des Serums erfolgte nach Gerinnung der Proben (30 min bei RT) durch Zentrifugation (2x 10 min; 10 000 x g) bei 4°C. Das Serum wurde abgenommen und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.5.3 Bestimmung der IGF-II-Spiegel im Serum mittels Radioimmunoassay

Im Radioimmunoassay (RIA) konkurriert das aus den Proben stammende Antigen mit dem radioaktiv markierten Antigen um die Bindungsstelle des ersten Antikörpers. Der gebildete lösliche Antigen-Antikörper-Komplex fällt mit der Zugabe des zweiten Antikörpers als unlöslicher Komplex aus. Die Höhe der gemessenen radioaktiven Strahlung des präzipitierten Komplexes gibt Aufschluss über die Antigenkonzentration der Probe, welche anhand einer Standardkurve quantifiziert werden kann. In allen gewonnenen Seren wurde die Konzentration von IGF-II durch Verwendung eines RIA bestimmt. Die Durchführung des RIA erfolgte durch das Hormon-Labor der Kinderklinik der Universität Tübingen, in der IGF-II-Bestimmungen im Serum routinemäßig durchgeführt werden. Der RIA basiert auf dem Protokoll von Blum *et al.* 1988 [63].

5.5.4 Organentnahme

Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke wurde hochgezogen, aufgeschnitten und zu den Seiten hin aufgespannt, so dass der Gastrointestinaltrakt freilag. Das Kolon wurde direkt am Analrand abgeschnitten und bis zum Caecum vorsichtig hochgezogen, distal des Caecums abgeschnitten und direkt in gekühlten Tris-Puffer (4°C) gelegt. Unter Verwendung einer Schlundsonde wurde das Kolon mit Tris-Puffer mehrmals durchspült, bis es vollständig gereinigt war. Für die Isolierung von RNA aus Kolongewebe wurde das Kolon von einigen Tieren auf Trockeneis schockgefroren und in Kryogefäße bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.5.5 Präparation der Därme zur Auswertung von ACF und Tumorpräparation

Das Kolon wurde für die Auswertung von ACF in Anlehnung an die von Tudek *et al.* 1989 beschriebene Methode [595] in drei Segmente, einen caecalen, mittleren und rektalen Abschnitt, unterteilt. Das auf ein Stäbchen (Glas oder Plastik Ø 2 mm) aufgezugene Kolon wurde mit einem Skalpell an der mesenterialen Seite longitudinal aufgeschnitten und auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger geklappt. Die mukosale Seite zeigte nach oben, während die serosale Seite auf dem Objektträger auflag.

5.5.5.1 ACF

Das Kolon wurde mit einem in Tris-Puffer getränkten Gel-Blotting-Papier (GB002) überspannt und in die Formalinlösung gelegt. Die Fixierung für die Methylenblaufärbung fand mindestens 3 h bei 4°C statt. Für die Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurde das Kolon bei 4°C zunächst für 10 min in 2 %igem Paraformaldehyd und danach für 5 min in 1 %igem Paraformaldehyd fixiert.

5.5.5.2 Sichtbare Tumore

Sichtbare Tumore wurden nummeriert und ihre Lokalisation im Darmabschnitt notiert. Tumore wurden mit einem Teil des Kolons ausgeschnitten und in Formalin über

Nacht fixiert.

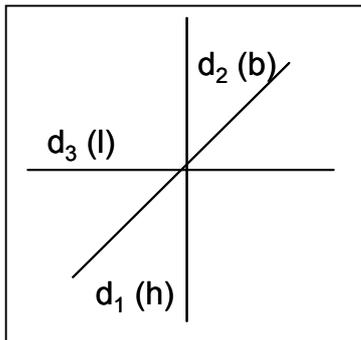


Abb. 14: Schema zur Vermessung eines Tumors.

Vor und nach der Fixierung wurden die Tumore in ihrer Länge (l), Höhe (h) und Breite (b), unter Verwendung einer Schieblehre vermessen. Diese Messwerte bilden die Grundlage für einen Mittelwert der korrespondierenden Durchmesser (d1-3), aus dem wiederum der Mittelwert der Radien (r) berechnet werden kann, wobei $r = d/2$ ist. Im Ergebnisteil angegebene Volumenwerte beziehen sich auf die Messung nach der Fixierung.

Das Volumen (V) des Tumors wurde unter Benutzung der folgenden Formel berechnet [541]:

$$V = 4/3 \pi r^3$$

Nach der Vermessung (Abbildung 14) wurden alle Tumore in Paraffin eingebettet. Das restliche Kolon wurde wie unter 4.5.5.1 beschrieben für die Auswertung der ACF vorbereitet.

5.5.6 Bestimmung von ACF am ungeschnittenen Kolon

AC und ACF sind morphologische Veränderungen der Krypten im Kolon. Durch Anfärbung der Mukosa mit Methylenblau können diese atypischen Kolonkrypten sichtbar gemacht werden [57]. Diese morphologisch veränderten Krypten sind durch ein Fehlen der Aktivität von β -Hexosaminidase charakterisiert [472]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Expression von β -Hexosaminidase während der Differenzierung von epithelialen Kolonzellen anstieg [647]. Neben der anerkannten Methylenblaufärbung wird die reduzierte β -Hexosaminidase-Aktivität ebenfalls als ein Marker für die Identifikation ablaufender Kolonkarzinogenese auf molekularer Basis diskutiert [472].

5.5.6.1 Methylenblaufärbung

Methylenblau wurde als sogenannter Vitalfarbstoff (supravital) 1985 von P. Ehrlich entdeckt. Methylenblau färbt in wässriger Lösung Zellwände, Plasma und Kerne gut

an und wird in der Histologie zur Färbung von fixierten als auch lebenden Zellen eingesetzt. Eine Methylenblaufärbung ist wegen einer deutlicheren Färbung einer Toluidinblau- oder Giemsa-Färbung vorzuziehen [57]. Methylenblau fungiert als Wasserstoffakzeptator und geht dabei in reversibler Reaktion in eine farblose Leukoform über. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Mukosa des Kolons direkt nach der Färbung zu beurteilen.

Die fixierten Segmente des Kolons wurden aus dem Formalin in 0,01 M PBS überführt und darin 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gel-Blotting-Papier entfernt und das Kolon noch einmal für 2 x 5 min in 0,01 M PBS gewaschen. Die auf den Objektträgern haftenden Kolonstücke wurden nun für 10 bis 15 min in der frisch angesetzten Methylenblaulösung (2 g/l) angefärbt, mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt und einige Minuten bei 4°C gekühlt. Sofort im Anschluss wurde die Anzahl der ACF und die Anzahl der beteiligten Krypten in einem Foci unter dem Mikroskop bei 25-facher Vergrößerung ausgezählt und dokumentiert. Die Fläche des aufgespannten Kolons wurde mit einem halbautomatischen Bildauswertegerät mit Hilfe der Optimas Software ermittelt.

5.5.6.2 Bestimmung der β -Hexosaminidase Aktivität

Die enzymatische Aktivität der β -Hexosaminidase bewirkt die Hydrolyse von N-acetyl- β -Galaktosamin bzw. N-acetyl- β -Glukosamin sowie von Oligosacchariden und Glykosaminoglykanen, die terminale nicht reduzierende N-acetyl- β -Glukosaminyl- bzw. N-acetyl- β -Galaktosaminyl-Reste besitzen [197,506,572]. Der in dieser Arbeit angewandte enzymatische Nachweis von β -Hexosaminidase beruht auf der von Robertson *et al.* [506] und Pretlow *et al.* 1987 [471] beschriebenen Methode mit einigen kleinen Modifikationen. Bei einem pH-Optimum von 4,5 spaltet die β -Hexosaminidase das ihr angebotene Substrat, das durch eine simultane Azokopplung mit p-Rosanilin die enzymaktiven Stellen rot färbt.

Die fixierten Segmente des Kolons wurden aus dem Paraformaldehyd in 0,1 M PBS überführt und darin 3x 5 min bei 4°C inkubiert und dann für mindestens 2 h in Saccharose-Puffer (4°C) ausgewaschen. Nach der Entfernung der Gel-Blotting-Papiere wurde die Gebrauchslösung der Hexosaminidase-Färbung auf die Darmabschnitte verteilt und das Ganze unter Verwendung einer Feuchtkammer bei 37°C 1-2 h inkubiert. Die Gebrauchslösung wurde schnell und gründlich (nicht länger als 1 min) mit Citratpuffer von dem Gewebe gespült. Die Kontrastfärbung fand für

1-4 s mit Methylengrün statt. Diese Färbung wurde für 1-4 s mit Aqua dest. nachgewaschen und dann zur Auswertung mit Kaisers Glyzerin-Gelatine eingedeckelt. Danach wurde für einige Minuten bei 4°C gekühlt und sofort die Anzahl der ACF, die durch das Fehlen des Enzyms gekennzeichnet waren, und die Anzahl der beteiligten Krypten in einem Foci unter dem Mikroskop bei 25-facher Vergrößerung ausgezählt und dokumentiert. Die Fläche des aufgespannten Kolons wurde mit einem halbautomatischen Bildauswertegerät mit Hilfe der Optimas Software ermittelt.

5.5.7 Paraffineinbettung

Für die Darstellung morphologisch normaler und veränderter Krypten im histologischen Schnitt und zur histopathologischen Auswertung der entstandenen Tumore wurden die fixierten Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Einbettung der Gewebe erfolgte vollautomatisch nach folgendem Protokoll:

Reagenz	Verdünnung	Zeit (h:min)	Temperatur (°C)
Ethanol	70 %	0:30	40
Ethanol	80 %	0:30	40
Ethanol	95 %	0:45	40
Ethanol	95 %	0:45	40
Ethanol	100 %	0:45	40
Ethanol	100 %	0:45	40
Ethanol	100 %	0:45	40
Xylol	100 %	0:45	40
Xylol	100 %	0:45	40
Paraffin		0:30	58

Das Paraffin-durchtränkte Gewebe wurde mit Paraffin in Blöcke gegossen und in einer Dicke von 3-4 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Für weitere histologische Färbungen oder immunhistologische Untersuchungen wurden die Schnitte

entparaffiniert und rehydriert.

5.5.8 Entparaffinierung und Rehydratisierung von Paraffinschnitten

Entparaffinieren und Rehydratisieren fand für alle Paraffinschnitte nach dem gleichen Schema statt:

Schritte	Lösung	Zeit
1.	Xylol 100 %	5 min
2.	Xylol 100 %	5 min
3.	Ethanol 100 %	2 min
4.	Ethanol 100 %	2 min
5.	Ethanol 96 %	2 min
6.	Ethanol 70 %	2 min
7.	Ethanol 50 %	2 min

5.5.9 Histopathologische Bewertung von ACF und Tumoren

5.5.9.1 Färbung mit Hämalan und Eosin (H&E)

Die Färbung der Kerne der entparaffinierten Gewebe fand mit Hämatoxylin für 5 min statt. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser 5 min gebläut und für knapp 1 min in einer Salzsäure-Alkohol-Lösung inkubiert. Bevor die Gegenfärbung für 1-2 min in Eosin (0,5 %) erfolgte, wurden die Schnitte nochmals 5 min unter fließendem Wasser gewaschen. Nach der Eosinfärbung inkubierten die Schnitte für 1-2 min in Essigsäure (0,1 %) und wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %) für je 2 min dehydriert. Die Schnitte wurden in Xylol überführt und nach 2 min mit Entellan eingedeckelt.

5.5.10 Identifikation von S-Phase-Zellen mit Bromdesoxyuridin (BrdU)

Für die Identifikation von sich in Mitose befindenden Zellen mittels BrdU muss den lebenden Tieren 2 h vor der Tötung BrdU (30 mg/kg KG) injiziert werden. Diese Zeitspanne, welche die Inkorporation von BrdU in die DNA beinhaltet, sollte für alle Versuchstiere gleich gehalten werden. Weitere Behandlungen (Blut bzw.

Organentnahme etc.) der Tiere erfolgten wie beschrieben.

5.5.10.1 Immunhistologie

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden kurz in Aqua dest. gespült, für 15-30 min luftgetrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Die Schnitte wurden durch Tris-HCl-Puffer gezogen, bevor sie für 15 min in 2 N HCl bei 37°C inkubierten. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei RT in Borat-Puffer überführt, bei 37°C mit Trypsin (0,01 %) für 1-2 min angedaut und mit Aqua dest. für 1 min bei RT gespült. Alle weiteren Schritte erfolgten nun bei RT. Zunächst wurden die Schnitte 15 min in H₂O₂ (3 %) inkubiert, 2x 5 min in Tris-HCl gewaschen und dann in eine Feuchtkammer überführt. Nachdem eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA (1 %) für 60 min stattgefunden hatte, wurden die Schnitte mit einem anti-Bromdesoxyuridin-Antikörper (5 µg/ml) für 90 min inkubiert und im Anschluss der Überschuss an Antikörper durch zweimaliges waschen mit Tris-HCl-Puffer für je 5 min entfernt. Die Kopplung des zweiten Peroxidase-konjugierten, Antikörpers erfolgte für 60 min in einer Verdünnung von 1:10 mit anschließendem Waschschrift (2x 5 min in Tris-HCl-Puffer). Die Umsetzung des Substrates DAB durch die Peroxidase betrug, nachdem die DAB-Färbelösung auf die Schnitte pipettiert war, ungefähr 10 bis 30 min. Die Färbelösung wurde mit Aqua dest. für 2 min abgespült, die Schnitte für 5 min in Hämatoxylin inkubiert und weitere 5 min unter fließendem Wasser gespült. Es erfolgte eine differentielle Darstellung der Kerne durch Inkubation für knapp 1 min in einer Salzsäure-Ethanol-Lösung und anschließendem Waschen für 5 min unter fließendem Wasser. Die Schnitte wurden für je 2 min in aufsteigender Alkohohlreihe (30 %, 50 %, 70 %, 95 %, 100 %) dehydriert und in Xylol (2 x) überführt, wo sie für je 1 min inkubierten, bevor sie mit Entellan eingedeckelt wurden.

5.6 Statistik

5.6.1 Statistische Datenauswertung Zellkultur

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (means \pm SEM) angegeben. Die Daten wurden mit Hilfe des Student's T-test (Graph Pad, Prism) analysiert. Messungen der Proliferation und Kolonieformation wurden in Triplikaten, Invasionsmessungen in Duplikaten durchgeführt und alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

5.6.2 Statistische Datenauswertung Genexpression

Hybridisierungen mit 1536 PCR-Produkten wurden mindestens sechsmal wiederholt und unter Verwendung der AIDA Array Software ausgewertet. Von differentiell exprimierten Fragmenten wurden erneut Mikroarrays hergestellt. Alle Kandidatenfragmente wurden dabei doppelt aufgespottet und die Hybridisierung zweimal wiederholt.

Zur statistischen Datenauswertung wurden die Mikroarrays mit 1536 PCR-Produkten (drei Hybridisierungen) und die Mikroarrays mit den Kandidatenfragmenten (zwei Hybridisierungen) herangezogen. Aus den Werten der fünf Hybridisierungen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung (mean \pm SD) gebildet. Die Differenzen der Mittelwerte der verschiedenen Klone wurden unter Verwendung des LSD post hoc tests (SPSS programm package; SpSS) miteinander verglichen.

5.6.3 Statistische Datenauswertung des *in vivo* Versuchs

Die gemessenen Daten wurden statistisch ausgewertet, indem die Signifikanz zwischen jeweils zwei Tiergruppen ermittelt wurde. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (means \pm SEM) oder als Median, wie in den Legenden der Abbildungen beschrieben, dargestellt. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Student's T-test (Graph Pad, Prism) analysiert. Weiterhin wurde der Mann Whitney Test (U-Test) zur Signifikanzermittlung herangezogen. Dieser Test ist verteilungsunabhängig (nicht parametrisch).

6 Ergebnisse

6.1 Expression von IGF-Bindungsproteinen und IGF-II in Kolonkarzinomzelllinien

6.1.1 Nachweis der Expression mittels RT-PCR in 22 Karzinomzelllinien des Kolons

Verschiedene Karzinomzelllinien unterscheiden sich in ihrer Expression der einzelnen Komponenten des IGF-Systems. Um einen Überblick über die Expression der sechs IGFBPs und von IGF-II speziell in Kolonkarzinomzelllinien zu bekommen, wurden 21 humane Kolonkarzinomzelllinien im Vergleich zu einer Zelllinie aus nicht-transformierten Kolonozyten mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Die Untersuchung der sechs verschiedenen Bindungsproteine ergab, dass alle Zelllinien Transkripte für IGFBP-4 besitzen, aber nur eine einzige Zelllinie Transkripte für IGFBP-5. Das Vorhandensein von Transkripten der weiteren vier Bindungsproteine ist zwischen den einzelnen Zelllinien sehr variabel. In zehn Zelllinien wurde mRNA für IGFBP-1 nachgewiesen und in 13 Zelllinien IGFBP-2-mRNA. IGFBP-3-mRNA wurde in zwölf Zelllinien exprimiert und IGFBP-6-mRNA in 13 Zelllinien. Nur elf Zelllinien besaßen Transkripte für IGF-II. Im Vergleich dazu exprimiert die Zelllinie aus normalen Kolonozyten (NCOL-1) IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6 und IGF-II. Diese vier Bindungsproteine einschließlich IGF-II scheinen also die normalen Komponenten des IGF-Systems im Kolon zu sein. Auch in Gewebeproben des gesunden Kolons wurde die Expression von IGF-II festgestellt [195]. Außerdem wurde in gesundem Kolongewebe die mRNAs für IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 und IGFBP-6 nachgewiesen [393]. In Tabelle 3 wurden die Ergebnisse aus mindestens drei verschiedenen RT-PCR-Ansätzen zusammengestellt.

Tab. 3: Expressionsmuster der mRNAs von IGF-II und den IGFBPs in 22 verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien und einer Zelllinie aus normalen Kolonozyten.

Zelllinie	Tumor Lokalisation	Differenzierungs-grad	Dukes' Stage	IGFBP-						
				1	2	3	4	5	6	IGF-II
LS174T	Primär	gut	B	-	+	+	+	-	-	-
Lovo	Schlüsselbein	moderat/gut	NR	+	-	+	+	-	+	-
LS411N	Primär	moderat/gut	B	-	-	+	+	-	-	-
WIDR	Primär	moderat/gut	NR	-	+	-	+	-	+	+
HT29	Primär	moderat/gut	NR	-	+	-	+	-	+	+
Caco-2	Primär	moderat	NR	-	-	-	+	-	-	+
HCT-15	Primär	moderat	C	-	+	+	+	+	+	+
SW1116	Primär	moderat	A	-	+	-	+	-	+	+
LS513	Primär	moderat	C	+	-	-	+	-	-	-
LS1034	Primär	moderat	C	+	+	-	+	-	+	+
Isreco-2 ^c	Leber	moderat	C	-	-	-	+	-	-	-
Isreco-3 ^c	Lunge	moderat	C	+	-	-	+	-	-	-
Isreco-1 ^c	Primär	gering	C	-	-	-	+	-	+	-
Lisp-1	Primär	gering	NR	-	+	+	+	-	+	+
Co115	Primär	gering	C	+	-	+	+	-	+	-
Colo205 ^b	Bauchhöhle	gering	D	+	+	+	+	-	-	-
Colo201 ^b	Bauchhöhle	gering	D	+	+	+	+	-	+	+
DLD-1	Bauchhöhle	gering	C	-	+	+	+	-	+	+
SW480 ^a	Bauchhöhle	gering	B	+	+	+	+	-	+	+
SW620 ^a	Lymphknoten	gering	C	+	+	+	+	-	+	+
HPR600	Bauchhöhle	NR	NR	+	+	+	+	-	-	-
NCOI-1*	/	/	/	-	+	+	+	-	+	+
Σ				10	14	13	22	1	14	12

*= normale Kolonozyten; NR: Nicht beschrieben; ^{a, b, c} stammen jeweils vom gleichen Patienten

Die Tabelle beinhaltet die zusammengefassten Ergebnisse aus mindestens drei RT-PCR Läufen.
(+: mRNA wurde detektiert; -: mRNA wurde nicht detektiert)

6.1.2 Nachweis der Expression IGF-II-bindender Proteine mittels Ligandenblot in einigen ausgewählten Zelllinien des Kolons

Die festgestellten Unterschiede bezüglich der Transkripte der Bindungsproteine in den verschiedenen Zelllinien spiegeln sich auch in deren sezernierten Proteinen wieder. Konditionierte Medien verschiedener Kolonkarzinomzelllinien wurden im Vergleich zum Medium von NCOL-1 Zellen im Ligandenblot auf ihre biologisch aktiven Bindungsproteine getestet. Isreco-2-Zellen exprimieren auf mRNA Ebene nur IGFBP-4, im Ligandenblot zeigt sich ebenfalls nur eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht von 24 kDa, die auf unglykosyliertes IGFBP-4 schließen lässt. Alle weiteren getesteten Zelllinien besitzen ebenfalls Transkripte für IGFBP-4 und weisen

ein Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kDa auf. Für LS1034, Isreco-3, Co115 und NCOI-1 wurde zusätzlich eine Bande in Höhe von 28 kDa nachgewiesen, die der 28 kDa glykosylierten Form von IGFBP-4 entsprechen könnte. Co115, Isreco-1 und NCOL-1 Zellen exprimieren auf mRNA-Ebene IGFBP-6 (siehe Tabelle 3). Das IGFBP-6-Protein wurde mit einem Molekulargewicht von 29 kDa beschrieben [76]. Isreco-3-, LS1034- sowie NCOL-1-Zellen besitzen eine weitere Bande zwischen 29 kDa und 36 kDa. LS1034 und Isreco-3 exprimieren IGFBP-1 und NCOL-1 IGFBP-2 auf mRNA-Ebene. IGFBP-1 und IGFBP-2 wurden in der SDS-Page mit einem Molekulargewicht von 28-36 kDa beschrieben [546], so dass die entsprechenden Banden im Ligandenblot IGFBP-1 bzw. IGFBP-2 darstellen könnten. Co115 besitzt zwar ebenfalls Transkripte für IGFBP-1, weist im Ligandenblot aber keine Bande in der entsprechenden Höhe auf. Die für IGFBP-3 typische Doppelbande bei 40-43 kDa konnte nur in Co115 Zellen deutlich nachgewiesen werden, obwohl in NCOI-1 Zellen mRNA für IGFBP-3 vorliegt. Die Ergebnisse zeigen, dass erstens eine sehr heterogene Expression der IGFBPs und von IGF-II in unterschiedlichen Kolonkarzinomzelllinien vorliegt, und zweitens nicht unbedingt alle mRNAs, die für IGFBPs kodieren, in ein funktionelles Protein translatiert werden. Die beschriebenen Ergebnisse des Ligandenblots sind in Abbildung 15 dargestellt.

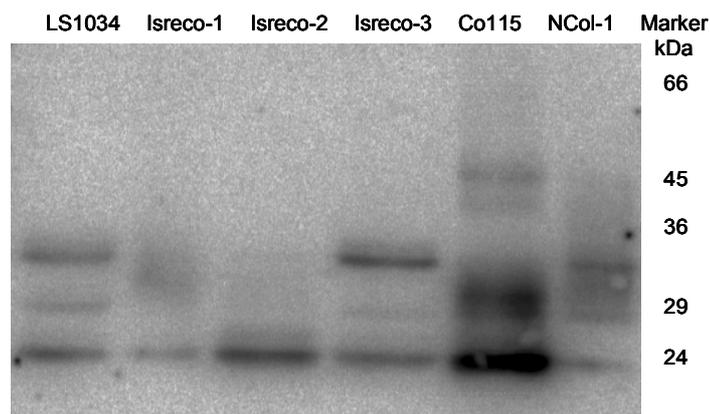


Abb. 15: Autoradiographische Identifizierung IGF-II-bindender Proteine aus conditionierten Medien.

Zellkulturüberstände wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit ^{125}I -IGF-II inkubiert.

Während die Expression von IGFBPs mit Ausnahme von IGFBP-4 sehr stark von der jeweiligen Kolonkarzinom-Zelllinie abhängt, wurde IGFBP-4 durchweg von allen

getesteten Linien exprimiert. Da die biologische Wirkung von IGFBP-4 in der Literatur als inhibitorisch auf Krebs-relevante Parameter beschrieben wird [650], dies aber bislang in Bezug auf die kolorektale Karzinogenese kaum untersucht wurde, sollte anhand einer Überexpression von IGFBP-4 in ausgewählten Kolonkarzinomzelllinien seine Funktion auf verschiedene Parameter der Karzinogenese *in vitro* untersucht werden.

6.2 Überexpression von mIGFBP-4 durch Transfektion verschiedener humaner Kolonkarzinomzelllinien

In verschiedenen Zellsystemen und auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass IGFBP-4 seine Wirkungen in der Regel über die Bindung von IGF-II bzw. IGF-I und die damit verbundene reduzierte Verfügbarkeit dieser Wachstumsfaktoren vermittelt. Unabhängig von dieser IGF-bindenden Eigenschaft besitzt IGFBP-4 aber auch die Fähigkeit, direkt auf verschiedene Zellprozesse zu wirken.

Um die Wirkung von IGFBP-4 auf Tumor-relevante Parameter zu untersuchen, wurde mIGFBP-4 in Kolonkarzinomzellen exprimiert. Durch Transfektion der Mutterlinie mit dem Transfektionsvektor ohne mIGFBP-4 war die Möglichkeit gegeben, spezifische Wirkungen von IGFBP-4 von einem evtl. Transfektionseffekt zu unterscheiden. Zusätzlich war durch eine mIGFBP-4-Transfektion in antisense-Richtung eine Unterdrückung des endogen gebildeten IGF-BPs möglich.

Für die Transfektion wurden LS1034-Zellen verwendet, die eine hohe endogene IGF-II-Expression besitzen und gleichzeitig gegenüber exogenem IGF-II sensitiv sind, Isreco-1-Zellen, die kein IGF-II produzieren und IGF-II-insensitiv sind, sowie die zu Isreco-1-Zellen korrespondierende Lebermetastase Isreco-2 die zwar keine eigene IGF-II Produktion zeigt, aber IGF-II-sensitiv ist.

6.2.1 Überprüfung der sense- und antisense-Richtung der mIGFBP-4 cDNA im Transfektionsvektor pCI-neo mittels Restriktionsanalyse

Die 1176 bp lange cDNA des murinen IGFBP-4 wurde in sense- und antisense-Richtung in den Expressionsvektor pCI-neo einkloniert. Für diese Klonierung wurde die Restriktionsschnittstelle *EcoR* I benutzt, die in der multiplen Klonierungsstelle lokalisiert ist. Die Plasmid-DNA für die mock-Transfektion des leeren Expressionsvektors wurde mit dem Restriktionsenzym *Hind* III überprüft.

Hind III schneidet pCI-neo an zwei Stellen. Die daraus resultierenden Fragmente wurden im 1,5 %igen Agarosegel in der erwarteten Größe von 3815 bp und 1659 bp sichtbar (Abbildung 16). Die Klonierung der cDNA von mIGFBP-4 wurde überprüft, indem pCI-neo-mIGFBP-4 mit *EcoR* I gespalten wurde. Die Fragmentgrößen der Expressionsvektoren mit sense- und antisense-mIGFBP-4 entsprechen nach dem Verdau der Länge des leeren pCI-neo-Vektors sowie der Länge der eingefügten cDNA. Die Richtung der Klonierung wurde mittels *Sma* I-Restriktionsverdau überprüft. Das Enzym *Sma* I spaltet zum einen an einer Stelle in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors und zum anderen in der klonierten cDNA. Für den antisense-cDNA enthaltenden Vektor wurden Fragmente in der Größe von 6183 bp und 467 bp erwartet und die Fragmente des sense-cDNA enthaltenden Vektors sollten den Größen von 5879 bp und 771 bp entsprechen. Die im 1,5 % igen Agarosegel detektierten Banden entsprachen den erwarteten Größen (Abbildung 16).

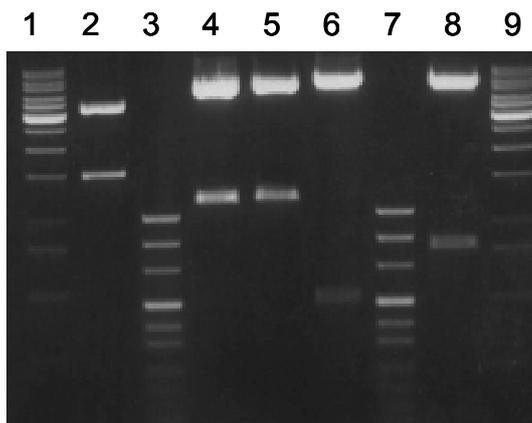


Abb. 16: Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA von pCI-neo, pCI-neo-mIGFBP-4 antisense und pCI-neo-mIGFBP-4 sense.

Spuren 1 und 9: 1 kb DNA Ladder; Spuren 3 und 7: Puc Mix Marker 8; Spur 2: pCI-neo (Hind III); Spur 4: pCI-neo-mIGFBP-4 antisense (*EcoR* I); Spur 5: pCI-neo-mIGFBP-4 sense (*EcoR* I); Spur 6: pCI-neo-mIGFBP-4 antisense (*Sma* I); Spur 8: pCI-neo-mIGFBP-4 sense (*Sma* I).

6.2.2 Selektion der Klone mit G418

Eine stabile Transfektion zielt auf ein hohes Expressionsniveau der eingeschleusten cDNA ab. Zellen, welche die Plasmid-DNA aufgenommen hatten wurden mit G418 (Geneticin) selektiert, weil sie auf der Plasmid-DNA das entsprechende Neomycin-Phosphotransferase(neo)-Gen enthielten, welches ihnen eine Resistenz gegenüber G418 verlieh. Um nach der Transfektion Zellen ohne aufgenommenes Konstrukt zu eliminieren, wurde zunächst die spezifische letale Konzentration von G418 in den Mutterlinien ermittelt. Abbildungen 17 bis 19 zeigen die Hemmung der Proliferation durch G418 im Vergleich zur Kontrolle.

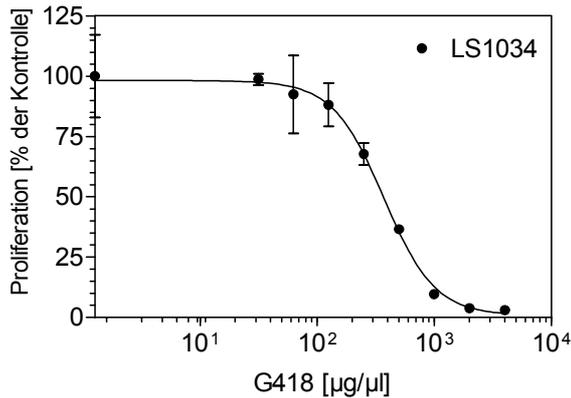


Abb. 17: Hemmung der Proliferation von LS1034-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.

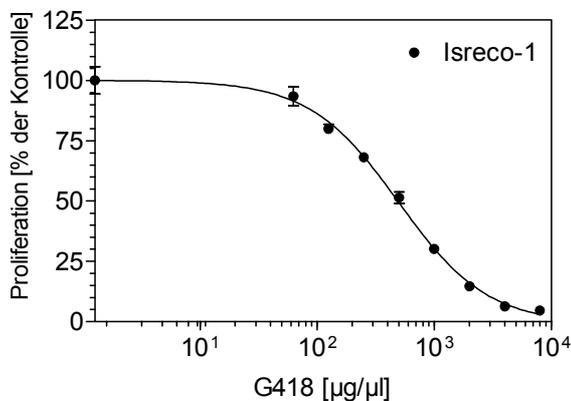


Abb. 18: Hemmung der Proliferation von Isreco-1-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.

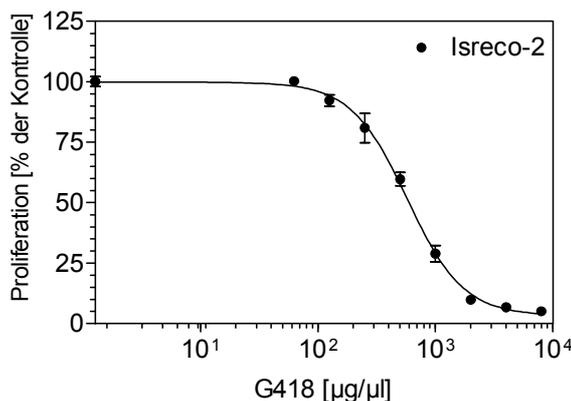


Abb. 19: Hemmung der Proliferation von Isreco-2-Zellen als Funktion der G418-Konzentration.

Während für LS1034-Zellen die letale Dosis 1 mg/ml betrug, erwiesen sich Isreco-1- und Isreco-2-Zellen als resistenter. Deshalb wurden LS1034-Zellen bei einer Konzentration von 1 mg/ml und Isreco-1- und Isreco-2-Zellen bei einer Konzentration von 2 mg/ml G418 selektioniert.

Von jeder Zelllinie wurden zwischen 60 und 100 Klone gepickt, 10 bis 20 aus der mock-Kontrolle, 40 bis 60 aus den sense-transfizierten Zellen und 10 bis 20 aus den antisense-transfizierten Zellen. Alle sense-Klone, die in der PCR aus dem

Kawasakiverdau mIGFBP-4 positiv waren, wurden serumfrei gesetzt. Das daraus resultierende konditionierte Medium wurde in einem Ligandenblot auf die Expression eines funktionellen IGFBP-4-Proteins untersucht. Klone, die eine hohe funktionelle IGFBP-4-Expression aufwiesen, wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Darüber hinaus wurden jeweils ein mock-Klon und ein antisense-Klon für weitere molekularbiologische und funktionelle Analysen ausgewählt.

6.2.3 Expression von mIGFBP-4 und IGF-II auf mRNA-Ebene in Mutterlinie und Zellklonen

Wie aus den Abbildungen 20A, 21A und 22A ersichtlich wird, konnte das bereits genomisch identifizierte mIGFBP-4 mit spezifischen Primern in den mIGFBP-4-transfizierten Zellen auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die korrespondierenden Kontrollen zeigen keine Expression von mIGFBP-4. Mit Primern für hIGFBP-4 wurde die Expression von endogenem IGFBP-4 sowohl in den Kontrollen als auch in den mIGFBP-4 positiven Klonen nachgewiesen (Abbildungen 20B, 21B und 22B). Zusätzlich wurde noch die mRNA von β -Aktin, einem konstitutiv exprimierten Gen, als Kontrolle amplifiziert (Abbildungen 20D, 21C und 22C). Transkripte für IGF-II wurden nicht nur in nicht-transfizierten LS1034-Zellen detektiert, sondern auch in mock-transfizierten, sense-transfizierten und antisense-transfizierten Klonen (Abbildung 20C). Isreco-1- und Isreco-2-Zellen sowie ihre korrespondierenden Zellklone exprimieren kein IGF-II (Daten nicht gezeigt).

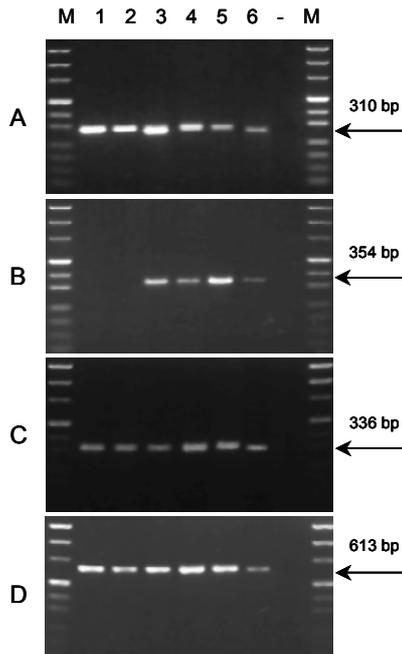


Abb. 20: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten miGFBP-4 sowie von IGF-II und β -Aktin mittels RT-PCR in LS1034-Zellen und den korrespondierenden Klonen.

Spur M: 500 ng Puc Mix Marker 8; Spur 1: LS1034 (Mutterlinie), Spur 2: mock-Kontrolle CI01; Spuren 3, 4 und 5: miGFBP-4 sense-Klone CI12, CI14 und CI15; Spur 6: miGFBP-4 antisense-Klon CI23, Spur -: Negativkontrolle.

A: hIGFBP-4, 310 bp, B: miGFIGFBP-4, 354 bp, C: IGF-II, 336 bp, D: β -Aktin, 613 bp.

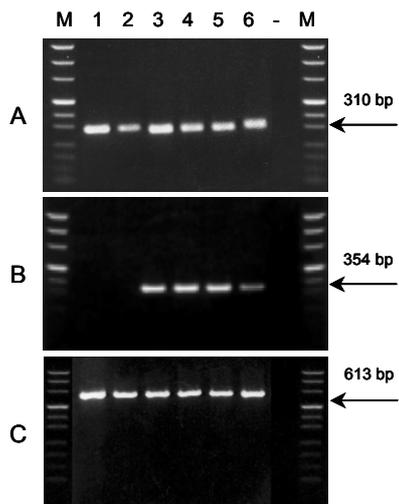


Abb. 21: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten miGFBP-4 und von β -Aktin mittels RT-PCR in Isreco-1-Zellen und den korrespondierenden Klonen.

Spur M: 500 ng Puc Mix Marker 8; Spur 1: Isreco-1 (Mutterlinie), Spur 2: mock-Kontrolle CI07; Spuren 3, 4 und 5: miGFBP-4 sense-Klone CI22, CI32 und CI47; Spur 6: miGFBP-4 antisense-Klon CI89, Spur -: Negativkontrolle.

A: hIGFBP-4, 310 bp, B: miGFIGFBP-4, 354 bp, C: β -Aktin, 613 bp.

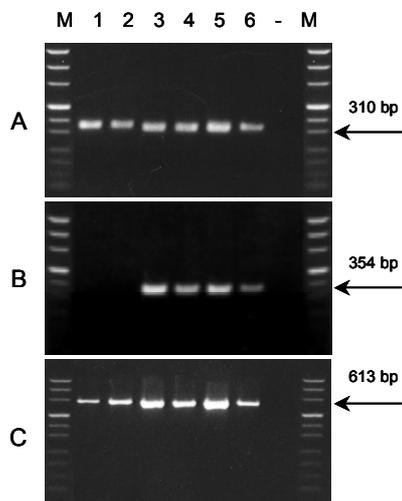


Abb. 22: Nachweis des endogen exprimierten hIGFBP-4, des exprimierten miGFBP-4 und von β -Aktin mittels RT-PCR in Isreco-2-Zellen und den korrespondierenden Klonen.

Spur M: 500 ng Puc Mix Marker 8; Spur 1: Isreco-2 (Mutterlinie), Spur 2: mock-Kontrolle CI06; Spuren 3, 4 und 5: miGFBP-4 sense-Klone CI17, CI18 und CI26; Spur 6: miGFBP-4 antisense-Klon CI48, Spur -: Negativkontrolle.

A: hIGFBP-4, 310 bp, B: miGFIGFBP-4, 354 bp, C: β -Aktin, 613 bp.

6.2.4 Expression des mIGFBP-4-Proteins in Mutterlinie und transfizierten Zellklonen von LS1034-, Isreco-1- und Isreco-2-Zellen

Die Analyse der Zelllinien LS1034 (Abbildung 23), Isreco-1 (Abbildung 24) und Isreco-2 (Abbildung 25) und ihrer jeweiligen Zellklone mittels Westernliganden- und Westernimmunoblot erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Endogenes IGFBP-4 und auch exprimiertes mIGFBP-4 sind in der Lage, ^{125}I -markiertes IGF-II zu binden. Dass eine starke Expression von mIGFBP-4 in den sense-Klonen der drei verschiedenen Zelllinien stattfindet, wird vor allem an dem 24 kDa großen Protein sichtbar, welches das unglykosylierte IGFBP-4 darstellt (Abbildungen 23-25A). In LS1034-Zellen wird auch das glykosylierte 28 kDa große IGFBP-4 überexprimiert (Abbildung 23). Da neben IGFBP-4 weitere IGFBPs in den Zelllinien exprimiert werden und diese ebenfalls IGF-II als Liganden besitzen, wurde die Expression von IGFBP-4 mit einem IGFBP-4 spezifischen Antikörper im Immunoblot bestätigt (Abbildungen 23-25B). In LS1034-Zellen detektiert der IGFBP-4-Antikörper zusätzlich noch ein ca. 18 kDa großes Protein, welches wahrscheinlich ein Spaltprodukt von IGFBP-4 darstellt.

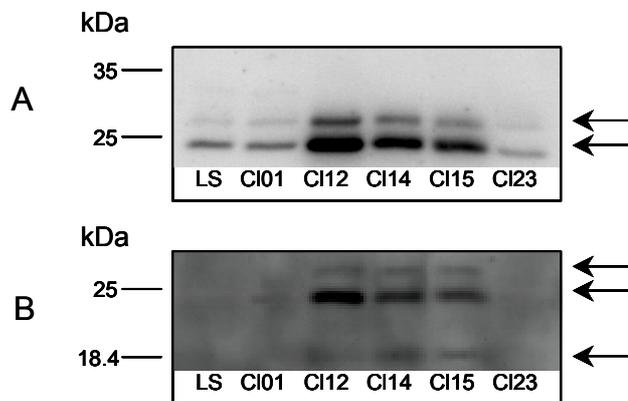


Abb. 23: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie LS1034.

LS: Mutterlinie, CI01: mock-Kontrolle, CI12, CI14, CI15: sense-Klone, CI23: antisense-Klon.

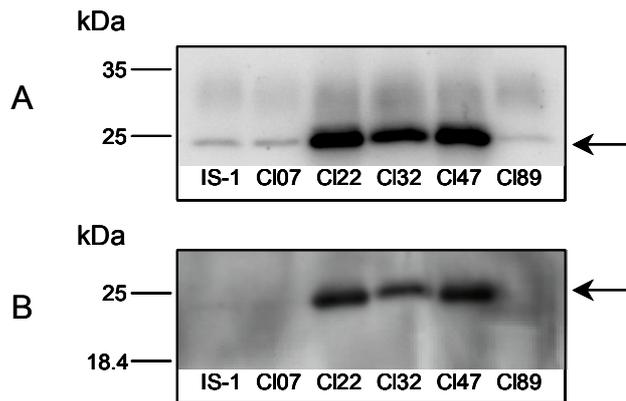


Abb. 24: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie Isreco-1.

IS-1: Mutterlinie, CI07: mock-Kontrolle, CI22, CI32, CI47: sense-Klone, CI89: antisense-Klon.

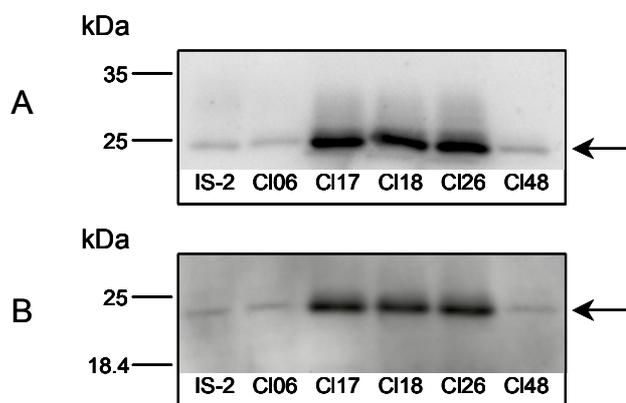


Abb. 25: Westernligandenblot (A) und Westernimmunoblot (B) der Zelllinie Isreco-2.

IS-2: Mutterlinie, CI06: mock-Kontrolle, CI17, CI18, CI26: sense-Klone, CI48: antisense-Klon.

6.3 Funktionelle Analyse von IGFBP-4

6.3.1 Wirkung von IGFBP-4 auf die Proliferation

Es ist bekannt, dass die Komponenten des IGF-Systems in die Regulierung der Proliferation eingreifen. Während die Liganden IGF-I und IGF-II in der Regel mitogene Signale über den IGF-IR vermitteln, besitzen viele IGF-Bindungsproteine das Potential, diese Signalvermittlung zu verhindern. In mehreren Zelltypen wurde die hemmende Wirkung von IGFBP-4 auf die Proliferation beschrieben.

In dieser Arbeit sollte nun die Wirkung von IGFBP-4 auf die Proliferation von kolorektalen Karzinomzellen untersucht werden. LS1034-Zellen, welche endogen IGF-II exprimieren, wurden durch die Überexpression von IGFBP-4 in ihrer Proliferation gehemmt (Abbildung 26). Bei Zugabe von exogenem IGF-II in steigenden Konzentrationen konnte sowohl bei nicht-transfizierten als auch bei transfizierten LS1034-Zellen die Proliferation stimuliert werden (Abbildung 26). Jedoch erreichten die IGFBP-4-überexprimierenden Klone auch unter Zugabe von exogenem IGF-II nicht das Proliferationsniveau der Mutterlinie (Abbildung 26). Dass

die Proliferation in LS1034-Zellen stark IGF-abhängig ist, wird zusätzlich durch das proliferative Verhalten des antisense-Klones (CI23) (Abbildung 26) unterstützt, dessen Proliferationsrate in An- und Abwesenheit von exogenem IGF-II höher war als die der Mutterlinie oder von mock-transfizierten Zellen, weil im antisense-Klon die Bildung von endogenem IGFBP-4 Protein unterdrückt wird (Abbildung 23).

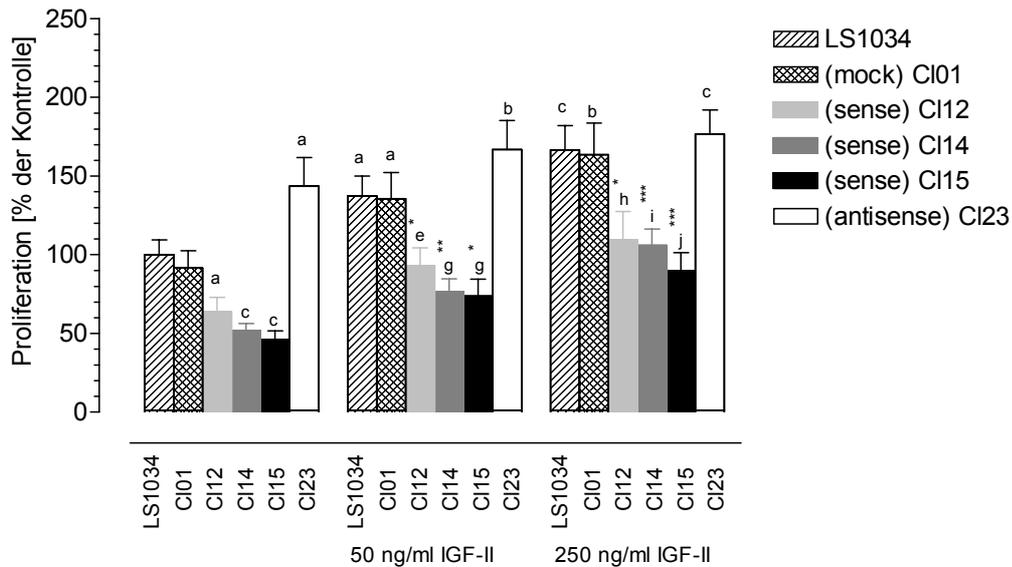


Abb. 26: Wirkung von mIGFBP-4 auf die basale und IGF-II-stimulierte Proliferation in LS1034-Zellen.

Die Hemmung der basalen Proliferation von LS1034 durch Überexpression von IGFBP-4 kann durch Zugabe von IGF-II unterdrückt werden. Signifikante Steigerung der Proliferation in CI12, CI14, CI15 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) durch Zugabe von 50 bzw. 250 ng IGF-II/ml gegenüber den korrespondierenden unbehandelten Klonen. ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ versus unbehandelten LS1034; ^e $P < 0,05$, ^g $P < 0,001$ versus LS1034 + 50 ng/ml IGF-II; ^h $P < 0,05$, ⁱ $P < 0,01$, ^j $P < 0,001$ versus LS1034 + 250 ng/ml IGF-II.

Eine Veränderung der basalen Proliferation durch exprimiertes mIGFBP-4 in den Zelllinien Isreco-1 (Abbildung 27) und Isreco-2 (Abbildung 28), die kein endogenes IGF-II besitzen, konnte nicht festgestellt werden.

In der Isreco-1-Zelllinie sowie in deren transfizierten Klonen erfolgte auch durch exogenes IGF-II keine Änderung des Proliferationsverhaltens (Abbildung 27).

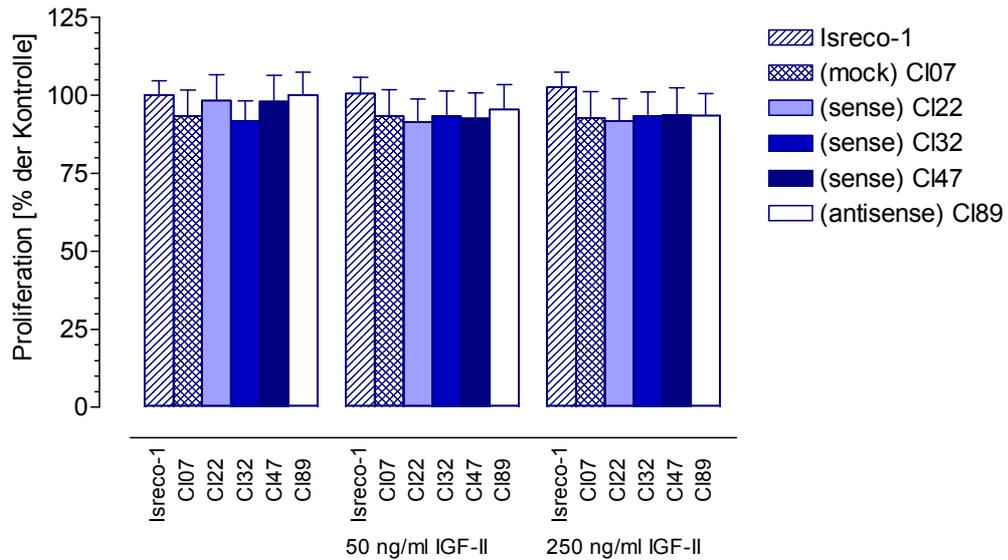


Abb. 27: Wirkung von mIGFBP-4 auf die Proliferation in Isreco-1-Zellen mit und ohne IGF-II.

In Isreco-1-Zellen wurde kein Effekt von mIGFBP-4 auf die Proliferation beobachtet.

Der Einfluss von IGFBP-4 in den IGF-sensitiven Isreco-2-Zellen, zeigte sich erst in der IGF-II-induzierten Proliferation. Unter Zugabe von exogenem IGF-II war die Proliferation in den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen niedriger als in der Mutterlinie oder den mock-transfizierten Zellen (Abbildung 28).

Die erhobenen Befunde zur Wirkung von mIGFBP-4 auf die Proliferation in LS1034, Isreco-1 und Isreco-2-Zellen sprechen dafür, dass IGFBP-4 die Proliferation in diesen Kolonkarzinomzellen über die Bindung von verfügbarem IGF-II reguliert.

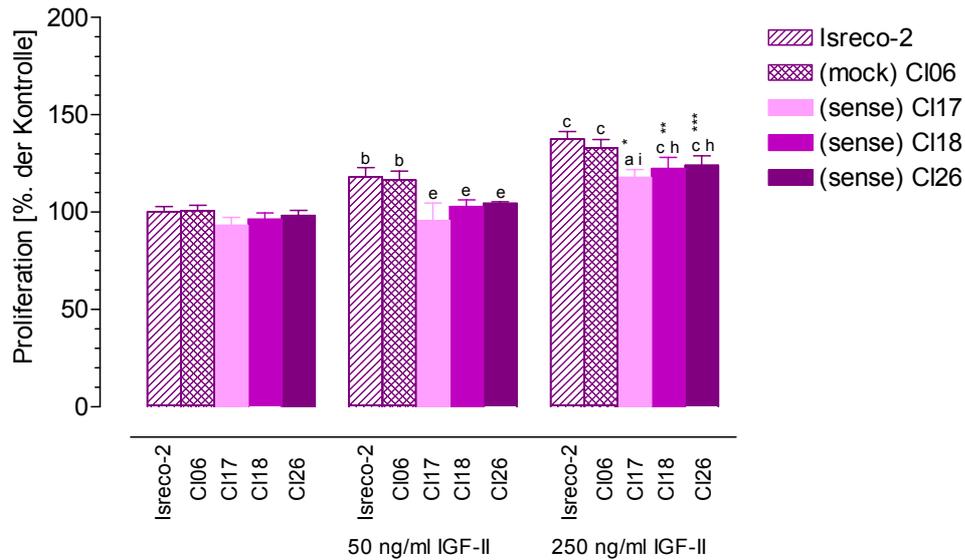


Abb. 28: Wirkung von mIGFBP-4 auf die basale und IGF-II-stimulierte Proliferation in Isreco-2-Zellen.

Ohne endogenes IGF-II liegt kein Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen nicht-transfizierten Isreco-2-Zellen und den mIGFBP-4 sense-Klonen vor. mIGFBP-4 hemmt die IGF-II-stimulierte Proliferation, was unter Zugabe von exogenem IGF-II sichtbar wird. Signifikante Steigerung der Proliferation in den mIGFBP-4 sense-Klonen CI17, CI18 und CI26 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ durch Zugabe von 250 ng IGF-II/ml. ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ versus unbehandelten Isreco-2; ^e $P < 0,05$ versus Isreco-2 + 50 ng/ml IGF-II; ^h $P < 0,05$, ⁱ $P < 0,01$ versus Isreco-2 + 250 ng/ml IGF-II.

6.3.2 Wirkung von IGFBP-4 auf die Koloniebildung

Der maligne Phänotyp einer transformierten Zelle äußert sich dadurch, dass das Wachstum in diesen Zellen unaufhörlich aufrecht erhalten wird und so schließlich ein Tumor entsteht. Dieses Verhalten transformierter Zellen wird ermöglicht durch den Verlust der Kontaktinhibition, die in normalen Zellen eine unaufhörliche Teilung verhindert.

Der maligne Phänotyp von LS1034-, Isreco-1- und Isreco-2-Zellen, sowie ihrer korrespondierenden Klone wurde anhand ihrer Koloniebildung im semi-soliden Medium unter Verwendung von Methylcellulose getestet. Ebenso wurde untersucht, ob exogenes IGF-II auf die Koloniebildung der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien Einfluss nimmt.

Eine Überexpression von IGFBP-4 führte in allen drei Zelllinien zu einer signifikant verminderten Koloniebildung. Die Anzahl der Kolonien war in den mIGFBP-4-exprimierenden Zellklonen in allen 3 Zelllinien gegenüber den Mutterlinien um 50-80 % reduziert (Abbildung 29, 30 und 31). Dahingegen zeigte eine exogene

Zugabe von IGF-II in keiner der untersuchten Zelllinien einen Effekt auf die Anzahl der Kolonien, was eine Bedeutung von frei verfügbarem IGF-II für die Koloniebildung in Frage stellt (Abbildung 29, 30 und 31).

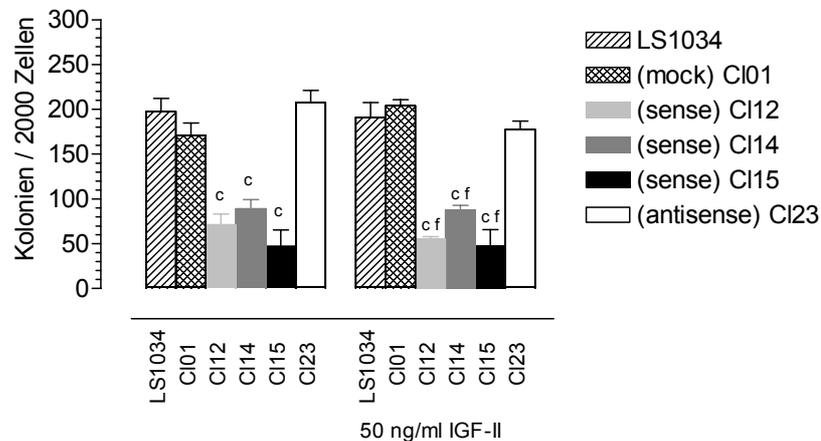


Abb. 29: Koloniebildung in LS1034-Zellen.

In LS1034-Zellen wurde die Anzahl der Kolonien in den mIGFBP-4 sense-Klonen um 55-76 % reduziert. Exogenes IGF-II hatte keinen Einfluss auf die Koloniebildung. ^c $P < 0,001$, versus LS1034; ^f $P < 0,001$, versus LS1034 + 50 ng/ml IGF-II.

Die Expression von mIGFBP-4 antisense-cDNA führte in Isreco-1-Zellen (Abbildung 30) zu einer deutlich erhöhten Anzahl von Kolonien, während in LS1034 (Abbildung 29) und in Isreco-2-Zellen (Abbildung 31) das antisense-Konstrukt zu keiner Veränderung der Koloniebildung führte.

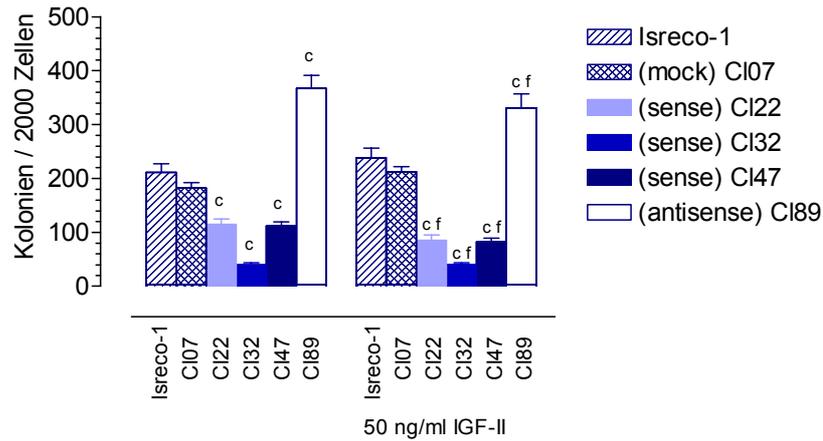


Abb. 30: Koloniebildung in Isreco-1-Zellen.

In Isreco-1-Zellen wurde die Anzahl der Kolonien in den mIGFBP-4 sense-Klonen um 45-80 % reduziert. Exogenes IGF-II hatte keinen Einfluss auf die Koloniebildung. ^c $P < 0,001$, versus Isreco-1; ^f $P < 0,001$, versus Isreco-1 + 50 ng/ml IGF-II.

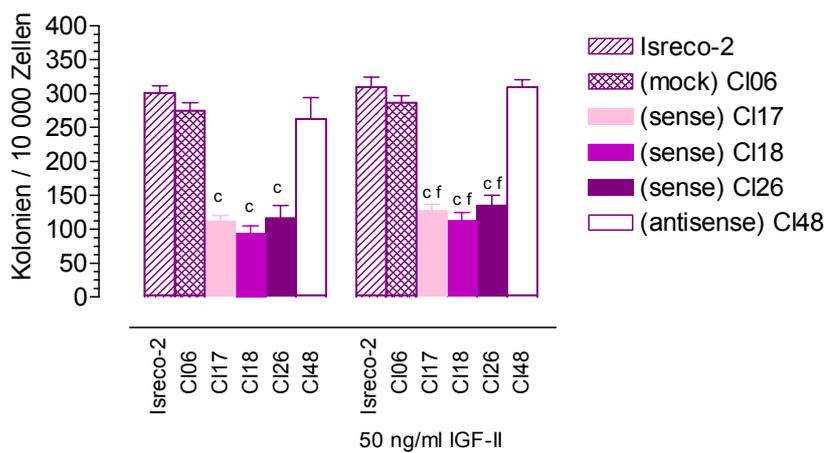


Abb. 31: Koloniebildung in Isreco-2-Zellen.

In Isreco-2-Zellen wurde die Anzahl der Kolonien in den mIGFBP-4 sense-Klonen um 61-79 % reduziert. Exogenes IGF-II hatte keinen Einfluss auf die Koloniebildung. ^c $P < 0,001$, versus Isreco-2; ^f $P < 0,001$, versus Isreco-2 + 50 ng/ml IGF-II.

6.3.3 Wirkung von IGFBP-4 auf die Invasion

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen. Das Risiko sich zu einem invasiven Karzinom zu entwickeln nimmt mit zunehmender Größe eines Adenoms zu. Die Tumorphistologie (Grad der Differenzierung, Grad der Infiltration etc.) spielt hierbei ebenfalls eine Rolle.

In vitro kann man das invasive Potential von Zellen testen, indem man den Durchtritt der Zellen durch eine semipermeable Barriere misst.

Unter Standardbedingungen migrierten 15 % der LS1034-Zellen innerhalb von 16 h durch diese Barriere (Abbildung 32). Geringgradig differenzierende Isreco-1-Zellen (Abbildung 33) zeigen von den drei untersuchten Kolonkarzinomzelllinien die höchste Invasionsrate von ca. 30 %, während Zellen der korrespondierenden Lebermetastase Isreco-2, die etwas besser differenzieren, kaum durch diese Barriere wandern. Wegen der fehlenden Migration der Isreco-2-Zellen konnte diese Untersuchung bei diesem Zelltyp nicht durchgeführt werden.

Ob IGF-II und IGFBP-4 einen direkten Einfluss auf die invasive Kapazität von LS1034 bzw. Isreco-1-Zellen nehmen, wurde anhand des Invasionsassays ebenfalls untersucht. Die Invasionsrate von LS1034-Zellen konnte durch exogenes IGF-II signifikant gesteigert werden, während IGF-II als exogenes Stimulans keinen Effekt auf die Migration von Isreco-1-Zellen hatte (Abbildung 32 und 33).

Die Überexpression von IGFBP-4 bewirkte in LS1034 eine signifikante Hemmung der aktiven Migration, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von exogenem IGF-II (Abbildung 32). Eine Überexpression von IGFBP-4 hatte dagegen keinen Einfluss auf die Migration von Isreco-1-Zellen (Abbildung 33).

Da Isreco-1-Zellen keinen funktionellen IGF-IR besitzen, sprechen die in LS1034- und Isreco-1-Zellen erhobenen Befunde für eine IGFBP-4-bedingte Regulation der Invasion, die auf der Bindung von IGF-II beruht.

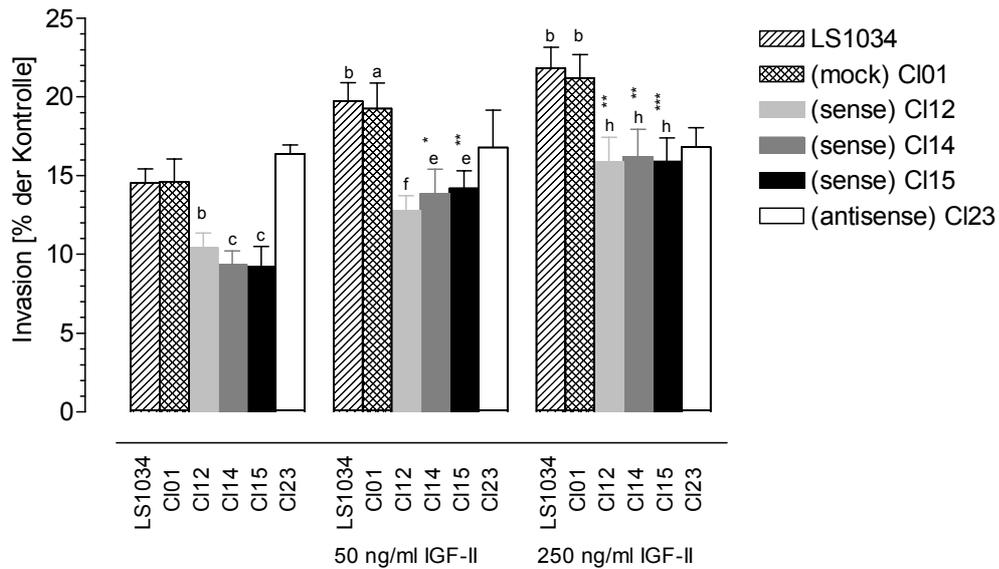


Abb. 32: Wirkung von miGFBP-4 auf die Invasionsrate von LS1034-Zellen mit und ohne IGF-II als „Chemotaxin“.

Die Hemmung der Migration von LS1034-Zellen durch die Membran bei miGFBP-4 Überexpression, konnte durch IGF-II als zusätzliches Chemotaxin teilweise aufgehoben werden. Signifikante Steigerung der Migration in CI12, CI14 und CI15 (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) durch Zugabe von 50 bzw. 250 ng IGF-II/ml. ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$) versus LS1034 ohne IGF-II; ^e $P < 0,05$, ^f $P < 0,01$ versus LS1034 + 50 ng/ml IGF-II; ^h $P < 0,05$, ⁱ $P < 0,01$ versus LS1034 + 250 ng/ml IGF-II.

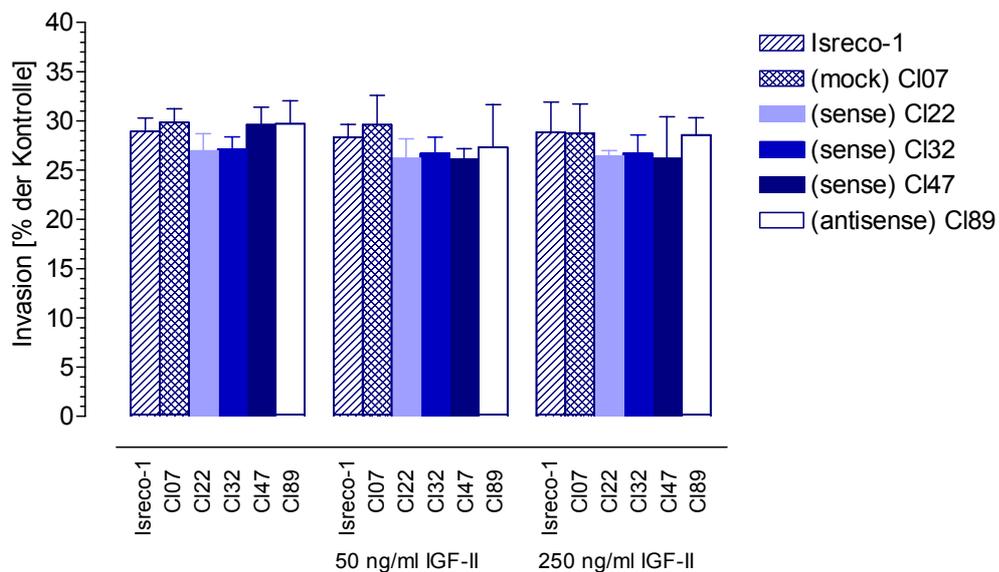


Abb. 33. Wirkung von miGFBP-4 auf die Invasionsrate von Isreco-1-Zellen mit und ohne IGF-II als „Chemotaxin“.

Die Überexpression von miGFBP-4 bewirkt keine Veränderung des Migrationsverhaltens von Isreco-1-Zellen und den korrespondierenden Klonen.

6.4 Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken aus nicht-transfizierten und mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellen unter Verwendung der „Suppression-Subtractive-Hybridization“-Methode

Für die Herstellung der subtraktiven cDNA-Banken wurden LS1034-Zellen und der korrespondierende CI15 (sense-mIGFBP-4) ausgewählt, da die Überexpression von mIGFBP-4 in dieser Zelllinie bezüglich aller untersuchten Tumor-relevanten Parameter starke Effekte zeigte. Folglich wurde in dieser Zelllinie die höchste Rate an differentiell regulierten Genen erwartet.

Zur Erstellung der cDNA-Banken wurde das Verfahren der „Suppression-Subtractive-Hybridization“ verwendet, durch das differentiell exprimierte Gene angereichert werden. Nachdem die subtraktiven-cDNA Banken aus LS1034-Zellen und dem sense-mIGFBP-4-Klon (CI15) hergestellt waren, wurden cDNAs von differentiell exprimierten Genen zwischen LS1034-Zellen und transfizierten Klonen mit Hilfe der cDNA-Array-Hybridisierung identifiziert.

6.4.1 Isolierung der mRNA aus Gesamt-RNA

Zum Zweck der Erstellung von cDNA-Banken wurde die Gesamt-RNA aus LS1034-Zellen und den korrespondierenden Klonen isoliert. Die Isolierung der poly (A)⁺-RNA erfolgte wie unter Punkt 5.4.3 beschrieben. Durch UV-Messung wurde die RNA-Konzentration bestimmt und für die Anreicherung der poly (A)⁺-RNA jeweils 550 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Es wurden folgende Mengen an poly (A)⁺-RNA isoliert:

Zelllinie	Gesamt-RNA [µg]	poly (A) ⁺ -RNA [µg]
LS1034	550	7,9
LS1034-mIGFBP-4 CI15	550	4,2

Der Anteil an mRNA in eukaryontischen Zellen bewegt sich je nach Zelltyp zwischen 1 % und 3 %. Während der Anteil der isolierten mRNA von LS1034-Zellen bei 1,4 % und damit im erwarteten Bereich lag, war die Ausbeute der mRNA aus LS1034-mIGFBP-4 CI15 mit 0,76 % eher gering. Da für die cDNA-Synthese allerdings nur 2 µg mRNA benötigt wurden, reichte die gewonnene Menge an mRNA aus.

Zur Überprüfung der Qualität der angereicherten poly(A)⁺-RNA, welche zur Erstellung der subtraktiven Banken herangezogen werden sollte, wurde diese und ein Aliquot der poly(A)⁻-RNA in einem TBE-Agarosegel (1 %) aufgetrennt (Abbildung 34). Es wurden 0,5 µl der in 20 µl Aqua bidest. gelösten mRNA aufgetragen. Daraus ergaben sich die etwas unterschiedlichen Bandenstärken für LS1034 (198,5 ng) und CI15 (105,5 ng). Als Kontrolle wurden ebenfalls 0,5 µl des Durchlaufs (1 ml), d.h. ca. 250 ng der nicht an die Oligo-(dT)-Cellulose gebundenen RNA aufgetragen (Spuren 4 und 5). Diese poly(A)⁻-RNA weist deutlich 3 Banden auf. Die beiden oberen Banden korrespondieren mit der 28 S-rRNA bzw. mit der 18 S-rRNA. Unterhalb von 200 bp des Längenstandards ist die tRNA im Gel zu sehen. Da die RNA im Agarosegel deutliche Banden aufwies, wobei die 28SrRNA ungefähr doppelt so stark war wie die 18SrRNA, konnte davon ausgegangen werden, dass keine Degradation der RNA bis zu diesem Zeitpunkt der mRNA-Anreicherung stattgefunden hatte. Die poly(A)⁺-RNA in den Spuren 2 und 3 wurde als breite Bande im Vergleich zum Längenstandard zwischen 12 000 bp und 400 bp aufgetrennt. Reste der ribosomalen RNA sind noch zu erkennen, die tRNA war hingegen nicht mehr nachweisbar. Die Größenverteilung der poly(A)⁺-RNA ließ darauf schließen, dass keine RNA-Degradierung vorlag.

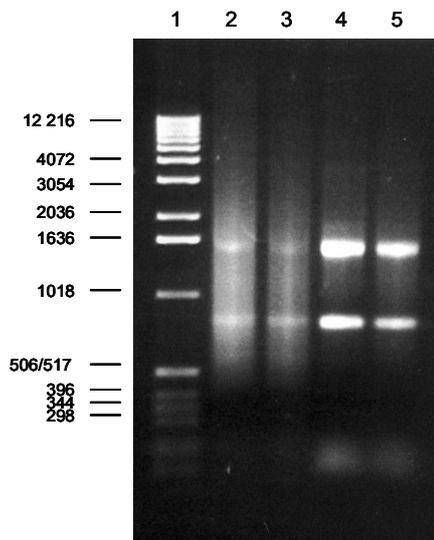


Abb. 34: Gelanalyse der angereicherten poly(A)⁺-RNA und der poly(A)⁻-RNA.

Spur 1: 100 ng kb DNA Ladder; Spur 2: mRNA LS1034 (198 ng), Spur 3: mRNA CI15 (105 ng); Spuren 4 und 5: nicht an Oligo-(dT)-Cellulose gebundene RNA (ca. 250 ng) von LS1034 und CI15.

6.4.2 cDNA-Synthese und Spaltung mit *RsaI*

Zur Erstellung der subtraktiven Banken wurden insgesamt 2 µg der isolierten poly (A)⁺-RNA verwendet. Die cDNA-Synthese, d.h. die Erststrangsynthese und die sich anschließende Synthese des Zweitstranges wurden wie unter 5.4.6 beschrieben durchgeführt. Nach Glättung der Enden mit T4-DNA-Polymerase und anschließender Aufreinigung durch Phenolextraktion und Fällung, wurde die erhaltene cDNA mit *RsaI* gespalten. Die Erzeugung kleinerer cDNA-Fragmente durch diese Spaltung wurde in einem 0,8 %igen TBE-Agarosegel kontrolliert. Aufgetragen wurden ungefähr 1/50 der cDNA vor und nach der Spaltung (Abbildung 35). Die Spaltung mit *RsaI* ergab eine Verschiebung der cDNA-Fragmentgrößen von größer 10 000 bp bis ca. 300 bp zu ca. 2000 bp bis ca. 150 bp. Die *RsaI*-gespaltene cDNA wurde als „Treiber“-cDNA in der subtraktiven Hybridisierung eingesetzt.

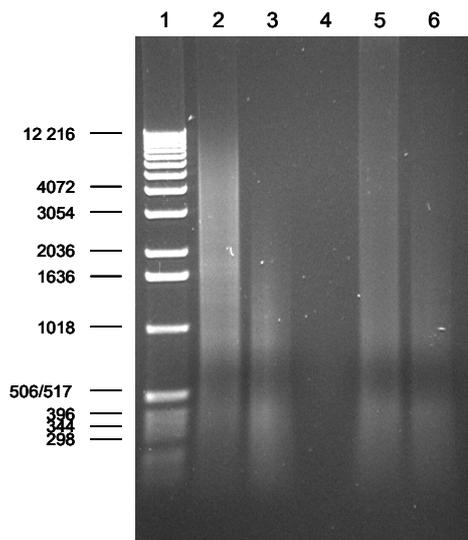


Abb. 35: Gelanalyse der cDNA vor und nach *RsaI*-Spaltung.

Die doppelsträngige cDNA aus LS1034-Zellen und dem mIGFBP-4 sense-Klon (CI15) wurden mit *RsaI*-gespalten. Der Probenauftrag im Gel war folgendermaßen: 100 ng kb DNA Ladder (Spur 1), cDNA LS1034 ungespalten (Spur 2), cDNA LS1034 *RsaI*-gespalten (Spur 3), Leerspüre (Spur 4), cDNA CI15 ungespalten (Spur 5), cDNA CI15 *RsaI*-gespalten (Spur 6).

6.4.3 Ligation der Adaptoren an *RsaI*-gespaltene cDNA-Fragmente

Zur Herstellung der „Tester“-cDNA wurden Adaptoren an die mit *RsaI*-gespaltene cDNA ligiert. Zur Kontrolle der Ligation der Adaptoren 1 und 2 an die cDNA wurde gleichzeitig eine Ligation der Adaptoren an die Fragmente eines DNA-Längenstandards (BM-IX) durchgeführt, der ebenfalls mit *RsaI* gespalten worden war. Weiterhin wurden an einen Teil der cDNA in einem Ansatz beide Adaptoren ligiert, so dass ca. 1/3 der cDNA verschiedene Adaptoren an den Enden trug. Abbildung 36 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung des Längenstandards mit ligierten Adaptoren und *RsaI*-Spaltung im Vergleich zum Längenstandard ohne Adaptoren. Nach der Ligation der Adaptoren an die cDNA-Fragmente des

Längenstandards laufen ein Teil der jeweiligen Banden des Längenstandards etwas langsamer im Gel. Die Analyse der Kontrolle im TBE-small-DNA-Agarosegel (2 %) zeigte, dass die Ligation der Adaptoren zumindest an die Fragmente des Markers unter den gegebenen Bedingungen (5.4.8) erfolgreich war.

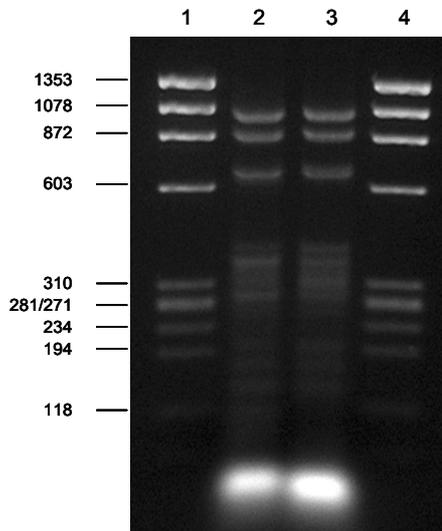


Abb. 36: Gelanalyse der Kontrolligation der Adaptoren 1 und 2 an einen DNA-Längenstandard (BM-IX).

Auftragung der Proben: 100 ng BM-IX (Spur 1 und 4), BM-IX-1 (Spur 2), BM-IX-2 (Spur 3).

Die erfolgreiche Ligation der Adaptoren an die cDNA wurde weiterhin durch eine PCR mit dem PCR-Primer 1 und der verdünnten Kontrolligation mit beiden Adaptoren nachgewiesen. Die Produkte dieser PCR trennten sich von etwa 300 bp bis 3000 bp nach der Gelelektrophorese im Agarosegel (1 %) auf (Abbildung 37, Spuren 3 und 4).

6.4.4 Subtraktive Hybridisierung und Suppressor-PCR

Nachdem die Ligation der Adaptoren an die cDNA erfolgt war, wurde die subtraktive Hybridisierung durchgeführt. Im ersten Schritt der subtraktiven Hybridisierung wurde jeweils cDNA mit Adaptor („Tester“) mit cDNA ohne Adaptor („Treiber“) von der jeweils anderen Zelllinie hybridisiert. Pro Adaptor wurde eine Reaktion angesetzt. Bei der ersten Hybridisierung erfolgt neben der Subtraktion (Hybridisierung von „Tester“- mit „Treiber“-Molekülen) auch eine Normalisierung der Häufigkeiten der cDNAs, die nur in der „Tester“-Population, bzw. dort häufiger als in der „Treiber“-Population vorkommen, weil beim SSH-Verfahren doppelsträngige cDNA verwendet wird. Dadurch werden auch cDNAs von schwach exprimierten differentiellen Genen sehr gut angereichert. Nach der ersten Hybridisierung wurden die korrespondierenden Ansätze mit den beiden verschiedenen Adaptoren unter weiterer Zugabe frischer „Treiber“-cDNA zusammengegeben.

Bei diesem zweiten Schritt konnten sich nun bis dahin einzelsträngig gebliebene „Tester“-Moleküle eines Gens finden und doppelsträngige Moleküle mit verschiedenen Adaptoren an den Enden bilden. Nur solche Moleküle wurden in der sich anschließenden Suppressor-PCR exponentiell vermehrt, die in zwei Schritten, erst mit einem in den Adaptoren außen liegenden Primer und dann mit weiter innen liegenden „*nested*“-Primern, erfolgte. Der eigentlich Suppressor-Effekt tritt dabei nur bei der ersten PCR auf, weil dort noch die vollständigen Adaptoren vorhanden sind. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Agarosegel (1 %) analysiert. Von der ersten PCR wurden 8 µl und von der zweiten PCR 5 µl aufgetragen. Während die Produkte der ersten PCR-Amplifizierung relativ schwach zu erkennen waren, sind die Signale der zweiten PCR-Amplifizierung deutlich stärker (Abbildung 37). Vergleicht man die Produkte aus der subtraktiven Hybridisierung mit denen der Kontrolle, wird deutlich, dass diese schwächer waren als die Kontrollen vor der subtraktiven Hybridisierung in der ersten PCR-Amplifizierung. In der zweiten PCR-Amplifizierung war dieser Unterschied nicht mehr zu sehen, sondern eher eine Abnahme der Signalstärke bei den Kontrollen. Die Produkte der Kontrollen trennen sich zwischen ca. 300 bp und etwas mehr als 3000 bp im Vergleich zum Längenstandard auf. Die Produkte nach der subtraktiven Hybridisierung bewegten sich zwischen 200 bp und 2000 bp in beiden PCR-Amplifikationen und sind kürzer als ihre Kontrollen. Abbildung 37 zeigt repräsentative Suppressor-PCRs, die für die Klonierung der subtraktiven Bank verwendet wurden.

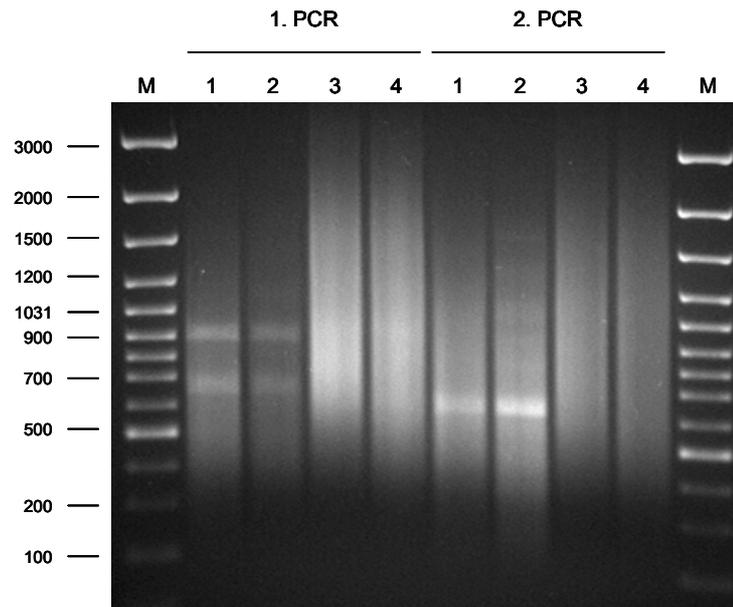


Abb. 37: Suppressor-PCR.

Die Suppressor-PCR besteht aus zwei Stufen, die erste PCR wurde mit dem außen liegenden Primer 1 und die sich anschließende zweite PCR wurde mit weiter innen liegenden „nested“-Primern durchgeführt. Die Aufteilung der Proben im Gel war wie folgt: 100 bp DNA Ladder Plus (100 ng) (Spur M), LS1034 subtrahiert (Spur 1), CI15 subtrahiert (Spur 2), LS1034 Kontrolle nicht subtrahiert (Spur 3), CI15 Kontrolle nicht subtrahiert (Spur 4). Links erste PCR, Rechts zweite PCR.

6.4.5 Klonierung der subtrahierten cDNA

Zur Entfernung der Taq-Polymerase, wurde die subtrahierte cDNA aus der zweiten Suppressor-PCR durch Phenolextraktion mit anschließender Fällung aufgereinigt. Bevor die subtrahierte cDNA in das Plasmid (pBSIISK⁻MO) kloniert wurde, erfolgte eine Spaltung in den Adaptoren mit BssHII. Anschließend wurde die subtrahierte cDNA in einem TBE-Low Gelling Typ VII-Agarosegel größenfraktioniert und cDNA-Fragmente kleiner als 200 bp wurden durch Abschneiden des Gels unterhalb dieser Molekülgröße entfernt. Nach weiterer Gelelektrophorese bei umgekehrter Polung wurden die cDNA-Moleküle >200 bp in einer Bande ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (Abbildung 38).

Die so aufgereinigte cDNA von LS1034 und CI15 wurde in das Plasmid (pBSIISK⁻MO) ligiert. Diese Plasmide wurden durch Elektroporation in *E. coli* transformiert. Ein Teil (30 µl) der Bakterien wurde auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen, der Rest als Glycerin-Dauerkultur konserviert. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden ausgezählt und dann abgeschwemmt, um die Plasmid-DNA zu isolieren.

Die Hochrechnung der erhaltenen Kolonienzahl auf die gesamten Kulturen ergab etwa 45 000 Kolonien für die LS1034-Bank und etwa 55 000 Kolonien für die CI15-Bank.

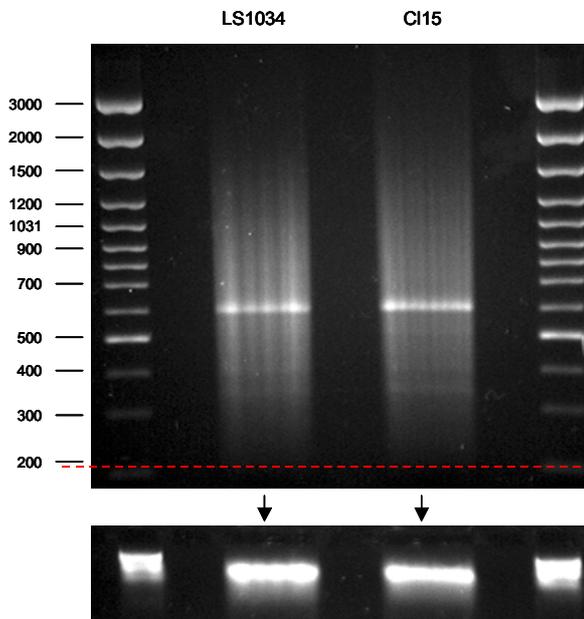


Abb. 38: Größenfraktionierung der subtrahierten und BssHII-gespaltenen cDNA von LS1034- und CI15-Zellen.

Nach der Elektrophorese wurde der untere Teil des Gels bei einem Molekulargewicht von 200 bp abgeschnitten. Alle größeren Fragmente wurden einer weiteren Elektrophorese bei umgekehrter Laufrichtung unterzogen und dann für die Klonierung ausgeschnitten. Als Längenstandard wurden 500 ng 100 bp DNA Ladder Plus aufgetragen.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde ungespalten im Vergleich zum Plasmid ohne cDNA-Insertionen (pBSIISK⁻MO) in einem TBE-Agarosegel (1 %) aufgetrennt (Abbildung 39). Bei der Plasmid-DNA aus den Bakterienkolonien lief nur ein sehr kleiner Anteil auf Höhe der Vektor-DNA im TBE-Agarosegel. Dies deutete darauf hin, dass der Anteil des Vektors ohne cDNA-Insertion in den Banken sehr gering war. Der größte Teil der isolierten Plasmid-DNA lief deutlich höher als der leere Vektor und enthielt folglich cDNA-Fragmente.

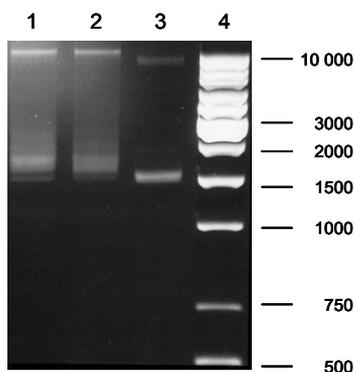


Abb. 39: Isolierung der Plasmid-DNA aus abgeschwemmten *E. coli*-Kolonien.

Die Probenauftragung im Gel war wie folgt: Spur 1: pBSIISK⁻MO-DNA LS1034 (1/50), Spur 2: pBSIISK⁻MO-DNA CI15 (1/50), Spur 3: pBSIISK⁻MO (20 ng), Spur 4: 1 kb Ladder (250 ng). Die „supercoiled“-Form des „leeren“ Plasmids läuft auf einer Höhe von ca. 1600 bp.

6.4.6 Amplifizierung der cDNA-Insertionen mittels PCR

Nachdem gezeigt worden war, dass die Ligation der subtrahierten cDNA in den Vektor erfolgreich war, wurden Kolonien für die Amplifizierung der cDNA-Insertionen gepickt. Insgesamt wurden aus 1728 Kolonien die cDNA-Insertionen wie unter Punkt 5.4.15 beschrieben amplifiziert. Die Amplifizierung der cDNA-Fragmente fand mit Primern statt, die jeweils im Anschluss an die cDNA im Klonierungsvektor binden. Die genauen Bedingungen der PCR wurden im Methodenteil beschrieben. Alle amplifizierten Produkte wurden durch Auftrennung im TBE-Agarosegel (1 %) analysiert. Zur Analyse wurden 0,5 µl PCR-Produkt im Vergleich zu einem Längenstandard aufgetrennt. Abbildung 40 zeigt eine repräsentative Aufnahme eines Agarosegels, das die aufgetrennten cDNA-Fragmente gegenüber dem Längenstandard zeigt. In fast allen analysierten Ansätzen konnte ein Produkt amplifiziert werden. Die Größe der amplifizierten cDNA-Fragmente variierte zwischen 200 bp und maximal 2000 bp.

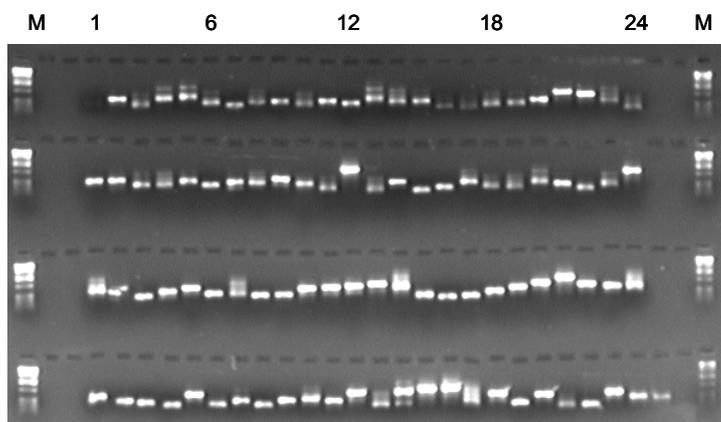


Abb. 40: PCR-Amplifizierung der cDNA-Insertionen aus *E. coli*.

PCR-Reaktion mit 96-Proben. Pro Reihe wurden 24 cDNA-Fragmente aufgetragen, am äußeren Rand wurde der Längenstandard (Spur M), 100 bp Ladder Plus (100 ng), aufgetragen.

6.4.7 Herstellung von cDNA-Arrays und anschließende Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden

Ob bereits differentiell exprimierte cDNA-Fragmente unter 192 cDNA-Klonen zu finden waren, wurde ausgetestet, bevor Arrays mit 1536 Proben hergestellt wurden. Es wurden zwei identische Arrays mit je 192 Proben mit Hilfe eines Replikators mit der Hand aufgespottet. Bromphenolblau im PP-Puffer diente zur Sichtbarmachung der Spots auf der Membran. Dadurch konnte man erkennen, ob die Proben gleichmäßig und punktgenau aufgetragen worden waren, nachdem 15-mal auf die

gleiche Stelle gespottet worden war. Das mehrmalige Auftragen einer Probe auf dieselbe Stelle sollte zum einen dazu dienen, dass eine ausreichend große Menge der Probe auf der Membran gebunden wurde und zum anderen gewährleisten, dass auf beiden Membranen die gleiche Menge appliziert wurde. Die weitere Behandlung der Membran, z.B. Denaturierung und Fixierung der cDNA, ist im Methodenteil beschrieben. Für die Hybridisierung der Arrays des Vorversuchs (192 cDNA-Fragmente) wurden cDNA-Sonden aus poly A⁺-RNA von LS1034 und Cl15 hergestellt. In weiteren Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass eine adäquate Hybridisierung auch mit aus Gesamt-RNA hergestellten cDNA-Sonden möglich war. Hybridisierungen von Membranen mit mehr als 192 cDNA-Fragmenten erfolgten deshalb mit aus Gesamt-RNA hergestellten Sonden. Bevor die cDNA radioaktiv markiert wurde, wurde sie nochmals im Agarosegel (1 %) kontrolliert (Abbildung 41). Nur qualitativ und quantitativ vergleichbare cDNAs wurden zur Hybridisierung verwendet.

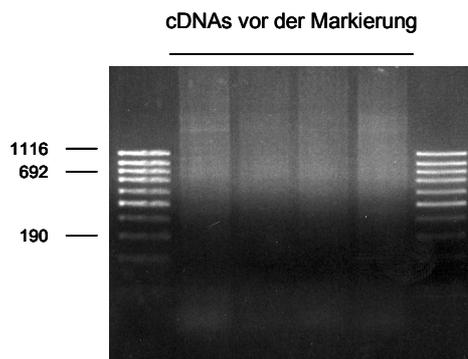


Abb. 41: Beispiel verwendeter cDNAs für die radioaktive Markierung.

In den äußeren Spuren wurden 500 ng Puc Mix Marker 8 aufgetragen, in der Mitte cDNAs hergestellt aus Gesamt-RNA aus nicht-transfizierten LS1034-Zellen (linke Spur) und transfizierten LS1034-Zellen (restliche Spuren).

Nachdem die cDNA von LS1034 und Cl15 mit α -[³²P]-dCTP markiert worden war, wurde sie für die Hybridisierung eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays unter gleichen, stringenten Bedingungen gewaschen und die Signale mit dem Phosphorimager nachgewiesen. Die Auswertung mit der Aida Software ergab, dass von den 192 Proben 20 Kandidaten-Fragmente unterschiedlich exprimiert waren. Die Sequenzanalyse der 20 cDNA-Fragmente zeigte, dass einige der cDNA-Fragmente dem gleichen Gen oder der gleichen cDNA zugeordnet werden konnten. miGFBP-4, das in Cl15 exprimiert ist, war z.B. dreimal unter diesen 20 cDNA-Fragmenten vertreten. Nach dem Nachweis, dass die Identifizierung differentiell exprimierter Gene in den erstellten subtraktiven Genbanken grundsätzlich möglich war, wurden Arrays mit 1536 cDNA-Fragmenten hergestellt.

Die Herstellung der Arrays erfolgte zunächst mit dem Replikationssystem von Nunc per Hand. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit stand jedoch ein Spot-Roboter zur Verfügung, der die Arrays auf einer wesentlich kleineren Fläche herstellen konnte. Durch die kleinere Fläche konnte das Hybridisierungsvolumen deutlich verringert werden (von 7,5 ml auf 2 ml), wodurch die Hybridisierungskinetik, die proportional zum Quadrat der Probenkonzentration ist, deutlich verbessert wurde. Weiterhin war ein wesentlich gleichmäßigeres Hybridisieren und Waschen der Arrays möglich. Zudem konnten sogenannte Hintergrundspots, die nur den Probenpuffer enthielten, über die Membran verteilt als Kontrollspots aufgespottet werden. Diese Kontrollspots dienten zum Abgleich des Hintergrunds in der jeweiligen Region und zur Kontrolle der Gleichmäßigkeit der Hybridisierung. Abbildung 42 stellt den Vergleich eines handgespotteten Arrays (Makroarray) mit einem durch den Spot-Roboter hergestellten Array (Mikroarray) dar.

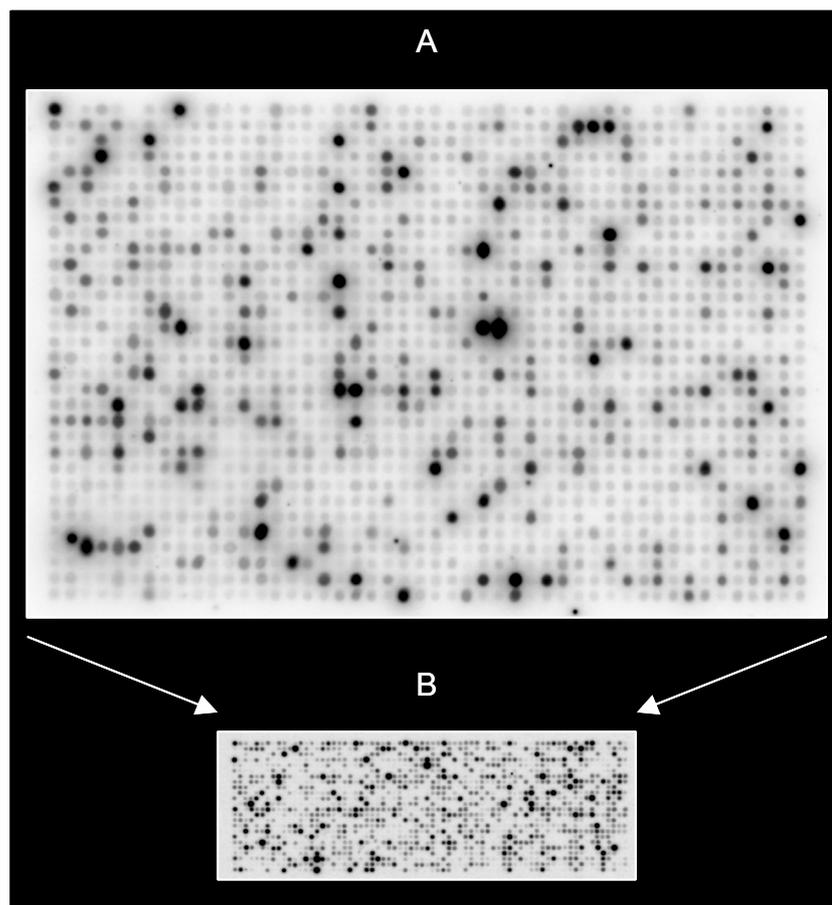


Abb. 42: Größenvergleich eines Makroarrays (A) zu einem Mikroarray (B).

Die Abbildung zeigt die Arrays nach ihrer Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten cDNA. Die Membranen wurden mit dem Storm 860 1:1 eingescannt und sind in Originalgröße dargestellt.

Alle Membranen wurden mit radioaktiv markierter cDNA von nicht-transfizierten LS1034-Zellen, von mock-transfizierten LS1034-Zellen (CI01) und von mIGFBP-4 sense-transfizierten LS1034-Zellen (CI14 und CI15) hybridisiert.

Im Gegensatz zu den Makroarrays, die mit α -[^{32}P]-dCTP-markierter cDNA hybridisiert wurden, eigneten sich für die Mikroarrays nur α -[^{33}P]-dCTP-markierte Sonden, die pro Spot einen wesentlich kleineren Strahlungsradius erzeugten. Jede Hybridisierung wurde mindestens zweimal unterschiedlich lang exponiert und mit der zur Verfügung stehenden AIDA Software ausgewertet. Kurze Expositionszeiten dienten dazu, den Unterschied zwischen stärkeren Signalen zu ermitteln, ohne in den Sättigungsbereich zu kommen. Längere Expositionszeiten wurden benutzt, um Unterschiede zwischen schwächeren Signalen zu identifizieren. Der jeweils repräsentative Wert wurde zur statistischen Auswertung herangezogen. Für Signale, die sich in beiden Expositionen im linearen Bereich befanden, wurde der Durchschnitt ermittelt. Für die statistische Auswertung wurden nur Membranen herangezogen, die mit α -[^{33}P]-dCTP-markierten Sonden hybridisiert worden waren, um eine Vergleichbarkeit der Strahlungsintensität zu gewährleisten. Der in den Abbildungen 43 bis 46 graphisch dargestellte Mittelwert mit Standardabweichung setzt sich aus diesem Grund aus 5 unabhängigen Hybridisierungen zusammen.

6.5 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Nachdem gezeigt worden war, dass IGFBP-4 effektiv die Proliferation, die Transformation und die Invasion von LS1034 Kolonkarzinomzellen hemmt, war durch die Herstellung und Analyse von subtraktiven Banken die Möglichkeit gegeben, die Wirkung der mIGFBP-4-Überexpression auf die Transkription verschiedener Gene zu untersuchen. Anhand der ausgewerteten Hybridisierungen wurden insgesamt 66 cDNA-Fragmente identifiziert, die in allen Hybridisierungen in transfizierten Zellen differentiell gegenüber der Mutterlinie reguliert waren. Nach der Sequenzierung dieser cDNA-Fragmente konnten diese insgesamt 39 verschiedenen Genen zugeordnet werden. 17 der 66 cDNA-Fragmente, die ein starkes Signal bei CI14 und CI15 aufwiesen, wurden als mIGFBP-4 identifiziert. Weiterhin waren noch sieben andere Gene durch mehrere Fragmente vertreten, EMP-1 (epithelial membran protein 1) viermal, HIF responsive RTP801 und HMGCS2 (mitochondriale 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase 2) jeweils dreimal, PTPR0 (Protein Tyrosine Phosphatase Rezeptor Type 0), VDAC2 (voltage-dependent anion channel 2) und

HIG1 (hypoxia-inducible Gene 1) je zweimal.

Die identifizierten Gene sind in den folgenden Abbildungen unterteilt nach Transkripten, die durch die mIGFBP-4-Expression hochreguliert wurden (Abbildung 43), nach Transkripten, die durch die mIGFBP-4-Expression bedingt verminderte Spiegel aufwiesen (Abbildung 44), nach Transkripten, die durch mIGFBP-4 signifikant unterschiedlich zur Mutterlinie und zur mock-Kontrolle waren und die durch die Transfektion (mock-Kontrolle) gegenteilig und signifikant unterschiedlich zur Mutterlinie reguliert wurden (Abbildung 45), und sechs Gene für die nicht zwischen Transfektions- und mIGFBP-4-Effekt differenziert werden konnte (Abbildung 46). Die veränderten Signale sind mit Pfeilen in den Ausschnitten markiert. Somit ist schon ein sichtbarer Vergleich der Signalstärke zwischen den Kontrollen (LS1034, CI01) und den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14, CI15) möglich. Rechts neben den Ausschnitten ist die graphische Darstellung der aus Klonen und Mutterlinie gebildeten Expressionsunterschiede und links neben den Hybridisierungssignalen das Kürzel des Gennamens gezeigt. Die zu den Abbildungen 43 bis 46 korrespondierenden Tabellen 4 bis 7 fassen das Ergebnis der Datenbanksuche mit der Genbank „Accession number“, der Homologie zur in der Datenbank angegebenen Sequenz und der Proteinfunktion zusammen. Des weiteren besitzen die identifizierten Gene oft mehrere Aufgaben und Eigenschaften, so dass die Zuordnung der identifizierten Kandidaten zu einer bestimmten Genklasse nicht zwingend sein muss.

6.5.1 Durch mIGFBP-4-Expression hochregulierte Transkripte

8 Gene, einschließlich IGFBP-4, wurden nur in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14 und CI15) hochreguliert. RHOBTB3, das zur Familie der Rho-GTPasen gehört, zeigte ein 60-fach stärkeres Signal in diesen Klonen gegenüber der LS1034-Mutterlinie oder der mock-Kontrolle (CI01). Signale für Cystain SN (CST1), das Cysteineproteinasen reversibel und kompetitiv hemmt [32], und PTPR0, das im Zellzyklus einen G₀/G₁-Arrest vermittelt [4], waren in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen 10-fach bzw. 5-fach stärker. Weitere mIGFBP-4 induzierte Gene, deren mRNA-Spiegel ebenfalls signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht waren, sind die Metalloendopeptidase MEP1A (N-benzoyl-L-tyrosyl-p-amino-benzoic acid hydrolase alpha subunit) und die im Mitochondrium lokalisierte Cytochrom C-Oxidase

(MTCO2), die für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich ist und in Kolonpolyphen gegenüber normalem Gewebe herunterreguliert wird [387]. Zwei der acht durch mIGFBP-4 induzierten Gene konnten nicht identifiziert werden.

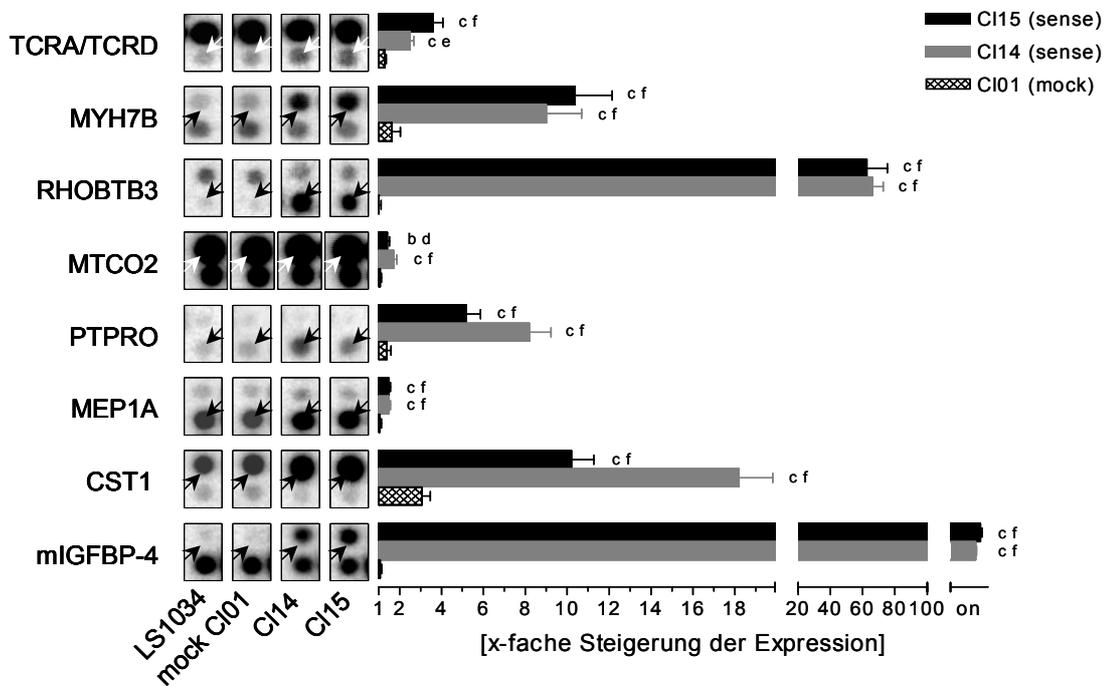


Abb. 43: Durch mIGFBP-4 Expression hochregulierte mRNAs.

Links in der Abbildung sind die Kürzel der identifizierten Gene aufgelistet. Repräsentative Hybridisierungssignale aus LS1034-Zellen, der mock-Kontrolle (CI01) und den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14, CI15) sind in den Ausschnitten mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die Ratios der Signalintensitäten der cDNAs von transfizierten Zellen zu LS1034-Zellen graphisch dargestellt. Die Ratios sind als Mittelwert \pm SD mit $n = 5$ angegeben. Signifikante Unterschiede der Hybridisierungsintensitäten in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen gegenüber Ls1034 sind gekennzeichnet mit: ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$. Signifikante Unterschiede der Hybridisierungsintensitäten in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen gegenüber der mock-Kontrolle (CI01) sind gekennzeichnet mit ^d $P < 0,05$, ^e $P < 0,01$, ^f $P < 0,001$.

Tab. 4: Nomenklatur der Gene, deren Transkripte durch mIGFBP-4 Expression in LS1034-Zellen hochreguliert wurden.

cDNA/Gen	Genbank "Accession number"	Homologie (%)	Proteinfunktion
Mus musculus Insulin-like growth factor binding protein 4 (mIGFBP-4)	BC019836	100	IGF-Bindungsprotein
Cystatin SN (CST1)	NM_001898	100	Proteinaseinhibitor
Homo sapiens N-benzoyl-L-tyrosyl-p-amino-benzoic acid hydrolase alpha subunit (MEP1A)	AF478685	100	Metalloendopeptidase
Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, 0 transcript variant 5 (PTPR0)	NM_030671	100	Signaltransduktion, Tyrosine Phosphatase
Homo sapiens Cytochrome C oxidase (MTCO2)	NM_173705	99	Oxidase
Homo sapiens Rho-related BTB domain containing 3 (RHOBTB3)	NM_014899	100	Signaltransduktion, "subfamily" der Rho GTPasen
Myosin, heavy polypeptide 7B, cardiac muscle, beta (MYH7B) KIAA1512	NM_033424	100	Unbekannt
Homo sapiens T cell receptor alpha delta locus (TCRA/TCRD) bp 886172-886777	NG_001332	100	Unbekannt

Die angegebene Homologie in % zeigt die Ähnlichkeit der sequenzierten cDNAs zu den Sequenzen, die durch BLAST-Datenbank-Suche identifiziert wurden. Darüber hinaus ist, soweit bekannt, noch die Proteinfunktion des Genprodukts angegeben.

6.5.2 Durch mIGFBP-4 Expression verminderte Transkripte

Bei dem Hauptanteil (25) der differentiell exprimierten Gene wurden die korrespondierenden Transkripte durch die Überexpression von mIGFBP-4 vermindert (Abbildung 44 und 45). Von diesen mRNAs wurden 13 ausschließlich durch die Überexpression von mIGFBP-4 beeinflusst (Abbildung 44), während 12 auch durch die Transfektion verändert wurden, ohne allerdings die signifikante Reduktion durch mIGFBP-4 aufzuheben (Abbildung 45). In den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14, CI15) wurde die Expression der COX-2-mRNA um mehr als das 4-fache und die mRNA einer Serinprotease (TMPRSS2) um mehr als das 1,5-fache herunterreguliert (Abbildung 44). Viele der mRNAs, die durch IGFBP-4 signifikant reduziert wurden, stammen von Zellzyklus-relevanten Genen. Zu diesen Genen gehören unter anderem MRG 15 [53], TUBGCCP2, [418] und IFRD1 [227]. Signifikante Verminderungen im Expressionsniveau von an der Signaltransduktion oder an der Apoptose beteiligten Genen, wie TNFRSF1A [107], CAPN2 [14] und CSNK1A1 [56], konnten ebenfalls identifiziert werden (Abbildung 44). Schließlich wurden die mRNA-Spiegel von Genen signifikant reduziert, die wichtige Funktionen im Metabolismus der Zellen erfüllen (PTS, SLC7A5), sowie von solchen, die am Auf- und Umbau des Zytoskeletts beteiligt sind, wie z.B. Ezrin [373]. Die mRNAs von zwei weiteren Genen, deren Funktionen nicht genau bekannt sind, wurden ebenfalls durch mIGFBP-4 signifikant vermindert (Abbildung 44).

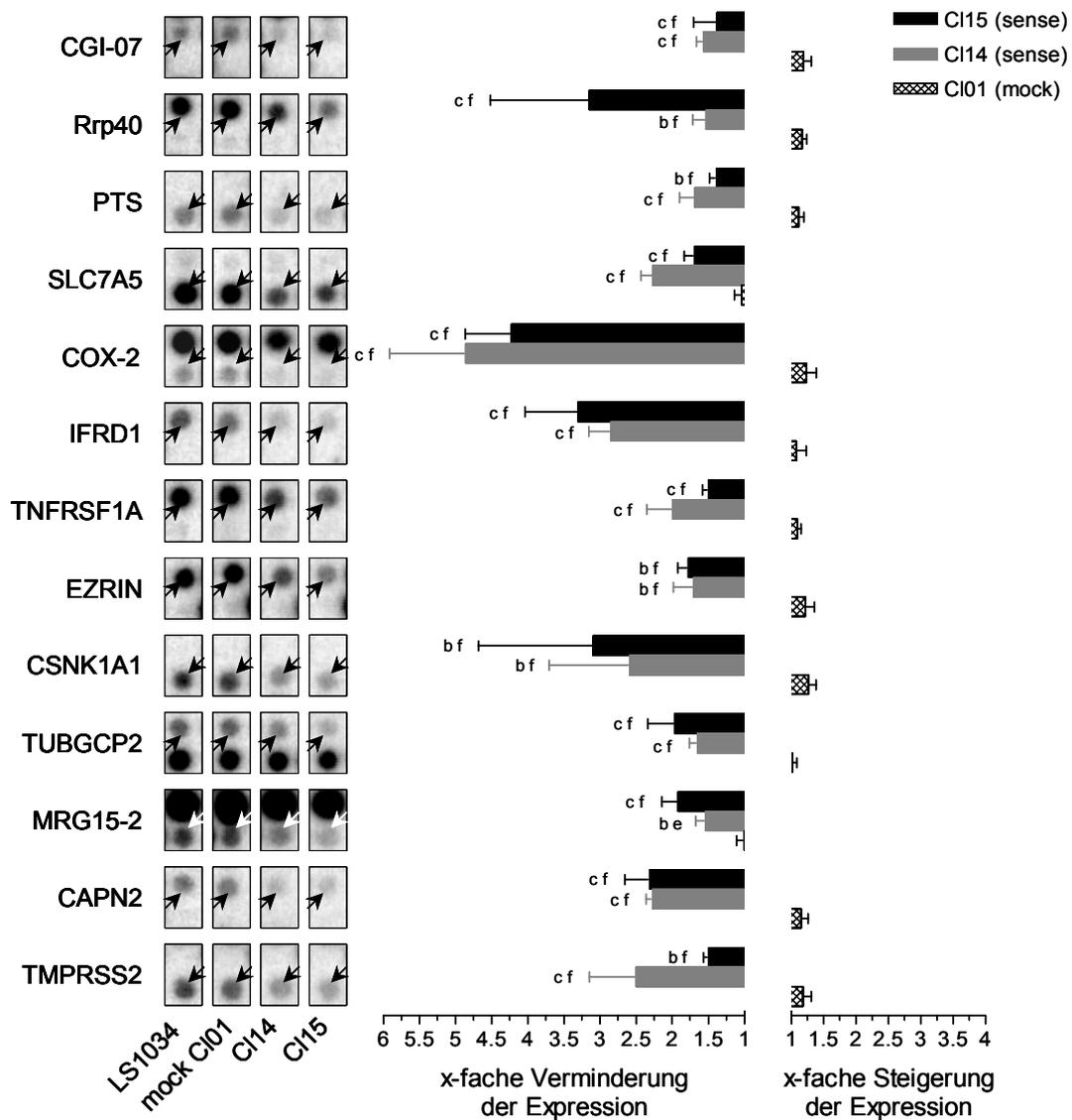


Abb. 44: Durch mIGFBP-4 in ihrer Menge reduzierte Transkripte.

Links in der Abbildung sind die Abkürzungen der identifizierten Gene aufgelistet, deren mRNA-Spiegel durch IGFBP-4 Expression abnehmen. Repräsentative Hybridisierungsintensitäten aus LS1034, der mock-Kontrolle (CI01) und aus den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14, CI15) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die korrespondierenden Ratios der Signalintensitäten der cDNAs von transfizierten Zellen zu LS1034-Zellen graphisch dargestellt. Die Ratios sind als Mittelwert \pm SD mit $n = 5$ angegeben. Signifikante Unterschiede mIGFBP-4-exprimierender Klone zu den Kontrollen wurden wie folgt gekennzeichnet: ^a*P*<0,05, ^b*P*<0,01, ^c*P*<0,001 (versus LS1034) und ^d*P*<0,05, ^e*P*<0,01, ^f*P*<0,001 (versus CI01).

Tab. 5: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch miGFBP-4 Expression in LS1034-Zellen vermindert wurden.

cDNA/Gen	Genbank "Accession number"	Homologie (%)	Protein Funktion
Homo sapiens transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2)	NM_005656	99,6	Serinprotease
Homo sapiens calpain 2 (m/II) large subunit (CAPN2)	NM_001748	100	Calcium aktivierte Protease,
Homo sapiens MORF-related gene 15 (MRG15)	NM_006791	100	Protein des Zellzyklus
Homo sapiens tubulin gamma complex associated protein 2 (TUBGCP2)	NM_145806	100	Komponente des " <i>Tubulin-γ complex</i> " in der mitotischen Spindel
Homo sapiens casein kinase 1, alpha 1 (CSNK1A1)	NM_001892	100	Proteinkinase
Homo sapiens villin 2 (EZRIN) (VIL2)	NM_003379	100	Substrat der Protein-Tyrosinkinase
Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A (TNFRSF1A)	NM_001065	100	Signaltransduktion, TNF-receptor
Homo sapiens interferon-related developmental regulator 1 (IFRD1)	NM_001550	100	Während der zellulären Differenzierung und der Entwicklung reguliert
Homo sapiens prostaglandin-endoperoxidase synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2) (COX-2)	NM_00963	99	Prostaglandin-Biosynthese Tumormarker
Homo sapiens solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y system) member 5 (SLC7A5)	NM_003486	100	Aminosäure Transporter
Homo sapiens 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTS)	NM_000317	99	Neurotransmitter-Biosynthese
Homo sapiens exosome component Rrp40 (Rrp40)	AF281132	100	Komponente des Exosomen Komplexes, 3'-5' Exoribonuclease Aktivität
Homo sapiens CGI protein (CGI-07)	NM_015938	99	Unbekannt Elektronentransport

Die angegebene Homologie in % zeigt die Ähnlichkeit der sequenzierten cDNAs zu den Sequenzen, die durch BLAST-Datenbank-Suche identifiziert wurden. Darüber hinaus ist, soweit bekannt, noch die Proteinfunktion des Genprodukts angegeben.

Von den 25 mRNAs, die durch mIGFBP-4 vermindert wurden, waren zwölf auch durch die Transfektion beeinflusst, d.h. in mock-transfizierten Zellen (CI01) lagen im Vergleich zur Mutterlinie signifikant veränderte Transkript-Spiegel vor. Drei dieser zwölf Gene, wiesen in der mock-Kontrolle erniedrigte mRNA-Spiegel auf, allerdings waren die mRNA-Spiegel dieser Gene in den mIGFBP-4-exprimierenden Zellen nochmals signifikant gegenüber der mock-Kontrolle reduziert (Abbildung 45). Bei diesen Genen handelte es sich um den Tumormarker Gluthathion S-Transferase (GSTPI) [5], sowie die Phosphoserin-Aminotransferase (PSA) und die Asparaginsynthetase (ASNS), die im Metabolismus der Zelle eine Rolle spielen [36] bzw. eine Funktion im Zellzyklus besitzen [220] (Abbildung 45). Neun der zwölf durch Transfektion beeinflussten mRNAs wiesen signifikant höhere Spiegel als die LS1034-Mutterlinie auf (Abbildung 45). In den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14, CI15) hingegen wurde die Expression dieser mRNAs signifikant gegenüber der Mutterlinie und der mock-Kontrolle reduziert. Dies betraf z.B. die mRNA-Spiegel der Tumormarker CEACAM5 und CEACAM6 [217] (Abbildung 45). Des Weiteren wurden durch mIGFBP-4 Transkripte Zellzyklus-relevanter Gene signifikant reduziert, wie die von EREG, einem Wachstumsfaktor der EGF-Familie [589], des am Auf- und Umbau des Zytoskeletts beteiligten Gens CLP-36 [322], sowie von APLP2 [609] und von EMP1 [366]. Auch die Transkript-Spiegel des am Anionen-Transport beteiligten Gens VDAC2, eines an der Stressantwort beteiligten Gens (HIG1) und einer Protease (BACE) [235] nahmen signifikant ab.

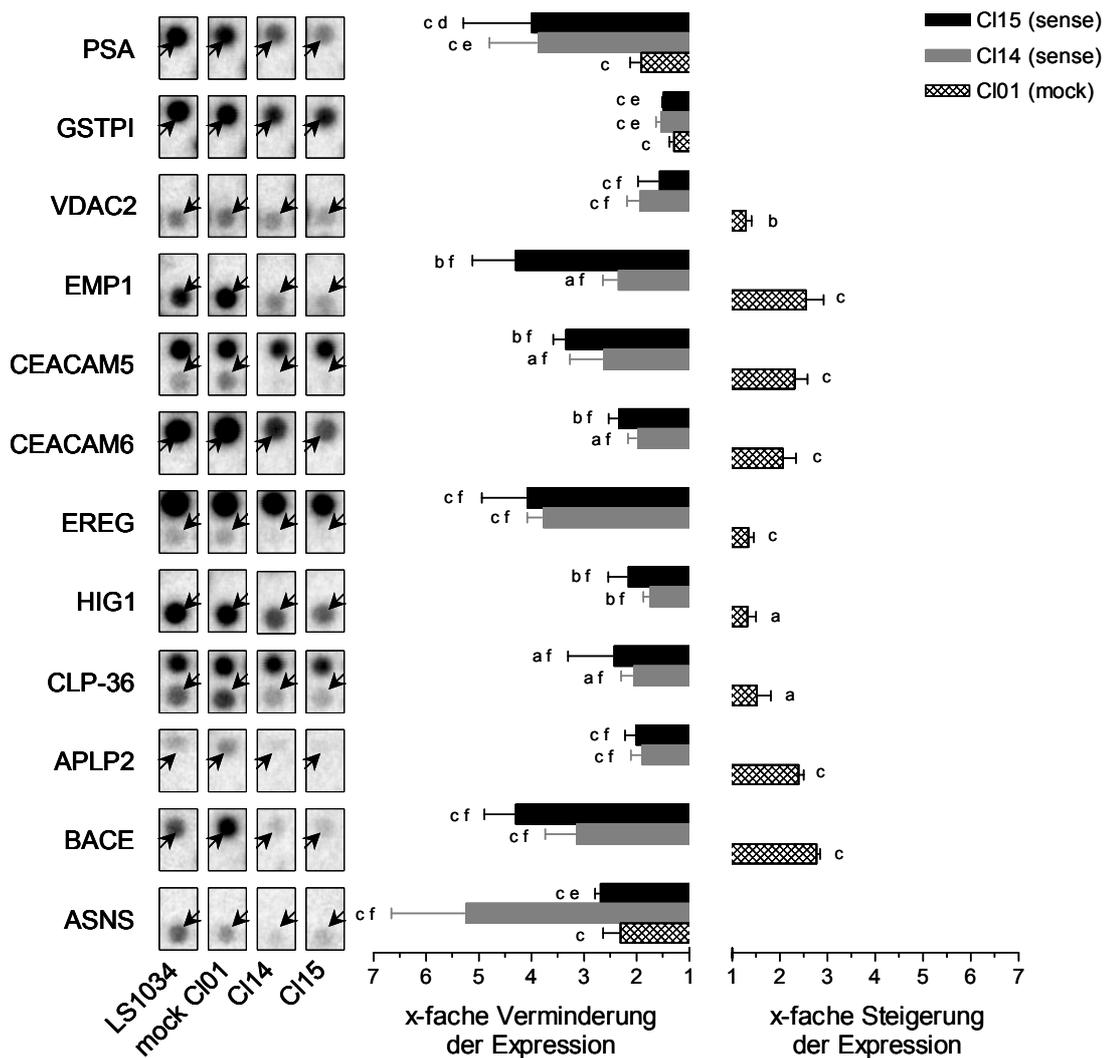


Abb. 45: Transkripte, die in ihre Menge durch miGFBP-4 und durch die Transfektion beeinflusst wurden.

Links in der Abbildung sind die Abkürzungen der identifizierten Gene aufgelistet, die sowohl durch miGFBP-4 (CI14, CI15) als auch durch die Transfektion alleine (CI01) auf mRNA-Ebene beeinflusst wurden. Repräsentative Hybridisierungen aus LS1034, der mock-Kontrolle (CI01) und aus miGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14 und CI15) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der rechten Seite der Abbildung wurden die korrespondierenden Ratios der Signalintensitäten der cDNAs von transfizierten Zellen zu LS1034-Zellen graphisch dargestellt. Die Ratios sind als Mittelwert \pm SD mit $n = 5$ angeben. Signifikante Unterschiede zwischen miGFBP-4-exprimierenden Klonen und LS1034-Zellen bzw. der mock-Kontrolle wurden mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet: ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ (versus LS1034) und ^d $P < 0,05$, ^e $P < 0,01$, ^f $P < 0,001$ (versus CI01).

Tab. 6: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch miGFBP-4 Expression, aber auch durch die Transfektion in LS1034-Zellen beeinflusst wurden.

cDNA/Gen	Genbank "Accession number"	Homologie (%)	Protein Funktion
Homo sapiens asparagine synthetase (ASNS), transcript variant 1	NM_13336	100	Wird für die G1-Progression benötigt
Homo sapiens beta-site APP-cleaving enzyme (BACE)	AF190725	99	atypischer Vertreter der Pepsin-Familie
Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 (APLP2)	NM_001642	100	In mitogenen Zellen stark vertreten
Homo sapiens PDZ-LIM protein mystique (CLP-36)	XM_011687	98	Adapter zwischen Kinasen und Zytoskelett
Homo sapiens hypoxia-inducible gene 1 (HIG1)	AF145385	100	Stress "response" Protein
Homo sapiens epiregulin (EREG)	NM_001432	100	Vertreter der EGF-Familie
Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6)	XM_029919	99	Tumor marker
Homo sapiens carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (CEACAM5)	NM_004363	99	Tumor marker
Homo sapiens epithelial membrane protein 1 (EMP1)	NM_001423	100	Zellzyklus-Protein Tumormarker
Homo sapiens, voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)	BC000165	100	Mitochondriales Integral-Membran Protein
Homo sapiens glutathione S-transferase pi (GSTPI)	NM_000852	100	S-conjugation von Glutathion
Homo sapiens phosphoserine aminotransferase (PSA) transcript variant 1	NM_058179	98	Serin-Biosynthese

Die angegebene Homologie in % zeigt die Ähnlichkeit der sequenzierten cDNAs zu den Sequenzen, die durch BLAST-Datenbank-Suche identifiziert wurden. Darüber hinaus ist, soweit bekannt, noch die Proteinfunktion des Genprodukts angegeben.

6.5.3 Transkripte, deren Menge durch die Transfektion beeinflusst wurde

Sechs Gene waren in Bezug auf ihre mRNA-Spiegel in den LS1034-Zellen durch den Transfektionsprozess und/oder die G418 Selektion signifikant verändert. Die Regulation dieser Gene durch die Transfektion unterschied sich nicht signifikant von der Regulation durch mIGFBP-4 (Abbildung 46).

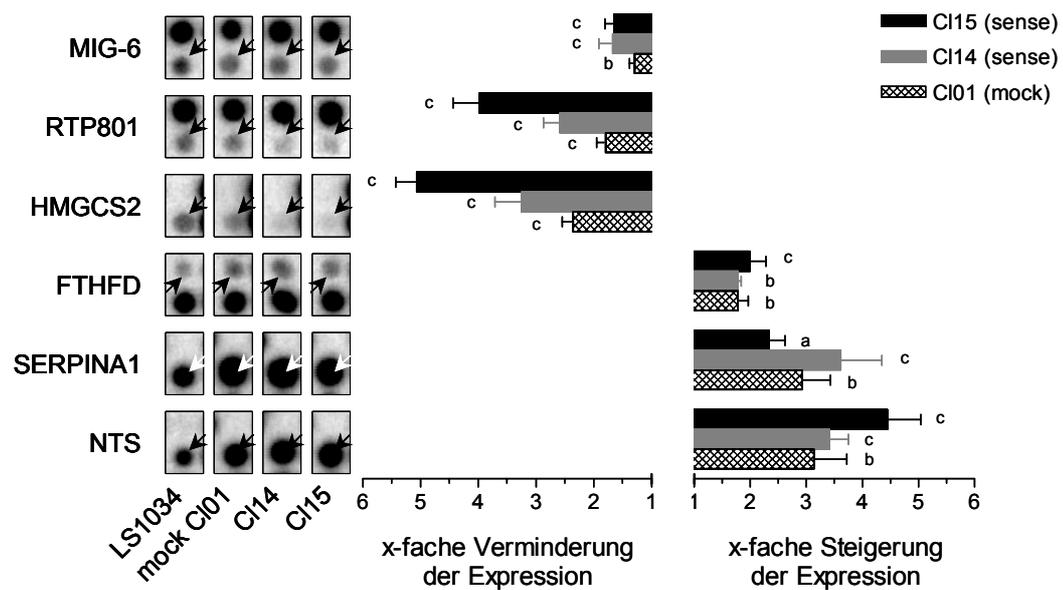


Abb. 46: mRNA-Spiegel, die durch den Transfektionsprozess und/oder die G418-Selektion verändert wurden.

Links in der Abbildung sind die Abkürzungen der identifizierten Gene aufgelistet, die durch den Transfektionsprozess und/oder die G418-selektion beeinflusst wurden. Repräsentative Hybridisierungssignale aus LS1034, der mock-Kontrolle (CI01) und aus mIGFBP-4-exprimierenden Klonen (CI14 und CI15) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Auf der rechten Seite der Abbildung sind die korrespondierenden Ratios der Signalintensitäten der cDNAs von transfizierten Zellen zu LS1034-Zellen graphisch dargestellt. Die Ratios sind als Mittelwert \pm SD mit $n=5$ angegeben. Signifikante Unterschiede mIGFBP-4-exprimierender Klone und der mock-Kontrolle zu LS1034-Zellen sind wie folgt gekennzeichnet: ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$, ^c $P < 0,001$ (versus LS1034).

Tab. 7: Nomenklatur der Gene, deren Transkript-Spiegel durch den Transfektionsprozess und/oder die G418-Selektion verändert wurden.

cDNA/Gen	Genbank "Accession number"	Homologie (%)	Protein Funktion
Human ribosomal nontranscribed spacer (HSRGNTS)	X12818	100	Unbekannt
Homo sapiens formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FTHFD) transcript variant 2	NM_144776	99	Aldehyd-Dehydrogenase
Homo sapiens serine proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin) member 1 (SERPINA1)	NM_000295	100	Serinproteaseinhibitor
Homo sapiens 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial) (HMGCS2)	NM_005518	100	Ketogenese
Homo sapiens HIF responsive RTP801 (RTP801)	AF335324	100	Stress "response" Protein
Homo sapiens Gene 33/Mig-6 (MIG-6)	NM_018948	100	Stress "response" Protein

Die angegebene Homologie in % zeigt die Ähnlichkeit der sequenzierten cDNAs zu den Sequenzen, die durch BLAST-Datenbank-Suche identifiziert wurden. Darüber hinaus ist, soweit bekannt, noch die Proteinfunktion des Genprodukts angegeben.

6.6 Wirkung von IGF-II auf die chemisch induzierte kolorektale Karzinogenese *in vivo*

6.6.1 Identifikation von PEPCK-IGF-II-transgenen Tieren

Die insgesamt 124 für den Versuch verwendeten Tiere wurden auf die Transgenintegration von PEPCK-hIGF-II untersucht. In 60 dieser Tiere konnte ein positives Signal für das humane IGF-II-Transgen nachgewiesen werden. Der Nachweis des Transgens in einigen Tieren bzw. das Fehlen des IGF-II-Signals in den nicht-transgenen Wurfgeschwistern (Wildtyp) ist in Abbildung 47 dargestellt.

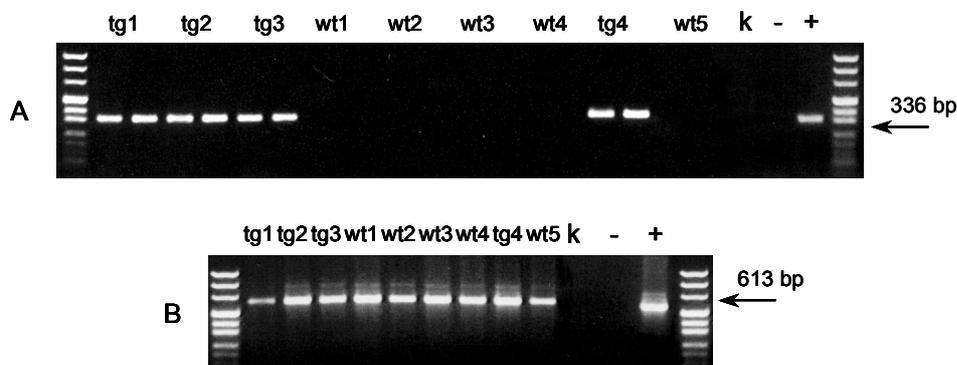


Abb. 47: PCR-Analyse der PEPCK-hIGF-II-transgenen (tg)- und Wildtyp (wt)-Tiere nach Kawasakiverdau der Schwanzprobe.

Der Nachweis des PEPCK-hIGF-II Transgens erfolgte mit IGF-II spezifischen Primern in einer Doppelbestimmung (A). Als Kontrolle wurde für jede Probe eine PCR mit β -Aktin spezifischen Primern durchgeführt (B). Die Größe des IGF-II Produktes betrug 336 bp, die des β -Aktins 613 bp. Die β -Aktin-Primer amplifizierten bei genomischer DNA als Matrize noch zusätzlich 2 schwache über der 613 bp großen Bande laufende Fragmente. Rechts und links wurde Puc Mix Marker 8 aufgetragen. Spur +: (Positivkontrolle), Spur -: (Negativkontrolle), Spur k: (Kawasaki-Puffer als zweite Negativkontrolle), Spur tg: (transgene Tiere); Spur wt: (wildtyp).

6.6.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Nach der Genotypisierung, die ab der dritten Lebenswoche stattfand, wurden die Tiere in vier Versuchsgruppen eingeteilt. Tiere mit gleicher Behandlung teilten sich einen Käfig, wobei die Anzahl der Tiere im Käfig maximal fünf Tiere betrug. Die Versuchsgruppen setzten sich zusammen aus Tieren, die mit DMH (40 mg/kg KG) behandelt wurden, und Kontrollgruppen, die kein Karzinogen erhielten.

-
- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1. PEPCK-IGF-II-transgene Tiere: | Behandlung: 6x DMH in NaCl-EDTA-Puffer |
| 2. nicht-transgene Wurfgeschwister: | Behandlung: 6x DMH in NaCl-EDTA-Puffer |
| 3. PEPCK-IGF-II-transgene Tiere: | Behandlung: 6x NaCl-EDTA-Puffer |
| 4. nicht-transgene Wurfgeschwister: | Behandlung: 6x NaCl-EDTA-Puffer |

In einem Vorversuch, in dem die DMH-Konzentrationen für die Induzierung von Tumoren in der späteren Phase ausgetestet wurde, erwies sich eine Konzentration von 20 mg DMH/kg KG als zu gering. Keines der Tiere entwickelte unter sechsmaliger Gabe von DMH in diesem Vorversuch Mikroadenome oder sichtbare Tumore (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund erhielten alle Versuchsgruppen, die mit DMH behandelt wurden, eine DMH-Konzentration von 40 mg/kg KG pro Injektion sowohl für die Induzierung von ACF in der frühen Phase (beurteilt fünf Wochen nach der letzten DMH-Injektion) als auch zur Untersuchung späterer Phasen (beurteilt 34 Wochen nach der letzten DMH-Injektion).

6.6.3 Wirkung der DMH-Behandlung auf die Expression von IGF-II im Kolon

Im Lebergewebe von Mäusen, die mit einem Leber-spezifischen Karzinogen behandelt worden waren, war eine dosisabhängige Reexpression von murinem IGF-II festgestellt worden [334]. Die Reexpression des endogenen IGF-II war unter PCR-Standardbedingungen zunächst nicht deutlich nachweisbar, weswegen eine zweistufige RT-PCR zum Nachweis endogenen IGF-IIs etabliert wurde [334]. Ob eine Behandlung mit DMH einen vergleichbaren Effekt auf die Expression von endogener IGF-II-mRNA im Kolon hatte, wurde mit der bereits etablierten RT-PCR mit den Spezies-spezifischen Primern untersucht. Zur Untersuchung des Kolons wurden repräsentativ drei IGF-II-transgene Tiere und vier nicht-transgene Tiere herangezogen, die jeweils DMH erhalten hatten. Als Kontrollen dienten drei IGF-II-transgene und zwei nicht-transgene Tiere, die nur das Vehikel injiziert bekommen hatten.

Wie aus Abbildung 48A hervorgeht, wiesen nur die IGF-II-transgenen Tiere eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe von 499 bp auf, die mit den Spezies-spezifischen Primern IGF-II#5 und hIGF-II#10 für humanes IGF-II amplifiziert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Transgen-Expression von humanem IGF-II im Kolon stattfindet und ist konform mit den bereits für dieses Mausmodell

veröffentlichten Daten [633].

Ob eine Reexpression von IGF-II im Kolon DMH-behandelter Tiere stattgefunden hatte, wurde zusätzlich mit den sensitiveren PCR-Bedingungen (zweistufige RT-PCR) überprüft. Die erste PCR (20 Zyklen) wurde mit den Maus-spezifischen Primern IGF-II#5 und mIGF-II#11 durchgeführt. Die nachfolgende PCR (25 Zyklen), wurde mit „nested“-Primern (IGF-II#5 und IGF-II#6) (Abbildung 48B) durchgeführt. Weder in DMH-behandelten noch in unbehandelten Tieren konnte endogene IGF-II-mRNA im Kolon detektiert werden (Abbildung 48B).

Aus dieser PCR kann geschlossen werden, dass DMH im Gegensatz zum Leber-spezifischen Karzinogen keinen Einfluss auf die Reexpression von IGF-II im Kolon hat und dass nur in IGF-II-transgene Tiere eine postnatale Expression von humanem IGF-II im Kolon nachweisbar ist.

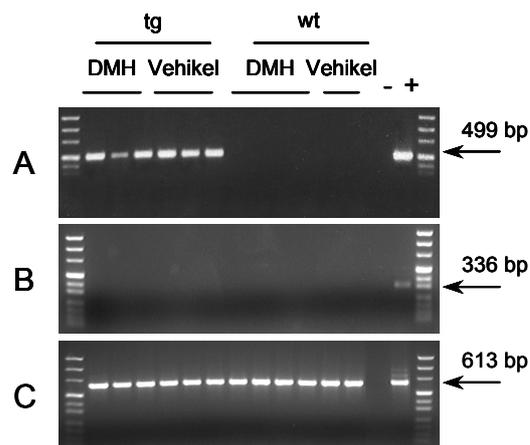


Abb. 48: Expression von hIGF-II und mIGF-II im Kolongewebe DMH-behandelter und unbehandelter Tiere.

Als Positivkontrollen (+) dienten für hIGF-II die genomische DNA eines PEPCK-IGF-II-transgenen Tieres und für mIGF-II cDNA aus einem 17 Tage alten Mausembryo. Als Negativkontrolle (-) wurde Aqua bidest. verwendet. Die Größen der amplifizierten Produkte entsprachen den erwarteten Banden; β -Aktin: 613 bp (C), humanes IGF-II: 499 bp (A) und endogene IGF-II Expression: 336 bp (B). Spuren tg = PEPCK-IGF-II-transgene Tiere; Spuren wt = Wildtyp; Spuren DMH = Tiere mit DMH-Behandlung; Spuren Vehikel = Tiere, die nur NaCl-EDTA-Puffer erhalten hatten.

6.6.4 Wirkung der DMH-Behandlung auf die Gewichtsentwicklung

Abbildung 49 stellt die Gewichtsentwicklung der vier verschiedenen Versuchsgruppen während der sechswöchigen DMH-Behandlung (siehe Punkt 5.5.1) und den darauffolgenden fünf Wochen dar. DMH-behandelte Tiere wiesen keinen

Unterschied zu ihren unbehandelten Kontrollen in der Gewichtszunahme auf. Ebenso hatte das IGF-II-Transgen keinen Effekt auf die Gewichtsentwicklung.

Der Verlauf der Gewichtsentwicklung über 34 Wochen nach der DMH-Behandlung unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den vier Gruppen (Daten nicht gezeigt).

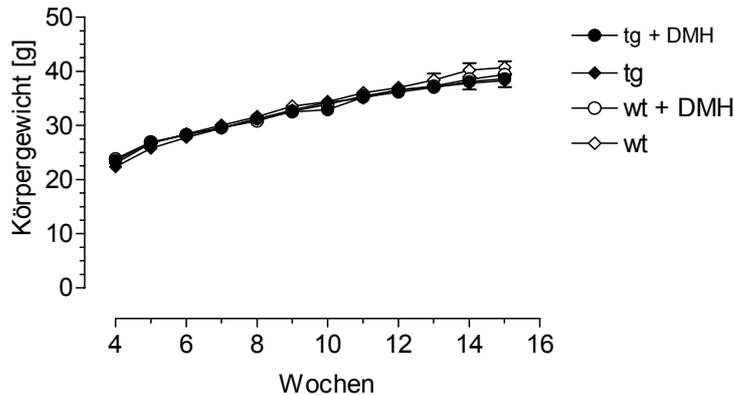


Abb. 49: Wachstumskurven von PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen (tg) und nicht transgenen Wurfgeschwistern (wt) mit oder ohne DMH-Behandlung.

6.6.5 Quantifizierung von ACF im Kolon nach Initiation mit DMH

Die Quantifizierung der Läsionen am ganzen Kolon fand mit der unter Punkt 5.5.6 beschriebenen Methylenblaulösung oder anhand der Bestimmung der Enzymaktivität von β -Hexosaminidase statt. Diese ersten Läsionen bestehen aus hyperproliferativem Epithel und werden als „*aberrante crypt foci*“ (ACF) bezeichnet. Sie sind im angefärbten Gewebe deutlich von den normalen Krypten zu unterscheiden. Kriterien dieser Auffälligkeiten sind ihre Größe und die Ausdehnung des Lumens in der Krypte. Darüber hinaus ist der äußere Rand der Krypte durch die unregelmäßige Anordnung der Kerne verdickt. Läsionen einzelner Krypten (AC) und Läsionen, die mehrere Krypten betreffen (ACF), entstanden nach einer Karzinogenbehandlung sowohl in IGF-II-transgenen Mäusen als auch in Wildtyptieren. In den nur mit Vehikel behandelten Kontrollgruppen der beiden Genotypen wurden zu keinem gemessenen Zeitpunkt solche Läsionen gefunden. Die Darmmukosa der nicht mit DMH-behandelten Tieren präsentierte sich mit gleichmäßiger Anordnung ihrer Krypten in der Methylenblaufärbung (Abbildung 50a) und die Aktivität der β -Hexosaminidase war ebenfalls in jeder Krypte nachweisbar (Abbildung 51a). Foci, die aus bis zu sechs AC (Abbildung 50b-f und 51b-f)

bestanden, konnten nach DMH-Behandlung sowohl in IGF-II-transgenen als auch in nicht-transgenen Mäusen dargestellt werden. Nach 15 Wochen wurden Foci mit mehr als acht betroffenen AC (Abbildung 50g) nur in IGF-II-transgenen Tieren festgestellt. Der Verlust der β -Hexosaminidase-Aktivität war nicht in allen AC gleich stark, trotzdem können bei dieser Art von Nachweis die morphologisch veränderten Krypten von normalem Gewebe unterschieden werden (Abbildung 51b-g).

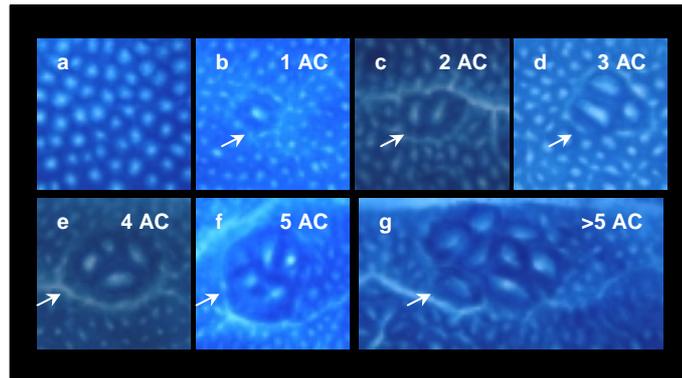


Abb. 50: Methyleneblau-gefärbte Kolonmukosa des frischen ungeschnittenen Kolons aus DMH-behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Aufnahmen zeigen repräsentative Beispiele von ACF mit unterschiedlicher Anzahl betroffener AC im Foci. Vergrößerung (50 x 0,5).

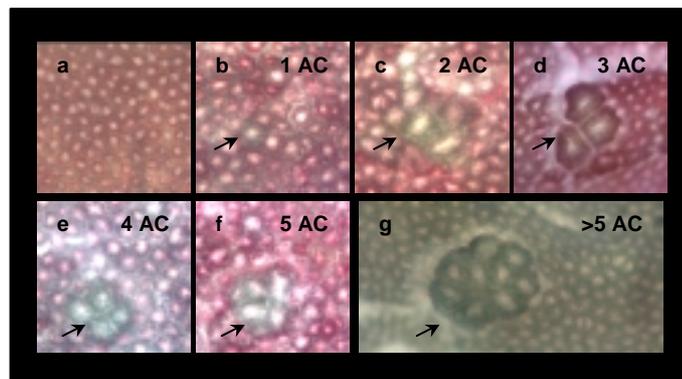


Abb. 51: Nachweis der β -Hexosaminidase-Aktivität am frischen ungeschnittenen Kolon von DMH-behandelten und unbehandelten Tieren.

Die Aufnahmen zeigen repräsentative Beispiele von ACF mit unterschiedlicher Anzahl AC im Foci. Morphologisch veränderte ACF zeigen eine verringerte oder keine β -Hexosaminidase-Aktivität. Vergrößerung (50 x 0,5).

Entsprechend der Anzahl bzw. der „*crypt multiplicity*“ aberranter Krypten in einem ACF, konnten in den DMH-behandelten Tieren ACFs unterschieden werden, die aus 1, 2, 3, 4 oder mehr als 5 AC zusammengesetzt waren. Die quantitative Auswertung

morphologisch veränderter Foci (ACF) in DMH-behandelten IGF-II-transgenen Mäusen und im Wildtyp ist in Abbildung 52 dargestellt. In der frühen Phase, d.h. 5 Wochen nach der letzten DMH-Injektion, entwickelten PEPCK-IGF-II-transgene Tiere deutlich mehr ACF. Hierbei waren ACFs, die aus mindestens 3 AC zusammengesetzt waren, in IGF-II-transgenen Tieren signifikant ($***P<0,001$; $*P<0,05$) gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abbildung 52). In der späten Phase, d.h. 34 Wochen nach der letzten DMH-Injektion, hatte sich die Gesamtzahl der ACF sowohl in IGF-II-transgenen als auch in nicht-transgenen Tieren stark zurückentwickelt. Es kam insbesondere zu einer signifikanten Abnahme ($^cP<0,001$) von ACF mit 1-3 AC im Focus gegenüber der frühen Phase, während die Anzahl der ACF mit mehr als 3 AC im Focus nahezu konstant blieb. In der späten Phase konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl von AC in einem ACF zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (Abbildung 52).

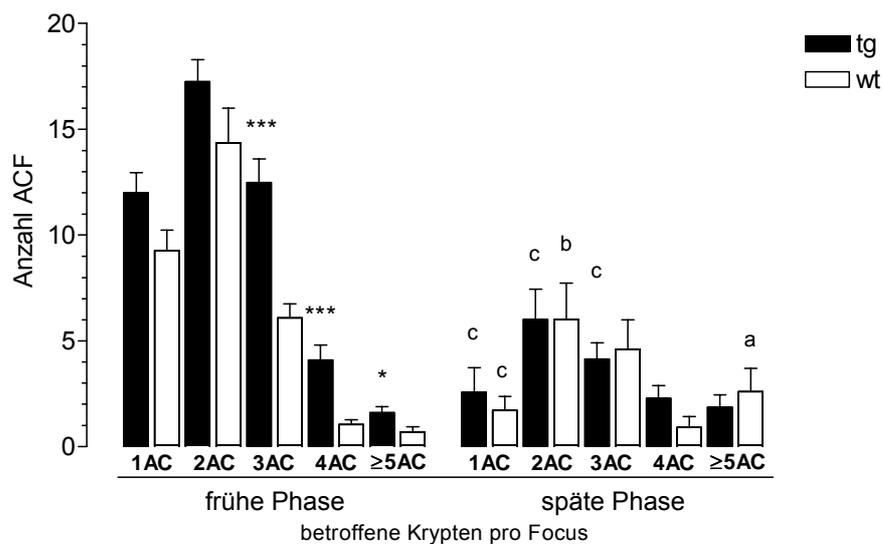


Abb. 52: Anzahl von ACFs mit unterschiedlicher Anzahl ACs im Focus in IGF-II-transgenen Mäusen (tg) oder ihren Wildtyp Wurfgeschwistern (wt).

$***P<0,001$, $*P<0,05$ zeigen signifikante Unterschiede zwischen den zwei Genotypen auf. Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen genetischen Gruppe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten an ($^aP<0,05$, $^bP<0,01$, $^cP<0,001$).

Aus der Zusammenfassung aller ermittelten Foci pro Genotyp ergibt sich eine signifikant ($***P<0,001$) höhere Gesamtanzahl der ACF in PEPCK-IGF-II-transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp in der frühen Phase (Abbildung 53). Insgesamt war die Ausbildung von ACF in IGF-II-transgenen Tieren um ca. 63 % gegenüber dem Wildtyp gesteigert.

Innerhalb der späten Phase konnte kein Unterschied der gesamten ACF zwischen IGF-II-transgenen Tieren und dem Wildtyp festgestellt werden. Im Vergleich zur frühen Phase wurden in der späten Phase 67 % weniger ACF in PEPCK-IGF-II-transgenen Tieren verzeichnet. Für diese Abnahme der Gesamtzahl der ACF ergibt sich in PEPCK-IGF-II-transgenen Tiere eine Signifikanz von $^cP < 0,001$. Der Rückgang von 55 % der ACF von der frühen bis zur späten Phase war im Wildtyp ebenfalls signifikant ($^aP < 0,05$) (Abbildung 53).

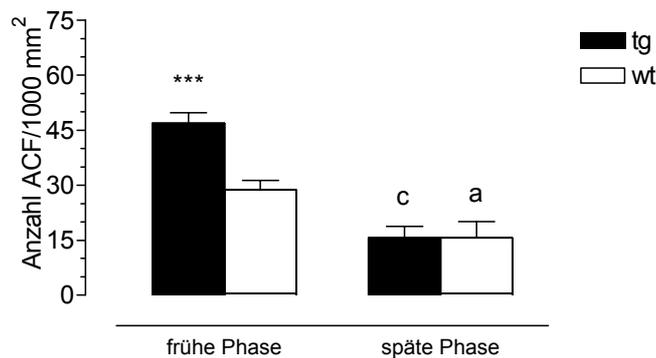


Abb. 53: Gesamtanzahl an ACF in DMH-behandelten Mäusen.

Nur DMH-behandelte Mäuse entwickelten ACF in der frühen und in der späteren Phase der Karzinogenese. $***P < 0,001$ zeigt signifikante Unterschiede der ACF-Gesamtzahl zwischen den zwei Genotypen in der frühen Phase. Buchstaben geben signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen genetischen Gruppe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten an ($^cP < 0,001$, $^aP < 0,05$).

6.6.6 Quantifizierung von IGF-II im Serum

Um die Menge von IGF-II mit der Anzahl der entwickelten Foci zu korrelieren, wurde IGF-II im Serum aller Versuchstiere mit Hilfe eines RIAs quantifiziert (Abbildung 54). IGF-II-transgene Tiere zeigten signifikant ($***P < 0,001$) höhere IGF-II-Spiegel im Serum als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister, sowohl im Alter von 15 (3-fach) als auch im Alter von 44 Wochen (2,3-fach). Die Menge des im Blut zirkulierenden IGF-II nahm in allen getesteten Mäusen mit dem Alter zu. Eine Behandlung mit DMH hatte keinen Einfluss auf die Höhe von IGF-II im Serum.

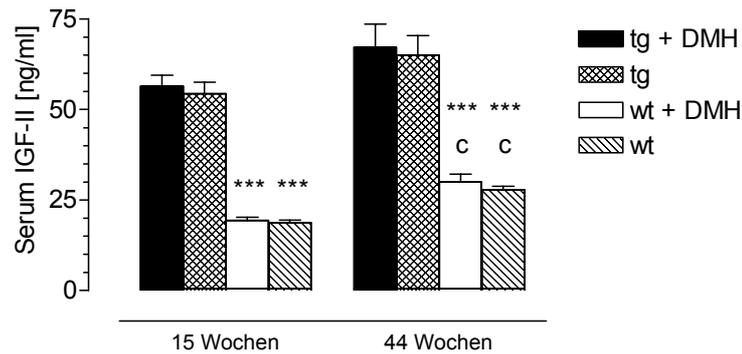


Abb. 54: Effekte von DMH und Alter auf die Serum-IGF-II-Spiegel von IGF-II-transgenen und nicht-transgenen Mäusen.

Signifikante ($^{\circ}P < 0,001$) Unterschiede innerhalb der genetischen Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten sind durch Buchstaben gekennzeichnet. $***P < 0,001$ zeigt die signifikante Differenz zwischen den beiden Genotypen zum selben Zeitpunkt.

6.6.7 Korrelation der Serum-IGF-II-Spiegel mit der Anzahl von entwickelten ACF

Im frühen Stadium der Tumorentstehung konnte ein Bezug zwischen der Gesamtzahl entwickelter ACF und dem IGF-II im Serum hergestellt werden (Abbildung 55). In der späten Phase konnte diese Korrelation in Anbetracht des fehlenden Effekts von IGF-II auf die ACF-Entwicklung zum späteren Zeitpunkt (Abbildung 53) nicht hergestellt werden (Abbildung 55).

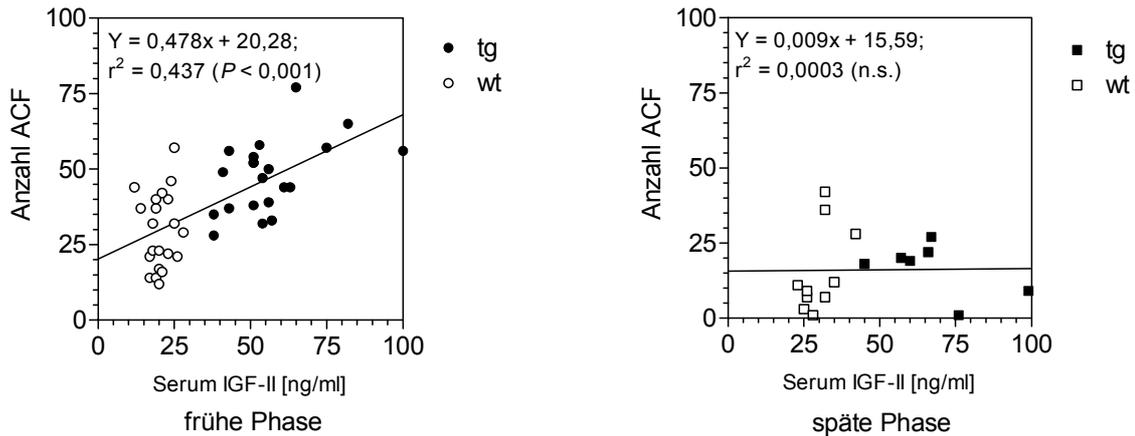


Abb. 55: Korrelation von Serum-IGF-II und der Anzahl gebildeter ACF.

Korrelation zwischen dem Serum-IGF-II-Spiegel und der Gesamtzahl von ACF pro Maus in PEPCCK-IGF-II-transgenen Mäusen (tg) und Wildtyp (wt) nach DMH-Behandlung in der frühen Phase (links) und späten Phase (rechts) der Transformation. Eine signifikante Korrelation ($P < 0,001$) konnte nur in der frühen Phase festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant).

6.6.8 Darstellung von ACF im histologischen Schnitt

Während die quantitative Auswertung von morphologisch veränderten Krypten am frischen Darm unter Verwendung der beschriebenen Methoden erfolgte, wurden ACF auch anhand einer histologischen Färbung im Schnitt identifiziert. ACF scheinen sich nicht nur in der Anzahl ihrer betroffenen Krypten zu unterscheiden, sondern zeigen in der H&E-Färbung auch unterschiedliche Grade der Dysplasie.

Abbildung 56A stellt einen Querschnitt durch Kolongewebe eines unbehandelten Tieres dar. In den Krypten kann man die deutlich ausgeprägten Becherzellen sehen, die das sekretorische Kompartiment im Kolon darstellen. Basolateral ordnen sich gleichmäßig die runden Kerne an. Abbildung 56B zeigt Ausschnitte aus der Kolonmukosa von DMH-behandelten Tieren im H&E-Schnitt links und nach BrdU-Färbung rechts. In Abbildung 56B weisen die ACs im ACF noch Becherzellen mit Schleimproduktion auf, während die Kerne am äußeren Rand anfangen, sich palisadenförmig zu staffeln. Dies geht einher mit dem Verlust der Stratifikation. Darüber hinaus weisen die Kerne eine eher längliche anstatt einer runden Form auf, ein Zeichen für den Beginn einer Zellteilung. In der BrdU-Färbung zeigt dieser AC noch keine gesteigerte Proliferation. Gegenüber dieser noch moderaten Form von Dysplasie zeigen die ACs der in Abbildung 56C dargestellten ACF keine Becherzellen mehr, und auch der stark ausgeprägte Verlust der Stratifikation und die

Form der Kerne sind Anzeichen einer stärkeren Dysplasie. Die obere Reihe im Bild zeigt Schnitte nach H&E-Anfärbung, die untere Reihe Schnitte nach einer immunhistochemischen Färbung mit BrdU. Die verstärkte BrdU-Antikörper Bindung an das in die DNA von S-Phasezellen inkorporierte BrdU zeigt, dass die gesteigerte Proliferation mit dem Rückgang des sekretorischen Kompartiments im Kolon und dem Verlust der Kernanordnung assoziiert sind. Umliegende gesunde Krypten zeigen hingegen keine gesteigerte Proliferation (Abbildung 56C)

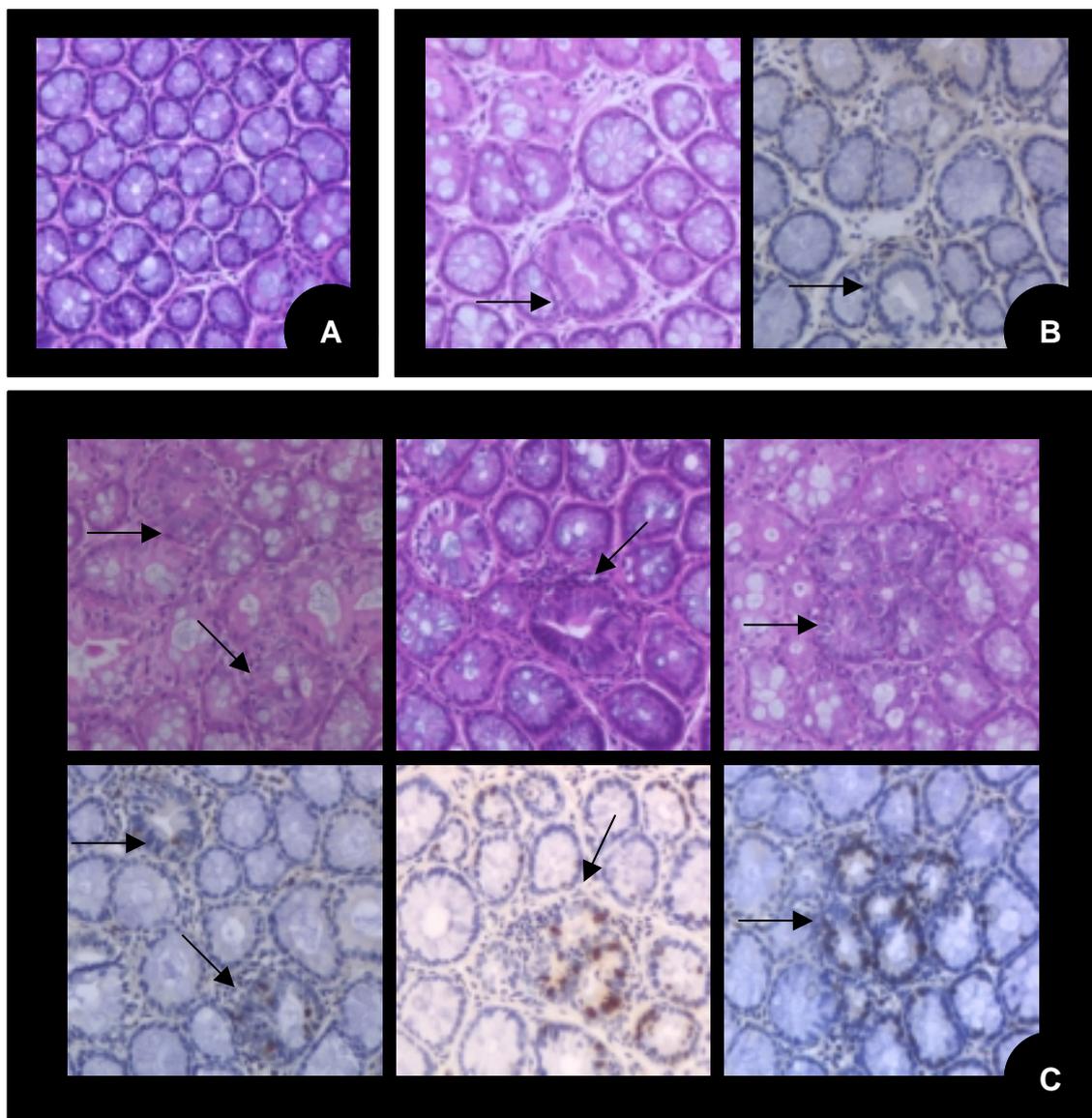


Abb. 56: ACF im H&E-Schnitt und nach Immunhistochemischerfärbung des inkorporierten BrdU.

Histologischer Schnitt der Kolonmukosa von einem unbehandelten Tier (A) und nach DMH-Behandlung (B und C). Linkes Bild (B) und obere Reihe (C) H&E x100. Rechtes Bild (B) und untere Reihe (C) korrespondierende BrdU-Färbung der Darmabschnitte mit ACF-Bildung.

6.6.9 Tumorentwicklung in der späten Phase der Karzinogenese

Während es in der frühen Phase der Karzinogenese ausschließlich zur Entwicklung von ACF kam, erwies sich die sechsmalige Dosis von 40 mg/kg KG als ausreichend, um sichtbare Tumore (Abbildung 57) sowohl in PEPCK-IGF-II-transgenen (B und C) als auch in Wildtyp Mäusen (A) in der späten Phase zu induzieren. Tumore in den IGF-II-transgenen Tieren waren sichtbar größer (Abbildung 57B und C).

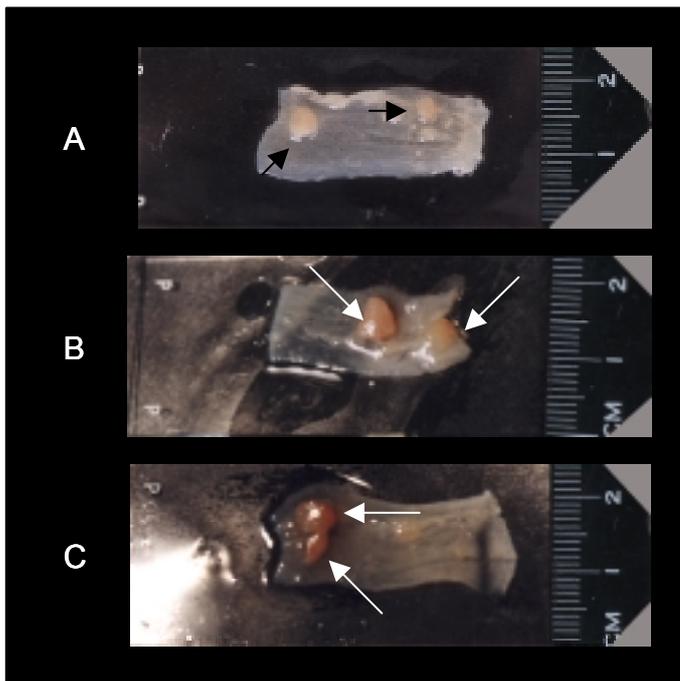


Abb. 57: Sichtbare Tumore auf der Darmmukosa 34 Wochen nach der letzten DMH-Injektion.

Darmabschnitt aus einem nicht-transgenen Tier (A) und Darmabschnitte aus PEPCK-IGF-II-transgenen Tieren (B und C). IGF-II-transgene Tiere entwickelten sichtbar größere Tumore.

56 % (4 von 7) der IGF-II-transgenen Tiere und 40 % (4 von 10) der nicht-transgenen Tiere entwickelten neben ACF sichtbare Tumore (Tabelle 7). Während in IGF-II-transgenen Tieren die Tumorzinzidenz im mittleren und distalen Abschnitt des Kolons gleich war, trat im Wildtyp die Mehrheit 87,5 % der Tumore im distalen Kolon und nur 12,5 % im mittleren Segment des Kolons auf.

Tab. 8: Inzidenz, Verteilung und Gesamtanzahl der Tumore.

Genotyp	n	Tumor Inzidenz	Gesamtzahl d. Tumore	Kolonabschnitt		
				Proximal	Transversal	Distal
PEPCK-IGF-II	7	4 (56 %)	12	0	6 (50 %)	6 (50 %)
Wildtyp	10	4 (40 %)	8	0	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)

n: Anzahl der Mäuse

Die Anzahl der Tumore pro Tier ist aus Abbildung 58 ersichtlich. Ein IGF-II-transgenes Tier entwickelte 6 Tumoren und ein Mikroadenom. Aus diesem Grund erhöht sich der Mittelwert der gebildeten Tumore pro Tier in den IGF-II-transgenen Tieren etwas, aber nicht signifikant gegenüber den nicht-transgenen Tieren.

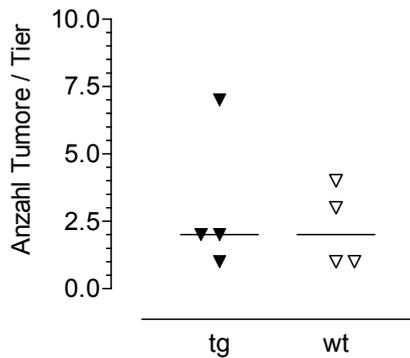


Abb. 58: Effekt von IGF-II auf die Anzahl der Tumore.

56 % der IGF-II-transgenen und 40 % der nicht-transgenen Mäuse entwickelten 34 Wochen nach der letzten DMH-Injektion Tumore. Die horizontale Linie zeigt den Median innerhalb des Genotyps an. Dafür wurde die Gesamtanzahl der Tumore pro Genotyp durch die Anzahl der Tiere geteilt, die Tumore entwickelt hatten.

PEPCK-IGF-II-transgene Tiere entwickelten zwar pro Tier nicht signifikant mehr Tumore als nicht-transgene Tiere, aber die Tumore IGF-II-transgener Tiere wiesen ein größeres Volumen auf. Die Erhöhung um das 5,7-fache des Tumorumfanges in PEPCK-IGF-II Mäusen gegenüber der nicht-transgenen Gruppe war signifikant (Abbildung 59).

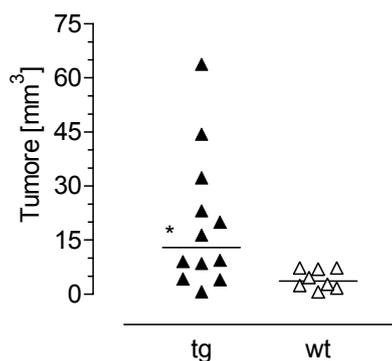


Abb. 59: Effekt von IGF-II auf das Tumorumfang.

Das Tumorumfang wurde mit der Formel $V = 4/3 \pi r^3$ berechnet. Die horizontale Linie zeigt den Median innerhalb des jeweiligen Genotyps an. Das Tumorumfang in IGF-II-transgenen Tieren ist signifikant erhöht (* $P < 0,05$)

6.6.10 Korrelation der IGF-II-Spiegel im Serum mit der Anzahl und dem Volumen der entwickelten Tumore

Die Höhe von IGF-II im Serum korrelierte nicht mit der Anzahl der entwickelten Tumore pro Tier (Abbildung 60). Allerdings konnte gezeigt werden, dass der

Mittelwert der gemessenen Tumorzahlen pro Tier mit der Höhe des IGF-II im Serum korreliert ($r^2=0,701$).

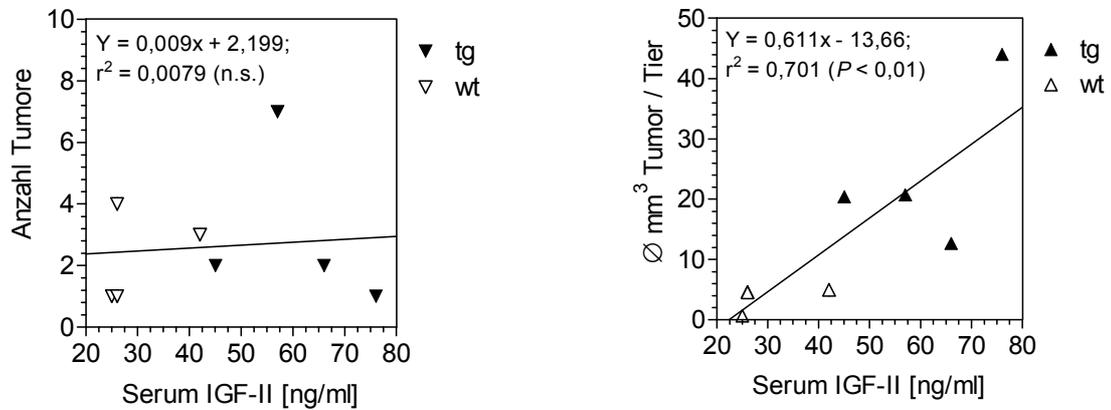


Abb. 60: Korrelation von Serum-IGF-II mit Tumoranzahl und TumorgroÙe.

Korrelation zwischen Serum-IGF-II-Spiegel und der Anzahl von Tumoren pro Maus in PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen (tg) und Wildtyp (wt) nach DMH-Behandlung (links). Korrelation zwischen Serum IGF-II-Spiegel und dem Durchschnittsvolumen von Tumoren pro Maus in PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen (tg) und Wildtyp (wt) nach DMH-Behandlung (rechts). Eine signifikante Korrelation ($**P < 0,01$) zwischen dem Tumorzahlen und dem IGF-II-Spiegel im Serum konnte festgestellt werden (n.s. = nicht signifikant).

7 Diskussion

7.1 IGFBP-4 und Kolonkarzinogenese

IGF-Bindungsproteine nehmen durch die Bindung ihrer Liganden IGF-I und IGF-II starken Einfluss auf die Wachstumskontrolle einer Zelle. Ausserdem besitzen IGFBPs auch Wirkungen, die unabhängig von der Bindung der IGFs sind, wie z.B. Effekte auf die Wachstumsregulation oder die Migration bei der Wundheilung [184]. Die Bedeutung der IGFBPs für die Wachstumsregulation wird auch dadurch deutlich, dass Veränderungen von IGFBP-Spiegeln im Serum mit Prozessen der Kanzerogenese assoziiert sind. So findet man z.B., dass niedrige IGFBP-3-Spiegel im Serum mit einem erhöhten Risiko an einem CRC zu erkranken [210,211] assoziiert sind oder dass niedrige IGFBP-3-Spiegel mit einem progressiven Verlauf der Prostatakarzinogenese in Verbindung stehen [582,583]. IGFBP-2, das im gesunden Gewebe *in vivo* einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum besitzt [247,251], korreliert positiv in malignem Gewebe des Kolons [399] und der Prostata [582] mit dem Grad der Malignität [250,496] und dem Auftreten von Metastasen [250,496]. IGFBP-4, für das sowohl in Bezug auf das Wachstum normaler Zellen, als auch auf das von Tumorzellen, fast ausschließlich inhibitorische Eigenschaften gezeigt wurden [184], ist in der Lage, die IGFBP-2-Proteinspiegel in Prostatakarzinomzellen zu senken [152]. Inwieweit IGFBP-4 in der Kolonkarzinogenese ein Rolle spielt, war bislang kaum bekannt.

Um die Rolle von IGFBP-4 in der kolorektalen Karzinogenese im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Kolonkarzinomzellen respektive ihres Expressionsmusters von IGFBPs und IGF-II untersucht, um dieses im Vergleich zu einer nicht-transformierten Kolonozytenzelllinie darzustellen. Im weiteren Verlauf wurde auf die Wirkungen von IGFBP-4 fokussiert und IGF-abhängige sowie unabhängige Effekte dieses Bindungsproteins auf Tumor-relevante Parameter in drei unterschiedlichen Tumorzelllinien bestimmt. Schließlich erfolgte die Identifizierung von Genen, deren mRNA-Spiegel durch mIGFBP-4 Expression verändert werden, um Erklärungsansätze für die molekularen Wirkmechanismen von IGFBP-4 zu erhalten.

7.1.1 Expressionsmuster der IGFBPs in Kolonzelllinien

Die Expressionsanalyse der IGFBP-mRNAs in 21 untersuchten Kolonkarzinomzelllinien und der nicht-transformierten Kolonzelllinie NCOL-1 zeigte, dass IGFBP-4 in allen Zelllinien vertreten war. Da sowohl gesundes als auch malignes Kolongewebe IGFBP-4 exprimierten und IGFBP-4 in Tumorgewebe einer Regulation unterliegt [268,393,583], scheint IGFBP-4 zusammen mit weiteren Kolon-typischen IGFBPs für eine Regulation der IGF-Aktivität verantwortlich zu sein. Transkripte von IGFBP-1, -2, -3 und -6 waren in einigen, aber nicht allen 21 Zelllinien detektierbar. In der nicht-transformierten Kolonzelllinie NCOL-1 ist IGFBP-1 nicht vertreten, was zeigt, dass die Expression von IGFBP-1 für einige der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien charakteristisch ist. IGFBP-1 könnte in den Kolonkarzinomzellen eine verstärktes Wachstum bewirken, wie es in Keratinozyten und Fibroblasten gezeigt werden konnte [184,324]. Im Gegensatz zu IGFBP-1 werden IGFBP-2, -3 und -6 und auch IGF-II mRNA in NCOL-1-Zellen exprimiert. Auch bezüglich dieser Komponenten des IGF-Systems unterscheiden sich die Kolonkarzinomzellen mehr oder weniger deutlich von den nicht-transformierten Zellen. Da Bindungsproteine Einfluss auf die Proliferation, Invasion und/oder das Differenzierungsverhalten einer Zelllinie nehmen, kann die Veränderung der Expression eines oder mehrerer IGFBPs zu einem veränderten Verhalten der Zellen beitragen. IGFBP-5 besitzt als einziges Bindungsprotein scheinbar keine Bedeutung für den Transformationsgrad von Kolonozyten, da es weder in NCOL-1 Zellen noch in den meisten Kolonkarzinomzellen vorkommt.

7.1.2 Expression von mIGFBP-4

Antiproliferative Effekte von IGFBP-4 in Kolonkarzinomzellen wurden in Bezug auf ihre IGF-Abhängigkeit bislang kontrovers diskutiert [449,553]. Darüber hinaus gab es bislang keinerlei Hinweise auf eine Beeinflussung weiterer Krebs-relevanter Parameter, wie die Koloniebildung oder die Invasion. In dieser Arbeit wurde deshalb die Wirkung von IGFBP-4 in drei verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien auf die Proliferation sowie auf spätere Stadien der malignen Progression untersucht. Späte Stadien der malignen Progression wurden anhand der Fähigkeit von Zellen sich in semi-soliden Medien zu teilen bzw. invasives Verhalten zu zeigen, beurteilt.

Die Auswahl der verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien wurde so getroffen, dass die

Möglichkeit gegeben war, zwischen IGF-abhängigen und IGF-unabhängigen Wirkungen von IGFBP-4 zu unterscheiden. LS1034, eine IGF-produzierende und IGF-sensitive Zelllinie, Isreco-2 eine IGF-sensitive Zelllinie, die kein IGF-II produziert, und Isreco-1, eine IGF-insensitive Zelllinie ebenfalls ohne endogenes IGF-II, wurden mit einem murinen IGFBP-4 Expressionsvektor transfiziert. Von jeder Zelllinie wurden stabile Klone, d.h. eine mock-Kontrolle, drei mIGFBP-4 sense-Klone und ein antisense-Klon etabliert.

Während endogenes IGFBP-4 in allen Mutterlinien und deren Klonen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, wurden Transkripte für mIGFBP-4 nur in mIGFBP-4 transfizierten Zellen gefunden.

In LS1034-Zellen zeigte sich, dass sowohl in der Mutterlinie als auch in den Klonen das unglykosylierte 24 kDa- und das glykosylierte 28 kDa-Protein [112,629] gebildet werden. Dahingegen wurde in Isreco-2- und Isreco-1-Zellen nur die unglykosylierte 24 kDa große Form von IGFBP-4 nachgewiesen. In den LS1034-Zellklonen wurde zusätzlich ein 18 kDa großes Protein detektiert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein proteolytisches Spaltprodukt, da durch IGF-abhängige und IGF-unabhängige Proteasen erzeugte Spaltprodukte von IGFBP-4 in dieser Größe bereits in der Literatur beschrieben wurden [85,135,346,495]. Da solche Spaltprodukte von IGFBP-4 nur in den LS1034-Zellklonen detektiert wurden und LS1034-Zellen als einzige Zellen endogenes IGF-II besitzen, kann man davon ausgehen, dass in LS1034-Zellen eine IGF-II-abhängige Protease aktiv ist, die IGFBP-4 spaltet und dieses Fragment erzeugt.

Die Funktionalität der detektierten IGFBP-4-Proteine wurde mit der Bindung von IGF-II in einem Westernligandenblot bestätigt. Der Nachweis der Bindung der 24 kDa großen unglykosylierten IGFBP-4-Form an IGF-II konnte in allen drei untersuchten Zelllinien erbracht werden. In den LS1034-Zellen und den korrespondierenden Klonen war die glykosylierte 28 kDa große IGFBP-4-Form ebenfalls fähig, IGF-II zu binden, während das Spaltprodukt keinerlei Bindungsaktivität zeigte. Spaltprodukte von IGFBP-4 können zwar prinzipiell noch über eine geringe IGF-II-Bindungsaktivität verfügen [570], allerdings lag diese, falls vorhanden, bei den hier angewendeten Methoden unterhalb der Nachweisgrenze.

Die sezernierte Menge von mIGFBP-4 in den sense-Klonen war deutlich höher als die sezernierte Menge des endogenen IGFBP-4 durch die Mutterlinie und die mock-Kontrolle. Durch die Expression von mIGFBP-4 in antisense-Richtung war die Menge des sezernierten endogenen IGFBP-4 im konditionierten Medium vermindert,

was vermuten lässt, dass die mIGFBP4-antisense-mRNA die humane IGFBP-4-mRNA blockiert.

7.1.3 Effekte von mIGFBP-4 auf Proliferation, Transformation und Invasion

Nachdem die Überexpression von mIGFBP-4 in den mIGFBP-4-transfizierten Klonen sichergestellt werden konnte, war die Voraussetzung für die Untersuchung von Parametern gegeben, die maßgeblich Einfluss auf die Karzinogenese nehmen.

Die basale Proliferation wurde durch die Überexpression von mIGFBP-4 nur in LS1034-Zellen gehemmt. Die Überexpression von mIGFBP-4 führte in dieser Zelllinie zum Abfangen des endogen gebildeten IGF-II, wodurch die IGF-II-vermittelte autokrine Stimulation in den sense-Klonen (CI12, CI14, CI15) unterdrückt wurde. Diese Annahme wird durch das Ergebnis unterstützt, dass der antisense-Klon (CI23) unter gleichen Bedingungen stärker als die LS1034-Zellen und die mock-Kontrolle wächst. Ausserdem zeigt die Applikation von IGF-II, dass der hemmende Effekt von IGFBP-4 auf die Proliferation aufgehoben werden kann. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Spiegel an freiem IGF-II maßgeblich die Proliferation in LS1034-Zellen beeinflussen.

Diese Hypothese wird bestätigt durch die in Isreco-1 und Isreco-2 erhaltenen Ergebnisse. Da Isreco-1- und Isreco-2-Zellen kein endogenes IGF-II besitzen, führt eine Überexpression von mIGFBP-4 hier zu keiner Änderung des basalen Proliferationsverhaltens. Bei Applikation von exogenem IGF-II zeigt sich, dass die Proliferation in der IGF-sensitiven Zelllinie Isreco-2 stimuliert, die IGF-II-stimulierte Proliferation aber durch IGFBP-4 reduziert wird. Isreco-1-Zellen und ihre korrespondierenden Klone zeigten keine Änderung im Wachstumsverhalten nach IGF-II-Applikation oder in Abhängigkeit von mIGFBP-4, da sie IGF-insensitiv sind.

Ähnliche Befunde ergaben sich auch bei Überexpression von IGFBP-4 in einer menschlichen IGF-sensitiven Prostatakarzinomzelllinie [152]. In dieser Zelllinie war zusätzlich zu einer IGFBP-4-bedingten Hemmung der Proliferation auch die Apoptose erhöht. Dass die Proliferation der sense-Klone in LS1034-Zellen und Isreco-2-Zellen bei IGF-II Zugabe nicht komplett auf das Niveau der Mutterlinie und mock-Kontrolle gehoben werden konnte, könnte mit darauf zurückzuführen sein, dass mIGFBP-4 möglicherweise auch Apoptose auslöste.

Die Wirkung von IGFBP-4 auf die Koloniebildung in semi-soliden Medien wurde bisher nur für Prostatakarzinomzellen und für Chondrozyten untersucht. In beiden Zelltypen wird die Koloniebildung durch IGFBP-4 unterdrückt und konnte durch Zugabe von IGF zum Teil wieder stimuliert werden [152,308]. Da durch eine Hemmung des IGF-IR mit spezifischen Antikörpern eine Reduzierung der Bildung von Kolonien von LS1034-Zellen in Methylcellulose gezeigt werden konnte [332], lag es nahe zu vermuten, dass die Koloniebildung von Kolonkarzinomzellen ebenfalls über IGF-abhängige Mechanismen gesteuert wird.

Allerdings konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die exogene Gabe von IGF-II keine Stimulierung der Koloniebildung in IGF-sensitiven LS1034-Zellen oder deren Klonen bewirken. Ebenso wie in LS1034-Zellen war auch in IGF-sensitiven Isreco-2-Zellen keine Stimulierung der Koloniebildung durch IGF-II zu finden, während mIGFBP-4 nicht nur die Koloniebildung in Isreco-2 und LS1034-Zellen reduzierte, sondern auch in der IGF-insensitiven Zelllinie Isreco-1. Die Ergebnisse belegen somit eindeutig einen hemmenden Effekt von IGFBP-4 auf die Koloniebildung von Kolonkarzinomzellen, der unabhängig von der IGF-Bindungskapazität von IGFBP-4 ist.

In Bezug auf die Beeinflussung der Migration durch das IGF-System konnte für Rhabdomyosarcoma-Zellen gezeigt werden, dass deren Migration durch IGF gesteigert wird [201]. Darüber hinaus konnte die Migration von Ovar-(CHO)-Zellen durch IGFBP-1 stimuliert werden [288]. Insgesamt wurden sowohl IGF-abhängige wie auch IGF-unabhängige Mechanismen beschrieben, welche die Migration transformierter Zellen beeinflussen können [526].

Eine Überexpression von mIGFBP-4 in LS1034-Zellen bewirkte eine deutliche Verringerung migrierender Zellen. Durch Zugabe von exogenem IGF-II konnte die durch mIGFBP-4 reduzierte Invasionsrate von LS1034-Zellen wieder erhöht werden. Da Isreco-1-Zellen keine Hemmung der Invasionsrate mIGFBP-4-exprimierender Klone zeigten, deutet dies darauf hin, dass die Hemmung der Invasion durch IGFBP-4 in den untersuchten Kolonkarzinomzelllinien von der Bindung von IGF abhängt.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Befunde von Reinmuth *et. al.* 2002, die die Wirkung eines dominant negativen IGF-IR in Kolonkarzinomzellen *in vivo* untersuchten [494]. Die dominant negative Form des IGF-IR führte zu vermindertem Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen verbunden mit einer verminderten

Proliferation der Kolonkarzinomzellen. Wurden die mit dem dominant negativen IGF-IR transfizierten Zellen in die Milz injiziert, waren sie im Gegensatz zu nicht-transfizierten oder mock-transfizierten Karzinomzellen nicht mehr in der Lage, Lebermetastasen zu bilden [494]. Bei der Metastasierung maligner Kolonkarzinomzellen hat demnach das IGF-IR-Signal eine wichtige Funktion. Damit kommt dem IGF-IR und seinem Liganden IGF-II eine bedeutende Rolle in der Progression eines Tumors zu.

Da sich LS1034-Zellen einerseits und Isreco-1- bzw. Isreco-2-Zellen andererseits in der Expression des glykosylierten IGFBP-4 unterscheiden, stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Glykosylierungsform und dem Effekt von IGFBP-4 auf die gemessenen Tumor-relevanten Parameter gibt. Für IGFBP-3, das ebenso wie IGFBP-4 einer N-Glykosylierung unterliegen kann, wurde gezeigt, dass unglykosyliertes IGFBP-3 stärker an die Zellmembran bindet und dadurch seine Affinität zu IGF vermindert wird. Dies bedeutet umgekehrt, dass eine N-Glykosylierung die Verfügbarkeit von IGFBP-3 für die IGF-Bindung unterstützt und somit inhibitorisch auf IGF-vermittelte Signale wirkt [183,184]. Eigenschaften von IGFBP-4, die mit seiner N-Glykosylierung zusammenhängen, wurden bisher nicht beschrieben. Zudem konnte auch noch keine direkte Assoziation von IGFBP-4 mit der Zellmembran nachgewiesen werden [184]. LS1034-Zellen, in denen mIGFBP-4 inhibitorisch auf alle drei gemessenen Parameter wirkte, exprimieren zusätzlich zur 24 kDa unglykosylierten IGFBP-4-Form auch das glykosylierte 28 kDa große IGFBP-4-Protein. In den ebenfalls IGF-sensitiven Isreco-2-Zellen konnte hingegen nur das 24 kDa große IGFBP-4-Protein detektiert werden. Die Hemmung der IGF-abhängigen Proliferation durch mIGFBP-4 findet allerdings sowohl in LS1034- als auch in Isreco-2-Zellen statt, was dafür spricht, dass die Glykosylierungsform von IGFBP-4 die Bindung von IGF-II nicht beeinflusst.

In Bezug auf die Invasion der Zellen, die ebenfalls IGF-abhängig war, kann ein Effekt von glykosyliertem IGFBP-4 nicht vollständig ausgeschlossen werden, da Isreco-2-Zellen in einer nicht ausreichenden Anzahl durch die Membran wanderten und so nicht als Kontrolle für die Wirkung von unglykosyliertem IGFBP-4 auf die Invasion zur Verfügung standen. Die fehlende Hemmung der Invasion von mIGFBP-4 in Isreco-1-Zellen könnte daher nicht nur auf die IGF-Insensitivität dieser Zelllinie zurückzuführen sein, sondern möglicherweise auch auf das Fehlen von glykosyliertem mIGFBP-4.

7.2 Genexpressionsanalyse

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, durch die Proliferation, Transformation und Migration von mIGFBP-4-exprimierenden Zellen beeinflusst wurden, diente eine Genexpressionsanalyse in LS1034-Zellen, deren mock-Kontrolle (CI01) und zwei sense-Klonen (CI14 und CI15). LS1034-Zellen wurden für diese Analyse ausgewählt, weil in dieser Zelllinie sowohl IGF-abhängige (Proliferation) als auch IGF-unabhängige Effekte (Koloniebildung) von mIGFBP-4 auftraten. Mit Hilfe von subtraktiven cDNA-Banken wurden cDNAs von solchen Genen angereichert, die durch die Überexpression von IGFBP-4 in ihrer Expression verändert wurden. Es wurden 1728 cDNA-Fragmente aus den subtraktiven cDNA-Banken mit cDNA-Array-Hybrisierungen analysiert. Davon waren 66 cDNA-Fragmente zwischen nicht-transfizierten und transfizierten LS1034-Zellen differentiell exprimiert. Nach Identifizierung dieser cDNA-Fragmente durch Sequenzierung konnten diese 39 verschiedenen Genen zugeordnet werden. Von diesen 39 Genen wurden die Transkripte von sieben Genen durch mIGFBP-4 hochreguliert. Verminderte mRNA-Spiegel durch mIGFBP-4 wurden bei 25 Genen detektiert. Obwohl die mock-Kontrolle sich bezüglich der untersuchten biologischen Parameter (Proliferation, Transformation und Invasion) nicht signifikant von der nicht-transfizierten Zelllinie unterschied, wurde deutlich, dass die Zellen auf die Transfektion und die anschließende G418-Selektion mit gesteigerter oder verminderter Expression bestimmter Gene reagierten. Zwölf der 25 Gene, deren Transkripte durch mIGFBP-4 vermindert wurden, wurden ebenfalls durch die Transfektion beeinflusst. Neun der durch mIGFBP-4 auf Transkriptebene reduzierten Gene wurden durch die Transfektion signifikant auf mRNA-Ebene erhöht. Drei Gene wurden durch die Transfektion auf Transkriptebene signifikant vermindert, allerdings waren diese mRNAs durch mIGFBP-4 signifikant stärker reduziert. Bei sechs Genen führte die Überexpression von mIGFBP-4 zu einer signifikanten Änderung der Transkriptmenge, die sich aber nicht signifikant vom Transfektionseffekt unterschied. Die Veränderung der Mengen spezifischer mRNAs durch den Transfektionsprozess ist am wahrscheinlichsten auf den Selektionsdruck während der Etablierung und Erhaltung von stabilen Klonen zurückzuführen. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass zwei der sechs Gene, RTP801 und MIG-6, die durch die Transfektion in deren Expression reduziert wurden, an der Stressantwort der Zelle beteiligt sind. Neben den Transkripten solcher „*stress-response*“ Gene wurden auch

zwei Gene des Metabolismus, die Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase und ein Gen, dessen Produkt (HMGCS2) im Mitochondrium den ersten Schritt der Ketogenese katalysiert [507] durch die Transfektion beeinflusst. Weiterhin wurde die mRNA von SERPINA1, das an der Regulation verschiedener proteolytischer Prozesse beteiligt ist [29] und als antiinflammatorisches Protein [177] gilt, in allen Klonen (sense-Klone und mock-Klon) mehr als 2-fach hochreguliert. Eine Zelle reagiert also deutlich mit veränderten Transkript-Spiegeln spezifischer Gene auf exogene Stress-Faktoren. Wie bereits erwähnt hatte die Veränderung dieser Gene jedoch keinen Einfluss auf das Proliferations- und Invasionsverhalten bzw. auf den Transformierungsgrad in LS1034-Zellen.

7.2.1 Effekte von mIGFBP-4 auf die Transkript-Spiegel Proteolyse-relevanter Gene

Einer der durch die Genexpressionsanalyse ermittelten möglichen Wirkmechanismen von IGFBP-4 ist, die eigene Proteolyse zu verhindern. Dies lässt die Konstellation folgender, verstärkt oder vermindert exprimierten mRNAs, nach mIGFBP-4 Transfektion vermuten. So sind z.B. die Transkripte von Cystatin SN in den mIGFBP-4 Klonen mehr als 10-fach gegenüber der mock-Kontrolle oder der Mutterlinie erhöht. Cystatin SN gehört zur Familie der S-Typ Cystatine [524], die Cysteinproteinasen, wie Cathepsin C, reversibel und kompetitiv inhibieren [593]. Da IGFBP-4 ein Substrat verschiedener Cathepsine ist [207,652], erscheint es möglich, dass IGFBP-4 entweder direkt oder durch die Akkumulation seiner Spaltprodukte das Cystatin-SN-Gen aktiviert oder dessen mRNA stabilisiert, um sich so vor weiterer Spaltung zu schützen. Die mRNA-Spiegel einer weiteren Cysteinprotease, der Ca²⁺-abhängigen Calpainprotease, wurden durch mIGFBP-4 vermindert. Die physiologische Rolle solcher Calpaine ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings weisen veröffentlichte Studien auf Funktionen in der Zellteilung, Migration, Integrin-vermittelten Signaltransduktion und Apoptose hin [14,263,330,537]. So wird beispielsweise das zelluläre Kontrollprotein p53 durch Calpaine degradiert [447]. Eine Hemmung der Calpaine führt hingegen zu einer Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose [15]. Auch Cyklin D1, das den Übergang der G₁-Phase zur S-Phase bestimmt, wird durch Calpaine reguliert [116,388]. Die mRNA-Spiegel der Zink-abhängigen Metalloendopeptidase MEP1A [282], die in der Lage ist, die B-Kette von Insulin zu hydrolysieren [634], wurden durch mIGFBP-4 erhöht. Die für das

Insulin beschriebene B-Kette ist auch in der Proteinstruktur der IGFs vorhanden [528]. Eine gesteigerte Hydrolyse von IGFs könnte somit neben der Bindung der IGFs einen Mechanismus darstellen, durch den IGFBP-4 seine antimitogene Wirkung entfaltet. Eine weitere Wirkung einer erhöhten IGF-Spaltung könnte sein, dass dadurch die IGFBP-4-Proteolyse vermindert wird, da IGFBP-4 durch eine IGF-II-abhängige Protease (PAPP-A) gespalten wird [345], die auch im Kolon vorkommt [443]. Neben der Spaltung von IGFBP-4 durch PAPP-A kann IGFBP-4 durch eine bisher nicht genau identifizierte Serinprotease gespalten werden [113,493]. Ein zusätzliches Indiz für den Eigenschutz von IGFBP-4 vor Proteolyse ist daher die Reduzierung der Transkripte von TMPRSS2, einer Serinprotease, die auch auf der Zelloberfläche im Kolon exprimiert wird [2,276,359].

7.2.2 Effekte von IGFBP-4 auf mRNA-Spiegel Zellzyklus-relevanter Gene und von Wachstumsfaktor-Genen

Der antimitotische Einfluss von IGFBP-4 in LS1034-Zellen wird durch die Wirkung auf Zellzyklus-relevante Gene deutlich. IGFBP-4 erhöhte die Transkript-Spiegel von solchen Genen, die Zellzyklus-Arrest und Differenzierung fördern, während Transkripte der an der Mitose beteiligten Gene reduziert wurden.

Der mRNA-Spiegel der Asparaginsynthetase (ASNS), die für die Progression in der G₁-Phase benötigt wird [220,221], wurde durch die Überexpression von mIGFBP-4 vermindert, während der mRNA-Spiegel der Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTPR0), die einen Zellzyklus Arrest (G₀/G₁-Arrest) vermittelt [4] und die Differenzierung von Zellen initiiert [49], mindestens um einen Faktor 5 erhöht wurde. Die Expression des Interferon-related developmental Regulator 1 (IFRD1) wurde durch die Überexpression von IGFBP-4 reduziert. In einer Myoblastenzelllinie wurde beobachtet, dass IFRD1 in den ersten Stunden nach Anschaltung der Differenzierung vermindert exprimiert wird [227], was darauf hinweist, dass mIGFBP-4 schon die Differenzierung von sich noch teilenden Zellen (90 % Konfluenz bei RNA-Extraktion) fördert. Der natürliche Alterungsprozess einer Zelle beinhaltet einen terminalen Status, in dem sich eine Zelle nicht mehr teilt. Dieser Status geht einer entarteten Zelle verloren. Zellen, die sich in einem nicht-teilenden Status befinden, besitzen niedrigere MRG-15-mRNA-Spiegel als proliferativ aktive Zellen [54]. Dies lässt vermuten, dass MRG-15 für die Progression des Zellzyklus gebraucht wird [53]. Durch die Überexpression von mIGFBP-4 wurde der mRNA-Spiegel von

MRG-15 deutlich gesenkt, was mit dem Befund übereinstimmt, dass LS1034-Zellen, die mIGFBP-4-exprimieren, eine niedrigere Proliferationsrate aufweisen.

Antimitogene Effekte von IGFBP-4 sind weiterhin mit verminderten Transkript-Spiegeln von TUBGCP2 (γ -Tubulin complex associated Protein 2) assoziiert. Das γ -Tubulin ist essentiell für die Funktion der mitotischen Spindeln [418,578]. Seine verminderte Expression könnte somit eine Folge der Hemmung der Mitose durch mIGFBP-4 sein. Auch besaßen mIGFBP-4-exprimierende LS1034-Zellen deutlich weniger Transkripte für Epiregulin (EREG) als die Kontrollen. Epiregulin wurde aus einer Kolonkarzinomzelllinie (HCT-15) kloniert und gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGFs). In seiner Struktur ähnelt es am meisten TGF- α [589]. Epiregulin vermittelt ein stärkeres mitogenes Signal als EGF [545] und wird in normalem Kolongewebe in sehr niedrigen Mengen exprimiert. In Kolonkarzinomzelllinien wird die hohe Expression von Epiregulin [589] durch ein Ki-Ras-vermitteltes Signal induziert [18]. Das maligne Potential von Epiregulin äußert sich in der Korrelation seiner Menge und der Tumor-Wachstumsrate in immundefizienten Mäusen [18]. Bei der Immortalisierung von Fibroblasten wird das Epiregulin-Gen aktiviert [362], während eine Blockade von Epiregulin das Wachstum und die Koloniebildung von transformierten Fibroblasten deutlich reduziert [362]. Die Expression von Epiregulin wird durch IKK und NF- κ B aktiviert [357]. Dies ist insofern von Bedeutung, da die Transkriptmengen des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors (TNFRSF1A), dessen Aktivierung wiederum zur Aktivierung von IKK und NF- κ B führen [107], ebenfalls durch mIGFBP-4 auf mRNA-Ebene vermindert wurden. Somit könnte die Reduktion der Epiregulin-Expression in LS1034-Zellen durch mIGFBP-4 auf einer verminderten Signalweitergabe durch den TNF-Rezeptor beruhen.

7.2.3 Wirkung von IGFBP-4 auf mRNA-Spiegel von Signaltransduktionsrelevanten Genen

Die Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene ergab weiterhin, dass eine Überexpression von mIGFBP-4 wahrscheinlich auch Einfluss auf apoptotische Signale nimmt. Dazu gehören die Verminderung des Transkript-Spiegels der bereits erwähnten Calpainprotease, was die Induzierung einer p53-abhängigen Apoptose bewirken kann [15], sowie die fast vollständige Inhibierung von COX-2 in mIGFBP-4-exprimierenden Zellklonen. COX-2, deren Expression durch TNF [480], einem Liganden des TNFRSF1A, erhöht werden kann, verschafft transformierten

Zellen einen Wachstumsvorteil durch Inhibierung der Apoptose [522]. Der mRNA-Spiegel eines weiteren Gens, das mit der Signalweitergabe über den TNF-Rezeptor in Verbindung steht, wurde ebenfalls durch mIGFBP-4 Expression reduziert. Die Caseinkinase-1 (CSNK1A1) phosphoryliert den Tumornekrosefaktorrezeptor (TNF-R) [56] und schützt dadurch die Zelle vor Apoptose. Neben dem TNF-R ist auch das beta-site APP-cleaving Enzyme (BACE 1) ein Substrate der Caseinkinase-1 [614] und wird ebenso wie der TNFRSF1A in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen der LS1034-Zellen auf mRNA-Ebene deutlich niedriger exprimiert. Bisher wurde allerdings noch keine Funktion von BACE 1 im Zusammenhang mit dem IGF-System oder der Karzinogenese beschrieben. Bekannt ist, dass BACE 1 mit seinen proteo- und peptidolytischen Eigenschaften eine kritische Rolle in der Spaltung des Amyloid Precursor Proteins (APP) im Rahmen der Alzheimer Erkrankung spielt [605]. Das Amyloid beta Precursor-like Protein 2 (APLP2), das dem APP-Protein vom Aufbau her sehr homolog ist, stellt ebenfalls ein Substrat der BACE dar [45] und wird vermehrt in mitotischen Zellen exprimiert [609]. Trotz verminderter Mengen an BACE-Transkripten wurden auch reduzierte mRNA-Spiegel von APLP2 in IGFBP-4-exprimierenden Klonen detektiert, was zeigt dass die Überexpression von mIGFBP-4 scheinbar die Menge an APLP2 nicht nur über BACE regulieren kann. Weitere Proteine, die in intrazelluläre Signal-Kaskaden involviert sind und deren Transkripte durch mIGFBP-4 reduziert wurden, sind das PDZ-Lim Protein CLP-36 und Ezrin. Beide Proteine fungieren als Bindeglieder zwischen Plasmamembran und Zytoskelett [231,373,436]. Hinsichtlich der Wirkung von mIGFBP-4 scheint insbesondere die Reduktion von Ezrin interessant, da Ezrin nach Stimulierung mit EGF zur „*ruffled*“, sprich gekräuselten, Oberfläche der Zellmembran wandert [78] und ausserdem eine Assoziation zwischen dieser Membraneigenschaft („*membran-ruffling*“) und der Motilität bzw. dem invasiven metastatischen Potential von Tumorzellen besteht [283,410,436]. Die verminderten Ezrin-Transkript-Spiegel in den IGFBP-4-überexprimierenden Klonen könnten somit ursächlich verantwortlich für deren verminderte Migration sein.

7.2.4 Wirkungen von IGFBP-4 auf Tumormarker

IGFBP-4 regulierte die Transkript-Spiegel der Tumormarker CEACAM 5 und 6 („*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules*“), die beide als Kolon-spezifische Tumormarker gelten, konsequent nach unten [48,368,651]. Auch

die mRNA der Glutathion-S-Transferase, die in die Entgiftung zahlreicher chemischer Kanzerogene, Mutagene und antikanzergener Wirkstoffe sowie deren Metabolite involviert ist, war in den mIGFBP-4-exprimierenden Zellklonen erniedrigt. Interessanterweise wurden in den meisten Tumoren oder präneoplastischen Läsionen erhöhte GSTPI-Spiegel gefunden, während im umliegenden gesunden Gewebe keine oder nur niedrige GSTPI-Expression zu finden war. In der Klinik werden daher hohe GSTPI-Spiegel mit der malignen Transformation, der Resistenz des Tumors gegen antikanzerogene Wirkstoffe sowie schlechten Überlebenschancen des Patienten in Verbindung gebracht [5].

EMP-1 ist ein weiterer Biomarker kolorektaler Karzinome [50,366] und unterliegt während des Zellzyklus einer genauen Regulation. Zellen, die sich in der G₀-Phase, d.h. in einem sich nicht-teilenden Status befinden, besitzen nur niedrige EMP-1-Spiegel [581]. Solche erniedrigten EMP-1-Spiegel wurden ebenfalls in mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellen gefunden.

Seit festgestellt wurde, dass COX-2, auch unter dem Namen Prostaglandin-Endo-Peroxidase-Synthetase 2 (PTGS2) bekannt, in 90 % aller sporadisch auftretenden Kolontumore erhöht ist, gilt dieses Enzym als ultimativer Marker für Kolontumoren [630]. Neben den bereits erwähnten antiapoptotischen und metastasierungsfördernden Eigenschaften [522] konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte COX-2-Expression zur verstärkten Produktion proangiogener Faktoren und einer Stimulation der endothelialen Migration führt [594]. Solche Regulationsprinzipien sind notwendig für die Angiogenese in wachsenden Tumoren. Die Expression von COX-2 wird nicht nur durch TNF stimuliert, sondern auch durch IGF-II über den IGF-IR [165]. Der Zusammenhang von IGF-II und COX-2 ist insofern bedeutsam, da IGF-II in sporadischen Kolontumoren durch Verlust des Imprintings des *IGF2*-Gens deutlich erhöht ist [145]. Der verminderte COX-2-mRNA-Spiegel in mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellen könnte daher einerseits durch eine Verminderung von verfügbarem IGF-II erklärt werden, aber auch durch eine Inhibierung des TNF-Rezeptor-Signalwegs. Die Reduktion von verfügbarem IGF-II kann entweder durch die Bindung von IGF-II an IGFBP-4 oder durch eine mögliche Spaltung von IGF-II auf Grund der in den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen vermehrt vorhandenen Transkripte der Metalloendopeptidase MEP1A erklärt werden.

7.2.5 Wirkung von IGFBP-4 auf Gene, die am Elektronen- oder Anionen-Transport beteiligt sind

Die Sequenz von in den Mitochondrien lokalisierten Enzymen, die für den Transport der aus oxidierbaren Substraten gewonnenen Reduktionsäquivalente verantwortlich sind, wird als Atmungskette bezeichnet. Der in der Atmungskette betriebene Elektronentransport führt zur Bildung von Energie in Form von ATP. Im Rahmen einer Zelltransformation unterliegen in der Regel auch solche Enzyme einer Dysregulation. Die Cytochrom C Oxidase Untereinheit II (MTCO2) gehört zu dem an der Atmungskette beteiligten Komplex IV. Dieser Komplex ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die Oxidation von Cytochrom C. Es konnte gezeigt werden, dass in Kolonpolyphen der mRNA-Spiegel der Cytochrom C Oxidase herunterreguliert wurde [387]. Crotonöl zeigt in hohen Dosen einen antiproliferativen Effekt auf glatten Muskelzellen des Kolons einhergehend mit der Steigerung der MTCO2-Expression und einer Senkung der COX-2-mRNA-Spiegel [618]. Neben der verminderten Expression von COX-2 konnte in mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellen auch eine Steigerung des MTCO2-mRNA-Spiegels festgestellt werden.

Die äußere Mitochondrienmembran, die das Mitochondrium vom Zytosol abgrenzt, ist für die meisten Verbindungen durchlässig und ist im Gegensatz zur inneren Mitochondrienmembran relativ arm an membrangebundenen Enzymen. Transkripte des in dieser äußeren Membran lokalisierten VDAC2 (voltage-dependent anion channel 2) wurden durch eine Überexpression von IGFBP-4 reduziert. Spannungsabhängige Anionen-Kanäle werden als membranintegrale Proteine beschrieben, die große hydrophile Poren bilden [391] und damit den Haupttransportweg für Adeninnukleotide durch die äußere Mitochondrienmembran darstellen [59]. Dadurch scheinen diese Kanäle auch eine entscheidende Rolle im Energiemetabolismus der Zelle zu spielen, indem sie als Pforte zwischen Zytoplasma und der mitochondrialen Matrix fungieren [391]. Da sich Tumorzellen durch einen sehr energieverbrauchenden Stoffwechsel auszeichnen, könnte die verminderte Expression dieser Anionenkanäle darauf hinweisen, dass mIGFBP-4-exprimierende Zellen an Energie verarmen und deswegen Apoptose begehren. [203]. Die verminderte Expression dieser Anionenkanäle könnte aber ebenso ein sekundärer Effekt der deutlich verringerten Proliferation in den mIGFBP-4-exprimierenden Klonen sein. Ein konkreter Zusammenhang zwischen dem IGF-System oder der

Kanzerogenese und dem VDAC2 ist allerdings bislang ebenso wenig erforscht wie für das am Elektronentransport beteiligte und im Kolon stark exprimierte Gen CGI-07 [336], dessen Transkripte ebenfalls durch mIGFBP-4 vermindert wurden.

7.2.6 IGFBP-4-Wirkung auf Gene des Metabolismus

Neben dem verminderten Transkript-Spiegel der für die Biosynthese von Asparagin verantwortlichen Asparaginsynthetase (ASNS-1), wurden verminderte mRNA-Spiegel weiterer am intermediären Stoffwechsel beteiligter Gene in mIGFBP-4-exprimierenden LS1034-Zellklonen identifiziert. Die Phosphoserin-Aminotransferase (PSA), die den zweiten Schritt in der Serin-Biosynthese katalysiert [36], wird im normalen Kolongewebe in relativ niedrigen Mengen exprimiert [25] und zeigt eine gesteigerte Expression in Kolontumoren und neoplastischen Geweben [437,562]. Die Pyruvoyltetrahydropterin Synthase (PTS) ist ebenfalls ein Enzym des Aminosäurestoffwechsels und katalysiert den zweiten Schritt der Tetrahydrobiopterin (BH₄)-Synthese [587,596]. Neben dieser Verminderung der mRNA-Spiegel von Enzymen, die an der Synthese neutraler Aminosäuren (Asparagin, Serin, Phenylalanin) beteiligt sind, wurde auch die mRNA des für den Transport neutraler Aminosäuren verantwortlichen Transporters SLC7A5 [468] in mIGFBP-4-exprimierenden Klonen reduziert. Dieser Transporter, auch unter dem Namen LAT1 bekannt, förderte das Wachstum von Tumoren, wenn Kolonkarzinomzellen in die Milz von Ratten injiziert wurden [435]. Die Expression eines weiteren Gens, das auf mRNA-Ebene durch die Überexpression von mIGFBP-4 vermindert wurde, war die des „*Hypoxia inducible Gene 1*“ (HIG1), das durch Hypoxie und Glucosemangel induziert werden kann und zur Angiogenese in Tumoren führt [161]. mIGFBP-4 könnte somit das Tumorstadium inhibieren, indem es einerseits die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen (z.B. Aminosäuren) und andererseits die HIG1-geförderte Angiogenese inhibiert.

7.3 Wirkungen von IGF-II im sporadischen CRC *in vivo*

Neue Studien weisen daraufhin, dass die Entstehung des CRC beim Menschen mit erhöhten IGF-II-Spiegeln assoziiert ist [195,353], bedingt durch den Verlust des *IGF2*-Gen-Imprintings [339]. Allerdings ist wenig darüber bekannt, in welcher Phase der Tumorentstehung IGF-II wirkt und ob erhöhte IGF-II-Spiegel ausreichen, um Tumore zu induzieren. Um diese Fragen zu beantworten, wurde in IGF-II-transgenen Mäusen und nicht-transgenen Kontrolltieren die Entstehung spontaner kolorektaler und die Entstehung von chemisch induzierten Kolontumoren untersucht.

Für die Untersuchung wurden vier Gruppen aus IGF-II-transgenen Mäusen und ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern zusammengestellt. Zwei der vier Gruppen dienten als Kontrollgruppen, in denen IGF-II-transgene und nicht-transgene Tiere nicht mit DMH, sondern nur mit dem Vehikel behandelt wurden. In diesen Gruppen sollten eventuelle spontan entstehende Veränderungen der Kolonmukosa durch IGF-II untersucht werden. In den zwei weiteren Gruppen, d.h. wiederum in IGF-II-transgenen und nicht-transgenen Tieren, wurden präneoplastische Foci und Tumore durch DMH induziert, um die Wirkung von IGF-II auf die chemisch induzierte Karzinogenese zu untersuchen.

7.3.1 DMH-induzierte Kolonkarzinogenese versus APC-Mutationsmodelle

Die Effekte einer IGF-II-Überexpression auf die Tumorbildung im Kolon wurden *in vivo* schon an $APC^{Min/+}$ -Mäusen untersucht [241]. $APC^{Min/+}$ -Mäuse (Min, multiple intestinale Neoplasien) besitzen eine Mutation im APC-Gen, die zu einem Funktionsverlust des APC-Proteins führt, der auch für die Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) charakteristisch ist [64,314,419]. Der Funktionsverlust des APC-Proteins führt allerdings in der Maus neben Tumoren im Kolon zusätzlich zu Karzinomen im Dünndarm sowie zu Tumoren und Abnormalitäten in verschiedenen weiteren Geweben [178,219,234,386]. Obwohl Mutationen im APC-Gen häufig auch in der Entwicklung des sporadischen CRC zu finden sind, ist das Mutationsmuster in den Tumoren heterogener [109,141]. Beim sporadischen CRC kann z.B. auch eine K-ras Mutation als initiales Ereignis auftreten [109].

Da das chemische Karzinogen DMH vornehmlich neoplastische Läsionen im

deszendierenden Kolon der Maus hervorruft [467,509,595,627], vergleichbar zur Lokalisation des sporadischen CRC beim Menschen, wurde dieses Modell der kolorektalen Tumorenstehung der APC^{Min/+}-Maus vorgezogen. Darüber hinaus entspricht nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Histopathologie der durch DMH erzeugten Neoplasien dem Krankheitsbild eines sporadischen CRC beim Menschen [109].

7.3.2 IGF-II und spontane Tumorenstehung

Im IGF-II-transgenen Mausmodell wird die Expression des humanen IGF-II durch einen vorangestellten PEPCK-Promotor reguliert [633]. Dieses Modell wurde schon für die Untersuchung von chemisch induzierten Neoplasien in der Leber verwendet [334]. Das humane IGF-II wird postnatal in diesem Modell in der Niere, der Leber, dem Jejunum, dem Ileum und im Kolon exprimiert [633]. Durch die Überexpression von IGF-II in den verschiedenen Organen ist auch gleichzeitig eine erhöhte Serumkonzentration von IGF-II zu erwarten. In den PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen sind die IGF-II-Spiegel im Serum ungefähr um den Faktor 3 erhöht [633]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Expression von hIGF-II hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichts ab der vierten Woche. Dies ist konform mit vorausgegangenen Studien, die ebenfalls keinen Unterschied im Körpergewicht zwischen IGF-II-transgenen und nicht-transgenen Tieren feststellen konnten [633]. In den vorausgegangenen Studien waren die Organgewichte von Niere und Testis im Alter von vier Wochen erhöht, während in einem Alter von zwölf Wochen nur in IGF-II-transgenen Tieren noch eine signifikante Erhöhung des Gewichts der Nebenniere verzeichnet werden konnte [633]. Diese Daten geben keinen Hinweis auf einen basalen Effekt von IGF-II auf das Kolon. Dies wird auch durch die in dieser Arbeit vermessene Fläche des Kolons belegt, die ebenfalls keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen aufwies.

Die unbehandelten IGF-II-transgenen Tiere und die unbehandelten nicht-transgenen Tiere entwickelten keine in der Methylenblau- bzw. β -Hexosaminidasefärbung sichtbaren Abnormalitäten des Kolons. Der Befund, dass eine Überexpression von IGF-II, wie sie in den PEPCK-IGF-II-transgenen Mäusen gegeben ist, alleine keine Neoplasien weder in frühen noch im späten Stadium im Kolon auslöst, steht im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen bezüglich des Einflusses von IGF-II auf die Tumorgenese [334,632]. Eine Veränderung der IGF-II Menge im Serum oder die

Veränderung der IGF-II Expression auf mRNA-Ebene im Kolon scheint damit alleine nicht auszureichen, um Tumore zu induzieren und stellt somit kein Initiationsereignis dar. Dieser *in vivo* erhobene Befund wird durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen von IGF-II-Effekten auf Kolonkarzinom-Zelllinien gestützt. Exogenes IGF-II wirkte hier weder in IGF-sensitiven noch in IGF-insensitiven Zelllinien transformationsfördernd, d.h. durch die Zugabe von IGF-II konnte keine Erhöhung der Kolonienanzahl in semisolidem Medium erreicht werden. Insgesamt drei der bisher fünf veröffentlichten IGF-II-transgenen Mausmodelle zeigen keine spontane Tumorformation. Ausnahmen bilden das IGF-II-transgene Mausmodell, dessen IGF-II-cDNA unter der Kontrolle des MUP (major urinary protein) Promotors steht, in dem ca. 20 % der Tiere in verschiedenen Organen Tumore entwickelten und das unter dem BLG (β -Lactoglobulin)-Promotor regulierte IGF-II-transgene Mausmodell, in dem allerdings nur einzelne weibliche Mäuse Tumore in der Brustdrüse entwickelten [632]. Auch unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ist es insgesamt wahrscheinlich, dass IGF-II kein Initiationsereignis auslöst.

7.3.3 Wirkung von IGF-II auf frühe Stadien und späte Stadien der chemisch-induzierten Karzinogenese

In der ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz der Tumorgenese stellen ACF präneoplastische Läsionen des Kolons dar [109]. Zur Entwicklung von neoplastischen Läsionen im Kolon, sowohl in IGF-II-transgenen als auch in nicht-transgenen Mäusen, musste ein initiierender Stimulus vorangehen, was durch die DMH-Gabe erreicht wurde. Dieser initiierende Stimulus führte zu der Entstehung von Tumoren 34 Wochen nach der letzten DMH-Behandlung in 56 % der IGF-II-transgenen Tiere und 40 % der Kontrolltiere assoziiert. Die Inzidenz der CRC-Entwicklung ist in IGF-II-transgenen Tieren somit etwas höher.

IGF-II-transgene Tiere wiesen fünf Wochen nach der letzten DMH-Behandlung (frühes Stadium der Karzinogenese) signifikant ($P < 0,001$) mehr ACF auf als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister. IGF-II ist demnach in der Lage, die Bildung präkanzerogener Läsionen, die durch DMH initiiert werden, zu fördern. Im frühen Stadium weisen IGF-II-transgene Mäuse vor allem ACF auf, die aus 3 oder mehr betroffenen ACs im Focus bestehen.

In einer Studie, in der ebenfalls ACF mit DMH im Kolon induziert worden waren, konnte gezeigt werden, dass die potentielle Malignität eines ACF mit der Anzahl der

Krypten im Focus korreliert. Während ACF mit 1 bis 3 AC im Focus das Potential beinhalten, sich zu einer malignen Läsion zu entwickeln, besitzen Foci mit 6-13 ACs schon bestimmte histochemische Profile von Adenomen [598].

34 Wochen nach der letzten DMH-Behandlung (spätes Stadium der Kanzerogenese) bildeten sich in beiden Genotypen die aus 2 ACs bestehenden ACF signifikant zurück. Zusätzlich entwickelten sich in den IGF-II-transgenen Tieren die ACF mit mehr als 3 ACs im Focus ebenfalls signifikant zurück, während in den nicht-transgenen Tieren die Anzahl der ACF mit mehr als 3 ACs im Focus gegenüber der Frühphase konstant blieb. Im Wildtyp erhöhte sich sogar die Anzahl der ACF mit mehr als 5 AC.

Dass die Anzahl von kleinen Läsionen zwölf Wochen nach DMH-Behandlung in den Mäusen größer war als 36 Wochen nach DMH-Behandlung, wurde schon von Thurnherr und Reinhart beobachtet, die daraus schlossen, dass atypische Veränderungen, die nur 1 AC umfassen, wieder ausheilen [588]. Diese Beobachtung wird durch die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigt. Es konnte in dieser Arbeit allerdings zusätzlich gezeigt werden, dass sich auch ACF mit 1-3 ACs im Focus zurückbilden können.

Weiterhin bildeten 34 Wochen nach der letzten DMH-Behandlung beide Genotypen sichtbare Tumore aus, wobei die Anzahl der Tumore pro Kolon sich nicht wesentlich zwischen den beiden Genotypen unterschied, wohl aber das Tumolvolumen, das in den IGF-II-transgenen Tieren deutlich erhöht war.

Unter Beachtung der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse scheint IGF-II einen Wachstumsvorteil der Läsionen im frühen Stadium zu verschaffen, der aber ausgeglichen werden kann, solange die zellulären Reparaturmechanismen des Organismus noch funktionieren. Zu einem späteren Zeitpunkt in der Karzinogenese, in der die Entwicklung eines Tumors nicht mehr verhindert werden kann, beeinflusst IGF-II offenbar wieder das Wachstum, was am signifikant ($P < 0,05$) erhöhten Tumolvolumen in IGF-II-transgenen Tieren deutlich wird. Ein signifikant höherer Durchmesser der Adenome wurde ebenfalls in $APC^{Min/+}$ -Mäusen, die IGF-II überexprimieren, bestimmt [241].

7.3.4 IGF-II und Initiation

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde deuten daraufhin, dass die Anzahl der ACF im frühen Stadium zwar IGF-II-abhängig ist, nicht aber mit der Anzahl der entstandenen Tumore korreliert. Dies spricht nicht für eine Rolle von IGF-II in der Initiation. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem Befund einer IGF-II-Überexpression in APC^{Min/+}-Mäusen, in denen erhöhte IGF-II-Spiegel mit einer höheren Anzahl von Adenomen assoziiert waren [241]. Eine Erklärung für die widersprüchliche Wirkung von IGF-II auf die Tumorentstehung könnte in der Erst-Mutation liegen, die wahrscheinlich in dem hier verwendeten Modell nicht das APC-Gen betrifft. Diese Annahme beruht darauf, dass Zellen mit einer Erst-Mutation im APC-Gen stets maligne entarten [96,280,289,429,580]. Möglicherweise ist eine APC-Mutation im Gegensatz zu den durch DMH erzeugten Mutationen nicht durch zelleigene Reparatursysteme zu kompensieren, so dass IGF-II entsprechend seiner wachstumsfördernden Eigenschaften auch das Wachstum von Zellen fördert, deren Transformationsprozess nicht mehr umkehrbar ist.

Die Tatsache, dass ACF sich zurückbilden können in Abhängigkeit von der initialen Mutation, zeigt, dass die Auswertung der Gesamtanzahl der ACF am frischen Darm alleine nicht ausreicht um einen Rückschluss auf das maligne Potential eines ACF zu schließen. Eine Methylenblaufärbung ist daher immer nur ein Indikator für die Menge der auftretenden ACF, die das Potential einer malignen Entartung besitzen, sich aber nicht zwangsläufig zu einem Tumor entwickeln müssen. Aus diesem Grund erscheint eine gleichzeitige histologische Begutachtung der ermittelten ACF wichtig, um das maligne Potential einer präkanzerogenen Läsion im sporadischen CRC zu erfassen. Dies ist vor allem für die Unterscheidung benigner und maligner ACF im sporadischen CRC von Bedeutung.

8 Zusammenfassung

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II vermitteln ihre Wirkung durch die Interaktion mit ihren transmembranären Rezeptoren. Ihre Wirkung wird aber auch maßgeblich durch Bindung an sechs IGF-Bindungsproteine (IGFBP-1 bis-6) beeinflusst, die IGFs mit hoher Affinität binden. Diese Interaktion beeinflusst die Halbwertszeit von zirkulierenden IGFs und auch ihre Verfügbarkeit für ihre Rezeptoren. Weiterhin gibt es Hinweise, dass IGFBPs zusätzlich Wirkungen besitzen, die unabhängig von einer IGF-Bindung sind.

Um Wirkungen des IGFBP-4 auf Parameter des malignen Wachstums von Kolonkarzinomzellen zu untersuchen, wurden IGF-sensitive (LS1034, Isreco-2) und IGF-insensitive (Isreco-1) Kolonkarzinomzelllinien mit einem Expressionsvektor, der murines IGFBP-4 (mIGFBP-4) enthielt, stabil transfiziert. Unter Verwendung einer RT-PCR konnte eine starke mIGFBP-4 Expression auf mRNA-Ebene in mIGFBP-4-transfizierten Klonen der drei Zelllinien festgestellt werden. Auf Proteinebene wurde das transfizierte mIGFBP-4 mit einem IGFBP-4-spezifischen Antikörper nachgewiesen und seine biologische Aktivität im Ligandenblot mit IGF-II bestätigt.

In IGF-insensitiven Isreco-1-Zellen führte eine Überexpression von mIGFBP-4 zu einer reduzierten Koloniebildung, die als Maß der Transformation benutzt wurde. Die Zellproliferation und die invasive Kapazität wurden dahingegen durch mIGFBP-4 nicht beeinflusst. In IGF-sensitiven LS1034-Zellen inhibierte mIGFBP-4 sowohl die Koloniebildung als auch die Proliferation und Invasion. Durch IGF-II-Zugabe konnte die Hemmung der Proliferation und der Invasion teilweise wieder aufgehoben werden, während die Hemmung der Koloniebildung durch IGF-II-Zugabe unbeeinflusst blieb. Auch in Isreco-2-Zellen, die zwar endogen kein IGF-II produzieren, aber durch IGF-II stimulierbar sind, wurden die Koloniebildung und die IGF-II-stimulierte Proliferation durch die Überexpression von IGFBP-4 reduziert und nur die hemmende Wirkung auf die Proliferation durch exogenes IGF-II vermindert.

Aufgrund dieser Daten konnte gezeigt werden, dass spezifische Parameter der Progression von Karzinomzellen des Kolons durch IGF-abhängige und IGF-unabhängige Wirkungen von mIGFBP-4 modifiziert werden können. Insbesondere die hemmende Wirkung auf die Koloniebildung konnte auf IGF-bindungsunabhängige Effekte des mIGFBP-4 zurückgeführt werden.

Um molekulare Wirkmechanismen von mIGFBP-4 aufzuklären, wurden Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene in LS1034-Zellen mittels Herstellung subtraktiver cDNA-Banken in Kombination mit cDNA-Array-Hybridisierungen durchgeführt. Der größte Vorteil dieser kombinierten Methode liegt in der initialen Anreicherung von cDNAs differentiell exprimierter Gene durch eine subtraktive Hybridisierung, wodurch die Anzahl der zu analysierenden cDNA-Klone bei der Array-Hybridisierung stark reduziert wird. Subtraktive cDNA-Banken wurden von nicht-transfizierten LS1034-Zellen und einem mIGFBP-4-exprimierenden Klon hergestellt. Insgesamt wurden 1728 cDNA-Klone dieser Banken mit der cDNA von nicht-transfizierten LS1034-Zellen, der mock-Kontrolle und zwei mIGFBP-4-exprimierenden Klonen hybridisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die mRNA-Spiegel zentraler, in den Transformationsprozess involvierter Gene quantitativ verändert werden. Die Transkript-Spiegel proliferations- und motilitätsfördernder Gene wurden durch mIGFBP-4 reduziert, während die mRNA-Spiegel von differenzierungsfördernden Genen erhöht wurden. Die Expression von mIGFBP-4 scheint ausserdem mit erhöhter IGF-II-Degradation einherzugehen, wie sich aus erhöhter mRNA-Expression einer Metalloendopeptidase schließen lässt. Transkriptmengen von Tumormarkern, wie dem "*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*" (CEACAM) oder von COX-2, wurden durch mIGFBP-4 Expression deutlich reduziert.

Um die Bedeutung von IGF-II für die frühe und späte Phase der Tumorentwicklung zu untersuchen, wurde die chemisch induzierte Tumorenstehung im Kolon von IGF-II-transgenen und nicht-transgenen Mäusen *in vivo* untersucht. In unbehandelten Mäusen traten weder „*aberrante crypt foci*“ (ACF) als Marker präneoplastischer Läsionen noch Tumore auf, was zeigt, dass IGF-II alleine nicht in der Lage ist, Tumore auszulösen. IGF-II-transgene Mäuse entwickelten nach DMH-Behandlung 63 % mehr ACF als der Wildtyp. Auch war die Anzahl der ACF mit mehr als drei aberranten Krypten (AC) in transgenen Tieren höher als in nicht-transgenen. Die Inzidenz von Foci mit einer niedrigeren Anzahl von ACs im Focus (1-3) war fünf Wochen nach der letzten DMH-Behandlung deutlich höher als nach 34 Wochen. Dies deutet darauf hin, dass Foci mit einer niedrigen „*crypt multiplicity*“ (1-3) sich nicht unbedingt im Laufe des Beobachtungszeitraums zu Tumoren weiterentwickeln müssen. 34 Wochen nach der letzten DMH-Behandlung waren Adenome und Karzinome mit Infiltrierung im Kolon beider Genotypen sichtbar. Während die Anzahl

der Tumore pro Tier sich zwischen den IGF-II-transgenen und den nicht-transgenen Wurfgeschwistern kaum unterschied, war das Tumolvolumen in den IGF-II-transgenen Tieren signifikant erhöht. Die *in vivo* Studie lieferte den Beweis, dass hohe IGF-II-Spiegel im Serum einen promovierenden Effekt auf das Wachstum sowohl in frühen als auch in späten Stadien der Tumorentwicklung besitzen.

9 Summary

The insulin-like growth factor (IGF) signaling system functions through interactions of the ligands IGF-I and IGF-II with a family of transmembrane receptors on the one hand and through binding of IGFs by six IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) on the other hand. IGFBPs bind IGFs with high affinity and the interaction affects the half-lives of IGFs in the circulation as well as the availability of IGFs for their receptors. Moreover, besides IGF-binding activity IGFBPs possess IGF-independent actions as well.

In order to investigate the impact of IGFBP-4 on parameters of malignant growth in colorectal cancer cells, colon cancer cell lines that are either IGF-sensitive (LS1034, Isreco-2) or -resistant (Isreco-1) were stably transfected with murine IGFBP-4 (mIGFBP-4). Strong expression of mIGFBP-4-mRNA was detected in mIGFBP-4 transfected clones by RT-PCR. At the protein level mIGFBP-4 was detected with an mIGFBP-4 specific antibody and the biological activity was confirmed by a Western ligand blot.

In IGF-insensitive Isreco-1 colon cancer cells expression of mIGFBP-4 reduced significantly colony formation, that served as a parameter for transformation, whereas cell proliferation or invasive capacity remained unaffected. In IGF-dependent LS1034 colon cancer cells colony formation but also proliferation and invasion were reduced by mIGFBP-4. Exogenous IGF-II reversed partially the inhibition of proliferation and invasion whereas the reduced colony formation remained IGF-independent. Also in IGF-deficient, but -sensitive Isreco-2 cells colony formation and IGF-II-stimulated proliferation was reduced by mIGFBP-4, whereas exogenous IGF-II restored cell proliferation only.

These results show that specific parameters of malignant progression are distinctly affected in colon cancer cells by IGF-dependent and IGF-independent effects of IGFBP-4. Especially the inhibiting effects on colony formation were found to be based on IGF-independent mechanisms of mIGFBP-4.

In order to investigate the effects of IGFBP-4 at the molecular level a subtractive cDNA library approach was used in combination with cDNA array hybridization in order to detect changes in the mRNA expression profiles. The major advantage of this approach is the initial enrichment of differentially regulated transcripts by

subtractive hybridization that reduces the number of cDNA clones which have to be analyzed by array hybridization. Subtracted cDNA libraries were constructed from untransfected LS1034 control cells and a mIGFBP-4 overexpressing clone. 1728 cDNA clones of these libraries were finally hybridized with cDNA from untransfected control cells, the mock-transfected control, and two mIGFBP-4 overexpressing clones. The mRNA levels of several proteins that play a central role in the transformation process were quantitatively affected. Transcript levels of genes responsible for proliferation or migration were reduced by expression of mIGFBP-4, whereas those that favour differentiation were upregulated. In addition, by inducing the mRNA-levels of a metalloendopeptidase, mIGFBP4 seems to promote IGF-II degradation. Transcript levels of tumor markers, such as the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEACAM) or COX-2, were reduced significantly by mIGFBP-4 expression.

To assess the role of IGF-II in early and late stages of tumor development *in vivo*, tumors were induced chemically in the colon of IGF-II transgenic and non-transgenic mice. In untreated mice no “*aberrant crypt foci*” (ACF), which are markers of preneoplastic lesions, nor tumors emerged. This indicates that IGF-II alone does not induce tumors. IGF-II transgenic animals displayed 63 % more ACF after DMH-treatment than wild type mice. Moreover, the numbers of ACF consisting of more than 3 “*aberrant crypts*” (AC) were higher in IGF-II-transgenic mice. The incidence of ACF consisting of 1-3 AC was higher 5 weeks after the last DMH-treatment than after 34 weeks. This suggests that focal atypias confined to small ACF (1-3) do not necessarily progress towards a tumor. At 34 weeks adenomas and carcinomas with infiltration were visible in the colons of both genotypes. Whereas the number of tumors per animal was not significantly increased in IGF-II transgenic mice compared to the nontransgenic littermates, the tumor volume was significantly higher. The *in vivo* studies thus provide evidence that a high serum IGF-II exerts growth promoting effects in early as well as in late stages of tumor development.

10 Literaturverzeichnis

1. HMSO. Mortality Statistics. Cause. England and Wales. London. Report 1992.
2. Afar DE, Vivanco I, Hubert RS et al.: Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res* 2001; 61:1686-1692.
3. Agrez MV: Cell adhesion molecules and colon cancer. *Aust N Z J Surg* 1996; 66:791-798.
4. Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S et al.: PTPROt: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood* 1999; 94:2403-2413.
5. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G et al.: Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997; 272:10004-10012.
6. Allander SV, Bajalica S, Larsson C et al.: Structure and chromosomal localization of human insulin-like growth factor-binding protein genes. *Growth Regul* 1993; 3:3-5.
7. Amaar YG, Thompson GR, Linkhart TA et al.: Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J Biol Chem* 2002; 277:12053-12060.
8. Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS: DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1993; 101 Suppl 5:35-44.
9. Andress DL: Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor. *Am J Physiol* 1998; 274:E744-E750.
10. Andress DL, Birnbaum RS: Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* 1992; 267:22467-22472.
11. Anwar A, Zahid AA, Phillips L, Delafontaine P: Insulin-like growth factor binding protein-4 expression is decreased by angiotensin II and thrombin in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:370-376.
12. Arai T, Busby W, Jr., Clemmons DR: Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 1996; 137:4571-4575.
13. Arnold PM, Ma JY, Citron BA et al.: Selective developmental regulation of gene expression for insulin-like growth factor-binding proteins in mouse spinal cord. *Spine* 2000; 25:1765-1770.

14. Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C et al.: Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 2000: 20:4474-4481.
15. Atencio IA, Ramachandra M, Shabram P, Demers GW: Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ* 2000: 11:247-253.
16. Augenlicht LH, Richards C, Corner G, Pretlow TP: Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* 1996: 12:1767-1772.
17. Awede BL, Thissen JP, Lebacqz J: Role of IGF-I and IGF-BPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002: 282:E31-E37.
18. Baba I, Shirasawa S, Iwamoto R et al.: Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis in vivo through activated Ki-Ras signaling pathway in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2000: 60:6886-6889.
19. Babajko S, Binoux M: Modulation by retinoic acid of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein expression in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Eur J Endocrinol* 1996: 134:474-480.
20. Babajko S, Leneuve P, Loret C, Binoux M: IGF-binding protein-6 is involved in growth inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: its production is both IGF- and cell density-dependent. *J Endocrinol* 1997: 152:221-227.
21. Bach LA: Insulin-like growth factor binding protein-6: the "forgotten" binding protein? *Horm Metab Res* 1999: 31:226-234.
22. Bach LA, Salemi R, Leeding KS: Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding proteins in IGF-II-induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology* 1995: 136:5061-5069.
23. Bachrach LK, Nanto-Salonen K, Tapanainen P et al.: Insulin-like growth factor binding protein production in human follicular thyroid carcinoma cells. *Growth Regul* 1995: 5:109-118.
24. Badinga L, Song S, Simmen RC et al.: Complex mediation of uterine endometrial epithelial cell growth by insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2. *J Mol Endocrinol* 1999: 23:277-285.
25. Baek JY, Jun dY, Taub D, Kim YH: Characterization of human phosphoserine aminotransferase involved in the phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis. *Biochem J* 2003: 373:191-200.
26. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993: 75:73-82.
27. Ballard FJ, Ross M, Upton FM, Francis GL: Specific binding of insulin-like growth factors 1 and 2 to the type 1 and type 2 receptors respectively. *Biochem J* 1988: 249:721-726.

28. Bar RS, Clemmons DR, Boes M et al.: Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990: 127:1078-1086.
29. Barbour KW, Goodwin RL, Guillonneau F et al.: Functional diversification during evolution of the murine alpha(1)-proteinase inhibitor family: role of the hypervariable reactive center loop. *Mol Biol Evol* 2002: 19:718-727.
30. Bardi G, Bottazzi C, Demori I, Palmero S: Thyroid hormone and retinoic acid induce the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 in prepubertal pig sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 1999: 141:637-643.
31. Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG et al.: The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 1991: 349:84-87.
32. Baron A, Barrett-Vespone N, Featherstone J: Purification of large quantities of human salivary cystatins S, SA and SN: their interactions with the model cysteine protease papain in a non-inhibitory mode. *Oral Dis* 1999: 5:344-353.
33. Bartke T, Siegmund D, Peters N et al.: p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene* 2001: 20:571-580.
34. Baserga R, Hongo A, Rubini M et al.: The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1997: 1332:F105-F126.
35. Baserga R, Resnicoff M, D'Ambrosio C, Valentinis B: The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* 1997: 53:65-98.
36. Basurko MJ, Marche M, Darriet M, Cassaigne A: Phosphoserine aminotransferase, the second step-catalyzing enzyme for serine biosynthesis. *IUBMB Life* 1999: 48:525-529.
37. Bates P, Fisher R, Ward A et al.: Mammary cancer in transgenic mice expressing insulin-like growth factor II (IGF-II). *Br J Cancer* 1995: 72:1189-1193.
38. Batzer MA, Deininger PL: Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 2002: 3:370-379.
39. Bauersachs S, Blum H, Mallok S et al.: Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. *Biol Reprod* 2003: 68:1170-1177.
40. Bauersachs S, Rehfeld S, Ulbrich SE et al.: Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. *J Mol Endocrinol* 2004: 32:449-466.
41. Baxter RC: The somatomedins: insulin-like growth factors. *Adv Clin Chem* 1986: 25:49-115.
42. Baxter RC: Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000:

- 278:E967-E976.
43. Baxter RC, Martin JL: Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. *J Clin Invest* 1986: 78:1504-1512.
 44. Baxter RC, Martin JL: Binding proteins for insulin-like growth factors in adult rat serum. Comparison with other human and rat binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1987: 147:408-415.
 45. Bayer TA, Paliga K, Weggen S et al.: Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997: 94:519-524.
 46. Bayes-Genis A, Schwartz RS, Lewis DA et al.: Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001: 21:335-341.
 47. Bazzoli F, Fossi S, Sottili S et al.: The risk of adenomatous polyps in asymptomatic first-degree relatives of persons with colon cancer. *Gastroenterology* 1995: 109:783-788.
 48. Beauchemin N, Draber P, Dveksler G et al.: Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 1999: 252:243-249.
 49. Beltran PJ, Bixby JL, Masters BA: Expression of PTPRO during mouse development suggests involvement in axonogenesis and differentiation of NT-3 and NGF-dependent neurons. *J Comp Neurol* 2003: 456:384-395.
 50. Ben Porath I, Benvenisty N: Characterization of a tumor-associated gene, a member of a novel family of genes encoding membrane glycoproteins. *Gene* 1996: 183:69-75.
 51. Berenblum I, Shubik P: The role of croton oil application, associated with a single painting of a carcinogen in tumor induction in the mouse skin. *Br J Cancer* 1947: 1:379-383.
 52. Bertram JS: The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000: 21:167-223.
 53. Bertram MJ, Berube NG, Hang-Swanson X et al.: Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol Cell Biol* 1999: 19:1479-1485.
 54. Bertram MJ, Pereira-Smith OM: Conservation of the MORF4 related gene family: identification of a new chromo domain subfamily and novel protein motif. *Gene* 2001: 266:111-121.
 55. Bethel CR, Vitullo JC, Miller RE, Aron DC: Molecular cloning of mouse insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4) cDNA and expression of a fusion protein with IGF-binding activity. *Biochem Mol Biol Int* 1994: 34:385-392.

56. Beyaert R, Vanhaesebroeck B, Declercq W et al.: Casein kinase-1 phosphorylates the p75 tumor necrosis factor receptor and negatively regulates tumor necrosis factor signaling for apoptosis. *J Biol Chem* 1995: 270:23293-23299.
57. Bird RP: Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 1987: 37:147-151.
58. Bird RP: Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995: 93:55-71.
59. Blachly-Dyson E, Baldini A, Litt M et al.: Human genes encoding the voltage-dependent anion channel (VDAC) of the outer mitochondrial membrane: mapping and identification of two new isoforms. *Genomics* 1994: 20:62-67.
60. Blackburn A, Schmitt A, Schmidt P et al.: Actions and interactions of growth hormone and insulin-like growth factor-II: body and organ growth of transgenic mice. *Transgenic Res* 1997: 6:213-222.
61. Blum WF, Horn N, Kratzsch J et al.: Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay. *Growth Regul* 1993: 3:100-104.
62. Blum WF, Ranke MB: Use of insulin-like growth factor-binding protein 3 for the evaluation of growth disorders. *Horm Res* 1990: 33 Suppl 4:31-37.
63. Blum WF, Ranke MB, Bierich JR: A specific radioimmunoassay for insulin-like growth factor II: the interference of IGF binding proteins can be blocked by excess IGF-I. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988: 118:374-380.
64. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987: 328:614-616.
65. Boes M, Booth BA, Sandra A et al.: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)4 accounts for the connective tissue distribution of endothelial cell IGFBPs perfused through the isolated heart. *Endocrinology* 1992: 131:327-330.
66. Booth BA, Boes M, Andress DL et al.: IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Regul* 1995: 5:1-17.
67. Booth BA, Boes M, Bar RS: IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments. *Am J Physiol* 1996: 271:E465-E470.
68. Booth BA, Boes M, Dake BL et al.: IGFBP-3 binding to endothelial cells inhibits plasmin and thrombin proteolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002: 282:E52-E58.
69. Bos JL: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989: 49:4682-4689.
70. Bos JL: p21ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal

- transduction. *Eur J Cancer* 1995; 31A:1051-1054.
71. Bottazzi C, Demori I, Leone M, Fugassa E: Thyroid hormone affects rat uterine expression of IGF-I and IGFBP-4. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1996; 72:133-138.
 72. Boutron MC, Faivre J, Quipourt V et al.: Family history of colorectal tumours and implications for the adenoma-carcinoma sequence: a case control study. *Gut* 1995; 37:830-834.
 73. Bradshaw SL, D'Ercole AJ, Han VK: Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in C6 glioma cells results in conditional alteration of cellular growth. *Endocrinology* 1999; 140:575-584.
 74. Bradshaw SL, Naus CC, Zhu D et al.: Insulin-like growth factor binding protein-4 gene expression is induced by transfection of gap junction connexin43 gene in a C6 glioma cell line. *Growth Regul* 1993; 3:26-29.
 75. Braulke T: Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 1999; 31:242-246.
 76. Braulke T, Claussen M, Saftig P et al.: Proteolysis of IGFBPs by cathepsin D in vitro and in cathepsin D-deficient mice. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6:265-271.
 77. Bresalier RS: The biology of colorectal cancer metastasis. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25:805-820.
 78. Bretscher A: Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J Cell Biol* 1989; 108:921-930.
 79. Burgaud JL, Resnicoff M, Baserga R: Mutant IGF-I receptors as dominant negatives for growth and transformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214:475-481.
 80. Burgess AW: Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353:903-909.
 81. Burmester JK, Qian SW, Roberts AB et al.: Characterization of distinct functional domains of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:8628-8632.
 82. Butler AA, LeRoith D: Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 2001; 142:1685-1688.
 83. Butt AJ, Firth SM, Baxter RC: The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999; 77:256-262.
 84. Byun D, Mohan S, Baylink DJ, Qin X: Localization of the IGF binding domain and evaluation of the role of cysteine residues in IGF binding in IGF binding protein-4. *J Endocrinol* 2001; 169:135-143.

85. Byun D, Mohan S, Kim C et al.: Studies on human pregnancy-induced insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteases in serum: determination of IGF-II dependency and localization of cleavage site. *J Clin Endocrinol Metab* 2000: 85:373-381.
86. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999: 9:M57-M60.
87. Calabretta B, Robberson DL, Barrera-Saldana HA et al.: Genome instability in a region of human DNA enriched in Alu repeat sequences. *Nature* 1982: 296:219-225.
88. Calonge MJ, Massague J: Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor-beta antiproliferative responses in colon cancer cells. *J Biol Chem* 1999: 274:33637-33643.
89. Camacho-Hubner C, Busby WH, Jr., McCusker RH et al.: Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J Biol Chem* 1992: 267:11949-11956.
90. Campbell PG, Andress DL: Plasmin degradation of insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): regulation by IGFBP-5-(201-218). *Am J Physiol* 1997: 273:E996-1004.
91. Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH: Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 1992: 130:1401-1412.
92. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR et al.: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998: 282:1318-1321.
93. Carter JW, Lancaster HK, Hardman WE, Cameron IL: Distribution of intestine-associated lymphoid tissue, aberrant crypt foci, and tumors in the large bowel of 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *Cancer Res* 1994: 54:4304-4307.
94. Casella SJ, Han VK, D'Ercole AJ et al.: Insulin-like growth factor II binding to the type I somatomedin receptor. Evidence for two high affinity binding sites. *J Biol Chem* 1986: 261:9268-9273.
95. Cataldo NA, Fujimoto VY, Jaffe RB: Interferon-gamma and activin A promote insulin-like growth factor-binding protein-2 and -4 accumulation by human luteinizing granulosa cells, and interferon-gamma promotes their apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998: 83:179-186.
96. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H et al.: Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 1999: 45:409-415.
97. Ceda GP, Fielder PJ, Henzel WJ et al.: Differential effects of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II on the expression of IGF binding proteins (IGFBPs) in a rat neuroblastoma cell line: isolation and characterization of two forms of IGFBP-4. *Endocrinology* 1991: 128:2815-2824.

98. Cerro JA, Grewal A, Wood TL, Pintar JE: Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development. *Regul Pept* 1993; 48:189-198.
99. Cerro JA, Pintar JE: Insulin-like growth factor binding protein gene expression in the pregnant rat uterus and placenta. *Dev Biol* 1997; 184:278-295.
100. Chamberlain CS, Spicer LJ: Hormonal control of ovarian cell production of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182:69-81.
101. Chambery D, de Galle B, Babajko S: Retinoic acid stimulates IGF binding protein (IGFBP)-6 and depresses IGFBP-2 and IGFBP-4 in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J Endocrinol* 1998; 159:227-232.
102. Chamoun D, DeMoura MD, Levitas E et al.: Transcriptional and posttranscriptional regulation of intraovarian insulin-like growth factor-binding proteins by interleukin-1beta (IL-1beta): evidence for IL-1beta as an antiatretic principal. *Endocrinology* 1999; 140:3488-3495.
103. Chang WW: Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1984; 104:27-43.
104. Chelius D, Baldwin MA, Lu X, Spencer EM: Expression, purification and characterization of the structure and disulfide linkages of insulin-like growth factor binding protein-4. *J Endocrinol* 2001; 168:283-296.
105. Chelius D, Wu SL, Bondarenko PV: Identification of N-linked oligosaccharides of rat insulin-like growth factor binding protein-4. *Growth Horm IGF Res* 2002; 12:169-177.
106. Chen BK, Overgaard MT, Bale LK et al.: Molecular regulation of the IGF-binding protein-4 protease system in human fibroblasts: identification of a novel inducible inhibitor. *Endocrinology* 2002; 143:1199-1205.
107. Chen G, Goeddel DV: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296:1634-1635.
108. Chen Y, Shu H, Ji C et al.: Insulin-like growth factor binding proteins localize to discrete cell culture compartments in periosteal and osteoblast cultures from fetal rat bone. *J Cell Biochem* 1998; 71:351-362.
109. Cheng L, Lai MD: Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9:2642-2649.
110. Cheng SL, Zhang SF, Mohan S et al.: Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *J Cell Biochem* 1998; 71:449-458.
111. Chernašek SD, Smith CE, Duffin KL et al.: Proteolytic cleavage of insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP-4). Localization of cleavage site to non-homologous region of native IGFBP-4. *J Biol Chem* 1995; 270:11377-11382.
112. Cheung PT, Smith EP, Shimasaki S et al.: Characterization of an insulin-like

- growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 1991; 129:1006-1015.
113. Cheung PT, Wu J, Banach W, Chernausk SD: Glucocorticoid regulation of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease produced by a rat neuronal cell line. *Endocrinology* 1994; 135:1328-1335.
 114. Cho KR, Vogelstein B: Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G:137-141.
 115. Choi D, Rohan RM, Rosenfeld RG et al.: Activin-attenuated expression of transcripts encoding granulosa cell-derived insulin-like growth factor binding proteins 4 and 5 in the rat: a putative antiatretic effect. *Biol Reprod* 1997; 56:508-515.
 116. Choi YH, Lee SJ, Nguyen P et al.: Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J Biol Chem* 1997; 272:28479-28484.
 117. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
 118. Claussen M, Kubler B, Wendland M et al.: Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* 1997; 138:3797-3803.
 119. Clemmons DR: Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8:45-62.
 120. Clemmons DR: Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocr Rev* 2001; 22:800-817.
 121. Clemmons DR, Busby W, Clarke JB et al.: Modifications of insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Endocr J* 1998; 45 Suppl:S1-S8.
 122. Clemmons DR, Jones JI, Busby WH, Wright G: Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 692:10-21.
 123. Cohen P, Graves HC, Peehl DM et al.: Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1046-1053.
 124. Cohen P, Lamson G, Okajima T, Rosenfeld RG: Transfection of the human insulin-like growth factor binding protein-3 gene into Balb/c fibroblasts inhibits cellular growth. *Mol Endocrinol* 1993; 7:380-386.
 125. Cohen P, Noveral JP, Bhala A et al.: Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis. *Am J Physiol* 1995; 269:L151-L157.
 126. Cohen P, Peehl DM, Graves HC, Rosenfeld RG: Biological effects of prostate

- specific antigen as an insulin-like growth factor binding protein-3 protease. *J Endocrinol* 1994: 142:407-415.
127. Cohen SM: Urinary bladder carcinogenesis: initiation-promotion. *Semin Oncol* 1979: 6:157-160.
128. Cohick WS, Clemmons DR: The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993: 55:131-153.
129. Cohick WS, Gockerman A, Clemmons DR: Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 synthesis and degradation by platelet-derived growth factor and the IGFs is enhanced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1995: 164:187-196.
130. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben Yedidia T et al.: Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003: 163:847-857.
131. Conover CA: Insulin-like growth factor binding protein proteolysis in bone cell models. *Prog Growth Factor Res* 1995: 6:301-309.
132. Conover CA: Posttranslational Modification of the IGF Binding Proteins II. In: *The IGF-System. Contemporary Endocrinology*, Humana Press New Jersey 1999: (Rosenfeld, R.G., Roberts, C.T., Jr., Eds):355-376.
133. Conover CA, Clarkson JT, Bale LK: Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor (IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. *Endocrinology* 1995: 136:1403-1410.
134. Conover CA, De Leon DD: Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. *J Biol Chem* 1994: 269:7076-7080.
135. Conover CA, Durham SK, Zapf J et al.: Cleavage analysis of insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis and expression of protease-resistant IGF-binding protein-4 mutants. *J Biol Chem* 1995: 270:4395-4400.
136. Conover CA, Faessen GF, Ilg KE et al.: Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. *Endocrinology* 2001: 142:2155.
137. Conover CA, Kiefer MC, Zapf J: Posttranslational regulation of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and transformed human fibroblasts. Insulin-like growth factor dependence and biological studies. *J Clin Invest* 1993: 91:1129-1137.
138. Conover CA, Oxvig C, Overgaard MT et al.: Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A. *J Clin Endocrinol Metab* 1999: 84:4742-4745.
139. Cooper HS, Deppisch LM, Gourley WK et al.: Endoscopically removed

- malignant colorectal polyps: clinicopathologic correlations. *Gastroenterology* 1995; 108:1657-1665.
140. Corkins MR, McQuade J, Schaffer BS, MacDonald RG: Insulin-like growth factor binding protein-4 expression is dependent on the carbohydrate in the media in HT-29 cells. *Growth Horm IGF Res* 2002; 12:184-192.
 141. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF: Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 1992; 340:626-630.
 142. Coverley JA, Baxter RC: Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128:1-5.
 143. Coverlizza S, Risio M, Ferrari A et al.: Colorectal adenomas containing invasive carcinoma. Pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer* 1989; 64:1937-1947.
 144. Cabbage ML, Suwanichkul A, Powell DR: Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity. *J Biol Chem* 1990; 265:12642-12649.
 145. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM et al.: Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299:1753-1755.
 146. Culouscou JM, Shoyab M: Purification of a colon cancer cell growth inhibitor and its identification as an insulin-like growth factor binding protein. *Cancer Res* 1991; 51:2813-2819.
 147. Cummings OW: Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. *Semin Gastrointest Dis* 2000; 11:229-237.
 148. D'Errico A, Grigioni WF, Fiorentino M et al.: Expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) in human hepatocellular carcinomas: an immunohistochemical study. *Pathol Int* 1994; 44:131-137.
 149. Dahlfors G, Arnqvist HJ: Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 regulate the expression of insulin-like growth factor-binding protein-3, -4, and -5 in large vessel endothelial cells. *Endocrinology* 2000; 141:2062-2067.
 150. Dai B, Widen SG, Mifflin R, Singh P: Cloning of the functional promoter for human insulin-like growth factor binding protein-4 gene: endogenous regulation. *Endocrinology* 1997; 138:332-343.
 151. Damon SE, Haugk KL, Birnbaum RS, Quinn LS: Retrovirally mediated overexpression of insulin-like growth factor binding protein 4: evidence that insulin-like growth factor is required for skeletal muscle differentiation. *J Cell Physiol* 1998; 175:109-120.
 152. Damon SE, Maddison L, Ware JL, Plymate SR: Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation. *Endocrinology* 1998; 139:3456-3464.

153. DAUGHADAY WH, Hall K, SALMON WD, Jr. et al.: On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *Endocrinology* 1987: 121:1911-1912.
154. DAUGHADAY WH, Rotwein P: Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989: 10:68-91.
155. Davies SM: Developmental regulation of genomic imprinting of the IGF2 gene in human liver. *Cancer Res* 1994: 54:2560-2562.
156. De Meyts P: The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetologia* 1994: 37 Suppl 2:S135-S148.
157. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ: A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990: 345:78-80.
158. Demori I, Bottazzi C, Arzani D et al.: Regulation of IGFBP-1 and -4 expression by triiodothyronine (T3) in cultured hepatocytes is cell- and gene-specific. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1997: 73:47-53.
159. Demori I, Bottazzi C, Voci A et al.: Tri-iodothyronine increases insulin-like growth factor binding protein-4 expression in rat hepatocytes. *J Endocrinol* 1997: 154:155-165.
160. Denizot F, Lang R: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986: 89:271-277.
161. Denko N, Schindler C, Koong A et al.: Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2000: 6:480-487.
162. Deveney CW, Rand-Luby L, Rutten MJ et al.: Establishment of human colonic epithelial cells in long-term culture. *J Surg Res* 1996: 64:161-169.
163. Di Battista JA, Dore S, Morin N et al.: Prostaglandin E2 stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 expression and synthesis in cultured human articular chondrocytes: possible mediation by Ca(++)-calmodulin regulated processes. *J Cell Biochem* 1997: 65:408-419.
164. Di Gregorio C, Losi L, Fante R et al.: Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* 1997: 30:328-334.
165. Di Popolo A, Memoli A, Apicella A et al.: IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2000: 19:5517-5524.
166. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP et al.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996: 93:6025-6030.

167. Douc-Rasy S, Barrois M, Fogel S et al.: High incidence of loss of heterozygosity and abnormal imprinting of H19 and IGF2 genes in invasive cervical carcinomas. Uncoupling of H19 and IGF2 expression and biallelic hypomethylation of H19. *Oncogene* 1996; 12:423-430.
168. Drivdahl RH, Sprenger C, Trimm K, Plymate SR: Inhibition of growth and increased expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and -6 in prostate cancer cells stably transfected with antisense IGFBP-4 complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 2001; 142:1990-1998.
169. Duan C, Clemmons DR: Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273:16836-16842.
170. Durham SK, Riggs BL, Conover CA: The insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4)-IGFBP-4 protease system in normal human osteoblast-like cells: regulation by transforming growth factor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1752-1758.
171. Durham SK, Riggs BL, Harris SA, Conover CA: Alterations in insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis in transformed osteoblastic cells. *Endocrinology* 1995; 136:1374-1380.
172. Ehrenborg E, Zazzi H, Lagercrantz S et al.: Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mamm Genome* 1999; 10:376-380.
173. el Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM et al.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54:1169-1174.
174. el Roeiy A, Chen X, Roberts VJ et al.: Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1488-1496.
175. Eshleman JR, Markowitz SD: Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet* 1996; 5 Spec No:1489-1494.
176. Ewton DZ, Coolican SA, Mohan S et al.: Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5. *J Cell Physiol* 1998; 177:47-57.
177. Faust D, Spirchez Z, Armbruster FP, Stein J: Determination of alpha1-proteinase inhibitor by a new enzyme linked immunosorbant assay in feces, serum and an enterocyte-like cell line. *Z Gastroenterol* 2001; 39:769-774.
178. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF: The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10:721-733.
179. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247:49-56.

180. Fearon ER, Jones PA: Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *Faseb J* 1992; 6:2783-2790.
181. Feliens D, Woodruff K, Abboud S: Potential role of insulin-like growth factor binding protein-4 in the uncoupling of bone turnover in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999; 104:715-722.
182. Fernandez-Celemin L, Thissen JP: Interleukin-6 stimulates hepatic insulin-like growth factor binding protein-4 messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 2001; 142:241-248.
183. Firth SM, Baxter RC: Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 1999; 160:379-387.
184. Firth SM, Baxter RC: Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002; 23:824-854.
185. Fogt F, Zimmerman RL, Ross HM et al.: Identification of lymphatic vessels in malignant, adenomatous and normal colonic mucosa using the novel immunostain D2-40. *Oncol Rep* 2004; 11:47-50.
186. Forbes BE, Turner D, Hodge SJ et al.: Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *J Biol Chem* 1998; 273:4647-4652.
187. Fottner C, Engelhardt D, Elmlinger MW, Weber MM: Identification and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression and secretion by adult human adrenocortical cells: differential regulation by IGFs and adrenocorticotropin. *J Endocrinol* 2001; 168:465-474.
188. Fottner C, Engelhardt D, Weber MM: Characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) secreted by bovine adrenocortical cells in primary culture: regulation by insulin-like growth factors (IGFs) and adrenocorticotropin (ACTH). *Horm Metab Res* 1999; 31:203-208.
189. Fowlkes J, Freemark M: Evidence for a novel insulin-like growth factor (IGF)-dependent protease regulating IGF-binding protein-4 in dermal fibroblasts. *Endocrinology* 1992; 131:2071-2076.
190. Fowlkes JL, Serra DM, Rosenberg CK, Thrailkill KM: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) functions as an IGF-reversible inhibitor of IGFBP-4 proteolysis. *J Biol Chem* 1995; 270:27481-27488.
191. Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thrailkill KM: Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 1994; 135:2810-2813.
192. Fowlkes JL, Thrailkill KM, George-Nascimento C et al.: Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 1997; 138:2280-2285.
193. Fowlkes JL, Thrailkill KM, Serra DM et al.: Matrix metalloproteinases as

- insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6:255-263.
194. Frattali AL, Pessin JE: Molecular defects of insulin/IGF-1 receptor transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 687:77-89.
 195. Freier S, Weiss O, Eran M et al.: Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut* 1999; 44:704-708.
 196. Froggatt NJ, Koch J, Davies R et al.: Genetic linkage analysis in hereditary non-polyposis colon cancer syndrome. *J Med Genet* 1995; 32:352-357.
 197. Frohwein YZ, Gatt S: Isolation of beta-N-acetylhexosaminidase, beta-N-acetylglucosaminidase, and beta-N-acetylgalactosaminidase from calf brain. *Biochemistry* 1967; 6:2775-2782.
 198. Frosina G: Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem* 2000; 267:2135-2149.
 199. Furihata T, Kawamata H, Kubota K, Fujimori T: Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for beta-catenin in inflammation-induced rat colon carcinogenesis. *Int J Mol Med* 2002; 9:353-358.
 200. Furukawa F, Nishikawa A, Kitahori Y et al.: Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21:197-201.
 201. Gallicchio MA, Kaun C, Wojta J et al.: Urokinase type plasminogen activator receptor is involved in insulin-like growth factor-induced migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro. *J Cell Physiol* 2003; 197:131-138.
 202. Gao L, Ling N, Shimasaki S: Structure of the rat insulin-like growth factor binding protein-4 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190:1053-1059.
 203. Garland JM, Halestrap A: Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *J Biol Chem* 1997; 272:4680-4688.
 204. Germain-Lee EL, Janicot M, Lammers R et al.: Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem J* 1992; 281 (Pt 2):413-417.
 205. Giannini S, Cresci B, Pala L et al.: IGF-BPs modulate IGF-I- and high glucose-controlled growth of human retinal endothelial cells. *J Endocrinol* 2001; 171:273-284.
 206. Gibson JM, Aplin JD, White A, Westwood M: Regulation of IGF bioavailability in pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2001; 7:79-87.
 207. Gibson TL, Cohen P: Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9:241-253.

208. Gillen CD, Andrews HA, Prior P, Allan RN: Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut* 1994; 35:651-655.
209. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P et al.: Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 1994; 35:1590-1592.
210. Giovannucci E: Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001; 131:3109S-3120S.
211. Giovannucci E, Pollak M, Platz EA et al.: Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-3 and the risk of colorectal adenoma and cancer in the Nurses' Health Study. *Growth Horm IGF Res* 2000; 10 Suppl A:S30-S31.
212. Giovannucci E, Pollak MN, Platz EA et al.: A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:345-349.
213. Giudice LC, Conover CA, Bale L et al.: Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2359-2366.
214. Glantschnig H, Varga F, Klaushofer K: Thyroid hormone and retinoic acid induce the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 in mouse osteoblastic cells. *Endocrinology* 1996; 137:281-286.
215. Glantschnig H, Varga F, Luegmayer E, Klaushofer K: Characterization of the mouse insulin-like growth factor binding protein 4 gene regulatory region and expression studies. *DNA Cell Biol* 1998; 17:51-60.
216. Gockerman A, Clemmons DR: Porcine aortic smooth muscle cells secrete a serine protease for insulin-like growth factor binding protein-2. *Circ Res* 1995; 76:514-521.
217. Gold P, Freedman SO: Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122:467-481.
218. Gori F, Hofbauer LC, Conover CA, Khosla S: Effects of androgens on the insulin-like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line. *Endocrinology* 1999; 140:5579-5586.
219. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 2000; 18:1967-1979.
220. Greco A, Ittmann M, Barletta C et al.: Chromosomal localization of human genes required for G1 progression in mammalian cells. *Genomics* 1989; 4:240-245.
221. Greco A, Ittmann M, Basilico C: Molecular cloning of a gene that is necessary for G1 progression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:1565-1569.

-
222. Green AR: Peptide regulatory factors: multifunctional mediators of cellular growth and differentiation. *Lancet* 1989; 1:705-707.
 223. Green BN, Jones SB, Streck RD et al.: Distinct expression patterns of insulin-like growth factor binding proteins 2 and 5 during fetal and postnatal development. *Endocrinology* 1994; 134:954-962.
 224. Greisen S, Flyvbjerg A, Ledet T, Ovesen P: Regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by human granulosa luteal cells in a polycystic ovary-like environment. *Fertil Steril* 2002; 78:162-168.
 225. Groden J, Thliveris A, Samowitz W et al.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66:589-600.
 226. Grothey A, Voigt W, Schober C et al.: The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125:166-173.
 227. Guardavaccaro D, Ciotti MT, Schafer BW et al.: Inhibition of differentiation in myoblasts deprived of the interferon-related protein PC4. *Cell Growth Differ* 1995; 6:159-169.
 228. Gumbiner BM: Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol* 2000; 148:399-404.
 229. Gustafsson T, Andersson P, Arnqvist HJ: Different inhibitory actions of IGFBP-1, -2 and -4 on IGF-I effects in vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* 1999; 161:245-253.
 230. Gustafsson T, Andersson P, Chen Y et al.: Interaction of angiotensin II and the insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 277:H499-H507.
 231. Guy PM, Kenny DA, Gill GN: The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin. *Mol Biol Cell* 1999; 10:1973-1984.
 232. Hall J, Angele S: Radiation, DNA damage and cancer. *Mol Med Today* 1999; 5:157-164.
 233. Hall K, Lundin G, Pova G: Serum levels of the low molecular weight form of insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988; 118:321-326.
 234. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE et al.: The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332:839-847.
 235. Haniu M, Denis P, Young Y et al.: Characterization of Alzheimer's beta - secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* 2000; 275:21099-21106.
 236. Hankins GR, De Souza AT, Bentley RC et al.: M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 1996; 12:2003-2009.

-
237. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA et al.: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998: 351:1393-1396.
 238. Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, Pretlow TP: Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res* 2001: 61:8085-8088.
 239. Harris TM, Rogler LE, Rogler CE: Reactivation of the maternally imprinted IGF2 allele in TGFalpha induced hepatocellular carcinomas in mice. *Oncogene* 1998: 16:203-209.
 240. Hassan AB: Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Am J Pathol* 2003: 162:3-6.
 241. Hassan AB, Howell JA: Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* 2000: 60:1070-1076.
 242. Hayford K, Boes M, Dake BL, Bar RS: Regulations of IGF binding proteins in human aorta vascular smooth muscle cells by cAMP, dexamethasone and IGF-I. *Growth Horm IGF Res* 1998: 8:369-375.
 243. He TC, Sparks AB, Rago C et al.: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998: 281:1509-1512.
 244. Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M et al.: Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000: 97:2229-2234.
 245. Hill DJ, Petrik J, Arany E et al.: Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *J Endocrinol* 1999: 161:153-165.
 246. Hill.D.J.: Insulin-like growth factors. In: *Encyclopedia of Molecular Biology*. John Wiley & Sons INC ,New York 1999:1268-1274.
 247. Hoeflich A, Bunger L, Nedbal S et al.: Growth selection in mice reveals conserved and redundant expression patterns of the insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol* 2004: 136:248-259.
 248. Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H et al.: Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 2000: 60:834-838.
 249. Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF et al.: Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 2001: 142:1889-1898.
 250. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H et al.: Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* 2001: 61:8601-8610.
 251. Hoeflich A, Wu M, Mohan S et al.: Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 1999: 140:5488-5496.

-
252. Hoeflich A, Yang Y, Huber S et al.: Expression of IGFBP-2, -3, and -4 mRNA during differentiation of Caco-2 colon epithelial cells. *Am J Physiol* 1996: 271:E922-E931.
 253. Hoflich A, Lahm H, Blum W et al.: Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett* 1998: 434:329-334.
 254. Holthuizen PE, Cleutjens CB, Veenstra GJ et al.: Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes. *Regul Pept* 1993: 48:77-89.
 255. Honda Y, Landale EC, Strong DD et al.: Recombinant synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4): Development, validation, and application of a radioimmunoassay for IGF-4 in human serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 1996: 81:1389-1396.
 256. Hoops TC, Traber PG: Molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997: 11:609-633.
 257. Horiuchi T, Shinohara Y, Sakamoto Y et al.: Expression of insulin-like growth factor II by a gastric carcinoma associated with hypoglycaemia. *Virchows Arch* 1994: 424:449-452.
 258. Houck CM, Rinehart FP, Schmid CW: A ubiquitous family of repeated DNA sequences in the human genome. *J Mol Biol* 1979: 132:289-306.
 259. Hourvitz A, Kuwahara A, Hennebold JD et al.: The regulated expression of the pregnancy-associated plasma protein-A in the rodent ovary: a proposed role in the development of dominant follicles and of corpora lutea. *Endocrinology* 2002: 143:1833-1844.
 260. Hourvitz A, Widger AE, Filho FL et al.: Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. *J Clin Endocrinol Metab* 2000: 85:4916-4920.
 261. Humbel RE: Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 1990: 190:445-462.
 262. Hunter KW: Host genetics and tumour metastasis. *Br J Cancer* 2004: 90:752-755.
 263. Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q et al.: Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* 1997: 272:32719-32722.
 264. Huynh H: In vivo regulation of the insulin-like growth factor system of mitogens by human chorionic gonadotropin. *Int J Oncol* 1998: 13:571-575.
 265. Huynh H, Beamer W, Pollak M, Chan TW: Modulation of transforming growth factor beta1 gene expression in the mammary gland by insulin-like growth factor I and octreotide. *Int J Oncol* 2000: 16:277-281.
 266. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG: The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999: 20:761-787.

-
267. Ichii S, Horii A, Nakatsuru S et al.: Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum Mol Genet* 1992; 1:387-390.
268. Ilvesmaki V, Liu J, Heikkila P et al.: Expression of insulin-like growth factor binding protein 1-6 genes in adrenocortical tumors and pheochromocytomas. *Horm Metab Res* 1998; 30:619-623.
269. Ilyas M, Tomlinson IP: The interactions of APC, E-cadherin and beta-catenin in tumour development and progression. *J Pathol* 1997; 182:128-137.
270. Imai Y, Busby WH, Jr., Smith CE et al.: Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1997; 100:2596-2605.
271. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S et al.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561.
272. Iwashita M, Kudo Y, Yoshimura Y et al.: Physiological role of insulin-like-growth-factor-binding protein-4 in human folliculogenesis. *Horm Res* 1996; 46 Suppl 1:31-36.
273. Jackson AL, Chen R, Loeb LA: Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:12468-12473.
274. Jackson AL, Loeb LA: On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin Cancer Biol* 1998; 8:421-429.
275. Jacot TA, Clemmons DR: Effect of glucose on insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis. *Endocrinology* 1998; 139:44-50.
276. Jacquinet E, Rao NV, Rao GV et al.: Cloning and characterization of the cDNA and gene for human epitheliasin. *Eur J Biochem* 2001; 268:2687-2699.
277. Jaiswal AS, Narayan S: Protein synthesis and transcriptional inhibitors control N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced levels of APC mRNA in a p53-dependent manner. *Int J Oncol* 1998; 13:733-740.
278. Jaiswal AS, Narayan S: p53-dependent transcriptional regulation of the APC promoter in colon cancer cells treated with DNA alkylating agents. *J Biol Chem* 2001; 276:18193-18199.
279. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP: Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 1995; 267:1498-1502.
280. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N et al.: Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994; 54:5523-5526.
281. Jennische E, Hall CM: Expression and localisation of IGF-binding protein mRNAs in regenerating rat skeletal muscle. *APMIS* 2000; 108:747-755.

-
282. Jiang W, Le B: Structure and expression of the human MEP1A gene encoding the alpha subunit of metalloendopeptidase meprin A. *Arch Biochem Biophys* 2000: 379:183-187.
283. Jiang WG: Membrane ruffling of cancer cells: a parameter of tumour cell motility and invasion. *Eur J Surg Oncol* 1995: 21:307-309.
284. Johnson KF, Kornfeld S: The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi. *J Cell Biol* 1992: 119:249-257.
285. Jones JI, Busby WH, Jr., Wright G et al.: Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J Biol Chem* 1993: 268:1125-1131.
286. Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995: 16:3-34.
287. Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR: Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991: 88:7481-7485.
288. Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Jr. et al.: Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993: 90:10553-10557.
289. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A et al.: Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 1991: 66:601-613.
290. Kaaks R, Toniolo P, Akhmedkhanov A et al.: Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J Natl Cancer Inst* 2000: 92:1592-1600.
291. Kalebic T, Blakesley V, Slade C et al.: Expression of a kinase-deficient IGF-I-R suppresses tumorigenicity of rhabdomyosarcoma cells constitutively expressing a wild type IGF-I-R. *Int J Cancer* 1998: 76:223-227.
292. Kaleko M, Rutter WJ, Miller AD: Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 1990: 10:464-473.
293. Kalscheuer VM, Mariman EC, Schepens MT et al.: The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nat Genet* 1993: 5:74-78.
294. Kang JX, Li Y, Leaf A: Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997: 94:13671-13676.
295. Kanzaki S, Hilliker S, Baylink DJ, Mohan S: Evidence that human bone cells in culture produce insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 proteases. *Endocrinology* 1994: 134:383-392.

-
296. Karasik D, Rosen CJ, Hannan MT et al.: Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 5 and bone mineral density in elderly men and women. *Calcif Tissue Int* 2002: 71:323-328.
297. Karin M: Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *Faseb J* 1992: 6:2581-2590.
298. Kassem M, Okazaki R, De Leon D et al.: Potential mechanism of estrogen-mediated decrease in bone formation: estrogen increases production of inhibitory insulin-like growth factor-binding protein-4. *Proc Assoc Am Physicians* 1996: 108:155-164.
299. Kassem M, Okazaki R, Harris SA et al.: Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *Calcif Tissue Int* 1998: 62:60-66.
300. Kato GJ, Dang CV: Function of the c-Myc oncoprotein. *Faseb J* 1992: 6:3065-3072.
301. Kato H, Faria TN, Stannard B et al.: Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J Biol Chem* 1993: 268:2655-2661.
302. Kato M, Ishizaki A, Hellman U et al.: A human keratinocyte cell line produces two autocrine growth inhibitors, transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor binding protein-6, in a calcium- and cell density-dependent manner. *J Biol Chem* 1995: 270:12373-12379.
303. Katz LE, Bhala A, Camron E et al.: IGF-II, IGF-binding proteins and IGF receptors in pancreatic beta-cell lines. *J Endocrinol* 1997: 152:455-464.
304. Kelekar A, Cole MD: Immortalization by c-myc, H-ras, and Ela oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses. *Mol Cell Biol* 1987: 7:3899-3907.
305. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE et al.: Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 1996: 28:619-637.
306. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972: 26:239-257.
307. Kessler U, Aumeier S, Funk B, Kiess W: Biosynthetic labeling of beta-hexosaminidase B: inhibition of the cellular uptake of lysosomal secretions containing [3H]hexosaminidase B by insulin-like growth factor-II in rat C6 glial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992: 90:147-153.
308. Kiepe D, Andress DL, Mohan S et al.: Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001: 12:2400-2410.
309. Kiepe D, Ulinski T, Powell DR et al.: Differential effects of insulin-like growth

- factor binding proteins-1, -2, -3, and -6 on cultured growth plate chondrocytes. *Kidney Int* 2002; 62:1591-1600.
310. Kiess W, Thomas CL, Greenstein LA et al.: Insulin-like growth factor-II (IGF-II) inhibits both the cellular uptake of beta-galactosidase and the binding of beta-galactosidase to purified IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1989; 264:4710-4714.
311. Kiess W, Yang Y, Kessler U, Hoeflich A: Insulin-like growth factor II (IGF-II) and the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor: the myth continues. *Horm Res* 1994; 41 Suppl 2:66-73.
312. Kim EC, Lance P: Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26:1-17.
313. Kim EJ, Kang YH, Schaffer BS et al.: Inhibition of Caco-2 cell proliferation by all-trans retinoic acid: role of insulin-like growth factor binding protein-6. *J Cell Physiol* 2002; 190:92-100.
314. Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.
315. Kinzler KW, Vogelstein B: Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 1996; 379:19-20.
316. Kjeldsberg CR, Altshuler JH: Carcinoma in situ of the colon. *Dis Colon Rectum* 1970; 13:376-381.
317. Knudtson KL, Boes M, Sandra A et al.: Distribution of chimeric IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-4 in the rat heart: importance of C-terminal basic region. *Endocrinology* 2001; 142:3749-3755.
318. Kokontis JM, Wagner AJ, O'Leary M et al.: A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* 2001; 20:659-668.
319. Kolodner RD: Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci* 1995; 20:397-401.
320. Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:631-664.
321. Kornfeld S: Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:307-330.
322. Kotaka M, Ngai SM, Garcia-Barcelo M et al.: Characterization of the human 36-kDa carboxyl terminal LIM domain protein (hCLIM1). *J Cell Biochem* 1999; 72:279-285.
323. Kovacina KS, Steele-Perkins G, Purchio AF et al.: Interactions of recombinant and platelet transforming growth factor-beta 1 precursor with the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160:393-403.

324. Kratz G, Lake M, Ljungstrom K et al.: Effect of recombinant IGF binding protein-1 on primary cultures of human keratinocytes and fibroblasts: selective enhancement of IGF-1 but not IGF-2-induced cell proliferation. *Exp Cell Res* 1992; 202:381-385.
325. Kudo Y, Iwashita M, Iguchi T et al.: Estrogen and parathyroid hormone regulate insulin-like growth factor binding protein-4 in SaOS-2 cells. *Life Sci* 1997; 61:165-170.
326. Kudo Y, Iwashita M, Itatsu S et al.: Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-4 protease activity by estrogen and parathyroid hormone in SaOS-2 cells: implications for the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Endocrinol* 1996; 150:223-229.
327. Kuemmerle JF, Teng B: Regulation of IGFBP-4 levels in human intestinal muscle by an IGF-I-activated, confluence-dependent protease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:G975-G982.
328. Kuraguchi M, Cook H, Williams ED, Thomas GA: Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *J Pathol* 2001; 193:517-521.
329. Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen EF, Kassem M: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the production of insulin-like growth factor-binding proteins-2, -3 and -4 in human bone marrow stromal cells. *Eur J Endocrinol* 2001; 144:549-557.
330. Kwak KB, Chung SS, Kim OM et al.: Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1175:243-249.
331. Lahm H., Allenbacher A., Hoeflich A. et al.: Differential Growth Factor Responsiveness and Receptor Expression in Primary and Metastatic Human Colorectal Carcinoma Cells. *Contributions to Oncology, Karger* 1999; Vol 54:317-323.
332. Lahm H, Amstad P, Wyniger J et al.: Blockade of the insulin-like growth-factor-I receptor inhibits growth of human colorectal cancer cells: evidence of a functional IGF-II-mediated autocrine loop. *Int J Cancer* 1994; 58:452-459.
333. Lahm H, Amstad P, Yilmaz A et al.: Differential effect of interleukin-4 and transforming growth factor beta 1 on expression of proto-oncogenes and autocrine insulin-like growth factor II in colorectal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220:334-340.
334. Lahm H, Gittner K, Krebs O et al.: Diethylnitrosamine induces long-lasting re-expression of insulin-like growth factor II during early stages of liver carcinogenesis in mice. *Growth Horm IGF Res* 2002; 12:69-79.
335. Lahm H, Hoeflich A, Rieger N et al.: Identification of transgenic mice by direct PCR analysis of lysates of epithelial cells obtained from the inner surface of the rectum. *Transgenic Res* 1998; 7:131-134.

-
336. Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY et al.: Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 2000: 10:703-713.
337. LAJTHA LG: ON THE CONCEPT OF THE CELL CYCLE. *J Cell Physiol* 1963: 62:SUPPL1-SUPPL5.
338. Lalou C, Silve C, Rosato R et al.: Interactions between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1994: 135:2318-2326.
339. Lamonerie T, Laviaille C, de Galle B et al.: Constitutive or inducible overexpression of the IGF-2 gene in cells of a human colon carcinoma cell line. *Exp Cell Res* 1995: 216:342-351.
340. LaMont JT, O'Gorman TA: Experimental colon cancer. *Gastroenterology* 1978: 75:1157-1169.
341. Landale EC, Strong DD, Mohan S, Baylink DJ: Sequence comparison and predicted structure for the four exon-encoded regions of human insulin-like growth factor binding protein 4. *Growth Factors* 1995: 12:245-250.
342. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992: 358:15-16.
343. Latour D, Mohan S, Linkhart TA et al.: Inhibitory insulin-like growth factor-binding protein: cloning, complete sequence, and physiological regulation. *Mol Endocrinol* 1990: 4:1806-1814.
344. Laureys G, Barton DE, Ullrich A, Francke U: Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse. *Genomics* 1988: 3:224-229.
345. Laursen LS, Overgaard MT, Soe R et al.: Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett* 2001: 504:36-40.
346. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT et al.: The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999: 96:3149-3153.
347. Leal SM, Huang SS, Huang JS: Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor-beta receptor in mink lung epithelial cells. *J Biol Chem* 1999: 274:6711-6717.
348. Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS: The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* 1997: 272:20572-20576.
349. Lee HG, Vega RA, Phung LT et al.: The effect of growth hormone-releasing peptide-2 (KP102) administration on plasma insulin-like growth factor (IGF)-1

- and IGF-binding proteins in Holstein steers on different planes of nutrition. *Domest Anim Endocrinol* 2000: 18:293-308.
350. Lee JS, Weiss J, Martin JL, Scott CD: Increased expression of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor in breast cancer cells alters tumorigenic properties in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2003: 107:564-570.
351. Lee SJ, Nathans D: Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors. *J Biol Chem* 1988: 263:3521-3527.
352. LeRoith D, Roberts CT, Jr.: Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1993: 692:1-9.
353. LeRoith D, Roberts CT, Jr.: The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003: 195:127-137.
354. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr.: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995: 16:143-163.
355. Lewis MI, Horvitz GD, Clemmons DR, Fournier M: Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002: 282:E483-E490.
356. Li CY, Suardet L, Little JB: Potential role of WAF1/Cip1/p21 as a mediator of TGF-beta cytoinhibitory effect. *J Biol Chem* 1995: 270:4971-4974.
357. Li X, Massa PE, Hanidu A et al.: IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *J Biol Chem* 2002: 277:45129-45140.
358. Li YM, Arkins S, McCusker RH, Jr. et al.: Macrophages synthesize and secrete a 25-kilodalton protein that binds insulin-like growth factor-I. *J Immunol* 1996: 156:64-72.
359. Lin B, Ferguson C, White JT et al.: Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res* 1999: 59:4180-4184.
360. Lin TM, Halbert SP, Kiefer D: Pregnancy-associated serum antigens in the rat and mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974: 145:62-66.
361. Lindberg MK, Moverare S, Eriksson AL et al.: Identification of estrogen-regulated genes of potential importance for the regulation of trabecular bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2002: 17:2183-2195.
362. Lindvall C, Hou M, Komurasaki T et al.: Molecular characterization of human telomerase reverse transcriptase-immortalized human fibroblasts by gene expression profiling: activation of the epiregulin gene. *Cancer Res* 2003: 63:1743-1747.
363. Liu B, Farrington SM, Petersen GM et al.: Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995: 1:348-352.

364. Liu B, Lee HY, Weinzimer SA et al.: Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem* 2000: 275:33607-33613.
365. Liu XJ, Malkowski M, Guo Y et al.: Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 1993: 132:1176-1183.
366. Lobsiger CS, Magyar JP, Taylor V et al.: Identification and characterization of a cDNA and the structural gene encoding the mouse epithelial membrane protein-1. *Genomics* 1996: 36:379-387.
367. Losi L, Roncucci L, Di Gregorio C et al.: K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996: 178:259-263.
368. Lund LH, Andersson K, Zuber B et al.: Signal sequence deletion and fusion to tetanus toxoid epitope augment antitumor immune responses to a human carcinoembryonic antigen (CEA) plasmid DNA vaccine in a murine test system. *Cancer Gene Ther* 2003: 10:365-376.
369. Lynch HT, de la CA: Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999: 36:801-818.
370. MacDonald RG, Schaffer BS, Kang IJ et al.: Growth inhibition and differentiation of the human colon carcinoma cell line, Caco-2, by constitutive expression of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Gastroenterol Hepatol* 1999: 14:72-78.
371. Madhukar BV, Trosko JE: The causes of cancer: implications for prevention and treatment. *Indian J Pediatr* 1997: 64:131-141.
372. Maile LA, Holly JM: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation. *Growth Horm IGF Res* 1999: 9:85-95.
373. Majander-Nordenswan P, Sainio M, Turunen O et al.: Genomic structure of the human ezrin gene. *Hum Genet* 1998: 103:662-665.
374. Manes S, Mira E, Barbacid MM et al.: Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 1997: 272:25706-25712.
375. Marinaro JA, Neumann GM, Russo VC et al.: O-glycosylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-6 maintains high IGF-II binding affinity by decreasing binding to glycosaminoglycans and susceptibility to proteolysis. *Eur J Biochem* 2000: 267:5378-5386.
376. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al.: Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995: 268:1336-1338.
377. Martin JL, Willetts KE, Baxter RC: Purification and properties of a novel insulin-like growth factor-II binding protein from transformed human

- fibroblasts. *J Biol Chem* 1990: 265:4124-4130.
378. Marx J: Oncogenes reach a milestone. *Science* 1994: 266:1942-1944.
379. Mathieu M, Rochefort H, Barenton B et al.: Interactions of cathepsin-D and insulin-like growth factor-II (IGF-II) on the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II. *Mol Endocrinol* 1990: 4:1327-1335.
380. Matsell DG, Delhanty PJ, Stepaniuk O et al.: Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis. *Kidney Int* 1994: 46:1031-1042.
381. Matsumoto T, Gargosky SE, Kelley K, Rosenfeld RG: Characterization of an insulin-like growth factor binding protein-5 protease produced by rat articular chondrocytes and a neuroblastoma cell line. *Growth Regul* 1996: 6:185-190.
382. Mazerbourg S, Zapf J, Bar RS et al.: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine, and porcine preovulatory follicles: regulation by IGFs and heparin-binding domain-containing peptides. *Biol Reprod* 2000: 63:390-400.
383. McCusker RH, Clemmons DR: Effects of cytokines on insulin-like growth factor-binding protein secretion by muscle cells in vitro. *Endocrinology* 1994: 134:2095-2102.
384. McCusker RH, Clemmons DR: Role for cyclic adenosine monophosphate in modulating insulin-like growth factor binding protein secretion by muscle cells. *J Cell Physiol* 1998: 174:293-300.
385. McLellan EA, Bird RP: Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* 1988: 48:6187-6192.
386. Medeiros AC, Nagai MA, Neto MM, Brentani RR: Loss of heterozygosity affecting the APC and MCC genetic loci in patients with primary breast carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994: 3:331-333.
387. Melis R, White R: Characterization of colonic polyps by two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* 1999: 20:1055-1064.
388. Mellgren RL: Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997: 236:555-558.
389. Mendelsohn ML: The growth fraction: a new concept applied to tumours. *Science* 1963: 132:1496.
390. Menouny M, Binoux M, Babajko S: Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neuroblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Endocrinology* 1997: 138:683-690.
391. Messina A, Oliva M, Rosato C et al.: Mapping of the human Voltage-Dependent Anion Channel isoforms 1 and 2 reconsidered. *Biochem Biophys*

- Res Commun 1999: 255:707-710.
392. Michell NP, Dent S, Langman MJ, Eggo MC: Insulin-like growth factor binding proteins as mediators of IGF-I effects on colon cancer cell proliferation. *Growth Factors* 1997: 14:269-277.
393. Michell NP, Langman MJ, Eggo MC: Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *Br J Cancer* 1997: 76:60-66.
394. Midgley R, Kerr D: Colorectal cancer. *Lancet* 1999: 353:391-399.
395. Miller EC, Miller JA: Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 1981: 47:2327-2345.
396. Miller JA, Miller EC: Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutat Res* 1975: 33:25-26.
397. Milne M, Quail JM, Rosen CJ, Baran DT: Insulin-like growth factor binding proteins in femoral and vertebral bone marrow stromal cells: expression and regulation by thyroid hormone and dexamethasone. *J Cell Biochem* 2001: 81:229-240.
398. Minamoto T, Yamashita N, Ochiai A et al.: Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* 1995: 75:1520-1526.
399. Mishra L, Bass B, Ooi BS et al.: Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. *Growth Horm IGF Res* 1998: 8:473-479.
400. Miyakoshi N, Qin X, Kasukawa Y et al.: Systemic administration of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) increases bone formation parameters in mice by increasing IGF bioavailability via an IGFBP-4 protease-dependent mechanism. *Endocrinology* 2001: 142:2641-2648.
401. Miyakoshi N, Richman C, Qin X et al.: Effects of recombinant insulin-like growth factor-binding protein-4 on bone formation parameters in mice. *Endocrinology* 1999: 140:5719-5728.
402. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H et al.: Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992: 1:229-233.
403. Modrich P: Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991: 25:229-253.
404. Mohan S, Baylink DJ: Serum insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 levels in aging and age-associated diseases. *Endocrine* 1997: 7:87-91.
405. Mohan S, Baylink DJ: IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *J Endocrinol* 2002: 175:19-31.

-
406. Mohan S, Epstein JB: Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 2003: 39:537-546.
 407. Mohan S, Farley JR, Baylink DJ: Age-related changes in IGFBP-4 and IGFBP-5 levels in human serum and bone: implications for bone loss with aging. *Prog Growth Factor Res* 1995: 6:465-473.
 408. Mohan S, Nakao Y, Honda Y et al.: Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J Biol Chem* 1995: 270:20424-20431.
 409. Mohan S, Strong DD, Lempert UG et al.: Studies on regulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-4 production in human bone cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992: 127:555-564.
 410. Mohler JL, Levy F, Sharief Y: Metastatic potential and substrate dependence of cell motility and attachment in the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma model. *Cancer Res* 1991: 51:6580-6585.
 411. Mohseni-Zadeh S, Binoux M: Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. *Endocrinology* 1997: 138:5645-5648.
 412. Monget P, Mazerbourg S, Delpuech T et al.: Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biol Reprod* 2003: 68:77-86.
 413. Mori H, Sugie S, Yoshimi N et al.: Control of cell proliferation in cancer prevention. *Mutat Res* 1999: 428:291-298.
 414. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996: 93:7950-7954.
 415. Morson BC, Whiteway JE, Jones EA et al.: Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. *Gut* 1984: 25:437-444.
 416. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983: 65:55-63.
 417. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG: Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 1987: 120:1279-1282.
 418. Murphy SM, Urbani L, Stearns T: The mammalian gamma-tubulin complex contains homologues of the yeast spindle pole body components spc97p and spc98p. *J Cell Biol* 1998: 141:663-674.
 419. Nakamura Y: The role of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in

- human cancers. *Adv Cancer Res* 1993: 62:65-87.
420. Nam TJ, Busby WH, Jr., Clemmons DR: Characterization and determination of the relative abundance of two types of insulin-like growth factor binding protein-5 proteases that are secreted by human fibroblasts. *Endocrinology* 1996: 137:5530-5536.
421. Narayan S, Jaiswal AS: Activation of adenomatous polyposis coli (APC) gene expression by the DNA-alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine requires p53. *J Biol Chem* 1997: 272:30619-30622.
422. Narayan S, Roy D: Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003: 2:41.
423. Nascimbeni R, Villanacci V, Mariani PP et al.: Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am J Surg Pathol* 1999: 23:1256-1263.
424. Neiberghs HL, Hein DW, Spratt JS: Genetic profiling of colon cancer. *J Surg Oncol* 2002: 80:204-213.
425. Neumann GM, Bach LA: The N-terminal disulfide linkages of human insulin-like growth factor-binding protein-6 (hIGFBP-6) and hIGFBP-1 are different as determined by mass spectrometry. *J Biol Chem* 1999: 274:14587-14594.
426. Nickerson T, Huynh H: Vitamin D analogue EB1089-induced prostate regression is associated with increased gene expression of insulin-like growth factor binding proteins. *J Endocrinol* 1999: 160:223-229.
427. Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB et al.: Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993: 68:507-514.
428. Ninh NX, Maiter D, Lause P et al.: Continuous administration of growth hormone does not prevent the decrease of IGF-I gene expression in zinc-deprived rats despite normalization of liver GH binding. *Growth Horm IGF Res* 1998: 8:465-472.
429. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al.: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991: 253:665-669.
430. Noll K, Wegmann BR, Havemann K, Jaques G: Insulin-like growth factors stimulate the release of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and degradation of IGFBP-4 in nonsmall cell lung cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1996: 81:2653-2662.
431. Nyman T, Pekonen F: The expression of insulin-like growth factors and their binding proteins in normal human lymphocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993: 128:168-172.
432. O'Gorman DB, Costello M, Weiss J et al.: Decreased insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor expression enhances tumorigenicity in JEG-3 cells. *Cancer Res* 1999: 59:5692-5694.
433. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J et al.: Relaxation of insulin-like growth factor II

- gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 1993: 362:749-751.
434. Oh Y, Muller HL, Pham H, Rosenfeld RG: Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1993: 268:26045-26048.
435. Ohkame H, Masuda H, Ishii Y, Kanai Y: Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (4F2hc) in liver tumor lesions of rat models. *J Surg Oncol* 2001: 78:265-271.
436. Ohtani K, Sakamoto H, Rutherford T et al.: Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. *Cancer Lett* 1999: 147:31-38.
437. Ojala P, Sundstrom J, Gronroos JM et al.: mRNA differential display of gene expression in colonic carcinoma. *Electrophoresis* 2002: 23:1667-1676.
438. Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A: Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003: 14:2844-2860.
439. Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S et al.: Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1993: 53:382-387.
440. Otori K, Sugiyama K, Hasebe T et al.: Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res* 1995: 55:4743-4746.
441. Overgaard MT, Boldt HB, Laursen LS et al.: Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J Biol Chem* 2001: 276:21849-21853.
442. Overgaard MT, Haaning J, Boldt HB et al.: Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor. *J Biol Chem* 2000: 275:31128-31133.
443. Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M et al.: Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999: 61:1083-1089.
444. Pagter-Holthuisen P, Jansen M, van der Kammen RA et al.: Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. *Biochim Biophys Acta* 1988: 950:282-295.
445. Pagter-Holthuisen P, Jansen M, van Schaik FM et al.: The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett* 1987: 214:259-264.
446. Palmqvist R, Stattin P, Rinaldi S et al.: Plasma insulin, IGF-binding proteins-1 and -2 and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Int J Cancer* 2003: 107:89-93.

-
447. Pariat M, Carillo S, Molinari M et al.: Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol Cell Biol* 1997: 17:2806-2815.
448. Park HS, Goodlad RA, Wright NA: The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res* 1997: 57:4507-4510.
449. Park JH, Corkins MR, Vanderhoof JA et al.: Expression of insulin-like growth factor-II and insulin-like growth factor binding proteins during Caco-2 cell proliferation and differentiation. *J Cell Physiol* 1996: 166:396-406.
450. Parker A, Gockerman A, Busby WH, Clemmons DR: Properties of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells. *Endocrinology* 1995: 136:2470-2476.
451. Parsons R, Li GM, Longley M et al.: Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 1995: 268:738-740.
452. Pedroni M, Sala E, Scarselli A et al.: Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2001: 61:896-899.
453. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P et al.: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993: 260:810-812.
454. Peoples R, Milatovich A, Francke U: Hemizygoty at the insulin-like growth factor I receptor (IGF1R) locus and growth failure in the ring chromosome 15 syndrome. *Cytogenet Cell Genet* 1995: 70:228-234.
455. Pepe MG, Ginzton NH, Lee PD et al.: Receptor binding and mitogenic effects of insulin and insulinlike growth factors I and II for human myeloid leukemic cells. *J Cell Physiol* 1987: 133:219-227.
456. Peraino C, Fry RJ, Staffeldt E: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* 1971: 31:1506-1512.
457. Perks CM, Bowen S, Gill ZP et al.: Differential IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding proteins (1-6) on apoptosis of breast epithelial cells. *J Cell Biochem* 1999: 75:652-664.
458. Piferrer F, Li D, Shimasaki S, Erickson GF: Transforming growth factor-alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) expression and blocks follicle-stimulating hormone regulation of IGFBP-4 production in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1997: 133:9-17.
459. Pignatelli M: Models of colorectal tumour differentiation. *Cancer Surv* 1993: 16:3-13.
460. Pintar J, Schuller A, Bradshaw S et al.: Genetic disruption of IGF binding proteins. In: *Molecular Mechanisms to Regulate the Activities of Insulin-like Growth Factors*. Elsevier Sciences Amsterdam 1998: (Takano, K., Hizuka, N. and Takahashi, S.I., Eds.):65-70.

461. Pitot HC: Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1989: 80:599-607.
462. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000: 14:1837-1851.
463. Polakis P, Hart M, Rubinfeld B: Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999: 470:23-32.
464. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC: The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999: 20:535-582.
465. Potter VR: Initiation and promotion in cancer formation: the importance of studies on intercellular communication. *Yale J Biol Med* 1980: 53:367-384.
466. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y et al.: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992: 359:235-237.
467. Pozhariski KM, Likhachev AJ, Klimashevski VF, Shaposhnikov JD: Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology. *Adv Cancer Res* 1979: 30:165-237.
468. Prasad PD, Wang H, Huang W et al.: Molecular and functional characterization of the intestinal Na⁺-dependent multivitamin transporter. *Arch Biochem Biophys* 1999: 366:95-106.
469. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS et al.: Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 1991: 51:1564-1567.
470. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC et al.: K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993: 85:2004-2007.
471. Pretlow TP, Lapinsky AS, Flowers LC et al.: Enzymatic histochemistry of mouse kidney in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987: 35:483-487.
472. Pretlow TP, O'Riordan MA, Spancake KM, Pretlow TG: Two types of putative preneoplastic lesions identified by hexosaminidase activity in whole-mounts of colons from F344 rats treated with carcinogen. *Am J Pathol* 1993: 142:1695-1700.
473. Pretlow TP, Roukhadze EV, O'Riordan MA et al.: Carcinoembryonic antigen in human colonic aberrant crypt foci. *Gastroenterology* 1994: 107:1719-1725.
474. Price GJ, Berka JL, Edmondson SR et al.: Localization of mRNAs for insulin-like growth factor binding proteins 1 to 6 in rat kidney. *Kidney Int* 1995: 48:402-411.
475. Price JE: The biology of cancer metastasis. *Prog Clin Biol Res* 1990: 354A:237-255.
476. Price WA: Peptide growth factors regulate insulin-like growth factor binding protein production by fetal rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999: 20:332-341.

-
477. Price WA: PDGF-BB regulates IGF-mediated IGFBP-4 proteolysis in fetal lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 2001: 27:655-674.
478. Price WA, Moats-Staats BM, Stiles AD: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates IGFBP-3 and IGFBP-4 by multiple mechanisms in A549 human adenocarcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995: 13:466-476.
479. Price WA, Moats-Staats BM, Stiles AD: Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate insulin-like growth factor binding protein production by fetal rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002: 26:283-289.
480. Pruzanski W, Stefanski E, Vadas P et al.: Regulation of the cellular expression of secretory and cytosolic phospholipases A2, and cyclooxygenase-2 by peptide growth factors. *Biochim Biophys Acta* 1998: 1403:47-56.
481. Putowski L, Rohan RM, Choi DS et al.: Rat ovarian insulin-like growth factor binding protein-4: a hormone-dependent granulosa cell-derived antigonadotropin. *J Soc Gynecol Investig* 1997: 4:144-151.
482. Qin C, Singh P, Safe S: Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology* 1999: 140:2501-2508.
483. Qin X, Byun D, Lau KH et al.: Evidence that the interaction between insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein (IGFBP)-4 is essential for the action of the IGF-II-dependent IGFBP-4 protease. *Arch Biochem Biophys* 2000: 379:209-216.
484. Qin X, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S: Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein-4. *J Biol Chem* 1998: 273:23509-23516.
485. Radulescu RT: Nuclear localization signal in insulin-like growth factor-binding protein type 3. *Trends Biochem Sci* 1994: 19:278.
486. Rajah R, Bhala A, Nunn SE et al.: 7S nerve growth factor is an insulin-like growth factor-binding protein protease. *Endocrinology* 1996: 137:2676-2682.
487. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S: Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997: 18:801-831.
488. Ransohoff DF, Lang CA: Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1991: 325:37-41.
489. Rechler MM, Nissley SP: Insulin-like growth factor (IGF)/somatomedin receptor subtypes: structure, function, and relationships to insulin receptors and IGF carrier proteins. *Horm Res* 1986: 24:152-159.
490. Rechler MM, Nissley SP: Insulin-like growth factors. In: *Peptide growth factors and their receptors I*. Springer Publisher New York 1990: (Sporn, M.B., Roberts, A.B., Eds.):263-367.
491. Reddy BS, Watanabe K, Weisburger JH: Effect of high-fat diet on colon

- carcinogenesis in F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, or methylnitrosourea. *Cancer Res* 1977: 37:4156-4159.
492. Rees C, Clemmons DR: Inhibition of IGFBP-5 binding to extracellular matrix and IGF-I-stimulated DNA synthesis by a peptide fragment of IGFBP-5. *J Cell Biochem* 1998: 71:375-381.
493. Rees C, Clemmons DR, Horvitz GD et al.: A protease-resistant form of insulin-like growth factor (IGF) binding protein 4 inhibits IGF-1 actions. *Endocrinology* 1998: 139:4182-4188.
494. Reinmuth N, Liu W, Fan F et al.: Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002: 8:3259-3269.
495. Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Pommier GJ: Surface-bound plasmin induces selective proteolysis of insulin-like-growth-factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) and promotes autocrine IGF-II bio-availability in human colon-carcinoma cells. *Int J Cancer* 1997: 72:835-843.
496. Renehan AG, Jones J, Potten CS et al.: Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000: 83:1344-1350.
497. Renehan AG, Painter JE, O'Halloran D et al.: Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000: 85:3402-3408.
498. Resch ZT, Chen BK, Bale LK et al.: Pregnancy-associated plasma protein a gene expression as a target of inflammatory cytokines. *Endocrinology* 2004: 145:1124-1129.
499. Rex DK: Postpolypectomy and post-cancer resection surveillance. *Rev Gastroenterol Disord* 2003: 3:202-209.
500. Richardson RL, Hausman GJ, Wright JT: Growth factor regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins (IGFBP) and preadipocyte differentiation in porcine stromal-vascular cell cultures. *Growth Dev Aging* 1998: 62:3-12.
501. Rickert RR, Auerbach O, Garfinkel L et al.: Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer* 1979: 43:1847-1857.
502. Rinderknecht E, Humbel RE: Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 1978: 89:283-286.
503. Rinderknecht E, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978: 253:2769-2776.
504. Rivera GM, Fortune JE: Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine

- follicular fluid. *Endocrinology* 2003: 144:437-446.
505. Roberts RA, Nebert DW, Hickman JA et al.: Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology. *Fundam Appl Toxicol* 1997: 38:107-115.
506. Robertson WR: A quantitative study of N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in unfixed tissue sections of the guinea-pig thyroid gland. *Histochem J* 1980: 12:87-96.
507. Robinson AM, Williamson DH: Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev* 1980: 60:143-187.
508. Roemer K: Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999: 380:879-887.
509. Rogers AE, Nauss KM: Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci* 1985: 30:87S-102S.
510. Rogler CE, Yang D, Rossetti L et al.: Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J Biol Chem* 1994: 269:13779-13784.
511. Roncucci L, Medline A, Bruce WR: Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1991: 1:57-60.
512. Roncucci L, Modica S, Pedroni M et al.: Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998: 77:2343-2348.
513. Roncucci L, Stamp D, Medline A et al.: Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 1991: 22:287-294.
514. Rooman RP, De Beeck LO, Martin M et al.: IGF-I, IGF-II, 'free' IGF-I and IGF-binding proteins-2 to -6 during high-dose oestrogen treatment in constitutionally tall girls. *Eur J Endocrinol* 2002: 146:823-829.
515. Rosato R, Lindenbergh-Kortleve D, Neck J et al.: Effect of chronic thyroxine treatment on IGF-I, IGF-II and IGF-binding protein expression in mammary gland and liver during pregnancy and early lactation in rats. *Eur J Endocrinol* 2002: 146:729-739.
516. Roth RA, Kiess W: Insulin-like growth factor receptors: recent developments and new methodologies. *Growth Regul* 1994: 4 Suppl 1:31-38.
517. Rotwein P: Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991: 5:3-18.
518. Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE: Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988: 85:265-269.
519. Rotwein P, Hall LJ: Evolution of insulin-like growth factor II: characterization of

- the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. *DNA Cell Biol* 1990: 9:725-735.
520. Russo VC, Bach LA, Fosang AJ et al.: Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 1997: 138:4858-4867.
521. Ryser HJ: Chemical carcinogenesis. *N Engl J Med* 1971: 285:721-734.
522. Saha D, Datta PK, Sheng H et al.: Synergistic induction of cyclooxygenase-2 by transforming growth factor-beta1 and epidermal growth factor inhibits apoptosis in epithelial cells. *Neoplasia* 1999: 1:508-517.
523. Sahagian GG, Distler J, Jourdian GW: Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981: 78:4289-4293.
524. Saitoh E, Minaguchi K, Ishibashi O: Production and characterization of two variants of human cystatin SA encoded by two alleles at the CST2 locus of the type 2 cystatin gene family. *Arch Biochem Biophys* 1998: 352:199-206.
525. Salahifar H, Baxter RC, Martin JL: Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 protease activity secreted by MCF-7 breast cancer cells: inhibition by IGFs does not require IGF-IGFBP interaction. *Endocrinology* 1997: 138:1683-1690.
526. Samani AA, Brodt P: The receptor for the type I insulin-like growth factor and its ligands regulate multiple cellular functions that impact on metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 2001: 10:289-312, viii.
527. Samowitz WS, Slattery ML: Microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gastroenterology* 1997: 112:1515-1519.
528. Sara VR, Hall K: Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 1990: 70:591-614.
529. Scharf JG, Knittel T, Dombrowski F et al.: Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998: 27:1275-1284.
530. Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM et al.: Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin beta subunit. *J Biol Chem* 2000: 275:23462-23470.
531. Scheel G, Herzog V: Mannose 6-phosphate receptor in porcine thyroid follicle cells. Localization and possible implications for the intracellular transport of thyroglobulin. *Eur J Cell Biol* 1989: 49:140-148.
532. Schildberg FW, Meyer G, Piltz S, Koebe HG: Surgical treatment of tumor metastases: general considerations and results. *Surg Today* 1995: 25:1-10.
533. Schipper DL, Wagenmans MJ, Peters WH, Wagener DJ: Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. *Eur J Cancer* 1998: 34:781-790.

534. Schmelz EM, Dillehay DL, Webb SK et al.: Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996: 56:4936-4941.
535. Schmelz EM, Sullards MC, Dillehay DL, Merrill AH, Jr.: Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *J Nutr* 2000: 130:522-527.
536. Schofield PN, Tate VE: Regulation of human IGF-II transcription in fetal and adult tissues. *Development* 1987: 101:793-803.
537. Schollmeyer JE: Calpain II involvement in mitosis. *Science* 1988: 240:911-913.
538. Schuller AG, van Neck JW, Lindenbergh-Kortleve DJ et al.: Gene expression of the IGF binding proteins during post-implantation embryogenesis of the mouse; comparison with the expression of IGF-I and -II and their receptors in rodent and human. *Adv Exp Med Biol* 1993: 343:267-277.
539. Schutt BS, Langkamp M, Rauschnabel U et al.: Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 2004: 32:859-868.
540. Sell C, Rubini M, Rubin R et al.: Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993: 90:11217-11221.
541. Seril DN, Liao J, Ho KL et al.: Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* 2002: 23:993-1001.
542. Shanmugathan M, Jothy S: Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol Int* 2000: 50:273-279.
543. Shaw P, Bovey R, Tardy S et al.: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992: 89:4495-4499.
544. Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A et al.: Retinoic acid and estrogen modulation of insulin-like growth factor binding protein-4 gene expression and the estrogen receptor status of human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993: 193:1232-1238.
545. Shelly M, Pinkas-Kramarski R, Guarino BC et al.: Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem* 1998: 273:10496-10505.
546. Shimasaki S, Ling N: Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 1991: 3:243-266.

-
547. Shimasaki S, Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N: Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol* 1990; 4:1451-1458.
 548. Shoubridge CA, Steeb CB, Read LC: IGFBP mRNA expression in small intestine of rat during postnatal development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G1378-G1384.
 549. Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y et al.: Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol* 1998; 29:469-475.
 550. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I et al.: The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:5522-5527.
 551. Siddle K, Urso B, Niesler CA et al.: Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:513-525.
 552. Silha JV, Murphy LJ: Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 2002; 143:3711-3714.
 553. Singh P, Dai B, Dhruva B, Widen SG: Episomal expression of sense and antisense insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 complementary DNA alters the mitogenic response of a human colon cancer cell line (HT-29) by mechanisms that are independent of and dependent upon IGF-I. *Cancer Res* 1994; 54:6563-6570.
 554. Singh P, Dai B, Yallampalli C, Xu Z: Expression of IGF-II and IGF-binding proteins by colon cancer cells in relation to growth response to IGFs. *Am J Physiol* 1994; 267:G608-G617.
 555. Singh P, Dai B, Yallampalli U et al.: Proliferation and differentiation of a human colon cancer cell line (CaCo2) is associated with significant changes in the expression and secretion of insulin-like growth factor (IGF) IGF-II and IGF binding protein-4: role of IGF-II. *Endocrinology* 1996; 137:1764-1774.
 556. Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP: Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol* 1997; 150:1805-1813.
 557. Siu IM, Robinson DR, Schwartz S et al.: The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res* 1999; 59:63-66.
 558. Slaga TJ: Host factors in the susceptibility of mice to tumour initiating and promoting agents. *IARC Sci Publ* 1983:257-273.
 559. Sloomweg MC, Ohlsson C, Salles JP et al.: Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 1995; 136:4210-4217.
 560. Smith AJ, Stern HS, Penner M et al.: Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994; 54:5527-5530.

-
561. Smith EP, Kamyar A, Niu W et al.: IGF-binding protein-4 expression and IGF-binding protein-4 protease activity are regulated coordinately in smooth muscle during postnatal development and after vascular injury. *Endocrinology* 2001: 142:4420-4427.
562. Snell K: Enzymes of serine metabolism in normal and neoplastic rat tissues. *Biochim Biophys Acta* 1985: 843:276-281.
563. Soares MB, Ishii DN, Efstratiadis A: Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA. *Nucleic Acids Res* 1985: 13:1119-1134.
564. Soares MB, Turken A, Ishii D et al.: Rat insulin-like growth factor II gene. A single gene with two promoters expressing a multitranscript family. *J Mol Biol* 1986: 192:737-752.
565. Spencer EM, Chan K: A 3-dimensional model for the insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs); supporting evidence using the structural determinants of the IGF binding site on IGFBP-3. *Prog Growth Factor Res* 1995: 6:209-214.
566. Sporn MB, Roberts AB: *Peptide Growth Factors and Their Receptors I and II*. Springer-Verlag, New York 1991:98-104.
567. Sporn MB, Roberts AB: Autocrine secretion--10 years later. *Ann Intern Med* 1992: 117:408-414.
568. Srinivasan N, Edwall D, Linkhart TA et al.: Insulin-like growth factor-binding protein-6 produced by human PC-3 prostate cancer cells: isolation, characterization and its biological action. *J Endocrinol* 1996: 149:297-303.
569. Stanbridge EJ: Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 1990: 24:615-657.
570. Standker L, Braulke T, Mark S et al.: Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 2000: 39:5082-5088.
571. Stewart CE, Rotwein P: Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996: 76:1005-1026.
572. Stirling JL: Human N-acetyl-beta-hexosaminidases: hydrolysis of N, N' diacetylchitobiose by a low molecular weight enzyme. *FEBS Lett* 1974: 39:171-175.
573. Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU et al.: Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *J Mol Med* 1996: 74:253-268.
574. Suardet L, Gaide AC, Calmes JM et al.: Responsiveness of three newly established human colorectal cancer cell lines to transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Cancer Res* 1992: 52:3705-3712.

-
575. Sussenbach JS, Steenbergh PH, Holthuizen P: Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* 1992; 2:1-9.
576. Suzuki H, Veda R, Takahashi T, Takahashi T: Altered imprinting in lung cancer. *Nat Genet* 1994; 6:332-333.
577. Takagi Y, Kohmura H, Futamura M et al.: Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* 1996; 111:1369-1372.
578. Takahashi M, Yamagiwa A, Nishimura T et al.: Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring gamma-tubulin ring complex. *Mol Biol Cell* 2002; 13:3235-3245.
579. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H et al.: Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998; 92:645-656.
580. Takayama T, Ohi M, Hayashi T et al.: Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121:599-611.
581. Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U: Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem* 1995; 270:28824-28833.
582. Tennant MK, Thrasher JB, Twomey PA et al.: Insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 expression in benign human prostate epithelium, prostate intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma of the prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:411-420.
583. Tennant MK, Thrasher JB, Twomey PA et al.: Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP)-4, -5, and -6 in the benign and malignant human prostate: IGFBP-5 messenger ribonucleic acid localization differs from IGFBP-5 protein localization. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3783-3792.
584. Tetsu O, McCormick F: Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
585. Thomas LN, Wright AS, Lazier CB et al.: Prostatic involution in men taking finasteride is associated with elevated levels of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs)-2, -4, and -5. *Prostate* 2000; 42:203-210.
586. Thomas T, Gori F, Spelsberg TC et al.: Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 1999; 140:5036-5044.
587. Thony B, Heizmann CW, Mattei MG: Chromosomal location of two human genes encoding tetrahydrobiopterin-metabolizing enzymes: 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase maps to 11q22.3-q23.3, and pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase maps to 10q22. *Genomics* 1994; 19:365-368.
588. Thurnherr N, Reinhart K: [Induction of colonic carcinoma in mice using 1,2-dimethylhydrazine hydrochloride]. *Schweiz Med Wochenschr* 1975; 105:585-

- 586.
589. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S: Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 1997: 326 (Pt 1):69-75.
590. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP: Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000: 97:710-715.
591. Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP et al.: Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986: 46:6169-6173.
592. Tricoli JV, Rall LB, Scott J et al.: Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* 1984: 310:784-786.
593. Tseng CC, Tseng CP, Levine MJ, Bobek LA: Differential effect toward inhibition of papain and cathepsin C by recombinant human salivary cystatin SN and its variants produced by a baculovirus system. *Arch Biochem Biophys* 2000: 380:133-140.
594. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S et al.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998: 93:705-716.
595. Tudek B, Bird RP, Bruce WR: Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res* 1989: 49:1236-1240.
596. Turri MO, Ilg EC, Thony B, Blau N: Structure, genomic localization and recombinant expression of the mouse 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase gene. *Biol Chem* 1998: 379:1441-1447.
597. Twentyman PR, Luscombe M: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987: 56:279-285.
598. Uchida K, Kado S, Ando M et al.: A mucinous histochemical study on malignancy of aberrant crypt foci (ACF) in rat colon. *J Vet Med Sci* 2001: 63:145-149.
599. Ulinski T, Mohan S, Kiepe D et al.: Serum insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5 in children with chronic renal failure: relationship to growth and glomerular filtration rate. The European Study Group for Nutritional Treatment of Chronic Renal Failure in Childhood. German Study Group for Growth Hormone Treatment in Chronic Renal Failure. *Pediatr Nephrol* 2000: 14:589-597.
600. Ullrich A, Riedel H, Yarden Y et al.: Protein kinases in cellular signal transduction: tyrosine kinase growth factor receptors and protein kinase C. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986: 51 Pt 2:713-724.
601. Van Doorn J, Cornelissen AJ, Buul-Offers SC: Plasma levels of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) under normal and pathological

- conditions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001: 54:655-664.
602. van Kleffens M, Groffen C, Lindenbergh-Kortleve DJ et al.: The IGF system during fetal-placental development of the mouse. *Mol Cell Endocrinol* 1998: 140:129-135.
603. van Kleffens M, Groffen CA, Dits NF et al.: Generation of antisera to mouse insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-1 to -6: comparison of IGFBP protein and messenger ribonucleic acid localization in the mouse embryo. *Endocrinology* 1999: 140:5944-5952.
604. van Neck JW, Dits NF, Cingel V et al.: Dose-response effects of a new growth hormone receptor antagonist (B2036-PEG) on circulating, hepatic and renal expression of the growth hormone/insulin-like growth factor system in adult mice. *J Endocrinol* 2000: 167:295-303.
605. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S et al.: Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999: 286:735-741.
606. Voci A, Demori, Bottazzi C, Fugassa E: Regulation of renal growth and IGFBP-4 expression by triiodothyronine during rat development. *Horm Metab Res* 2001: 33:256-262.
607. Vogelstein B: Cancer. A deadly inheritance. *Nature* 1990: 348:681-682.
608. Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 1992: 70:523-526.
609. von der KH, Loffler C, Hanes J et al.: The gene for the amyloid precursor-like protein APLP2 is assigned to human chromosome 11q23-q25. *Genomics* 1994: 20:308-311.
610. Vu TH, Hoffman AR: Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* 1994: 371:714-717.
611. Vu TH, Yballe C, Boonyanit S, Hoffman AR: Insulin-like growth factor II in uterine smooth-muscle tumors: maintenance of genomic imprinting in leiomyomata and loss of imprinting in leiomyosarcomata. *J Clin Endocrinol Metab* 1995: 80:1670-1676.
612. Wagner KJ, Patek CE, Miles C et al.: Truncation of WT1 results in downregulation of cyclin G1 and IGFBP-4 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001: 287:977-982.
613. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B: p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995: 55:5187-5190.
614. Walter J, Fluhrer R, Hartung B et al.: Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 2001: 276:14634-14641.
615. Wang J, Niu W, Nikiforov Y et al.: Targeted overexpression of IGF-I evokes distinct patterns of organ remodeling in smooth muscle cell tissue beds of transgenic mice. *J Clin Invest* 1997: 100:1425-1439.

616. Wang J, Niu W, Witte DP et al.: Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology* 1998: 139:2605-2614.
617. Wang S, Souza RF, Kong D et al.: Deficient transforming growth factor-beta1 activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGFII receptor-mutant tumors. *Cancer Res* 1997: 57:2543-2546.
618. Wang X, Lan M, Wu HP et al.: Direct effect of croton oil on intestinal epithelial cells and colonic smooth muscle cells. *World J Gastroenterol* 2002: 8:103-107.
619. Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF: Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 1994: 372:464-467.
620. Ward JM, Yamamoto RS, Benjamin T et al.: Experimentally induced cancer of the colon in rats and mice. *J Am Vet Med Assoc* 1974: 164:729-732.
621. Warren BS, Naylor MF, Winberg LD et al.: Induction and inhibition of tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993: 202:9-15.
622. Warren BS, Slaga TJ: Mechanisms of inhibition of tumor progression. *Basic Life Sci* 1993: 61:279-289.
623. Wegmann BR, Schoneberger HJ, Kiefer PE et al.: Molecular cloning of IGFBP-5 from SCLC cell lines and expression of IGFBP-4, IGFBP-5 and IGFBP-6 in lung cancer cell lines and primary tumours. *Eur J Cancer* 1993: 29A:1578-1584.
624. Weinberg RA: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989: 49:3713-3721.
625. Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 1991: 254:1138-1146.
626. Weinstein IB: Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis* 2000: 21:857-864.
627. Weisburger JH, Reddy BS, Wynder EL: Colon cancer: its epidemiology and experimental production. *Cancer* 1977: 40:2414-2420.
628. Westergaard JG, Chemnitz J, Teisner B et al.: Pregnancy-associated plasma protein A: a possible marker in the classification and prenatal diagnosis of Cornelia de Lange syndrome. *Prenat Diagn* 1983: 3:225-232.
629. Wetterau LA, Moore MG, Lee KW et al.: Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Genet Metab* 1999: 68:161-181.
630. Williams CS, Smalley W, DuBois RN: Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 1997: 100:1325-1329.
631. Witschi H, Williamson D, Lock S: Enhancement of urethan tumorigenesis in mouse lung by butylated hydroxytoluene. *J Natl Cancer Inst* 1977: 58:301-305.

-
632. Wolf E, Hoeflich A, Lahm H: What is the function of IGF-II in postnatal life? Answers from transgenic mouse models. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8:185-193.
633. Wolf E, Kramer R, Blum WF et al.: Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* 1994; 135:1877-1886.
634. Wolz RL, Bond JS: Meprins A and B. *Methods Enzymol* 1995; 248:325-345.
635. Wright RJ, Holly JM, Galea R et al.: Insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 2002; 67:776-781.
636. Xu Y, Goodyer CG, Deal C, Polychronakos C: Functional polymorphism in the parental imprinting of the human IGF2R gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197:747-754.
637. Yakar S, Liu JL, Le Roith D: The growth hormone/insulin-like growth factor-I system: implications for organ growth and development. *Pediatr Nephrol* 2000; 14:544-549.
638. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A et al.: Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology* 1995; 108:434-440.
639. Ye P, Price W, Kassiotis G et al.: Tumor necrosis factor-alpha regulation of insulin-like growth factor-I, type 1 IGF receptor, and IGF binding protein expression in cerebellum of transgenic mice. *J Neurosci Res* 2003; 71:721-731.
640. Yeh LC, Adamo ML, Kitten AM et al.: Osteogenic protein-1-mediated insulin-like growth factor gene expression in primary cultures of rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1996; 137:1921-1931.
641. Yi HK, Hwang PH, Yang DH et al.: Expression of the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *Eur J Cancer* 2001; 37:2257-2263.
642. Yin J, Kong D, Wang S et al.: Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Hum Mutat* 1997; 10:474-478.
643. Zapf J, Walter H, Froesch ER: Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* 1981; 68:1321-1330.
644. Zazzi H, Nikoshkov A, Hall K, Luthman H: Structure and transcription regulation of the human insulin-like growth factor binding protein 4 gene (IGFBP4). *Genomics* 1998; 49:401-410.
645. Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ: Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 1994; 94:445-448.

646. Zhang M, Smith EP, Kuroda H et al.: Targeted expression of a protease-resistant IGFBP-4 mutant in smooth muscle of transgenic mice results in IGFBP-4 stabilization and smooth muscle hypotrophy. *J Biol Chem* 2002; 277:21285-21290.
647. Zhang Y, Wick DA, Haas AL et al.: Regulation of lysosomal and ubiquitin degradative pathways in differentiating human intestinal Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1267:15-24.
648. Zheng B, Clarke JB, Busby WH et al.: Insulin-like growth factor-binding protein-5 is cleaved by physiological concentrations of thrombin. *Endocrinology* 1998; 139:1708-1714.
649. Zhou J, Bondy C: Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril* 1993; 60:897-904.
650. Zhou R, Diehl D, Hoeflich A et al.: IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J Endocrinol* 2003; 178:177-193.
651. Zimmermann W, Weber B, Ortlieb B et al.: Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res* 1988; 48:2550-2554.
652. Zwad O, Kubler B, Roth W et al.: Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. *FEBS Lett* 2002; 510:211-215.

Danke

Prof. Dr. Eckhard Wolf danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für seine wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Prof. Dr. Hannelore Daniel danke herzlich ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

PD Dr. Harald Lahm bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas, für die finanzielle Sicherung der ersten 3 Jahre, sowie für die Unterstützung dieser Arbeit verpflichtet.

Für die Gewährung eines Stipendiums von 3 Jahren danke ich der Stiftung Eli Lilly International Foundation.

Dr. Doris Oesterle danke herzlich ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Institut für Toxikologie der GSF und für die wissenschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. Uwe Wenzel, auf dessen wissenschaftliche Ratschläge und Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Dr. Stefan Bauersachs, der mich in die Methodik der subtraktiven cDNA-Banken zur Untersuchung der Genexpression einführte, danke ich besonders für seine Mühe bei der kritischen Durchsicht des Manuskripts und für seine stetige Bereitschaft sein molekularbiologisches Wissen weiterzugeben.

Frau Marianne Berauer und Frau Carmen Spiller (Institut für Toxikologie der GSF), die an besonders langen Versuchstagen bis zum bitteren Ende ausharrten, danke ich ganz herzlich.

Besonders danke ich Dr. Regine Schönfeld die mir mit Tat und Rat bei den Mausektionen zur Seite stand und Frau Anneliese Helfrich für die Unterstützung beim Screening der Zellklone.

Sylvia Mallok, Elvira Glatt, Petra Demleitner und Dr. Helmut Blum danke ich für die schnelle Sequenzierung der cDNA-Fragmente.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Georg J. Arnold (Genzentrum) danke ich für die Synthese der Primer.

PD. Dr. Martin Elmlinger und Karin Weber (Hormon-Labor der Kinderklinik der Universität Tübingen) gilt mein Dank für die Durchführung der IGF-II RIAs.

Dr. Regina Klose, Elisabeth Kempter, Dr. Ingrid Renner-Müller und Anne Wünsch danke ich für die guten Ratschläge und/oder für die Bereitstellung von Puffern und Lösungen in der Endphase meiner Dr.-Arbeit.

Allen nicht namentlichen erwähnten Mitarbeitern der Ernährungsphysiologie, des Instituts für molekulare Tierzucht und Biotechnologie und der GSF danke ich für die stets freundliche Hilfe.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Daniela Diehl

Geburtsdatum: 23.06.1972

Geburtsort: Herborn (Hessen)

Familienstand: ledig

1978 - 1982 Grundschule Medenbach (Hessen)

1982 - 1986 MPS Breitscheid (Hessen)

1986 - 1988 Berufsfachschule, Dillenburg (Hessen)

Schwerpunkt: Ernährungslehre

1988 - 1991 Berufliches Gymnasium, Dillenburg (Hessen)

Schwerpunkt: Elektrotechnik

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1991 - 1992 Studienreise nach Israel

1992 - 1998 Studium der Oecotrophologie an der
Justus-Liebig-Universität in Gießen (Hessen)

Fachrichtung: Ernährungswissenschaft

Diplomarbeit im Institut für Biochemie der Ernährungslehre

Thema: Nachweis des hoch-affinen renalen Peptidtransporters
in LLC-PK₁-Zellen und seine zelluläre Regulation.

Abschluss: Diplom

1996 - 1999 Telefonmarketing bei Peppler GmbH & Co KG,
Dentalmedizinischer Großhandel in Gießen (Hessen)

Mai 1999 - 2004 Anfertigung der vorliegenden Dissertationsarbeit im Institut für
Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-
Maximilians-Universität München (Bayern)

Thema: Bedeutung von Insulin-like growth Factor II (IGF-II) und
IGF-Bindungsprotein-4 in der Kolonkarzinogenese: *In vitro* und
in vivo Studien.