

Für meine Eltern

Aus der Universitätskinderklinik  
Arbeitsbereich Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Konstruktion einer nicht-IGF-bindenden  
Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2-Variante  
und Untersuchung ihrer Wirkung auf das Tumorzellwachstum**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von      Anke Meichsner  
aus                    Leipzig  
Magdeburg         2008

Meichsner, Anke:

**Konstruktion einer nicht-IGF-bindenden Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2-Variante und Untersuchung ihrer Wirkung auf das Tumorzellwachstum. 2008.**

70 Bl.: 10 Abb., 142 Lit.

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Dissertation

IGF-Bindungsproteine binden und stabilisieren die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und -II. Neben dieser Funktion vermutet man auch IGF-unabhängige Wirkungen auf Zellwachstum und -differenzierung. IGFBP-2 im Serum wurde als unabhängiger Risikofaktor und Malignitätsmarker für verschiedene Neoplasien identifiziert. Die IGFBP-2-Genexpression korreliert dabei mit dem Tumorgrad und der Prognose. Aufgrund dieser klinischen Beobachtungen untersuchten wir mit dieser Studie den Einfluss von IGFBP-2 auf das Tumorzellwachstum.

Zur Unterscheidung zwischen IGF-abhängigen und -unabhängigen IGFBP-2-Wirkungen, konstruierten wir eine nicht IGF-bindende Variante durch Austausch der Aminosäuren Val<sup>64</sup>, Leu<sup>88</sup>, und Val<sup>89</sup> gegen Glycin durch *site-directed mutagenesis*. Zusätzlich markierten wir IGFBP-2 und die IGFBP-2-G<sup>64,88,89</sup>-Variante am c-terminalen Ende mit einem *flag*-Epitop. Die c-DNA von IGFBP-2<sup>flag</sup> und IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup> transfizierten wir in die Tumorzelllinien HS578T und SW480. Im Westernimmunoblot und Westernligandenblot mit biotinyliertem IGF-II konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup> im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen nicht in der Lage ist, IGF-II zu binden. In Proliferationsexperimenten wuchsen die IGFBP-2<sup>flag</sup>- und IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup>-transfizierte Zellen signifikant schneller als die Wildtypzellen. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Wachstums von den IGFBP-2<sup>flag</sup> zu den IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup>-transfizierte Zellen. Wir schließen daraus, dass der wachstumsstimulierende Effekt von IGFBP-2 in den IGFBP-2-überexprimierenden Zellen unabhängig von der IGF-Bindungsfähigkeit ist.

Schlüsselwörter

insulinähnliche Wachstumsfaktoren, IGFBP-2, IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>, PCR, *site-directed-mutagenesis*, Klonierung, Elektrophorese, Westernligandenblot, Affinitätsreduktion, Zellkultur, Tumorzellwachstum

**Inhaltsverzeichnis**

0.	Abkürzungsverzeichnis.....	4
1.	Grundlagen	
1.1.	Klinischer Hintergrund.....	5
1.2.	Die Struktur des IGF-Systems.....	6
1.3.	IGF-I und IGF-II.....	7
1.4.	IGF-Rezeptoren.....	8
1.5.	IGF-Wirkung auf den Zellzyklus.....	9
1.6.	IGF-Bindungsproteine.....	10
1.6.1.	Aufbau und Struktur.....	10
1.6.2.	Regulation und Funktion.....	10
1.6.3.	IGFBP-2.....	11
1.6.4.	Wirkungen der Bindungsproteine.....	12
1.6.5.	IGFBP-verwandte Proteine (IGFBP-rP).....	14
1.7.	Das IGF-System bei Malignomen.....	14
1.7.1.	Wachstumsfaktoren und IGF-Bindungsproteine.....	14
1.7.2.	IGFBP-2 bei Malignomen.....	15
1.7.3.	IGFBP-2 bei ALL.....	15
1.8.	Zielstellung der Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden.....	17
2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2.	Konstruktion der Mutationen durch PCR.....	17
2.2.1.	Materialien.....	17
2.2.2.	Durchführung .....	18
2.3.	Ligation.....	21
2.4.	Restriktionsenzyme.....	22
2.5.	Kontrolle der Mutationen.....	23
2.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.6.1.	Materialien.....	23
2.6.2.	Durchführung.....	24
2.6.3.	DNA-Gelextraktion.....	24
2.7.	Transformation.....	24

---

2.7.1. Materialien.....	24
2.7.2. Durchführung.....	24
2.8. Plasmidpräparation.....	25
2.8.1. Minipräp.....	25
2.8.2. Maxipräp.....	25
2.9. Klonierung der Mutationen in den Expressionsvektor.....	25
2.10. Flag-Markierung von IGFBP-2 und IGFBP-2-G <sup>64,88,89</sup> .....	26
2.11. Transfektion und Zellkultur.....	27
2.11.1. Zelllinien.....	27
2.11.2. Materialien.....	28
2.11.3. Transfektion.....	28
2.11.4. Gewinnung und Aufbereitung des Zellkulturüberstandes .....	29
2.12. Westernimmunoblot und Ligandenblot.....	29
2.12.1. Materialien.....	29
2.12.2. Vorbereitung der Proben.....	31
2.12.3. SDS-Page-Elektrophorese.....	31
2.12.4. Blotting.....	31
2.12.5. Inkubation mit Antikörper / Liganden.....	32
2.12.6. Chemilumineszenzentwicklung.....	32
2.13. Extraktion der flag-markierten Proteine durch Affinitätschromatographie.....	32
2.13.1. Material.....	32
2.13.2. Durchführung.....	33
2.14. Proliferationsuntersuchungen.....	33
2.14.1. Durchführung.....	33
2.14.2. Statistische Auswertung.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1. Konstruktion der nicht-bindenden IGFBP-2-Variante durch PCR.....	35
3.2. Transfektion.....	37
3.3. Gewinnung des Zellkulturüberstandes.....	37
3.4. Westernimmunoblot und Westernligandenblot.....	37
3.4.1. Darstellung von IGFBP-2 im Westernimmunoblot.....	38
3.4.2. Darstellung der flag-markierten Proteine.....	39
3.4.3. Westernligandenblot.....	39

---

3.5.	Nachweis der IGF-Affinitätsreduktion von IGFBP-2-G <sup>64/88/89flag</sup> .....	40
3.6.	Proteinisolierung durch Affinitätschromatographie.....	41
3.7.	Proliferationsuntersuchungen.....	42
4.	Diskussion.....	45
4.1.	Experimentelle Aspekte.....	45
4.1.1.	PCR.....	45
4.1.2.	Affinitätsuntersuchungen.....	46
4.1.3.	Proliferationsuntersuchungen.....	48
4.1.3.1.	Auswahl der Zelllinien.....	48
4.1.3.2.	Überexpression von IGFBP-2 in Tumorzelllinien.....	49
4.1.4.	IGFBP-2 Wirkung auf Tumorzellen.....	50
4.1.5.	Potenzielle IGF-unabhängige Mechanismen.....	51
4.2.	Klinische Aspekte.....	54
4.2.1.	IGFBP-2 bei Malignomen.....	54
4.2.2.	IGFBP-2 als möglicher Tumormarker und Prognosefaktor?.....	55
4.3.	Therapeutische Ansätze.....	55
5.	Zusammenfassung.....	57
6.	Literaturverzeichnis.....	59
7.	Anhang.....	70

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALS	<i>acid labile subunit</i>
BFM	Berlin-Frankfurt/Main-Münster
BP	Bindungsprotein
Bp	Basenpaar
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GH	<i>growth hormon</i>
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
HBD	heparinbindende Domäne
IDDM	<i>insulin dependent diabetes mellitus</i>
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding-protein
IGF-I/II R	Typ-1/2-IGF-Rezeptor
IGF-rP	<i>IGF-related peptide</i>
(k)bp	(kilo) Basenpaare
KDa	kilo-Dalton
LH	luteinisierendes Hormon
Mann-6-P	Mannose-6-Phosphat
MRD	<i>minimal residual disease</i>
NIDDM	<i>non insulin dependent diabetes mellitus</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PI <sub>3</sub> -Kinasen	Inositol-Triphosphat-Kinasen
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
SFM	serumfreies Medium
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon

## **1. Grundlagen**

### **1.1 Klinischer Hintergrund**

Leukämie ist die häufigste maligne Systemerkrankung im Kindesalter. Ca. 4 bis 5 von 100000 Kindern erkranken pro Jahr an einer akuten lymphatischen (80%) oder akuten myeloischen Leukämie (20%). Die chronische myeloische Leukämie ist im Kindesalter extrem selten. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 1. und 5. Lebensjahr.

Kindliche Leukämien sind durch die ungehemmte klonale Proliferation von Leukozytenvorstufen gekennzeichnet. Für die Erkrankung sind verschiedene prädisponierende Risikofaktoren bekannt, z.B. Störungen des Immunsystems, bestimmte Syndrome sowie chromosomale Störungen.

Die Leukämien lassen sich zytomorphologisch, zytochemisch, molekulargenetisch und immunphänotypisch einteilen. Diese Klassifizierung spielt für die optimale Behandlung eine wichtige Rolle, da Leukämien unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod führen würden. Nahezu alle Kinder in Deutschland werden in multizentrischen Therapieoptimierungsstudien der GPOH, wie der 1976 gegründeten ALL-BFM-Gruppe, behandelt, die in den letzten Jahrzehnten große Erfolge erzielte. Mittlerweile können über 80% der ALL-Patienten dauerhaft geheilt werden.

Die Behandlung erfolgt risikoadaptiert (Standard-, mittlere und Hochrisikogruppe) und gliedert sich in die Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie.

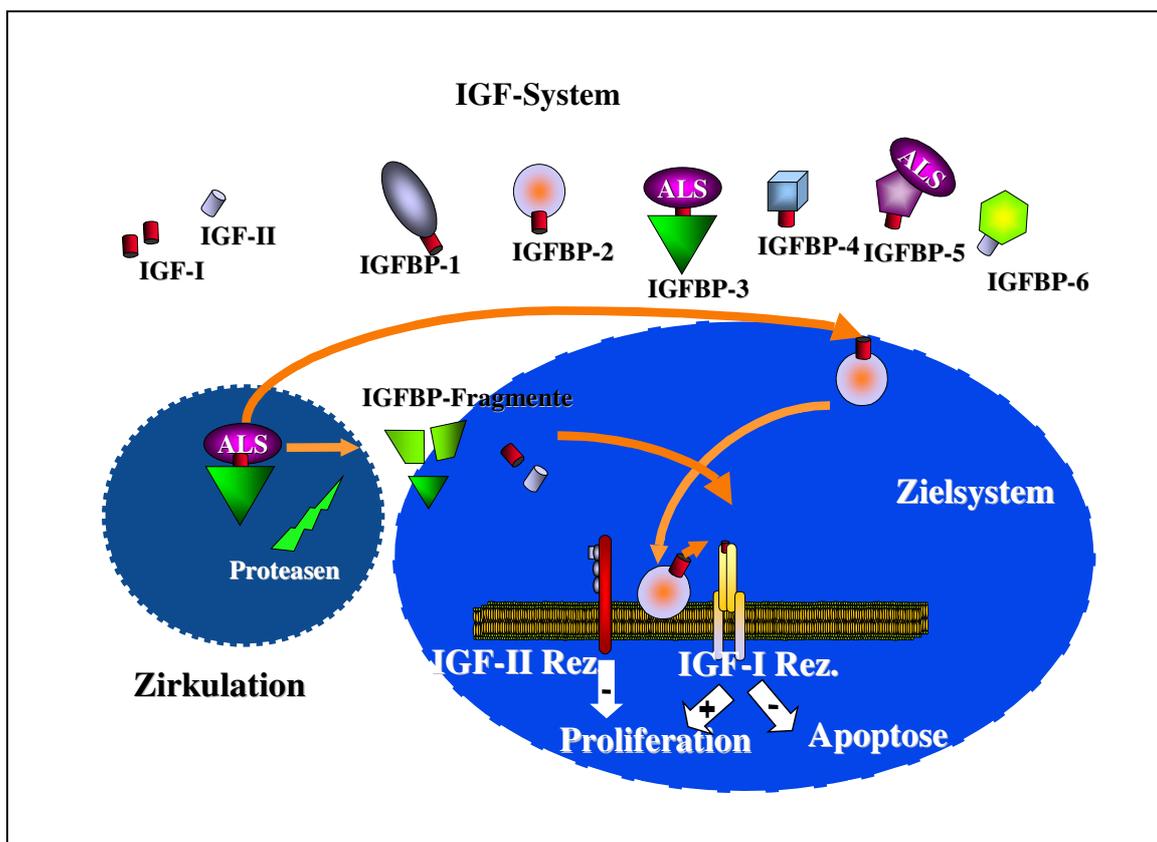
Die Therapieoptimierung und damit die Verbesserung der Prognose der Leukämien wird sich in den kommenden Jahren vor allem auf die bessere und frühere Erkennung von bestimmten Risikofaktoren stützen. So kann die Einteilung der Patienten in Risikogruppen durch die Bestimmung der minimalen Resterkrankung (= MRD, seit 2000 in der aktuellen Studie ALL-BFM 2000 durchgeführt) genauer vorgenommen und die Prognose durch geringere Rückfallraten und eine reduzierte Therapie in der Standardgruppe verbessert werden.

In früheren Untersuchungen wurden durch unsere Arbeitsgruppe Komponenten des IGF-Systems als mögliche Risiko- und Malignitätsmarker identifiziert, die für die Prognose der kindlichen Leukämien eine wichtige Rolle spielen.

## 1.2. Die Struktur des IGF-Systems

Das IGF-System ist ein komplexes Netzwerk, das aus verschiedenen Komponenten besteht und für das physiologische Wachstum, die Differenzierung und Entwicklung von Geweben eine unentbehrliche Rolle spielt.

Im Mittelpunkt des Netzwerks stehen die beiden insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II, deren sechs hochaffine Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6), zwei IGF-Rezeptortypen (IGF-IR und IGF-IIR), IGFBP-verwandte Peptide (IGFBP-rP) sowie verschiedene spezifische und unspezifische IGFBP-Proteasen.



**Abb.1** Überblick über das IGF-System

Vom Gleichgewicht dieser Komponenten hängt die Regulation des Wachstums auf der zellulären Ebene ab. Während die IGF direkte Wirkung auf metabolische und antiapoptotische Prozesse besitzen, regulieren die Bindungsproteine, die IGFBP-Proteasen und die IGFBP-verwandten Proteine die IGF-Aktivität und Wirkung durch Komplexbildung, Stabilisierung und Proteolyse.

### 1.3. IGF-I und IGF-II

1957 wurden erstmals Peptide beschrieben, die die Fähigkeit besitzen, im Knorpelgewebe die Synthese von Proteoglykanen zu stimulieren („*sulphation factor*“), am Fettgewebe insulinähnliche Effekte zu bewirken und die Zellteilung zu beschleunigen („*multiplication-stimulating activity*“). Da diese Peptide nicht von Antikörpern gegen Insulin erkannt wurden, bezeichnete man die Aktivität dieser Proteine als „*non-suppressible insulin like activity*“ (1;2). Daughaday et al. (3) und Rinderknecht und Humbel (4;5) führten für die Proteine die Begriffe IGF-I, IGF-II und „Somatomedine“ ein. Seit den achtziger Jahren existiert eine einheitliche Nomenklatur für die Begriffe (6).

Insulin und die IGF stammen von einem gemeinsamen Vorläuferpeptid ab. Zwischen den Aminosäuresequenzen besteht eine 63%ige Homologie (7).

Das IGF-I-Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Die molekulare Struktur von IGF-I wurde 1978 erstmalig von Rinderknecht (5) beschrieben. Das Peptid mit einem Molekulargewicht von 7,6 kDa besteht aus einer Kette von 70 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1 bis 29 besitzen eine strukturelle Homologie zur B-Insulin-Kette und die Aminosäuren 42 bis 62 zur A-Insulin-Kette des Proinsulins. IGF-I wird, je nach Bildungsort im Gewebe, auf unterschiedliche Weise posttranslational modifiziert (7;8).

IGF-II ist mit 67 Aminosäuren etwas kürzer als IGF-I und hat ein Molekulargewicht von 7,5 kDa. Es spielt bei der fetalen Entwicklung eine große Rolle und wird im Dottersack, der fetalen Leber und im Gewebe mesodermalen Ursprungs gebildet. Perinatal kommt es zu einem Abfall der Konzentrationen in der Lunge, in der Niere und Muskulatur (4;9-11). Beim Erwachsenen ist IGF-II fast ausschließlich im zentralen Nervengewebe zu finden (9). Die Gesamtkonzentration des IGF-I und -II im Serum eines Erwachsenen beträgt ca. 1µg/ml. Der größte Anteil der Wachstumsfaktoren ist an Bindungsproteine gebunden, so dass, je nach verwendeter Nachweismethode, nur zwischen 0,38% und 1,5% des gesamten IGF-I in freier Form vorliegt. Der freie IGF-II-Anteil liegt bei ca. 0,2% des Gesamt-IGF-II. Dies spielt eine entscheidende Rolle für die Wirkung und Funktion der IGF (s.u.) (12;13). Trotz dieses geringen freien Anteils zirkulieren die IGF-Peptide im Serum in einer über 1000fach höheren Konzentration als z.B. Insulin. Sie werden ubiquitär exprimiert und haben in ihrer Anreicherung und Wirkung keine Präferenz für ein spezifisches Gewebe (14;15).

Die Wachstumsfaktoren besitzen parakrine, endokrine und autokrine Funktionen. Neben akuten, insulinähnlichen Effekten auf die Glukosehomöostase im Körper besteht die

Wirkung der IGF in der Regulation und Steuerung des GH-vermittelten Wachstums sämtlicher Gewebe.

Die Produktion der beiden Wachstumsfaktoren wird vorwiegend durch die Ausschüttung des Hypophysenhormons GH stimuliert. Die Produktion von IGF-I erfolgt dabei hauptsächlich im Lebergewebe (11;16). Aber auch die Hormone TSH, FSH, LH und ACTH regulieren die Serumspiegel der Wachstumshormone (9;17;18).

Die Abhängigkeit der IGF-I-Konzentrationen von der metabolischen Situation des Körpers wurde erstmalig bei Patienten mit Anorexia nervosa beschrieben, bei denen der IGF-Spiegel auf ähnlich niedrige Werte wie bei Patienten mit Wachstumshormonmangel sinkt (19;20). Neben der Abhängigkeit vom metabolischen Status unterliegt die IGF-Ausschüttung auch der Abhängigkeit vom Lebensalter. Pränatal ist IGF-II der vorherrschende Wachstumsfaktor (21). Postnatal bildet IGF-I dagegen den Hauptanteil der beiden Wachstumsfaktoren mit der höchsten Serumkonzentration in der Pubertät (22).

#### **1.4. IGF-Rezeptoren**

Bereits in den achtziger Jahren wurde durch *in vivo* Untersuchungen bekannt, dass die Wachstumsfaktoren nicht nur über einen niedrigaffinen Insulinrezeptor im Fettgewebe (12;23), sondern auch über spezifische IGF-Rezeptoren am Herzmuskel und Skelettmuskel wirken (24;25). Zwei Transmembranrezeptoren von IGF sind bekannt, der Typ-1-(IGF-IR) und der Typ-2-Rezeptor (IGF-IIR) (9;26). Die beiden Rezeptoren weisen keine strukturellen Homologien zueinander auf.

Ausschließlich über den Typ-1-IGF-Rezeptor werden Wachstum und Differenzierung von Zellen und Geweben gesteuert. Der heterotetramere IGF-IR, der eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Insulinrezeptor hat (27), enthält zwei unterschiedliche Bindungsregionen mit einer jeweiligen Präferenz für die Bindung von IGF-I oder IGF-II (28), wobei die Affinität für IGF-I wesentlich höher als die für IGF-II ist (12). Der IGF-IR gehört zur großen Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren (29). Über verschiedene Zwischenschritte werden Proteine wie Grb2, SH2 oder SH3 aktiviert, die wiederum mit Ras-Raf-MAP-Kinasen oder mit PI<sub>3</sub>-Kinasen interagieren (30;31). Diese wirken im Zellkern als Transkriptionsfaktoren für Gene, die für einen gesteigerten Stoffwechsel, die Biosynthese von DNA und ECM sowie für die Expression antiapoptotischer Faktoren verantwortlich sind. Neuerdings gibt es Hinweise auf eine Wirkungsübertragung des aktivierten IGF-Rezeptors ohne second-messenger. Schindler et. al. berichteten über eine Signal-

übertragung durch phosphorylierte zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die interferon-regulierte Gene ohne Zwischenschritte direkt im Kern aktivieren können (32).

Die Bedeutung des Typ-2-IGF-Rezeptors im IGF-Netzwerk ist noch nicht vollständig geklärt. Der Rezeptor ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (33) und bindet neben IGF-II auch Proteine mit Mannose-6-Phosphatresten an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen. Die Affinität von IGF-I zu diesem Rezeptor ist vernachlässigbar gering (34). Seine Funktion besteht unter anderem in der Bindung und Internalisierung von lysosomalen Enzymen. IGF-II wird nach der Bindung an den Rezeptor als Komplex internalisiert, der Rezeptor teilweise recycelt und IGF-II in Lysosomen abgebaut. IGF-II wird auf diese Weise aus der Zirkulation entfernt (35). In einigen Zelllinien wurde auch eine kalziumvermittelte Aktivierung von  $PI_3$  und Diacylglycerolen beobachtet, welche die Zellproliferation fördert (36).

### **1.5. IGF-Wirkung auf den Zellzyklus**

Die Apoptose ist ein Zellprogramm, mit dessen Hilfe einer Fehlsteuerung von Wachstum und der Entstehung von Tumoren vorgebeugt werden kann.

Die Wachstumsfaktoren IGF-I und in geringerem Maße auch IGF-II wirken antiapoptotisch durch ihre Wirkung auf den Zellzyklus. Dabei sind die IGF nicht in der Lage, eigenständig Zellen zur Teilung anzuregen. Es bedarf zunächst Kompetenzfaktoren wie EGF, PDGF oder FGF, welche die IGF-IR-Dichte an der Zelloberfläche und damit die Sensitivität der Zellen für die Wachstumsfaktoren erhöhen (27). IGF-I oder in hohen Dosen auch Insulin als Progressionsfaktoren sind für das Durchlaufen der G1-Phase unabdingbar (37;38).

## 1.6. IGF-Bindungsproteine

### 1.6.1. Aufbau und Struktur

Die IGF-Bindungsproteine bilden eine Gruppe von sechs 24 bis 50 kDa großen Proteinen mit der Eigenschaft, IGF-I und IGF-II mit hoher Affinität zu binden.

Sie wurden erstmalig 1975 von Zapf et al. entdeckt (39), als sich in der Gelchromatographie von radioaktiv markiertem IGF, das mit humanem Serum inkubiert wurde, eine zusätzliche Fraktion von Proteinen darstellte. Neuere Methoden zum Nachweis der Bindungsproteine beruhen auf der Entwicklung von Immunoassays, des Westernligandenblots (15) oder über die Messung der korrespondierenden RNA-Menge (40).

Die sechs Bindungsproteine sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und stehen entwicklungsgeschichtlich in engem Zusammenhang mit den sogenannten Homebox-Genen (Hox) (41). Die Proteine sind hoch konserviert: zwischen den verschiedenen Spezies besteht eine 80%ige Homologie der einzelnen Bindungsproteine, innerhalb einer Spezies besteht eine 50%ige Homologie zwischen der Nukleinsäuresequenz der einzelnen Bindungsproteine (15;42). Die N- und C-terminalen Regionen der Proteine sind am höchsten evolutionär konserviert und durch ein gehäuftes Vorkommen von bis zu 18 Cystein-Resten gekennzeichnet. Die mittlere Region ist für das jeweilige Protein spezifisch.

Die einzelnen Bindungsproteine unterscheiden sich in ihrer Konzentration im Serum, ihrer Präferenz für die Bindung von IGF-I oder IGF-II sowie in ihren Interaktionen mit verschiedenen Geweben. IGFBP-3 ist das Hauptbindungsprotein im Serum, IGFBP-2 im Liquor und Samenflüssigkeit, IGFBP-1 in der Amnionflüssigkeit (17).

### 1.6.2. Regulation und Funktion

Da die Affinität der beiden IGF zu den verschiedenen Bindungsproteinen wesentlich höher als zu den IGF-Rezeptoren ist, sind die Wachstumsfaktoren fast vollständig an die Bindungsproteine gebunden. Dadurch wird ihre Funktion auf entscheidende Weise beeinflusst.

Postnatal bildet IGFBP-3 den Hauptanteil der Bindungsproteine im Serum. Seine Konzentration im Serum wird GH-abhängig reguliert und korreliert bei gesunden Individuen positiv mit der IGF-I-Konzentration (14;43). 90% des Gesamt-IGF ist an IGFBP-3 gebunden und zirkuliert im Blutplasma in zwei verschiedenen Komplexen: einem

50 kDa großen binären Komplex und einem 150 kDa großen ternären Komplex. Der Hauptanteil von IGF wird von IGFBP-3 und einer säurelabilen Untereinheit (ALS) in Form des ternären Komplexes transportiert (44;45).

Durch diese Komplexbildung verhindern die IGFBP die renale Clearance der Wachstumsfaktoren und verlängern so deren Halbwertszeit von 10 Minuten auf über 12 Stunden. Der ternäre Komplex ist aufgrund seiner Größe nicht in der Lage, die Blutbahn zu verlassen, sodass dieser zunächst durch Proteasen proteolysiert werden muss. Dieser Vorgang führt zu einer Reduktion der Affinität zu IGF und zur Bildung von BP-Fragmenten. Daraufhin können sich die Wachstumsfaktoren im Gewebe anreichern und mit den Rezeptoren interagieren. Die BP-Fragmente können vermutlich ihrerseits zelluläre, IGF-unabhängige Wirkungen hervorrufen (46). Unspezifische BP-Proteasen sind Kallikreine, Kathepsine und Matrixmetalloproteasen, die systemisch und lokal an der Regulation der freien IGF beteiligt sind (47). Spezifische Proteasen sind für IGFBP-2, -3, -4 und -5 bekannt (48).

Durch das Gleichgewicht zwischen Bindungsproteinen und Proteasen wird nicht nur eine Kontrolle über die IGF-Wirkung erreicht, sondern auch eine kontinuierliche Menge an IGF zur Verfügung gestellt. So werden z.B. IGF-induzierte Hypoglykämien vermieden, die aufgrund der pulsatilen Freisetzung des Wachstumshormons sonst fatale Folgen haben würden (47).

Auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen sind die Bindungsproteine in den letzten Jahren zunehmend untersucht worden. Die Erkenntnis, dass die Bindungsproteine in der Lage sind, durch spezifische Mechanismen selbst Effekte direkt an den Zielzellen zu bewirken und Zellwachstum und -differenzierung zu beeinflussen (s.u.), spielt dabei vermutlich eine besondere Rolle.

### **1.6.3. IGFBP-2**

IGFBP-2 wurde 1979 von Moses et al. in BRL-3A-Zellen von Ratten beschrieben und die cDNA erstmals 1989 vom Menschen isoliert (49). Das Gen für IGFBP-2 ist 32 kbp lang und auf 4 Exons des Chromosoms 2 lokalisiert. Das Protein, das aus dem menschlichen Serum isoliert werden kann, besteht aus 328 Aminosäuren mit einem zusätzlichen 39 Aminosäuren umfassenden Signalpeptid (15), es ist weder glykosyliert noch phosphoryliert (14). Seine Konzentration im Serum liegt zwischen 50 und 270 ng/ml und ist sowohl vom Lebensalter als auch von der metabolischen Situation abhängig. Hohe Spiegel finden sich im Kindes- und Erwachsenenalter, niedrige während der Pubertät (41). Langanhaltendes

Fasten, Mangelernährung, Hypoxämie und Anorexia nervosa führen zu erhöhten IGFBP-2-Spiegeln (47;50). Wachstumshormonmangel, IDDM und NIDDM gehen dagegen mit erniedrigten IGFBP-2-Spiegeln einher (51).

IGFBP-2 wird während der Embryonalzeit in einer Reihe von Geweben exprimiert, vorwiegend jedoch im zentralen Nervensystem. Dort spielt es besonders bei der Entwicklung der Hypophyse und beim Transport von IGF-II zu den Zielzellen eine große Rolle (14;21;42). Auch beim Erwachsenen ist IGFBP-2 das vorherrschende Protein im menschlichen Liquor (52). Außerdem wird es im Reproduktionsgewebe, in der Niere sowie in den Kupffer- und Parenchymzellen der Leber gebildet (41;47).

Mit radioaktiven Tracern konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 für IGF-II eine wesentlich höhere Affinität als für IGF-I hat (49). Für die IGF-Bindung spielt die N- und C-terminale Region eine wichtige Rolle (53;54). Die c-terminale Region scheint dabei für die besonders hohe Affinität zu IGF verantwortlich zu sein (55).

Die Expression des Proteins wird durch GH und die Wachstumsfaktoren positiv reguliert. Weitere Hormone wie FSH, Glukokortikoide, Insulin, Östrogene sowie TGF- $\beta$  und Interleukin sind ebenfalls an der Regulation beteiligt (50).

Ein besonders wichtiger Regulator der IGFBP-2-Expression scheint die Höhe des IGF-II-Spiegels zu sein. Bei Patienten mit *non islet cell*-Tumoren des Pankreas ist IGF-II erhöht, weshalb die Patienten unter rezidivierenden Hypoglykämien leiden. Gleichzeitig wurden im Serum der Patienten erhöhte IGFBP-2- und erniedrigte IGFBP-3-Spiegel gemessen, daher geht man davon aus, dass IGFBP-2 in diesem Falle den IGF-II-Überschuss transportiert (18;56).

#### **1.6.4. Weitere Wirkungen der Bindungsproteine**

Neben der Bedeutung der Bindungsproteine für die Regulation der Wachstumsfaktoren vermutet man weitere IGF-abhängige und -unabhängige Funktionen der Bindungsproteine. Ob die Beeinflussung des Wachstums über eigene Rezeptoren der Bindungsproteine abläuft, über „*interacting proteins*“ (57) oder auf direkten Wechselwirkungen mit der Zellmembran beruht, ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 in Gegenwart von IGF an die extrazelluläre Matrix binden kann (41). Die Affinität der heparin-bindenden Domäne (HBD) des Proteins zur ECM ist pH-abhängig (55). Wie IGFBP-1 enthält IGFBP-2 in der C-terminalen Region eine RGD-Sequenz, die aus der Abfolge der drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht. Die Sequenz ermöglicht Proteinen den Kontakt mit Integrinrezeptoren.

Die Entdeckung, dass Integrine nicht nur für Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte zuständig, sondern auch in der Lage sind, über eigene und assoziierte Proteine Thyrosinkinasen zu aktivieren, führte zu einem neuen Verständnis dieser Moleküle. Sie fungieren als Rezeptoren für die Vermittlung von Signalen über die RGD-Sequenz von Proteinen (58).

Bei IGFBP-1 wurden Zellkontakte mit Integrinen über die RGD-Sequenz (59;60) und für IGFBP-3 und -5 an heparinbindende Proteindomänen beschrieben (61).

IGFBP-2 bindet ebenfalls nachweislich an Integrinrezeptoren von verschiedenen Tumorzellen (62;63). Außerdem führten Experimente mit Mutationen in der RGD-Sequenz zu einer verminderten Zellassoziation von IGFBP-2 (64). Daneben wurden für IGFBP-2 *in vitro* Kontakte mit Proteoglykanen an der Zelloberfläche beschrieben und es konnte gezeigt werden, dass es in Gegenwart von IGF-I und -II an Glykosaminoglykane bindet (65;66).

Diese Beobachtungen stützen den Verdacht, dass dieses Bindungsprotein weitere Funktionen als den ausschließlichen IGF-Transport hat. Die Wirkungen der Bindungsproteine sind jedoch vielfältig und es wurden sowohl proliferationsfördernde als auch -hemmende Wirkungen der einzelnen Proteine beschrieben. Experimente mit IGF-I-Analoga, die nur sehr geringe Affinität zu IGFBP-1 haben, zeigten, dass IGFBP-1 *in vivo* einen von IGF unabhängigen wachstums-inhibitorischen Effekt hat (67). Jones et al. beschrieben dagegen eine von IGF unabhängige, IGFBP-1 induzierte, vermehrte Migration von glatten Muskelzellen nach Verletzung eines Zellverbands *in vivo*. Voraussetzung dafür war die intakte RGD-Sequenz und Integrininteraktion (68). Vermutlich spielt bei der Interaktion auch der Grad der postrationalen Modifizierung eine Rolle (69).

Experimente mit proteolytischen Fragmenten von IGFBP-3, die nicht in der Lage sind, IGF zu binden, zeigten eine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum (70). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass exogen zugegebenes IGFBP-3 auf HS578T-Zellen (humane Brustkrebszelllinie) einen dosisabhängigen proliferationshemmenden Effekt hat (71).

Auch für IGFBP-2 sind IGF-unabhängige Wirkungen beschrieben worden, die Zellen und Tumorzellen u.a. einen Proliferationsvorteil verschaffen können. So zeigten Untersuchungen mit überexprimiertem IGFBP-2 ein erhöhtes Wachstum von Endometriumzellen, Osteosarkomzellen und Nebennierenrindentumoren in Abwesenheit von IGF-I. Da in diesen Zellen die IGF-Rezeptorexpression zusätzlich herunterreguliert war und IGF-I-Analoga ohne Affinität zu den Bindungsproteinen die gleiche mitogene Wirkung auf die Tumorzellen hatten, wurde postuliert, dass IGFBP-2 möglicherweise zusätzliche Effekte auf das Tumorzellwachstum besitzt (50;69).

### 1.6.5. IGFBP-verwandte Proteine (IGFBP-rP)

In den letzten Jahren wurde das IGF-System um mehrere neue Proteine erweitert, die strukturelle Ähnlichkeiten mit den Bindungsproteinen besitzen. Sie werden als „*IGFBP-related proteins*“ bezeichnet und bilden mit den sechs Bindungsproteinen die IGFBP-Superfamilie. Der strukturelle Aufbau des N-terminalen Bindungsmotivs (GCGCC<sub>xx</sub>C) gleicht denen der Bindungsproteine und ermöglicht eine extrem schwache IGF-Bindung. Unterschiede in der C-terminalen Region der IGFBP-rP führen zu dieser bedeutend geringeren IGF-Affinität („*low-affinity-binding proteins*“). Ob diese Proteine einen relevanten Einfluss auf das IGF-System haben, wird kontrovers diskutiert (46;72).

Vier derartige Proteine sind bis jetzt beschrieben, von denen das ursprünglich als IGFBP-7 bezeichnete IGFBP-rP1 (entspricht mac25 oder dem *prostacyclin-stimulating factor*) am intensivsten untersucht wurde. Verminderte Konzentrationen von IGFBP-rP1 in Brustkrebszellen und Prostatakrebszellen lassen eine tumorsuppressive Wirkung des Proteins vermuten (73;74).

Da sich die IGF-Bindungsproteine und IGFBP-verwandten Proteine aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein entwickelt haben und beide an Integrine binden können, erhofft man sich, über die „*low-affinity-binding proteins*“ Einblicke in die IGF-unabhängigen Funktionen der Bindungsproteine zu erlangen (75;76).

## 1.7. Das IGF-System bei Malignomen

### 1.7.1. Wachstumsfaktoren und IGF-Bindungsproteine

Das physiologische Wachstum und die Differenzierung ist einer Reihe von zellulären und extrazellulären Regulationen unterworfen. Änderungen im Zusammenspiel der einzelnen Faktoren können zur Fehlsteuerung des Wachstums und zur Entstehung von Malignomen führen. Da die Wachstumsfaktoren direkt in die Mitogenese einer Zelle eingreifen, wurden diese in den letzten Jahren im Zusammenhang mit Tumorentstehung und -progression untersucht. Tatsächlich konnten in epidemiologischen Studien und experimentellen Analysen veränderte Expressionen der Wachstumsfaktoren und der Bindungsproteine in Tumoren selbst und veränderte Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden, die mit dem Therapieerfolg und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten korrelierten (77). Am besten untersucht wurde IGFBP-3. So zeigten sich in vielen Studien Beziehungen zwischen erhöhtem IGF-I, erniedrigten IGFBP-3-Spiegeln und dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken (78).

Weiterhin wurden bei verschiedenen Tumorerkrankungen erhöhte IGF-II-Spiegel im Serum bzw. im Tumor selbst gefunden (9;79-81). Bei Patienten mit Wilms Tumoren (82), Kolonkarzinomen (83), Osteosarkomen (84) und Malignomen von hämatopoetischen Zellen (85) wurde eine Hochregulation der IGF-Rezeptoren nachgewiesen und ein fortschreitendes Wachstum durch einen monoklonalen Antikörper gegen den IGF-IR verhindert.

### **1.7.2. IGFBP-2 bei Malignomen**

Dass IGFBP-2 vermutlich eine Sonderstellung der Bindungsproteine einnimmt, zeigen verschiedene Untersuchungen. Einerseits wirkt es durch die IGF-Bindung und der daraus resultierenden Inhibition des IGF-Rezeptorkontakts antiproliferativ, andererseits wurden von verschiedenen Autoren erhöhte IGFBP-2-Spiegel bei verschiedenen Tumoren beschrieben.

Die Vermutung, dass sich Tumorzellen einen Proliferationsvorteil gegenüber nicht entarteten Zellen verschaffen, indem sie entsprechende Wachstumsfaktoren selbst produzieren, wurde erstmals von Engstrom et al. experimentell nachgewiesen (86). Klinisch konnte dies für IGFBP-2 und -4 bei Kolonkarzinomen bestätigt werden (87).

Auch bei einer Reihe von anderen Tumoren wurden erhöhte Konzentrationen von IGFBP-2 im Serum und eine Überexpression des Proteins im Tumor selbst beschrieben. So wurden z.B. bei Prostata Tumoren (88), Lungentumoren (89), akuten lymphatischen Leukämien und soliden peripheren Tumoren bei Kindern erhöhte IGFBP-2-Spiegel gefunden. Hirntumoren bei Kindern gehen mit erhöhten IGFBP-2-Werten im Liquor einher (90).

Eine direkte IGFBP-2-Überexpression konnte in verschiedenen Tumoren ebenfalls beschrieben werden, z.B. bei Kolonkarzinomen oder Prostatakarzinomen (50).

### **1.7.3. IGFBP-2 bei ALL**

Klinische Studien zeigen, dass Serum-IGFBP-2 ein Risikofaktor und Malignitätsmarker für die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter ist.

So wurden bei den Patienten im Serum erhöhte IGFBP-2-Spiegel über der 95. Perzentile gefunden, IGFBP-3 war dagegen erniedrigt (91).

Erhöhte IGFBP-2-Konzentrationen im Serum bei Kindern mit neu diagnostizierter ALL und die Normalisierung der Werte während der Chemotherapie lassen vermuten, dass die Tumorzellen selbst für die erhöhten Serum-IGFBP-2-Spiegel verantwortlich sind (92). Gleichzeitig korreliert ein erhöhter IGFBP-2-Spiegel zum Zeitpunkt der Diagnose ALL mit

einem erhöhten Rezidivrisiko. Dies konnte durch Cox-Regressionsanalysen in einer Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (93).

### 1.8. Zielstellung der Arbeit

Verschiedene Studien zeigten, dass die N- und C-terminalen Regionen der IGFBP für die Bindung der Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen. Mit zwölf Cysteinresten in der N-terminalen Region und sechs in der C-terminalen Region zeigen diese Bereiche eine hohe Konservierung.

Durch Untersuchungen der isolierten N- und C-terminalen Fragmente vermutet man, dass vor allem die N-terminale Region mit hydrophoben Abschnitten für die hohe IGF-Affinität verantwortlich ist (94).

Im Jahr 2000 berichteten Imai et. al. über eine Affinitätsänderung von IGFBP-3 bzw. -5 zu IGF, wenn in der N-terminalen Region der Bindungsproteine ein Aminosäureaustausch erfolgte. Durch den Austausch von fünf Aminosäuren der Sequenzen von IGFBP-3 und -5 mit einer neutralen und vier nichthydrophoben Aminosäuren wurde eine über 1000-fache Reduktion der Affinität für IGF erreicht. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten, die mit BP-Fragmenten durchgeführt wurden, wurden diesmal erstmals die vollständigen Bindungsproteine untersucht, die ihre IGF-Bindungsfähigkeit verloren hatten (95). 2001 konnte von Buckway et al. gezeigt werden, dass der Austausch von drei N-terminalen Aminosäuren des IGFBP-3 ebenfalls zu einer IGF-Affinitätsreduktion führt (105).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Austausch von drei korrespondierenden Aminosäuren im N-terminalen Bereich von IGFBP-2 ebenfalls zu einer Reduktion der IGF-Affinität zu diesem Bindungsprotein führt. Der Austausch erfolgte durch *site-directed-mutagenesis* in einem PCR-Ansatz. Der Nachweis der Affinitätsreduktion wurde mit Hilfe des Westernimmuno- und Ligandenblots durchgeführt. Anschließend sollte in Proliferationsexperimenten mit zwei verschiedenen Zelllinien natives IGFBP-2 und mutiertes, nicht-IGF-bindendes IGFBP-2 im Hinblick auf die Beeinflussung der Proliferation von Tumorzellen verglichen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Elektrophorese: BioRAD POWER PAC 200

Western Blot: BioRAD POWER PAC 1000

Zentrifugen: Sigma 3k12, Biofuge fresco (Heraeus instruments), Jouan BR4

PCR: Hybaid OmniGene

Eppendorfgefäße Safe-lock-tubes 0,5 ml, 1,5 ml: Eppendorf AG, Berlin, BRD

Pipettenspitzen verschiedene Größen: Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, BRD

sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 50 ml): Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, BRD

Gewebekulturflaschen (50, 250, 550 ml): Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, BRD

Gewebekulturplatten (6-well bzw. 24-well): Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, BRD

PR-Test-tubes: Eppendorf, 15 ml, 50 ml

### **2.2. Konstruktion der Mutationen durch PCR**

#### **2.2.1. Materialien**

IGFBP-2-cDNA *gene bank accessionnumber*: M35410

Primer 1 (5` : Beginn der Matrize) nt 59-78

Basensequenz 5`-CCA GCA TGC TGC CGA GAG TG-3`

Primer 2 (G<sup>64</sup>- Mutation) nt 359-379

Basensequenz 5`-AG GCG TGC GGC GgC TAC ACC C-3`

Primer 3 (G<sup>88/89</sup>- Mutation) nt 420-455

Basensequenz 5`-TC GCC CAT GcC Ccc CGC CTG CAG GGG CAG CTC GGA G-3`

Primer 4 (3` : Ende der Matrize ) nt 549-569

Basensequenz 5`-GT GCT GTC CAC GTG GTT CTC C-3`

Primer 1 und 4 enthalten die korrekte Basensequenz der Wildtyp-cDNA.

Primer 2 und 3 enthalten die erwünschte veränderte Basensequenz (rot), die einen *mismatch* in der PCR verursacht und dadurch den Nukleotidaustausch ermöglicht.

Alle Primer wurden von Thermo Hybaid (Ulm, BRD) synthetisiert.

dNTP Nukleotide (dNTP Mix Qiagen)

Taq- DNA Polymerase 5 U/μl (Qiagen)

10x T4 DNA Ligasepuffer (mit 10 mM ATP) (New England Biolabs)

template (IGFBP2- cDNA)

Mineral OIL (Sigma)

### 2.2.2. Durchführung

Um die cDNA eines nicht-IGF-bindenden Proteins herzustellen, wurden in einer *overlap-extension* PCR vier Basen in der N-terminalen Region, die das IGF-Bindungsmotiv enthält, ausgetauscht. Der Basenaustausch resultierte in der Änderung von drei Tripletts. Als Vorlage diente die cDNA von IGFBP-2.

Zunächst wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen die Mutationen eingeführt (Abb.2).

In der ersten PCR wurde mit Hilfe von Primer 1 und Primer 3 drei Nukleotide ausgetauscht. Daraus resultiert in der Aminosäuresequenz der Einbau von jeweils Glycin anstelle von Leucin an Stelle 88 und Valin an Stelle 89 ( $G^{88/89}$ -Mutation).  $L^{88}$  und  $V^{89}$  konnten mit Hilfe eines gemeinsamen Primers (Primer 3) verändert werden, da diese beiden Aminosäuren direkt nebeneinander von der c-DNA kodiert werden.

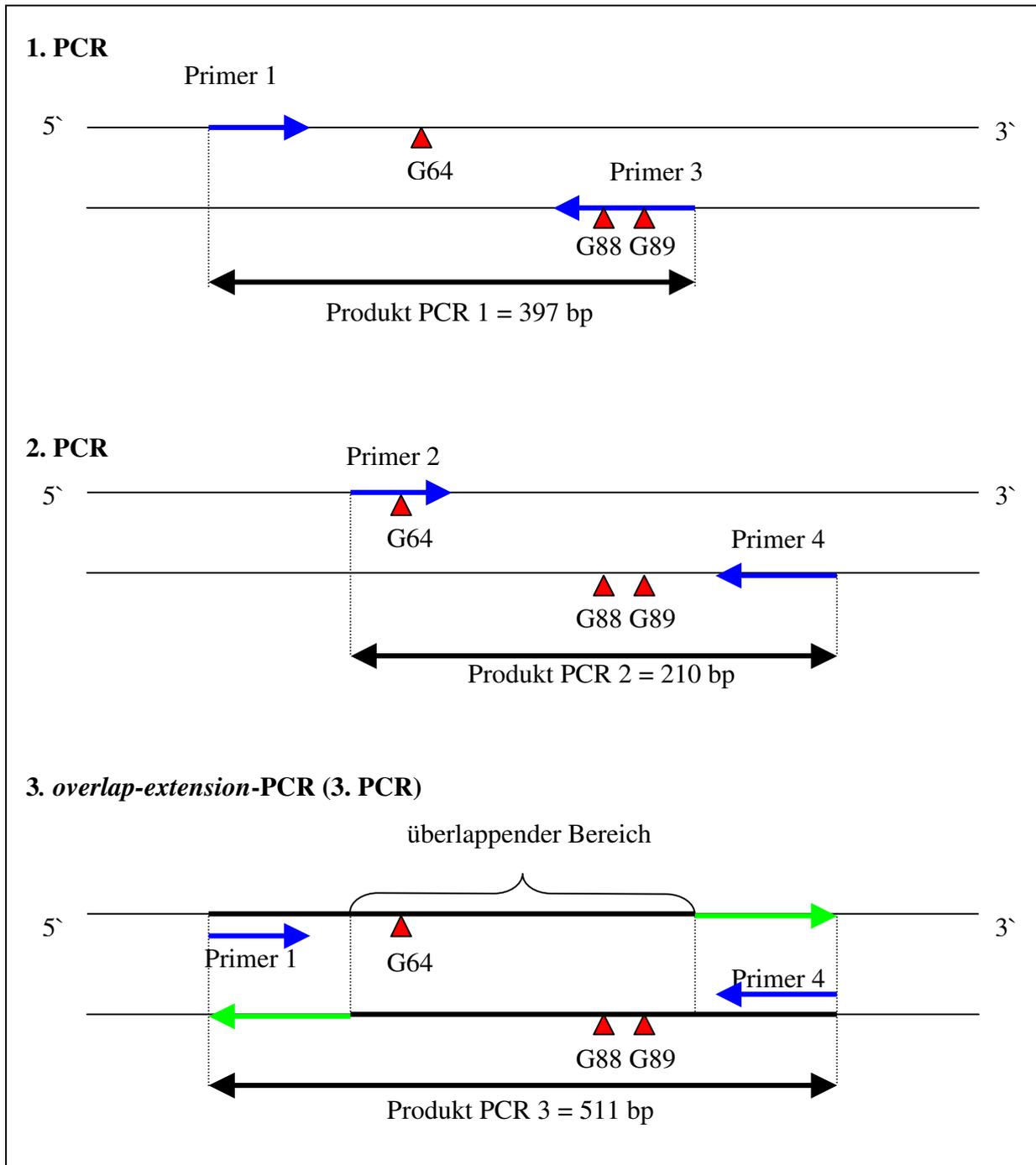
In der zweiten PCR wurde mit Hilfe von Primer 2 und 4 der Austausch eines Nukleotides erzielt, daraus resultierte in der Aminosäuresequenz der Austausch von Valin an Stelle 64 mit Glycin ( $G^{64}$ -Mutation).

Die entstandenen PCR-Produkte waren 397 bzw. 210 Basenpaare lang.

Rot dargestellt sind die ausgetauschten Basenpaare des 5`-3`-DNA-Stranges.

Die Nukleotide wurden in folgenden Tripletts ausgetauscht:

1. PCR    CTG → **ggG**    [  $L^{88} \rightarrow G^{88}$  ]  
           GTC → **GgC**    [  $V^{89} \rightarrow G^{89}$  ]
2. PCR    GTC → **GgC**    [  $V^{64} \rightarrow G^{64}$  ]



**Abb.2** Prinzip der *overlap-extension*-PCR

blau: Primer

rot: Mutationen

grün: Verlängerung durch Taq-Polmerase

Ansatz für PCR 1

1 µl dNTP

je 1 µl Primer 1 und 3

1 µl Template (IGFBP-2-cDNA)

5 µl 10x T4 DNA Ligasepuffer

40,5 µl H<sub>2</sub>O

2,5 U (0,5 µl) Taq-Polymerase

Anschließend wurden die Reagenzien im Tube mit 30µl Öl abgedeckt.

Programm: 99°C: 10 min; 35× (98°C: 1 min, 50°C: 1 min, 72°C: 1 min), 72°C: 10 min

Die PCR wurde als Hot-Start-PCR durchgeführt: 10 min nach Programmstart wurden 2,5

U (0,5 µl) Enzym Taq-Polymerase dazugegeben.

Ansatz für PCR 2:

1 µl dNTP

je 1 µl Primer 2 und 4

1 µl Template (IGFBP-2-cDNA)

41 µl H<sub>2</sub>O

5 µl 10x T4 DNA Ligasepuffer

1,25 Einheiten (0,25 µl) Taq-Polymerase

Anschließend wurden die Reagenzien im Tube mit 30µl Öl abgedeckt.

Programm: 98°C: 3 min; 35× (95°C: 1 min, 55°C: 1 min, 72°C: 1 min); 72°C: 10 min

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden zur Reinigung mittels eines 1%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend ausgeschnitten und mittels *gel extraction KIT* extrahiert (Arbeitsschritte siehe 2.6.3.)

Um beide Mutationsprodukte in eine IGFBP-2-cDNA rekombinieren zu können, mussten beide Amplifikationsprodukte auf die Größe von 511 Basenpaaren verlängert werden.

Dazu wurden mit den PCR-Amplifikationsprodukten aus den beiden ersten PCR eine *overlap-extension* PCR durchgeführt. Das 3'-Ende des Amplifikationsproduktes aus PCR 1 und das 5'-Ende des Amplifikationsproduktes aus PCR 2 lagerten sich an Stelle 359 bis 455 der IGFBP-2-cDNA um 97 Basenpaare so übereinander, dass sie ein doppelsträngiges DNA-Molekül bildeten. Der Taq-Polymerase stand somit eine freie 3'-OH-Gruppe zur Verlängerung des cDNA-Strangs zur Verfügung (Abb.2).

Das entstandene PCR-Produkt war 511 bp lang und enthielt zu jeweils 50% die G64-Mutation bzw. die G88/89-Mutation.

Ansatz für PCR 3 (overlap-extension-PCR):

1 µl dNTP

je 1 µl Primer 1 und 4

je 1 µl gereinigtes Amplifikationsprodukt aus PCR1 und PCR2

5 µl 10x T4 DNA Ligasepuffer

39,5 µl H<sub>2</sub>O

Anschließend wurden die Reagenzien im Tube mit 30µl Öl abgedeckt.

Die PCR wurde als Hot-Start-PCR durchgeführt: 10 Minuten nach Programmstart wurden 2,5 Einheiten (0,5 µl) Enzym Taq-Polymerase dazugegeben.

Programm:

99°C: 10 min; 35× (98°C: 1 min, 50°C: 1 min, 72°C: 1 min); 72°C: 10 min

### **2.3. Ligation**

Die generierten PCR-Produkte besaßen am 3'-Ende mehrere Basen Adenin als Überhang, die vom Enzym Taq-Polymerase bei der PCR angefügt wurden. Der Vektor pGemTEasy lag als linearisierter Vektor vor und enthielt an den 3'-Enden jeweils die Base Thymidin. Die PCR-Produkte wurden nach folgendem Ansatz ligiert:

1 µl pGem Teasy (Plasmid)

3 µl PCR-Produkt (Insert)

5 µl 2 x Ligasepuffer

1 µl T4 DNA Ligase (400 U/µl, New England Biolabs)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag transformiert

Weitere Klonierungen und Ligationen mit den Vektoren pBluescript und pcDNA3.1 und Plasmidfragmenten wurden wie folgt vorgenommen:

5 µl Insert

1 µl Plasmid

1 µl 10x T4 DNA Ligasepuffer(mit 10 mM ATP, New England Biolabs)

1 µl Enzym T4 DNA Ligase (400 U/µl, New England Biolabs)

2 µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend transformiert.

## 2.4. Restriktionsenzyme

Alle Enzyme (Ausnahme SacI: Pharmacia) wurden von New England Biolabs erworben.

100 x NEB- Puffer (10 mg/ml): New England Biolabs

BSA- Puffer: New England Biolabs

Beide Puffer wurden nach einer 1:10 Verdünnung verwendet.

10x BufferY<sup>+</sup>/Tango<sup>Tm</sup> mit BSA (MBI Fermentas)

Enzym	Aktivität	NEB-Puffer
AccI	10 U/µl	4
AlwNI	10 U/ml	4
EheI	10 U/µl	10x BufferY <sup>+</sup>
HindIII	20 U/µl	2
SacI		1+BSA
SacII	20 U/µl	4
StyI		3+BSA
XbaI	20 U/µl	2+BSA
XmaI	10 U/µl	4+BSA

**Tab.1** Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme

## 2.5. Kontrolle der Mutationen

Die einzelnen Klone wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme AlwNI und AccI auf das Vorhandensein der Mutationen überprüft. Durch die Mutation an Stelle 88/89 wurde die AlwNI-Schnittstelle neutralisiert, durch die Mutation an Stelle 64 entfiel die AccI-Schnittstelle. Durch Gelelektrophorese konnten beide Populationen cDNA unterschieden werden.

### Restriktionsansatz:

5 µl Plasmid

je 0,5 µl Enzym

2 µl NEB-Puffer

2 µl BSA

10 µl H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

## 2.6. Agarose-Gelelektrophorese

### 2.6.1. Materialien

TAE- Puffer

0,04 M Trisbase

+ 0,01 M EDTA

+ 5% Essigsäure

Gelladepuffer

15% Ficoll 400

+ 0,01 M EDTA

+ 0,25% Orange G

Agarose (Carl-Roth-GmbH+Co, Karlsruhe, BRD)

Ethidiumbromid

100 bp-Marker (Life technologies, Karlsruhe, BRD)

Gel Extraction Kit (150) QIAEX II Cat. No. 20021 (QIAGEN GmbH, Hilden, BRD)

### 2.6.2. Durchführung

Zur Trennung von Plasmiden und Fragmenten wurde der Restriktionsansatz elektrophoretisch aufgetrennt.

Dazu wurden 10 µl Probe mit 3 µl Gelladepuffer vermischt und auf ein horizontales 1% Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde mit Ethidiumbromid im Verhältnis 1:10000 versetzt, um die DNA mittels UV-Fluoreszenz sichtbar zu machen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

Die DNA wurde mit 5V / cm Gellänge in einem horizontalen Gel aufgetrennt.

### 2.6.3. DNA-Gelextraktion

Die gewünschte DNA (Plasmide bzw. DNA- Fragmente) wurde aus dem Elektrophoresegel unter Fluoreszenzkontrolle ausgeschnitten und mittels Gel Extraction Kit nach Anweisung gereinigt.

## 2.7. Transformation

### 2.7.1. Materialien

*E.coli competent cells* JM 109 (Promega), Lagerung bei -80 °C

LB-Agar (Lennox L Agar, GIBCO BRL)

Ampicillin (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, BRD)

### 2.7.2. Durchführung

50 µl kompetente *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl PCR-Amplifikations- bzw. Ligationsprodukt versetzt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 50 Sekunden auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium dazugefügt und der Reaktionsansatz 90 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Ampicillinzusatz der Agarplatten vermehrten sich ausschließlich die Bakterienklone, die die Plasmid-DNA aufgenommen hatten. Die selektierten Klone wurden in flüssiges, mit Ampicillin versetztes LB-Medium eingebracht und für acht Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend konnte die Plasmid-DNA durch Mini- oder Maxiprep extrahiert werden.

## 2.8. Plasmidpräparation

### 2.8.1. Miniprep

QIAprep Spin Miniprep Kit (250), Qiagen GmbH, Hilden, BRD

Die Plasmidpräparation wurde nach den Anweisungen des Hersteller-Protokolls durchgeführt.

Endkonzentration der gereinigten DNA: ca. 0,2 µg/µl

### 2.8.2. Maxiprep

EndoFree Plasmid Maxi Kit (10), Qiagen GmbH, Hilden, BRD

Plasmidpräparation erfolgte nach den Anweisungen des Hersteller-Protokolls.

Endkonzentration der gereinigten DNA: ca. 1 µg/µl

## 2.9. Klonierung der Mutationen in einen gemeinsamen Vektor

Vektoren: pGemTEasy- Vektor, 3015 bp (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, BRD)

PBluescript II SK (+/-) phagemid, 2961 bp

pcDNA 3.1, 5428/5427 bp (Promega, Madison, WI, USA)

Nach Identifikation der beiden DNA-Populationen (jeweils mit den Mutationen an Stelle 64 und 88/89) durch Restriktionsanalyse und Elektrophorese wurden diese in einen gemeinsamen Vektor kloniert.

An Position 257 der IGFBP2-cDNA befindet sich eine Sac II-Schnittstelle. Zwischen beiden Mutationen, an Position 414 der cDNA, schneidet das Enzym XmaI. Eine weitere SacII-Schnittstelle befindet sich an Position 49 im Vektor pGemTEasy, weitere XmaI-Schnittstellen existierten nicht (Abb.3).

Zunächst wurde mittels Sac II ein 248 bp langer Teil der c-DNA aus den zwei Klonen herausgeschnitten, die jeweils die G<sup>64</sup>-Mutation bzw. die G<sup>88/89</sup> Mutationen enthalten:

5 µl (1µg) Plasmid, 2 µl 10x NEB 4, 1 µl Enzym SacII, ad 20 µl H<sub>2</sub>O

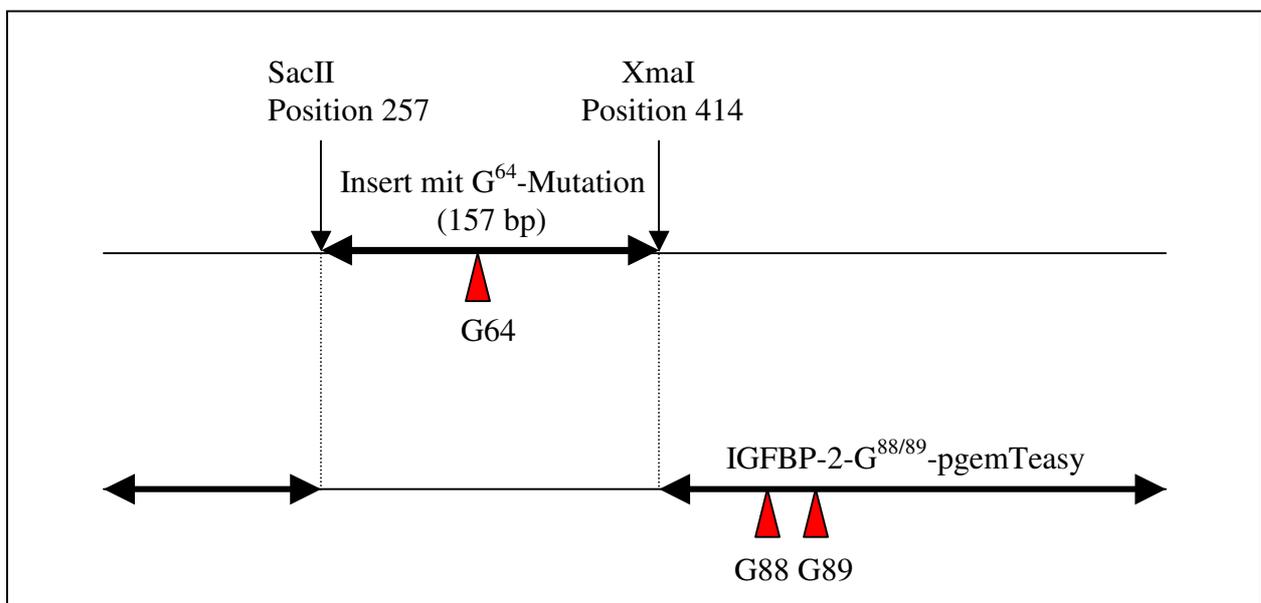
Das lineare Plasmid wurde nach Elektrophorese ausgeschnitten und gereinigt. Damit entfiel die SacII-Schnittstelle des Vektors.

Anschließend wurde ein Verdau des linearen Plasmids mit XmaI angesetzt:

15 µl pGemTEasy (linear), 2 µl BSA, 2 µl NEB 4, 1 µl Enzym XmaI

Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C für drei Stunden inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden das 157 bp umfassende Insert mit der G<sup>64</sup>-Mutation und das Plasmid des Klon, der G<sup>88/89</sup>-Mutation enthält, ligiert und in E.coli-Zellen transformiert (Ligationsansatz siehe 2.3, Transformation siehe 2.7).

Um die rekombinierte DNA auf Vorhandensein der gewünschten drei Mutationen zu kontrollieren und unerwünschte Mutationen auszuschließen, wurde sie vom 3`-Ende der cDNA her mit Hilfe des SP6-Promotor-Primers bzw. vom 5`-Ende her mit Hilfe des T7-Promotor-Primers vollständig in beide Richtungen sequenziert.



**Abb.3** Klonierung der Mutationen in einen DNA-Strang

### 2.10. *Flag*-Markierung von IGFBP-2 und IGFBP-2-G<sup>64,88,89</sup>

Um das von den Zellen endogen gebildete und das im fetalen Kälberserum stets enthaltene IGFBP-2 vom überexprimierten, plasmidkodierten IGFBP-2 unterscheiden zu können, wurde ein *flag*-Epitop vor das Stoppcodon des Proteins angefügt. Dazu wurde in einer PCR ein Primer verwendet, der sich mit 20 Nukleotiden am 3`-Ende der IGFBP-2-cDNA anlagert und weitere 24 Nukleotide für das *flag*-Epitop an die cDNA anfügt. An seinem 5`-

Ende, nach dem Stoppcodon, enthält dieser Primer eine Schnittstelle für XbaI für Klonierungszwecke. Als 5'-Primer für die PCR wurde ein interner IGFBP-2-Primer verwendet.

Folgende acht Aminosäuren wurden angehängt: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys.

Da der Expressionsvektor pcDNA3.1 eine Xba-I Schnittstelle enthielt, wurde das 211 bp lange G<sup>64,88,89</sup>-Insert mit Hilfe des Enzyms EheI zunächst in den Vektor pBluescript einkloniert, der bereits die komplette Wildtyp-cDNA von IGFBP-2 enthielt .

#### Restriktionsansatz für Klonierung in pBluescript:

3 µl Plasmid, 1 µl Enzym EheI, 2 µl 10x BufferY<sup>+</sup>, 14 µl H<sub>2</sub>O

Ligationsansatz siehe 2.3.

Durch Spaltung mit SacI und anschließender Elektrophorese (Spaltung des Vektors an Position 109 und in cDNA von IGFBP-2 an Position 300) wurde der Vektor mit der korrekten Orientierung des Inserts ausgewählt.

Anschließend wurde mit Hilfe einer StyI-Schnittstelle und der XbaI-Schnittstelle der *flag*-DNA-Abschnitt mit dem korrespondierenden Abschnitt von IGFBP-2 und IGFBP-2G<sup>64,88,89</sup> (im Vektor pBluescript) ausgetauscht.

Restriktionsansatz siehe Kap.2.4., Ligationsansatz siehe 2.3.

Zur Expression wurde die komplette IGFBP-2<sup>flag</sup>-DNA bzw. IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup> aus pBluescript mit den Enzymen HindIII (Position 689 im Vektor) und XbaI (Position 731 im Vektor) in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 einkloniert.

## **2.11. Transfektion und Zellkultur**

### **2.11.1. Zelllinien**

Die Zellkulturen wurden mit den Zelllinien HS578T und SW 480 durchgeführt. Die humane Mammakarzinomzelllinie HS578T wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) erworben. Die humane Kolonkarzinomzelllinie SW 480 stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, BRD).

Für die Kultur der HS578T-Zelllinie wurde DMEM-Medium verwendet, das mit fetalem Kälberserum in einer 1:10 Verdünnung und mit 0,01 mg/ml Insulin versetzt wurde.

Die SW480-Zelllinie wurde in RPMI-Medium kultiviert, ebenfalls versetzt mit fetalem Kälberserum. Beide Zelllinien wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in 6-Loch-Platten mit 2 ml Medium kultiviert.

### 2.11.2. Materialien

FuGENE 6 Transfection Reagent: Roche, BRD

Fetales Kälberserum: FKS Biochrom AG, Berlin, BRD

Insulin: Sigma, BRD

Dulbeccos MEM (DMEM): Biochrom AG, Berlin, BRD

VLE RPMI: Biochrom AG, Berlin, BRD

PBS-Dulbecco: Biochrom AG, Berlin, BRD

Trypsin: Trypsin/EDTA-Lösung, Biochrom AG, Berlin, BRD

Neomycinsulfat: G418, PAA-Laboratories, BRD

### 2.11.3. Transfektion

Folgende Vektoren wurden in die HS578T- und SW480-Zelllinie transfiziert:

pcDNA (leerer Vektor)

pcDNA-IGFBP-2<sup>flag</sup>

pcDNA-IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>

24 Stunden vor der Transfektion wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Loch (*6-well-plate*) eingesät und mit 2 ml Medium bedeckt.

Die Transfektion erfolgte durch Liposomentransfer mittels FuGENE.

Dazu wurde serumfreies Medium mit 3 µl FuGENE fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 µg DNA dazugegeben und der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA gelangt dabei in das Innere des Liposomenkomplexes. Nach einem Wechsel des Zellkulturmediums (1 ml) der am Tag zuvor eingesäten Zellen wurde der Ansatz auf die Zelllinien gegeben. Durch Verschmelzung der Membranen von Zelle und Liposomen wurde DNA in das Innere der Zellen eingeschleust. Nach vier Stunden wurden die einzelnen Ansätze mit Medium auf 2 ml aufgefüllt.

Alle zwei Tage wurde das Medium der Zellkulturen gewechselt. Nach fünf Tagen wurde dem Medium das Antibiotikum Neomycinsulfat (650 µg/ml) zugegeben, um die transfizierten Zellen zu selektieren.

Nach einer Woche konnten die Zellen in 50 ml-Gewebekulturflaschen umgesetzt werden. Dazu wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit Trypsin für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen konnten diese gesplittet werden.

Nach 24 Stunden wurde das Medium mit Hilfe des Western-Immunoblots (siehe 2.12) auf die Expression von IGFBP-2 bzw. der nicht-bindenden Variante untersucht.

#### **2.11.4. Gewinnung und Aufbereitung des Zellkulturüberstandes**

Transfizierte Zellen sezernieren sowohl endogen produzierte als auch plasmidkodierte Proteine in das Medium, das für einen Westernimmuno- bzw. Ligandenblot oder zur Proteinisolierung weiterverwendet werden konnte.

Für die Proteinisolierung wurden SW480-Zellen mit antibiotikafreiem Zellkulturmedium für 84 Stunden inkubiert. Für die Durchführung des Westernimmuno- und Ligandenblots konnte der Zellkulturüberstand direkt verwendet werden. Das Medium wurde 30 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen vollständig zu entfernen. Anschließend konnte das Medium bei -20°C eingefroren werden oder direkt für die Proteinisolierung bzw. im Westernblot verwendet werden.

### **2.12. Westernimmunoblot und Ligandenblot**

#### **2.12.1. Materialien**

Tris: TRIS Ultra Qualität Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, BRD

SDS: MERCK- Schuchardt, Hohenbrunn, BRD

Glycin: Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, BRD

Tween: Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, BRD

Acrylamid: rotiphorese gel 30, Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, BRD

Ammoniumpersulfat (APS): Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

TEMED: Carl-Roth-GmbH, Karlsruhe, BRD

Marker: Multimark Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, BRD

Trenngel: Gelpuffer (0,375 M Tris; 0,025 % SDS; pH=8,8)

- + 15% Acrylamid
- + 0,003% APS
- + 0,0007% TEMED

Sammelgel: Gelpuffer (0,125 M Tris; 0,025% SDS; pH=6,8)

- + 4,5% Acrylamid
- + 0,045% Glycerol
- + 0,003% APS
- + 0,0007% TEMED

Elektrophorese- Puffer: 0,025 M Tris

- + 0,192 M Glycin
- + 0,1% SDS

Blot-Puffer: 0,025 M Tris

- + 0,192 M Glycin
- + 0,02 % SDS
- + 20% Methanol

TBST-Lösung: 0,2 M Tris

- + 1,04 M NaCl
- + 10 ml Tween 20
- auf pH=7,4 einstellen

SDS-Ladepuffer für Ligandenblot: 0,25 M Tris

- 20% Glycerol
- 2% SDS
- 0,01% Bromphenolblau
- auf pH=8,8 einstellen

SDS-Ladepuffer für Immunoblot: wie SDS-Ladepuffer Ligandenblot + 100 mM DTT

### Antikörper

primär: *flag*-Antikörper (Maus): anti-M2 F3165, Sigma, BRD

IGFBP-2-AK (Kaninchen): anti-IGFBP-2, Upstate-Biozol, BRD

sekundär: *flag*-Epitop: *goat-anti-mouse*-Antikörper (Ziege-anti-Maus): Sigma, BRD

IGFBP-2-AK: *donkey-anti-rabbit*-Antikörper (Esel-anti-Kaninchen): Amersham Pharmacia, BRD

### Ligand

biotinyliertes IGF-II: Sigma, BRD

### Entwicklung

Chemilumineszenz (ECL): Western Lightening Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer, BRD

Kodak-X-Omat-AR-Film: Sigma, BRD

#### **2.12.2. Vorbereitung der Proben**

100 µl Probe wurde mit 33,3 µl SDS-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Tertiärstruktur der Proteine für den Immunoblot wurde dabei zerstört.

Da beim Ligandenblot die Tertiärstruktur erhalten bleiben muss, wurde dem SDS-Ladepuffer für den Ligandenblot kein DTT zugesetzt.

#### **2.12.3. SDS- Elektrophorese**

10 µl Marker und 35 µl der Probe wurden auf ein vertikales 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und im MiniProteanII-Elektrophoresesystem (BioRad, BRD) mit Elektro- phoresepuffer bei 200V über 65 min aufgetrennt.

#### **2.12.4. Blotting**

Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia, BRD) bei 135 mA und 50V 42 Minuten geblottet.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper bzw. Liganden zu verdrängen, erfolgte anschließend eine einstündige Inkubation der Membranen des Ligandenblots in einer 0,5%-igen fettfreien Trockenmilchlösung in TBST. Die Membranen für die Immunoblots wurden in einer 5%-igen fettfreien Trockenmilchlösung in TBST geblockt.

### 2.12.5. Inkubation mit Antikörpern bzw. Liganden

Anschließend wurden die Membranen einmal mit TBST-Lösung gewaschen und über Nacht in einer 1:1000 Verdünnung mit dem jeweiligen primären Antikörper bzw. Liganden inkubiert.

Immunoblot: *flag*-AK (anti-M2) → 1:1000 Verdünnung mit TBST

anti-IGFBP2 → 1:1000 Verdünnung mit TBST

Ligandenblot: IGF II<sup>biot</sup> 1µg/µl → 1:2000 Verdünnung mit TBST + 10 µM HCL

Am folgenden Tag wurden die Membranen dreimalig mit Detergenzien (TBST) gewaschen und mit dem sekundären Antikörper bzw. Streptavidin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert:

Immunoblot: IGFBP-2-AK-Nachweis (Esel-anti-Kaninchen-AK): Verdünnung 1:10000 mit TBST

anti-*flag*-AK (Ziege-anti-Maus-AK): Verdünnung 1:20000 mit TBST

Ligandenblot: Streptavidin 1:1000 Verdünnung

Anschließend wurden die Membranen in TBST dreimal je 15 Minuten gewaschen.

### 2.12.6. Chemilumineszenzentwicklung

Die sekundären Antikörper sind mit Peroxidase gekoppelt und können so mittels Chemilumineszenz nachgewiesen werden. Dazu wurden die Entwicklerlösungen nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membranen aufgetragen. Anschließend erfolgte die Belichtung und Entwicklung des Röntgenfilms.

## 2.13. Extraktion der *flag*-markierten Proteine durch Affinitätschromatographie

### 2.13.1. Material

*Anti-flag-affinity-beads* (M2-Beads): Sigma, BRD

Hepes Puffer (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, M=238,31): Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, BRD

HBS-Puffer: 20 mM Hepes  
150 mM NaCl  
→ auf pH=7,8 einstellen

Glyzinpuffer: 100 mM Glyzin  
→ auf pH=3,5 einstellen

Econo-Pack-Chromatographiesäule: BioRad, BRD

### 2.13.2. Durchführung

Die plasmidkodierten *flag*-markierten Proteine im Zellkulturüberstand können mit Hilfe eines Antikörpers gegen das *flag*-Epitop vom endogenen IGFBP-2 chromatographisch getrennt werden.

Dazu wurden 100 ml 84-h-Zellkulturmedium bei 20000 x g für 10 min zentrifugiert, um alle zellulären Bestandteile zu entfernen. Der gereinigte Überstand wurde mit 1 ml anti-*flag-beads* versetzt und bei 8°C über Nacht inkubiert.

Die Suspension wurde über eine Säule gegeben und die Säule anschließend dreimal mit 50 ml HBS-Puffer gewaschen. Zur Elution der Proteine wurde Glyzinpuffer (pH=3,5) über die Säule gegeben, wobei die an die *beads* gebundenen *flag*-Proteine in der zweiten bis vierten Elutionsfraktion erschienen. Die Neutralisation der Elutionen erfolgte mit Tris-Base.

Die eluierten Proteine konnten im Westernimmunoblot nachgewiesen bzw. zur Weiterverarbeitung bei -18°C tiefgefroren werden.

## 2.14. Proliferationsuntersuchungen

### 2.14.1. Durchführung

Die Experimente wurden jeweils mit den Transfektanten der HS578T- und SW480-Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden die Proliferationsraten der IGFBP-2<sup>flag</sup>-, IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-transfizierten und die mit dem leeren Vektor pcDNA 3.1-transfizierten Zellen verglichen.

Die Analysen erfolgten als quantitative Zellzahlanalyse zu Beginn und am Ende der Experimente.

Vor Beginn der Experimente wurden die Zellen zunächst 24 Stunden „synchronisiert“.

Dazu wurden die Zellen mit dem entsprechenden FKS-freiem Medium versetzt.

Die Einsaat der HS578T-Transfektanten erfolgte mit 25000 Zellen pro Loch und 1 ml Medium in 24-Lochplatten (entspricht einer Konzentration von 25000 Zellen pro ml Medium).

Der Ansatz der SW480-Transfektanten erfolgte mit einer Ausgangszellzahl von 50000 Zellen pro Loch in 750  $\mu$ l Medium (entspricht einer Konzentration von 67000 Zellen pro ml Medium).

Die korrekte Konzentration der vitalen Zellen im Zellansatz wurde zuvor mit Hilfe der Trypanblaufärbung (0,4%) ermittelt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit der Zugabe von 1 ml 10% FKS-haltigem Medium.

Es wurden parallel jeweils drei Ansätze pro Transfektante IGFBP-2<sup>flag</sup>, IGBFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> und pcDNA3.1 durchgeführt. Die Experimente wurden mit beiden Zelllinien insgesamt siebenmal wiederholt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen vom Boden der Platte mit Trypsin abgelöst, mit Trypanblau (0,4%) angefärbt und in einer Neubauer-Kammer gezählt.

#### **2.14.2. Statistische Auswertung**

Aus den Zellzahlen pro Loch der Triplets wurde der Mittelwert berechnet. Jeweils sieben Experimente wurden durchgeführt und in die Auswertung einbezogen. Die Daten wurden mit Hilfe von SPSS-Version 11 im robusten T-Test ausgewertet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Konstruktion der nicht-bindenden IGFBP-2-Variante durch PCR**

In der PCR wurde mit Hilfe von Mutationsprimern eine Veränderung der Basensequenz erzielt, was zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führte. An Stelle 64, 88 und 89 der Aminosäuresequenz wurden so die hydrophoben Aminosäuren Valin, Leucin und Valin durch neutrales Glycin ersetzt.

Die Mutationsprimer wurden so gewählt, dass aufgrund der nicht übereinstimmenden Basen (*mismatch*) eine ausreichende Überlappung zu beiden Seiten des zu verändernden Nukleotids gewährleistet war. Der 21 bp große Mutationsprimer für die Mutation der Aminosäure Valin an Stelle 66 verursachte an einer Base einen *mismatch*. Da zur Einführung der Mutationen an Stelle 88 und 89 an drei Basen eine Nicht-Übereinstimmung nötig war, wurde der Primer mit 36 Basenpaaren entsprechend länger gewählt.

Die anschließend durchgeführte *overlap-extension* PCR verlängerte die PCR-Produkte auf die Länge von 511 bp. Als Ergebnis lagen zwei DNA-Subpopulationen vor, die jeweils zu 50% die G<sup>64</sup>- oder G<sup>88/89</sup>- Mutation enthielten.

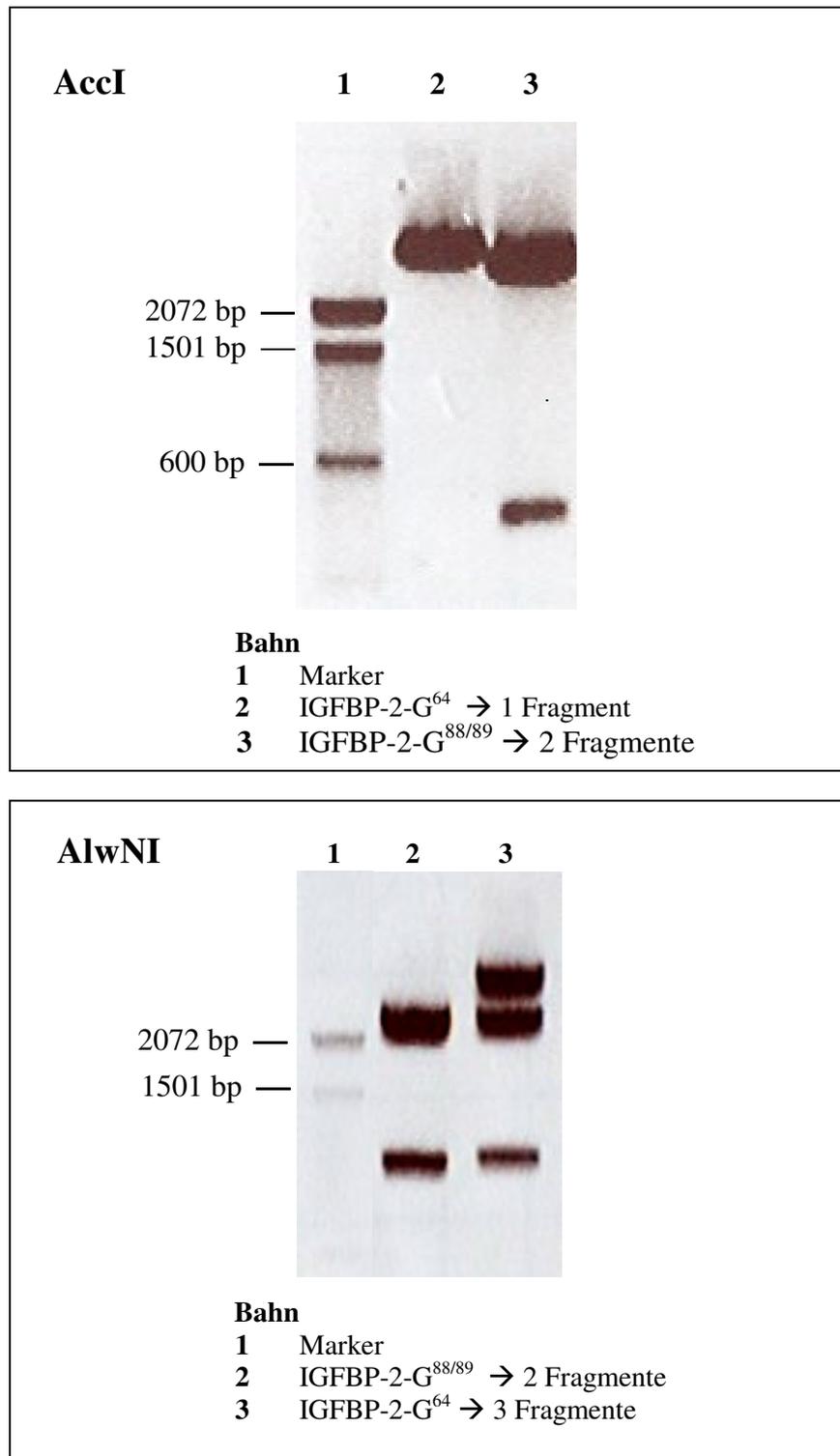
Durch Agarosegelelektrophorese wurden die PCR-Produkte von den Reagenzien der Polymerasekettenreaktion getrennt und mittels *gel extraction* KIT extrahiert. Nach Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor pGemTEasy wurden die Plasmide in kompetente E.coli transformiert.

Da diese Bakterien nur nach Aufnahme eines intakten Plasmids mit dem darin enthaltenen Gen für Ampicillinresistenz auf ampicillinhaltigem Nähragar wachsen können, wurden so die korrekt ligierten Plasmide selektiert.

Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen AccI und AlwNI wurde eine elektrophoretische Kontrolle der Ligationsprodukte durchgeführt. Mit Hilfe der Enzyme, die an den mutierten Stellen keine Schnittstellen mehr besitzen, konnten so die beiden cDNA- Subpopulationen unterschieden werden.

AccI → Neutralisation der Schnittstelle an Position 371 der 3'-5'-Basensequenz (Aminosäure 64)

AlwNI → Neutralisation der Schnittstelle an Position 441 der 3'-5'-Basensequenz (Aminosäuren 88 und 89)



**Abb.4** Ergebnisse der Gelelektrophorese nach Enzymrestriktion mit AccI und AlwNI

Nach Auswahl von geeigneten Klonen, die jeweils die G<sup>64</sup> oder G<sup>88/89</sup> enthielten, wurden beide Mutationen durch Austausch eines cDNA-Abschnitts in einen gemeinsamen Expressionsvektor inkloniert.

Zum Ausschluss von PCR-bedingten Fehlern wie Insertion, Duplikationen oder fehlerhafter Replikation wurde die IGFBP-2-G<sup>64/88/89</sup>-cDNA mit plasmidspezifischen Primern von beiden Seiten (3' und 5'-Ende) vollständig kommerziell sequenziert.

### 3.2. Transfektion

Die IGFBP-2-G<sup>64/88/89</sup>-Variante, die flagmarkierte IGFBP-2-G<sup>64/88/89/flag</sup>-Variante sowie der leere Vektor pcDNA3.1. wurden in HS578T- und SW 480- Zellen transfiziert.

In den Zellkulturüberständen waren bereits 48 Stunden nach der Transfektion im Westernimmuno- bzw. Ligandenblot Proteine nachweisbar.

Nach fünf Tagen wurde dem Nährmedium das Antibiotikum Neomycin zugefügt, um die transfizierten Zellen zu selektieren (DNA-Sequenz für Neomycinresistenz im Expressionsvektor pcDNA 3.1) und eine stabile Transfektionszelllinie zu etablieren.

### 3.3. Gewinnung des Zellkulturüberstandes

Für die Isolierung der Proteine durch Affinitätschromatographie wurden die Zellen 84 Stunden inkubiert, da Testreihen zeigten, dass nach dieser Inkubationszeit die Konzentration der überexprimierten, plasmidkodierten Proteine am höchsten waren. Bei längerer Inkubationszeit erfolgte aufgrund des Nährstoffmangels ein Absterben der jeweiligen Zellen und der proteolytische Abbau der Proteine im Überstand. Die Inkubation für die Gewinnung des Zellkulturüberstandes wurde mit antibiotikafreiem Medium durchgeführt, da Neomycin bei der Protein-Bead-Interaktion stört.

### 3.4. Westernimmunoblot und Westernligandenblot

Im Westernimmunoblot können Proteine mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers dargestellt werden. Im Gegensatz dazu beruht der Ligandenblot auf einer physiologischen Bindung eines Liganden an das Protein. Auf diese Weise können zusätzlich funktionelle Eigenschaften untersucht werden.

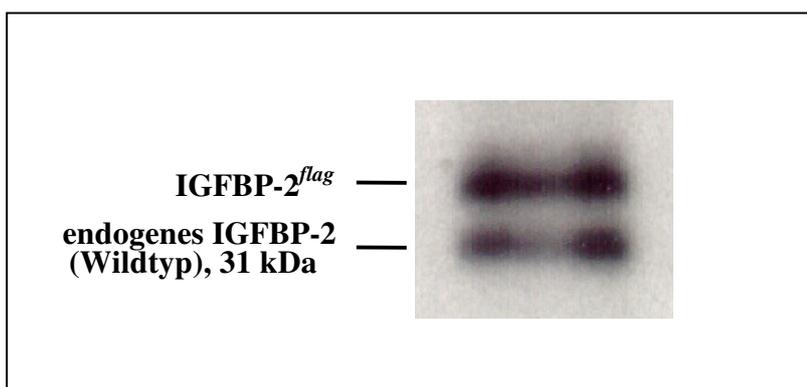
Zunächst erfolgte die Auftrennung der Proteine des Zellkulturüberstandes durch eine 12% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Durch Polymerisierung der Polyacrylamidmonomere wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe optimal getrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper bzw. Liganden inkubiert.

Bovines IGFBP-2 konnte im von uns verwendeten fetalen Kälberserum in geringen Mengen nachgewiesen werden, ebenso bildeten und sezernierten die humanen Zelllinien endogenes IGFBP-2. Durch einen stark aktivierten CMV-Promotor im Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde die jeweilige einklonierte cDNA transkribiert und stark überexprimiert, was sich im Vergleich zum endogenen IGFBP-2 als starke Signalanhebung widerspiegelte.

### 3.4.1. Darstellung von IGFBP-2 im Westernimmunoblot

Der monoklonale IGFBP-2-Antikörper zeigt die überexprimierten Proteine IGFBP-2<sup>flag</sup>, die IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Variante sowie das endogene Wildtypprotein.

In Abbildung 5 wird in der unteren Bande das 31 kDa große Wildtypprotein IGFBP-2 dargestellt, das um acht Aminosäuren größere *flag*-markierte Protein bildet die zweite (obere) Bande.



**Abb.5** Westernimmunoblot mit IGFBP-2-Antikörper:

untere Bande: Wildtypprotein IGFBP-2

obere Bande: acht Aminosäuren größeres *flag*-markiertes IGFBP-2

### 3.4.2. Darstellung der flag-markierten Proteine

Zur Unterscheidung des endogen gebildeten IGFBP-2 vom überexprimierten, plasmidkodierten IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> und IGFBP-2<sup>flag</sup> wurde mit Hilfe eines Primers in einer PCR am 5'-Ende ein *flag*-Epitop am C-terminalen Ende vor das Stopp-Codon angehängt.

Die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem monoklonalen Antikörper gegen das *flag*-Epitop stellt ausschließlich die Proteine IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> und IGFBP-2<sup>flag</sup> dar.

### 3.4.3. Westernligandenblot

Der Westernligandenblot dient der Darstellung der physiologischen Eigenschaften der Proteine. Die erhaltene Tertiärstruktur der Proteine ist dabei Voraussetzung für die Bindung des Liganden.

Als Ligand wurde IGF-II gewählt, an das eine Peroxidaseaktivität gekoppelt, über die das Bindungsprotein indirekt dargestellt werden kann.

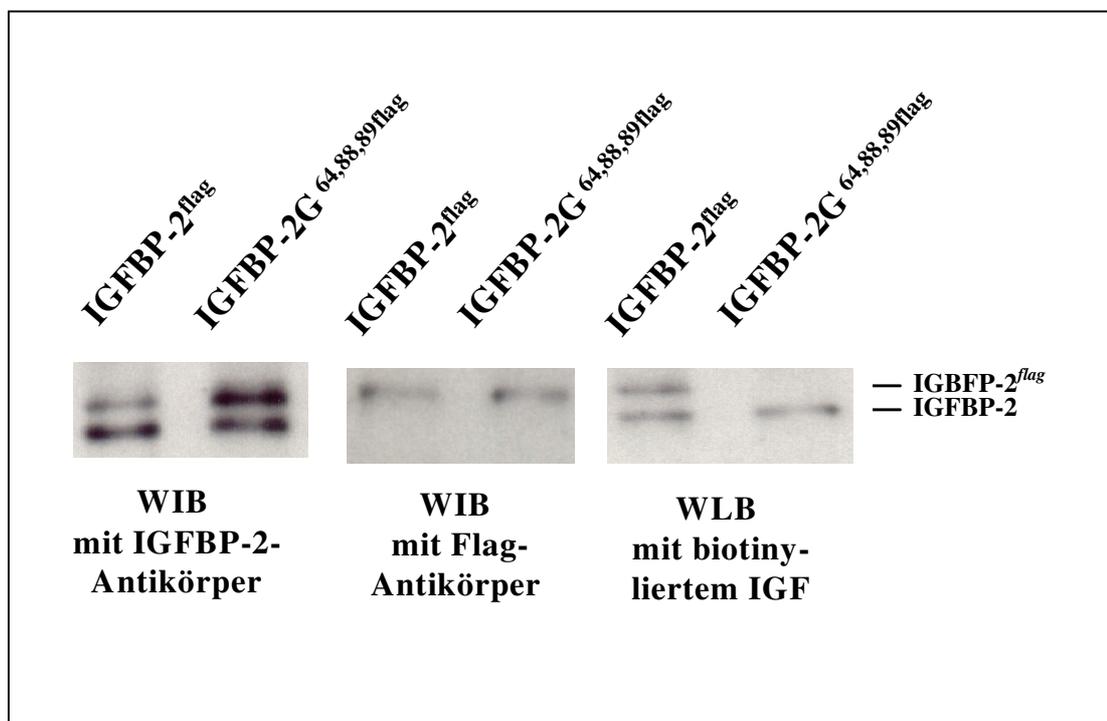
### 3.5. Nachweis der IGF-Affinitätsreduktion von IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>

Um zu zeigen, dass IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> im Vergleich zum Wildtyp-IGFBP-2 einen deutlichen Verlust der Affinität zu IGF-II besitzt, wurden mit dem gleichen proteinhaltigen Medium ein Westernimmunoblot mit monoklonalen Antikörpern gegen IGFBP-2 und das *flag*-Epitop sowie ein Westernligandenblot mit IGF-II durchgeführt.

Abbildung 6 (links) zeigt sowohl das endogen gebildete bzw. im FKS stets vorhandene Wildtyp-Protein als auch die überexprimierte mutierte und die *flag*-markierte IGFBP-2-Variante. Es zeigt sich hierbei auch, dass das *flag*-Epitop keinen Einfluss auf die Bindung des IGFBP-2- Antikörpers ( $\alpha$ -BP2) hat.

Der monoklonale Antikörper gegen das *flag*-Epitop ( $\alpha$ -*flag*) stellt nur die *flag*-markierten Proteine dar (Abb.6 Mitte).

Im entsprechenden Westernligandenblot (Abb.6 rechts) lässt sich die Bindung des Liganden IGF-II am endogenen IGFBP-2 und IGFBP-2<sup>*flag*</sup> nachweisen, jedoch nicht bei der mutierten IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Variante. Das fehlende Signal verdeutlicht die drastische Reduktion der IGF-Affinität der mutierten IGFBP-2-Variante.



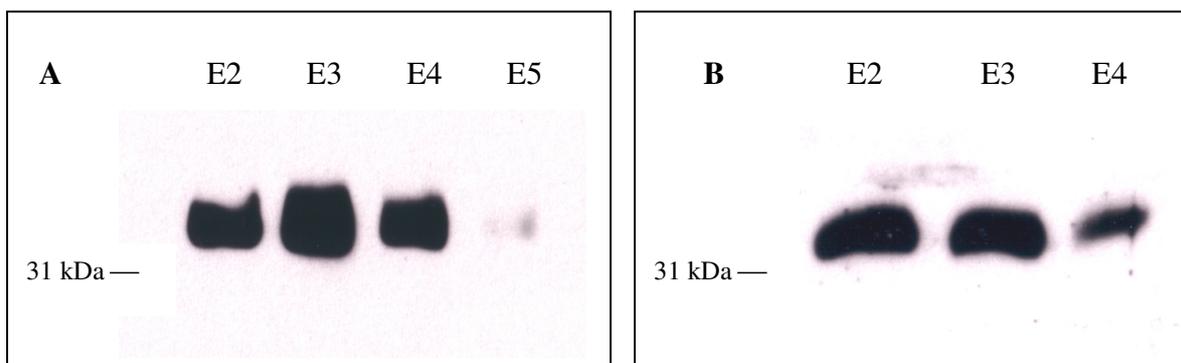
**Abb.6** Westernimmunoblot und Westernligandenblot, Zellkulturüberstand von IGFBP-2-G<sup>*flag*</sup> und IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup>-transfizierten Zellen nach 48 h Kultur

### 3.6. Proteinisolierung durch Affinitätschromatographie

Zur Isolation von IGFBP-2- $G^{flag}$  und IGFBP-2- $G^{64/88/89flag}$  aus dem Zellkulturüberstand wurde eine Affinitätschromatographie über Säulen durchgeführt. Die mit anti-*flag*-Antikörpern behafteten Trägerstoffe (*beads*) führten während des Durchlaufs des Überstandes zur Bindung der *flag*-markierten Proteine. Nach mehreren Durchläufen des Überstandes waren die *flag*-markierten Proteine fast vollständig an die *beads* gebunden und im Überstand nicht mehr nachweisbar. Durch mehrmalige Zugabe von HBS-Puffer in die Säule wurden die gebundenen Proteine von weiteren, im Überstand vorhandenen Proteinen gereinigt.

Die Elution erfolgte mit 1 ml 100mM Glycin, das die gebundenen Proteine an den Antikörperbindungsstellen kompetitiv verdrängte. Als Eluat erschienen die *flag*-markierten Proteine in der zweiten bis vierten Fraktion in gereinigter Form.

Die Abbildung zeigt die gereinigten *flag*-Proteine im Westernimmunoblot.



**Abb.7** Elutionsfraktionen (E) im Westernimmunoblot mit IGFBP-2-Antikörper nach 86 h Kultur

**A** E2 bis E5 von IGFBP-2- $G^{64/88/89flag}$

**B** E2 bis E4 von IGFBP-2 $^{flag}$

### 3.7. Proliferationsuntersuchungen

Um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der erhöhten IGFBP-2-Genexpression in Blasten und dem Proliferationsvorteil der malignen Zellen gegenüber Wildtypzellen herauszufinden, wurden Proliferationsexperimente mit zwei verschiedenen Zelllinien HS78T und SW 480 durchgeführt.

Die Proliferationsuntersuchungen erfolgten mit Zellen einer stabilen Kultur, so dass sichergestellt war, nur Zellen in die Experimente einzubeziehen, die die plasmidkodierte Proteine sezernierten. Während des Beobachtungszeitraums erfolgte kein Wechsel des Mediums, um eine möglichst hohe Konzentration der überexprimierten Proteine zu erhalten.

Die Untersuchungen wurden mit synchronisierten Zellen durchgeführt. Durch den Entzug des fetalen Kälberserums für 24 Stunden stellten die Zellen ihr Wachstum ein und befanden sich alle zu Beginn der Experimente im gleichen Zellzyklusstadium. Diese Ausgangsbedingungen gewährleisteten einen gemeinsamen Startpunkt und erlaubten den direkten Vergleich der Proliferationsraten nach 72 Stunden. Ohne vorherige Synchronisation ergaben sich keine Unterschiede im Zellwachstum.

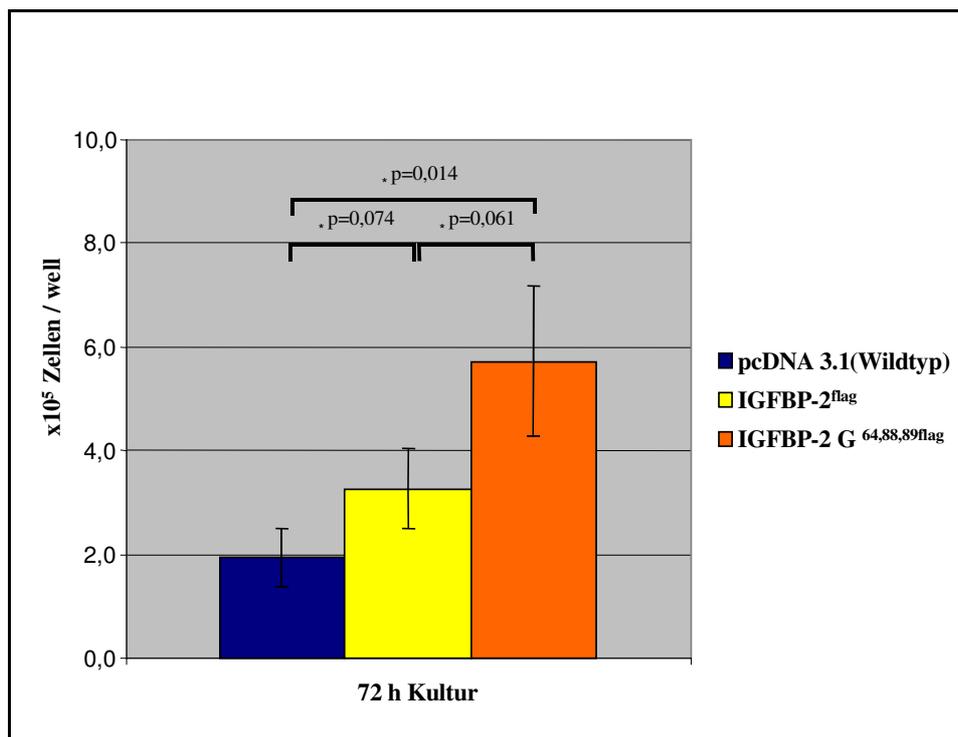
Der Vergleich wurde zwischen den Transfektanten pcDNA3.1 (leerer Vektor = Wildtyp, Kontrolle), IGFBP-2<sup>flag</sup> und IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> durchgeführt. Die Einsaat erfolgte in 24-Lochplatten als paralleler Dreifachansatz der Transfektanten in Triplets (=je Transfektante und Zelllinie drei Ansätze). Die Experimente wurden mit jeder Zelllinie siebenmal wiederholt.

Abbildung 8 und 9 zeigen die Ergebnisse der pcDNA3.1, IGFBP-2<sup>flag</sup> und IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Transfektanten der HS578T- und SW480-Zelllinien nach 72 Stunden Inkubationszeit. Aus den sieben Experimenten mit je drei Ansätzen wurden die Mittelwerte ermittelt. Dargestellt sind die Zellzahlen pro well (24-Lochplatten).

Es zeigte sich, dass die IGFBP-2<sup>flag</sup> und IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Transfektanten einen Proliferationsvorteil gegenüber den entsprechenden Wildtypzellen pcDNA3.1. hatten.

Die IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Transfektanten wuchsen signifikant schneller als die Wildtypzellen.

Es zeigte sich außerdem ein Anstieg der Proliferationsrate der IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Zellen gegenüber den IGFBP-2<sup>flag</sup>-Transfektanten, wobei jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wurde.



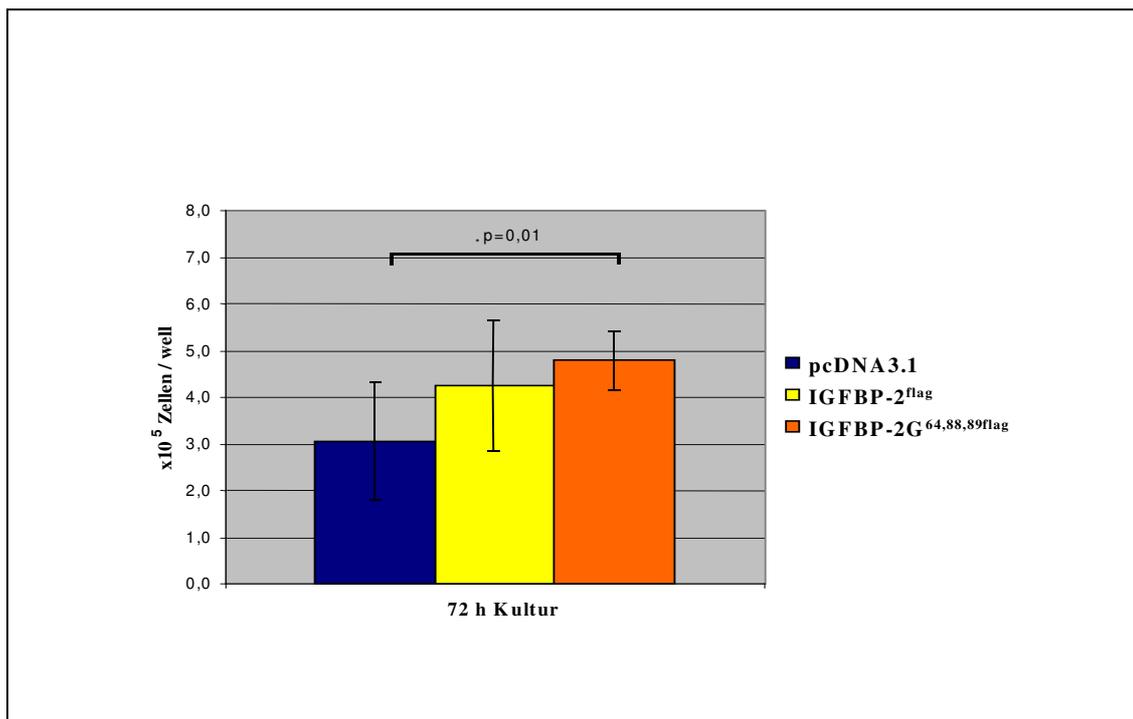
**Abb.8** Proliferationsergebnisse der HS578T-Transfektanten, Ergebnisse von 7 Experimenten nach 72 Stunden Kultur

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den SW480-Transfektanten.

Auch hier wuchsen die IGFBP-2<sup>flag</sup>-und IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Transfektanten deutlich schneller als die entsprechenden Wildtypzellen.

Die IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-transfizierten Zellen der SW480-Zelllinie wuchsen dabei sogar hoch signifikant schneller als die Wildtypzellen.

Es zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Proliferationsrate der IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Zellen gegenüber den IGFBP-2<sup>flag</sup>-transfizierten Zellen.



**Abb.9** Proliferationsergebnisse der SW480-Transfektanten,  
Ergebnisse von 7 Experimenten nach 72 Stunden Kultur

## **4. Diskussion**

### **4.1. Experimentelle Aspekte**

#### **4.1.1. PCR**

Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Jahre 1982, für die Kary Mullis 1993 den Nobelpreis erhielt, schaffte völlig neue Möglichkeiten DNA nachzuweisen und zu vervielfältigen. Bereits in den achtziger Jahren entwickelten verschiedene Wissenschaftler Methoden, DNA-Abschnitte mit Hilfe von synthetischen Mutationsprimern in PCR-Ansätzen zu verändern (*site-directed mutagenesis*) (96;97). Diese Methoden waren jedoch nur bedingt einsetzbar, da an den mutierten Enden der PCR-Produkte immer eine Restriktionsschnittstelle für Klonierungszwecke zur Verfügung stehen und diese erst eingebaut werden musste.

1989 entwickelten Ho et al. eine neue Methode, unabhängig von der Lokalisation von Restriktionsstellen Mutationen im gesamten DNA-Strang einfügen zu können (98). Zunächst wurden zwei getrennte PCR-Ansätze durchgeführt. Jede PCR-Reaktion nutzte jeweils einen Primer für das 3'-bzw. 5'-Ende und einen internen Mutationsprimer, jeweils in 3'-5' bzw. komplementärer 5'-3'-Orientierung. Es entstanden zwei PCR-Produkte, die an der Stelle der Mutationsprimer komplementär waren und durch Nutzung als Matrize und Primer in einer dritten PCR an der Stelle überlappten und die Verlängerung des DNA-Stranges ermöglichten.

Der Vorteil der sog. *overlap-extension* PCR besteht darin, dass die Notwendigkeit entfiel, direkt am Mutationsprimer eine Restriktionsstelle einzufügen. Ho et. al. generierten mit dieser Methode Punktmutationen, Insertionen und Deletionen.

Eine etwas veränderte Methode nutzten wir zur Erzeugung der drei Mutationen an Stelle 64, 88 und 89 der Aminosäuresequenz. Da unsere Mutationsprimer nicht nur in entgegengesetzter Orientierung, sondern auch an zwei ca. 97 Nukleotide voneinander entfernten Stellen der DNA lagen, also nicht komplementär waren, überlappten die PCR-Produkte in der *overlap-extension* PCR um 97 Basen und generierten ein Fusionsprodukt mit jeweils der G64- oder G88/89-Mutation (siehe Kap.2.3.2).

Ein weiterer Vorteil der von Ho et. al. beschriebenen *overlap-extension*-Methode ist die hohe Effektivität des Verfahrens. Im Vergleich zu den früheren Methoden beträgt diese nahezu 100%, d.h. alle PCR-Produkte besitzen die gewünschte Mutation. Sie lag in

unserem Fall durch die Einführung von drei Mutationen bei 50 % (zwei Subpopulationen mit jeweils der G<sup>64</sup>- und G<sup>88/89</sup>-Mutation), in der Summe jedoch ebenfalls bei 100 % (siehe 3.1.).

Die Fehleranalyse der Taq-Polymerase wurde von Ho et al. mit ca. 0,026 % angegeben (ein Fehler in über 3900 Nukleotiden). Die von uns amplifizierte DNA mit einer Größe von max. 511 bp ließ nur eine geringe Fehlerquote erwarten.

Weiterhin konnte die Fehlerrate durch eine hohe Ausgangskonzentration der *template*-cDNA (0,02 µg/µl) in den PCR-Ansätzen verringert werden, so dass im Vergleich zu Ansätzen mit einer geringeren DNA-Ausgangsmenge weniger PCR-Zyklen für die Einführung der Mutationen nötig waren. Die abschließende Sequenzierung der rekombinierten IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-cDNA ergab keine PCR-bedingten Nukleotid-austausche oder strukturellen DNA-Läsionen.

#### 4.1.2. Affinitätsuntersuchungen

Der Westernimmunoblot, erstmalig von Hossenlopp 1986 publiziert, und der Westernligandenblot sind sensitive und spezifische Methoden, um die strukturellen und physiologischen Eigenschaften von Proteinen zu beschreiben (15).

Veränderungen der Primärstruktur der DNA, wie die Einführung der drei Mutationen im N-terminalen Bereich von IGFBP-2, können zu einer Veränderung der Tertiärstruktur führen und die physiologischen Eigenschaften der Proteine beeinflussen.

In zahlreichen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die c-terminale *flag*-Epitop-Markierung keinen Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins, insbesondere der IGF-Bindungsfähigkeit hat (99-101).

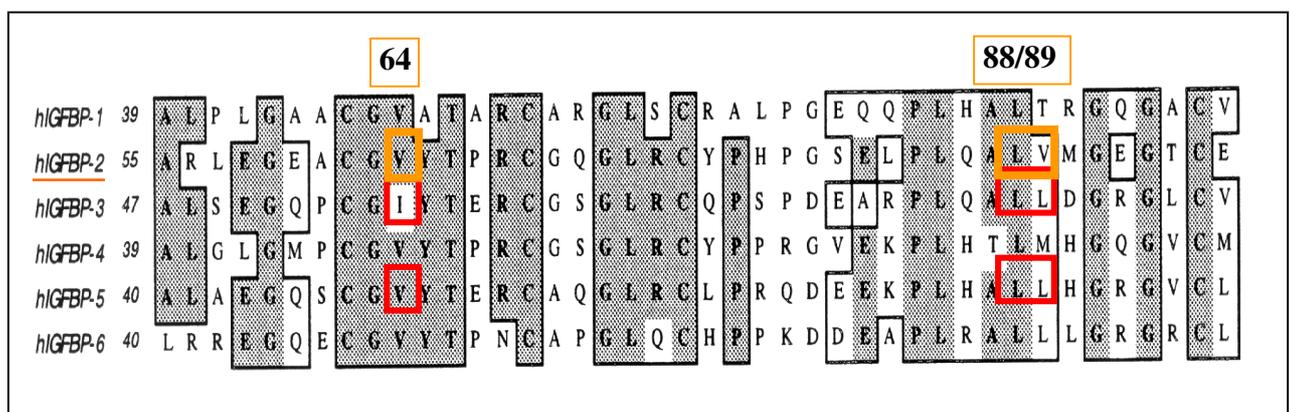
Die Aminosäuresubstitution in der IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-cDNA wurde so durchgeführt, dass es zu keiner Neubildung oder Zerstörung von Disulfidbrücken kommt. Dadurch sollte die Tertiärstruktur nicht wesentlich beeinflusst werden (95). Im Westernimmunoblot mit einem monoklonalen IGFBP-2-Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieser das veränderte Protein im gleichen Maße wie das Wildtypprotein bindet.

Kalus et al. führten mit Fragmenten des Bindungsproteins-5 NMR-Untersuchungen durch und zeigten, dass bestimmte Aminosäuren des N-Terminus der Bindungsproteine eine hydrophobe Region bilden, die das eigentliche IGF-Bindungsmotiv enthält (94). Vermutlich bilden die acht Aminosäuren an Stelle 49, 50, 62 sowie 68, 69, 70, 73 und 74 eine hydrophobe kritische Region bei IGFBP-3 und -5 (siehe Abb. 10) (95). Verschiedene Untersuchungen mit Fragmenten der Bindungsproteine-2, -3 und -5 zeigten jedoch auch,

dass für die IGF-Bindung nicht nur die N-terminale-Region, sondern auch der C-Terminus eine wichtige Funktion hat. Wahrscheinlich interagiert die C-terminale Region mit hydrophoben Regionen des N-Terminus und bildet gemeinsam das IGF-Bindungsmotiv (102-104). Mit Hilfe einer neuen NMR-Untersuchungstechnik, die transverse relaxation optimised spectroscopy (TROSY), konnte nun die Bindung von IGF-I und -II am intakten IGFBP-2 untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die C-terminale Region bei der IGF-Bindung des intakten IGFBP-2 ebenfalls eine Schlüsselrolle spielt.

Da die NMR-Analysen von Kalus et al. mit den BP-Fragmenten durchgeführt wurden, stellte sich nun die Frage, ob die Ergebnisse auch auf die intakten Bindungsproteine übertragbar waren. Imai et al. erreichten eine Affinitätsreduktion bei IGFBP-3 und -5 durch den Austausch von fünf Aminosäuren, wiesen jedoch auch darauf hin, dass womöglich weniger Aminosäureänderungen für eine Affinitätsreduktion ausreichend seien (95). Dies wurde wenig später für IGFBP-3 nachgewiesen mit der Herstellung einer rekombinanten  $G^{56}G^{80}G^{81}$ -IGFBP-3-Variante, welche die intrinsische IGF-Bindungsfähigkeit verloren hatte, ohne dass die physiologischen Eigenschaften des Proteins verändert wurden (105).

Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt aus dem N-Terminus von IGFBP-1 bis -6.



**Abb.10** grau unterlegt: hoch konservierte Aminosäuresequenzen der Bindungsproteine 1-6  
rot gerahmt: ausgetauschte Aminosäuren [Imai et al.] bei IGFBP-3 und -5  
orange gerahmt: korrespondierende Aminosäuren  $V^{64}$   $L^{88}$   $V^{89}$  von IGFBP-2

Wir untersuchten in unseren Experimenten die Auswirkungen des Aminosäureaustausches in der N-terminalen Region am kompletten IGFBP-2-Protein unter der Vermutung, dass der Austausch von drei der konservierten Aminosäuren 64, 88 und 89 zu einem ausreichenden Verlust der IGF-Bindungsfähigkeit führt.

Im Westernligandenblot konnten wir zeigen, dass der ausschließlich im N-terminalen Bereich durchgeführte Nukleotidaustausch den vollständigen Verlust der IGF-Bindungsfähigkeit zur Folge hat. Weiterhin waren für diesen Affinitätsverlust nur drei Aminosäureaustausche nötig. Die Aminosäuren an Stelle 64, 88 und 89 der Aminosäuresequenz von IGFBP-2 gehören demnach zu den kritischen Aminosäuren in der hydrophoben Region für die Bildung des IGF-Bindungsmotivs.

### **4.1.3. Proliferationsuntersuchungen**

#### **4.1.3.1. Auswahl der Zelllinien**

Für die Proliferationsuntersuchungen wurden zwei verschiedene Tumorzelllinien gewählt. Die HS578T-Zelllinie ist eine Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinomzelllinie (106), deren IGF-I-Rezeptor durch eine Mutation unabhängig von der IGF-Konzentration in der Umgebung der Zelle dauerhaft aktiviert ist. Die Zelllinie eignet sich daher gut zur Untersuchung der IGF-Rezeptor-unabhängigen Wirkungen der Bindungsproteine, wie sie bereits für IGFBP-3 durchgeführt wurden (107). Durch die ständige Aktivierung des Rezeptors werden die IGF-Rezeptor-vermittelten IGF-abhängigen Wirkungen der Bindungsproteine ausgeschaltet, ohne dass die Bindung von IGF an den IGF-I-Rezeptor gestört wird (108). Neue Untersuchungen wiesen bei der HS578T-Zelllinie die Bindung von IGFBP-2 an das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  nach, wodurch vermutlich Effekte vermittelt werden, die IGF-unabhängig sind (s.u.) (63).

Die zweite untersuchte Zelllinie ist die SW480-Kolonkarzinomlinie (109). Mehrere Studien beschrieben IGFBP-2 als Risikofaktor und Malignitätsmarker bei Kolonkarzinomen (87). Da sich ähnliche Ergebnisse bei der kindlichen ALL fanden und Leukämiezellkulturen schwer zu transfizieren sind, sollte die Kolonkarzinomlinie SW480 als experimentelles Vergleichsmodell dienen (92).

#### 4.1.3.2. Überexpression von IGFBP-2 in Tumorzelllinien

Zelllinien sezernieren Wachstumsfaktoren, die auto- und parakrine Wirkungen auf die Proliferation haben. Ebenso werden die sechs Bindungsproteine, je nach untersuchter Zelllinie, in unterschiedlichen Konzentrationen sezerniert. Die Transfektion der *flag*-markierten und der nicht-IGF-bindenden IGFBP-2-Variante führte bei unseren Untersuchungen zu einer deutlichen Überexpression der plasmidkodierten Proteine in den Zelllinien HS578T und SW480 und zu einer hohen Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand.

Wir untersuchten, inwiefern die transfizierten und sezernierten Proteine das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen. Die aussagekräftigste und sicherste Methode zum Vergleich von Zellwachstum ist die quantitative Zellzählung in Proliferationsexperimenten (110). Durch parallele Untersuchungen der drei Transfektanten einer Zelllinie wurden insgesamt vergleichbare Wachstumsbedingungen geschaffen. Mögliche Unterschiede in der Verteilung der Zellzahlen (Pipettierfehler) auf die drei Ansätze bei der Einsaat der Zellen wurden aufgrund der Durchführung der Experimente in Triplets weitgehend ausgeglichen. Die Berechnung der Mittelwerte aus den drei Ansätzen pro Transfektante (Triplets) führten so zu einer geringeren Streuung der Zellzahlen.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Transfektionen von Jurkat- und SW480-Zellen mit humaner IGFBP-2-cDNA zu einem signifikanten Proliferationsvorteil führten. Exogen zugegebenes IGFBP-2 führte ebenfalls zu einem vermehrten Wachstum von Jurkatzellen, die jedoch nicht Signifikanzniveau erreichten. Entsprechend vermindert zeigte sich das Wachstum bei Jurkatzellen, deren IGFBP-2-mRNA mittels *antisense*-Technik gehemmt wurde (111).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Proliferationsexperimenten mit transfizierten HS578T- und SW480-Zellen. Beide Transfektanten, IGFBP-2<sup>flag</sup> und IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup> wuchsen schneller als die korrespondierenden Wildtypzellen. Die IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-transfizierten Zellen der HS578T-Zelllinie wuchsen dabei signifikant schneller als der Wildtyp, die der SW480-Zelllinie sogar hochsignifikant schneller. Mögliche Ursachen für die erhöhte Proliferationsrate der IGFBP-2-transfizierten Zellen werden ausführlich in Kapitel 4.1.4. und 4.1.5. diskutiert.

Es zeigte sich auch ein Anstieg der Proliferationsrate der nicht-IGF-bindenden Variante gegenüber der flagmarkierten Variante. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass mutiertes IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Protein nicht in der Lage ist IGF zu binden, weshalb freies, ungebundenes IGF am IGF-I-Rezeptor seine wachstumsstimulierende Wirkung entfalten

kann. Die *flag*-Variante dagegen bindet para- und autokrin gebildetes IGF und verhindert so dessen Rezeptorinteraktion. Diese Begründung lässt sich jedoch nicht auf die HS578T-Zellen übertragen, da deren IGF-Rezeptor bei beiden Transfektanten IGF-unabhängig aktiviert ist.

Dem Wachstumsunterschied zwischen den IGFBP-2<sup>flag</sup> und den IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-transfizierten HS578T-Zellen könnte jedoch auch zugrundeliegen, dass die Bindung von IGF an IGFBP-2<sup>flag</sup> selbst eventuelle stimulatorische Eigenschaften von IGFBP-2 beeinträchtigt, wogegen die nicht-bindende Variante seine Wirkungen in Abwesenheit von IGF entfalten kann.

Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die von uns konstruierte IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Variante ein höheres stimulatorisches Wachstumspotenzial als das Wildtypbindungsprotein besitzt.

#### 4.1.4. IGFBP-2 Wirkung auf Tumorzellen

Zu den Kriterien von malignem Wachstum gehören eine erhöhte Proliferationsrate, das invasive Wachstum und die Fähigkeit, sich aus dem Zellverband zu lösen (Metastasierung). IGFBP-2 wurde bereits als positiver und negativer Regulator von Tumorwachstum beschrieben: einerseits wirken die Proteine durch die Bindung von lokal produzierten Wachstumsfaktoren antiproliferativ, andererseits können sie als eigenständiger Überlebensfaktor antiapoptotisch wirken (112;113). Aufgrund der IGFBP-2-Überexpression in vielen Tumoren und deren Korrelation mit dem Tumorgrad ist zu vermuten, dass es den Zellen einen Vorteil durch die Förderung von malignen Eigenschaften schaffen könnte. Zusätzlich fand man bei verschiedenen Tumoren eine hohe Menge von membranassoziiertem IGFBP-2 (69;114). Aufgrund dieser Beobachtungen werden sowohl IGF-abhängige als auch IGF-unabhängige Wirkungsmechanismen angenommen.

IGFBP-2 induziert *in vitro* die Bildung von Matrixmetalloproteasen bei Glioblastomzellen und könnte so die Invasion von Zellen in gesundes Gewebe erleichtern (115).

Ein verändertes Gleichgewicht von Proteasen kann ebenfalls Ursache von maligner Transformation sein. Eine erhöhte Proteolyseaktivität konnte bei Kolonkarzinomen im Vergleich zu normalem Darmgewebe gezeigt werden (116). Menouny et al. konnten zeigen, dass überexprimiertes IGFBP-2 *in vivo* in der Lage ist, Tumoren neu zu induzieren. IGFBP-2 bewirkte über die Induktion von Plasminaktivatoren und Hemmung der Inhibitoren eine erhöhte Proteolyse von IGFBP-3 und Umverteilungen des Transports der Wachstumsfaktoren zugunsten des Anteils von IGFBP-2. Der Komplex von IGFBP-2 und

IGF ist im Gegensatz zum ternären Komplex (IGFBP-3, IGF und ALS) in der Lage, die Zirkulation zu verlassen und an den Zielzellen zu wirken (117). Außerdem berichteten die Autoren in einer weiteren Studie über eine erhöhte Sekretion von *tissue-type plasminogen* (PLG) *activator* durch Neuroblastomzellen. Die daraus folgende erhöhte Proteolyse von IGFBP-2 resultiert in einer verminderten Affinität der Fragmente zu IGF-II, die daraufhin in erhöhtem Maße mit IGF-Rezeptoren interagieren können (118).

Untersuchungen mit verschiedenen Zelllinien zeigten jedoch auch inhibitorische Effekte von IGFBP-2 auf das Zellwachstum (67). Diese wurden mit exogen zugegebenem IGFBP-2 durchgeführt, das vermutlich zunächst freies IGF band und somit als Konkurrenz zum IGF-I-Rezeptor einen antiproliferativen Effekt bewirkte. Schütt et al. beschrieben bei der Untersuchung von HS578T-Zellen ebenfalls eine antiproliferative Wirkung von exogen zugefügtem IGFBP-2. Diese Beobachtung wurde als Integrinwirkung beschrieben, die von IGF unabhängig war (siehe 4.1.5.) (63).

#### 4.1.5. Potenzielle IGF-unabhängige Mechanismen

Über die genauen molekularen Mechanismen der IGF-unabhängigen bzw. IGF-Rezeptor-unabhängigen Wirkungen der einzelnen Bindungsproteine ist noch wenig bekannt. Man nimmt an, dass die Effekte durch die intakten Proteine oder deren Proteolysefragmente vermittelt werden und die Proteine sowohl über eigene als auch über die IGF-Rezeptoren wirken können.

Für IGFBP-3 ist bekannt, dass bei vielen Tumoren eine verminderte Serumkonzentration zu finden ist (119). Neue Hinweise auf Wirkungsmechanismen wurden in einer Studie postuliert, die mutiertes nicht-IGF-bindendes IGFBP-3 auf seine Wirkungen auf Pankreas-Inselzellen untersuchte. IGFBP-3 führte demnach zu einer Inhibition der c-raf-MEK-EK-Signalkette, wodurch die Apoptose von Zellen eingeleitet werden kann. Diese Eigenschaft war unabhängig von der IGF-Bindungsfähigkeit von IGFBP-3 (120).

In unseren Experimenten untersuchten wir die direkten IGF-unabhängigen Wirkungen von IGFBP-2 auf die Proliferation. Unsere rekombinante IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Variante war im Westernligandenblot nachweislich nicht in der Lage, IGF zu binden. Dadurch waren die direkten Einflussmöglichkeiten der Wachstumsfaktoren auf das Bindungsprotein weitestgehend reduziert. Durch diese IGF-Affinitätsreduktion konnte parakrin oder autokrin gebildetes IGF die nativen Funktionen des IGF-Bindungsproteins nicht mehr beeinflussen (95). Der signifikante wachstumsstimulierende Effekt der mutierten IGFBP-2-G<sup>64/88/89flag</sup>-Variante konnte, wie bereits diskutiert, also nicht auf die Bindung von IGF-I

an das Protein zurückgeführt werden, sondern muss eine eigenständige Wirkung des Bindungsproteins sein. Für die proliferationsfördernde Wirkung als eine Eigenschaft von IGFBP-2 spricht auch, dass der Effekt bei den HS578T-Zellen mit einem dauerhaft aktivierten IGF-I-Rezeptor nachweisbar war. Diese Wirkung war unabhängig von der Anwesenheit von IGF und sollte damit ausschließlich auf die Anwesenheit von überexprimiertem IGFBP-2 zurückzuführen sein.

Der Kontakt mit der extrazellulären Matrix (ECM) ist vor allem bei Tumoren des ZNS Voraussetzung für invasives Wachstum. Einige Bindungspartner von IGFBP-2 in der ECM wurden bereits identifiziert. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass IGFBP-2 an Glykosaminoglykan-Chondroitin-4 und -6-sulfate, Keratansulfat und über seine Heparin-bindende Domäne an die ECM binden kann. Die Bindung an Proteoglykane wurde *in vivo* nachgewiesen (65). Die Bindung an die ECM über Heparin gelang jedoch nur in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren. Für den Kontakt von IGFBP-2 mit Komponenten der extrazellulären Matrix war keine intakte RGD-Sequenz, sondern das Heparinbindungsmotiv erforderlich, wie Untersuchungen mit mutierten RGD- und HB-Domänen erbrachten. In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass eine intakte HBD von überexprimiertem IGFBP-2 Voraussetzung für eine erhöhte Proliferation, Migration und Invasion von Neuroblastomzellen ist (121).

Bei der direkten Interaktion mit der Zelloberfläche kommt der RGD-Sequenz im C-terminalen Bereich von IGFBP-2 vermutlich eine besondere Bedeutung zu. Über diese Sequenz können Proteine an Integrine binden, die als Zelloberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren können.

Frühere Studien zeigten, dass die Zellassoziation von IGFBP-2 nicht über die RGD-Sequenz abläuft und deren Mutation keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat (122). Neue Studien wiesen jedoch eine IGFBP-2-Bindung an das Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  bei Ewingsarkomzellen und der Brustkrebszelllinie HS578T nach. Dafür war eine intakte RGD-Sequenz erforderlich. Die Bindung resultierte bei den Brustkrebszellen in einer verminderten Zelladhäsion. *In vivo* könnte vermutlich dadurch die Metastasierung begünstigt werden (62;63). Unabhängig davon beschrieben andere Autoren ebenfalls die Bindung von IGFBP-2 an Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  in IGFBP-2-überexprimierenden Glioblastomzellen. Durch die Bindung wurde die Integrinexpression hochreguliert und

zusätzlich die Zellmigration verstärkt. Der Effekt wurde von den Autoren als IGF-unabhängig beschrieben (123;124).

Verminderte Zelladhäsion und Zellmigration bedeuten für Tumorzellen einen Selektionsvorteil und eine erhöhte Aggressivität. Durch die nachgewiesene Bindung von IGFBP-2 an bestimmte Integrine lässt sich die hohe Aggressivität von Tumoren erklären, die mit stark erhöhten IGFBP-2-Spiegeln einhergehen (z.B. Glioblastome, Prostatakarzinome).

Auf der anderen Seite zeigte eine Studie von Pereira et al., dass die Interaktion von IGFBP-2 mit dem Integrin  $\alpha 5\beta 3$ -Rezeptor zu einer geringeren Tumorgröße bei Brustkrebs führt und diese Interaktion nicht über die RGD-Sequenz abläuft. Bei diesen Mechanismen scheint Vitronectin als ECM-Komponente beteiligt zu sein, dessen Wirkung auf IGFBP-2 jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (121;125). Außerdem berichteten Schütt et al. über eine signifikant verminderte Proliferation von HS578T-Zellen, wenn exogenes IGFBP-2 oder RGD-haltige Proteine zugefügt wurden. Der Effekt wurde als IGF-unabhängig beschrieben. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass die proliferationshemmende Wirkung über Integrine vermittelt wird, da Peptide mit einer mutierten RGD-Sequenz (sogenannte RGE-Peptide) keinen Effekt bewirkten (63).

Neben der Integrinbindung wurde in Osteosarkomzellen auch eine IGF-unabhängige verstärkte Bindung der Wachstumsfaktoren an IGF-Rezeptoren nachgewiesen. Gleichzeitig induzierte die exogene Zugabe von IGFBP-2 die Expression der GH-Rezeptor-mRNA. Beide Effekte resultierten in einer erhöhten Proliferation der Zellen (126).

Die Überexpression von IGFBP-2 in Nebennierentumorzellen bewirkte ein beschleunigtes Wachstum dieser Tumorzellen (127). Eine mögliche Erklärung dafür ist die Aktivierung von proliferationsfördernden Genen wie z.B. Gluthation-S-Transferasen in IGFBP-2-transfizierten Zellen, die einen Proliferationsvorteil der Zellen gegenüber oxidativem Stress schafft. (69) Für die Hypothese, dass IGFBP-2 Schutzmechanismen bei oxidativem Stress aktiviert, spricht auch die Aktivierung von IGFBP-2 durch NF $\kappa$ B in Lungenepithelzellen bei oxidativem Stress (50).

## 4.2. Klinische Aspekte

### 4.2.1. IGFBP-2 bei Malignomen

Die klinische Bedeutung der Bindungsproteine für die normale menschliche Entwicklung wurde bereits in der Einleitung beschrieben. In der Diagnostik bei Entwicklungs- und Wachstumsverzögerung von Kindern ist die Bestimmung einzelner IGF-Komponenten schon seit langer Zeit Routine. Nun wurden zunehmend bei verschiedenen Malignomen Veränderungen der Serumkonzentrationen, Überexpressionen oder Hemmungen der BP-Produktion beschrieben.

Erhöhte Serumspiegel von IGFBP-2 wurden bei einer Vielzahl von Malignomen bestimmt, z.B. bei Tumoren des Kolons (128), der Lunge (89;129), der Prostata (88;130) sowie bei Kindern mit Wilms'Tumor (82;131) und soliden malignen ZNS-Tumoren (90). Die Höhe des Spiegels korrelierte dabei auch mit der Tumormalignität (115;132;133). Gerade bei den hochaggressiven Glioblastomen, Melanomen und kindlichen lymphatischen Blasten ist IGFBP-2 hoch exprimiert.

In zahlreichen klinischen Untersuchungen von Kindern mit ALL wurde eine signifikante Erhöhung von IGFBP-2 sowohl im Serum und Liquor als auch in der Genexpression der lymphatischen Leukämiezellen beschrieben (90;93;134). Die Höhe der IGFBP-2-Expression in den leukämischen Blasten bei Diagnosestellung korreliert dabei direkt mit der ereignisfreien Überlebenszeit, wie es in einer Studie unserer Arbeitsgruppe beschrieben wurde und kann als unabhängiger prognostischer Marker gewertet werden (93). Bei der prognostisch schlechteren T-ALL ergaben sich zusätzlich im Vergleich zur B-ALL erhöhte IGFBP-2-Werte. Gleichzeitig wurde im Serum von ALL-Patienten IGFBP-2-mRNA signifikant häufiger gefunden als bei gesunden Kindern (92).

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Tumorzellen IGFBP-2 selbst produzieren können (92). Dies wurde bereits bei zahlreichen Tumoren bestätigt (81;89;135). Eine weitere Ursache kann die von uns in der Vergleichszelllinie SW 480 beschriebene IGF-unabhängige proliferationsfördernde Wirkung des IGFBP-2 auf die lymphatischen Blasten sein, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil verschafft.

Ein ursächlicher Zusammenhang von erhöhten IGFBP-2-Spiegeln bei Kolonkarzinomen lässt sich mit unseren Proliferationsuntersuchungen und Vorexperimenten mit der Tumorzelllinie SW480 erklären. Auf weitere IGF-abhängige und unabhängige Wirkungsmechanismen wurde bereits eingegangen, die die klinischen Ergebnisse stützen.

#### **4.2.2. IGFBP-2 als möglicher Tumormarker und Prognosefaktor?**

Der Zusammenhang zwischen erhöhten IGFBP-2-Serumspiegeln bei verschiedenen Tumoren lässt die Frage aufkommen, ob IGFBP-2 als Tumormarker geeignet wäre, um Hochrisikopatienten zu erkennen und intensiver zu behandeln. Der Zusammenhang von IGFBP-2 und Malignität bei der kindlichen ALL wurde bereits beschrieben. Auch bei der Risikostratifizierung nach Knochenmarkstransplantation bei Kindern mit AML könnte die Bestimmung des Serum-IGFBP-2- Spiegel hilfreich sein, wie eine Studie von Dawczynski et al. ergab. Kinder mit einer Standardabweichung von  $> 4,5$  des IGFBP-2-Spiegels haben demnach ein wesentlich höheres Rezidivrisiko und könnten so als Risikopatientengruppe identifiziert und entsprechend aggressiver behandelt werden (136;137).

Da IGFBP-2 auch bei soliden ZNS-Malignomen im Liquor deutlich erhöht ist, jedoch der Liquor bei peripheren Tumoren unauffällige Werte zeigt, lässt sich das Bindungsprotein als selektiver Marker für Tumoren des ZNS einsetzen (90).

Auch bei der Früherkennung von Prostatakarzinomen könnte IGFBP-2 eine Bedeutung erlangen. Zwar ist die Bestimmung des PSA-Wertes sensitiver als der IGFBP-2-Spiegel, jedoch kann, vor allem bei niedrigen PSA-Werten, eine Erhöhung des Serumspiegels auf eine erhöhte Tumormasse hinweisen. (130;138). Zusätzlich wäre die Bestimmung des IGFBP-2-Spiegels ein zuverlässiges Unterscheidungskriterium zwischen der benignen Prostatahyperplasie und dem Prostatakarzinom, da es ausschließlich bei Karzinomen erhöht ist (139).

Die Kombination aus Messung von CEA und IGFBP-2-Spiegeln bei kolorektalen Tumoren als prognostischer Marker für Metastasierung und Rezidive wurde bereits von einigen Autoren vorgeschlagen (140).

#### **4.3. Therapeutische Ansätze**

Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II unter therapeutischen Gesichtspunkten intensiver untersucht als die IGF-Bindungsproteine. So sind bereits Somatostatin-Analoga bei neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und Tamoxifen bei östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen im klinischen Einsatz (36;141).

Antikörper gegen den IGF-I-Rezeptor und IGF-I-Analoga, die IGF-I vom Rezeptor verdrängen, bewirkten bei vielen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ein vermindertes Wachstum (142). Klinische Einsätze sind jedoch noch in Erprobung.

Für IGFBP-2 sind neben dem Einsatz als Tumormarker und unabhängigen Faktor zur Erkennung von Risikopatienten in Zukunft auch therapeutische Einsätze denkbar. Als direkter Wachstumsstimulator, wie das Protein in unseren Untersuchungen und in anderen Studien identifiziert wurde, sind in Zukunft eventuelle Einsatzmöglichkeiten eines spezifischen Antikörpers denkbar. Allerdings muss beachtet werden, dass die meisten Untersuchungen zum jetzigen Zeitpunkt ausschließlich *in vitro* und mit überexprimiertem IGFBP-2 mit zum Teil unphysiologisch hohen Konzentrationen des Proteins durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind also nicht ohne weiteres auf Prozesse *in vivo* übertragbar.

Auch dürfen die physiologischen Funktionen von IGFBP-2, das in sehr hoher Konzentration im Liquor vorkommt und dort das Hauptbindungsprotein darstellt, nicht nachteilig beeinflusst werden.

Die Entwicklung von Hemmern der IGFBP-Proteasen zur Regulation des freien Bindungsprotein- und IGF-Anteils ist Gegenstand der aktuellen Forschung (40).

Zunächst müssen jedoch die genauen Wirkungsmechanismen der Bindungsproteine geklärt werden und die Frage, ob IGFBP-2 ursächlich in die Abfolge der Karzinogenese eingereicht werden kann und durch welche Mechanismen die Bindungsproteine im gesunden Gewebe und in Malignomen kontrolliert werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II sind wichtige Effektorproteine für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Eine Gruppe von strukturell konservierten Proteinen, IGF-Bindungsproteine, binden, stabilisieren und verlängern die Halbwertszeit der IGF-Proteine.

Neben dieser Funktion vermutet man auch IGF-unabhängige Wirkungen auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung. IGFBP-2 im Serum wurde als unabhängiger Risikofaktor und Malignitätsmarker für verschiedene Neoplasien identifiziert, wie z.B. akute lymphatische Leukämie, Kolonkarzinome und Glioblastome. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die IGFBP-2-Genexpression mit Tumorgrad und Prognose korreliert. Aufgrund dieser klinischen Beobachtungen untersuchten wir die Rolle von IGFBP-2 auf Zellwachstum verschiedener Tumorzellen.

Um zwischen IGF-abhängigen und IGF-unabhängigen IGFBP-2-Wirkungen unterscheiden zu können, konstruierten wir eine nicht IGF-bindende IGFBP-2-Variante. Die Aminosäuren Valin, Leucin und Valin an den Stellen 66, 88 und 89 der Aminosäuresequenz in der N-terminalen Bindungsregion wurden mittels *site-directed mutagenesis* durch *overlap-extension-PCR* jeweils mit Glyzin ersetzt. Zur Unterscheidung der endogenen und plasmidkodierten Proteine markierten wir die Proteine am C-terminalen Ende mit einem *flag*-Epitop. Die cDNA von IGFBP-2<sup>flag</sup> und die IGFBP-2<sup>G64,88,89flag</sup> sowie der leere Vektor als Kontrolle wurden in die Tumorzelllinien HS578T und SW480 transfiziert.

Im Westernimmunoblot konnte eine Überexpression beider Proteine gezeigt werden. Der Westernligandenblot mit biotinyliertem IGF-II demonstrierte, dass IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup> im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen nicht in der Lage war, IGF-II zu binden.

In Proliferationsexperimenten wuchsen die IGFBP-2<sup>flag</sup>-und IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup>-transfizierten Zellen signifikant schneller als die Wildtypzellen. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Wachstums von den IGFBP-2<sup>flag</sup> zu den IGFBP-2-G<sup>64,88,89flag</sup> transfizierten Zellen. Der wachstumsstimulierende Effekt von IGFBP-2 in den IGFBP-2-überexprimierenden Zellen war unabhängig von der IGF-Bindungsfähigkeit des IGFBP-2.

Mögliche Wirkungsmechanismen von IGFBP-2, die in der Literatur beschrieben wurden, sind die Bindung an Integrine, die Induktion von antioxidativen Substanzen sowie die Erhöhung der Bindungsfähigkeit von Wachstumshormon an den Rezeptor. Die in

verschiedenen Studien nachgewiesene Verminderung der Zelladhäsion und Erhöhung der Zellmobilität durch die IGFBP-2-Überexpression kann die Metastasierung begünstigen und die Aggressivität von Tumorzellen erhöhen. Es besteht somit ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den erhöhten IGFBP-2-Spiegeln in Serum und Liquor und einer erhöhten Malignität und Aggressivität verschiedener Malignome wie der kindlichen ALL, der Kolonkarzinome und Glioblastome.

Verschiedene Studien wiesen auf die Möglichkeit hin, IGFBP-2 als Tumormarker bei der ALL, bei Prostatakarzinomen und Kolonkarzinomen einzusetzen. Gerade bei der akuten lymphatischen Leukämie im Kindesalter wird die Verbesserung der Therapiemöglichkeiten in der Früherkennung von Risikopatienten liegen. Die IGFBP-2-Serumkonzentration als unabhängiger Risikofaktor könnte eine solche Identifizierung erleichtern.

Inwieweit die Beeinflussung der IGFBP-2-Expression in Tumorzellen therapeutischen Wert hat, muss in Zukunft untersucht werden.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. **Grulich-Henn J, Spiess S, Heinrich U, Schonberg D, Bettendorf M** 1998 Ligand blot analysis of insulin-like growth factor-binding proteins using biotinylated insulin-like growth factor-I. *Hormone Research* 49:1-7
2. **Zapf J, Rinderknecht E, Humbel RE, Froesch ER** 1978 Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications. *Metabolism* 27:1803-1828
3. **Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., Van den Brande JL, Van Wyk JJ** 1972 Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235:107
4. **Rinderknecht E, Humbel RE** 1978 Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89:283-286
5. **Rinderknecht E, Humbel RE** 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-2776
6. **Baxter RC, Martin JL** 1989 Binding proteins for the insulin-like growth factors: structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res* 1:49-68
7. **Duguay SJ** 1999 Post-translational processing of insulin-like growth factors. *Horm Metab Res* 31:43-49
8. **Muller HL, Oh Y, Gargosky SE, Wilson KF, Lehrnbecher T, Rosenfeld RG** 1994 Insulin-like growth factor binding protein-3 concentrations and insulin-like growth factor binding protein-3 protease activity in sera of patients with malignant solid tumors or leukemia. *Pediatr Res* 35:720-724
9. **Sara VR, Hall K** 1990 Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70:591-614
10. **Van den Brande JL** 1992 Structure of the human insulin-like growth factors: relationship to function. In: Schofield PN (ed). *The insulin-like growth factors*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo:12-44
11. **Ward A, Elliss CJ** 1992 The insulin-like growth factor genes. In: Schofield PN (ed). *The insulin-like growth factors*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo:45-79
12. **Zapf J** 1997 Total and free IGF serum levels. *Eur J Endocrinol* 136:146-147
13. **Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER** 1989 Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121:753-758
14. **Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG** 1996 Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28:619-637

15. **Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG** 1991 Insulin-like growth factor binding proteins: structural and molecular relationships. *Growth Factors* 5:19-28
16. **Shand JH, Beattie J, Song H, Phillips K, Kelly SM, Flint DJ, Allan GJ** 2003 Specific amino acid substitutions determine the differential contribution of the amino- and carboxyl-terminal domains of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 in binding IGF-I. *J Biol Chem* .278:17859-17866
17. **Rosenfeld RG, Pham H, Cohen P, Fielder P, Gargosky SE, Muller H, Nonoshita L, Oh Y** 1994 Insulin-like growth factor binding proteins and their regulation. *Acta Paediatr Suppl* 399:154-158
18. **Baxter RC, Holman SR, Corbould A, Stranks S, Ho PJ, Braund W** 1995 Regulation of the insulin-like growth factors and their binding proteins by glucocorticoid and growth hormone in nonislet cell tumor hypoglycemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:2700-2708
19. **Hall K, Lundin G, Pogo G** 1988 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* 118:321-326
20. **Clemmons D.R., Klibanski A, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ** 1981 Reductions of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 53:1247-1250
21. **Delhanty PJ, Han VK** 1993 The expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 and IGF-II genes in the tissues of the developing ovine fetus. *Endocrinology* 132:41-52
22. **Hall K, Enberg G, Ritzen M, Svan H, Fryklund L, Takano K** 1980 Somatomedin A levels in serum from healthy children with growth hormone deficiency and delayed puberty. *Acta endocrinol* 94:155-165
23. **Zapf J, Schmid C, Froesch ER** 1984 Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin Endocrinol Metab* 13:3-30
24. **Froesch ER, Meuli C** 1976 Binding of insulin and nonsuppressible insulin-like activity to isolated perfused rat heart muscle. Evidence of two binding sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177:31-38
25. **Poggi C, Le Marchand -Brustel Y, Zapf J** 1979 Effects and binding of Insulinlike growth factor I in the isolated soleus muscle of lean and obese mice: comparison with insulin. *Endocrinology* 105:723-730
26. **Nissley P, Lopaczynski W** 1991 Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* 5:29-43
27. **Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, .** 1986 Insulin-like growth factor I receptor primary

- structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5 (10):2503-2512
28. **Casella SJ, Han NK, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ** 1986 Insulin-like growth factor II binding to the type I somatomedin receptor. *J Biol Chem* 261:9268-9273
  29. **Jacobs S, Cuatrecasas P** 1986 Phosphorylation of Receptors for Insulin and insulin-like growth factor I. Effects of hormones and phorbol esters. *J Biol Chem* 261:934-939
  30. **Datta SR, Dudex H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME** 1997 Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241
  31. **Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RS, Kaplan DR, Greenberg M** 1997 Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase. *Akt Science* 275:661-665
  32. **Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JRJ** 1992 Interferon-dependent tyrosin phosphorylation of latent cytoplasmatic transcription factor. *Science* 257 (5071):809-813
  33. **Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, Sahagian GG** 1988 Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263:9339-9344
  34. **Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S** 1988 The cation independent mannose 6-phosphat receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 263:2585-2588
  35. **Oka Y, Rozek LM, Czech MP** 1985 Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J Biol Chem* 260:9435-9442
  36. **Werner H, LeRoith D** 1996 The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 68:183-223
  37. **Löffler P** 2003 **Biochemie und Pathobiochemie**. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
  38. **Baserga R, Rubin R** 1993 Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3:47-61
  39. **Zapf J, Mader M, Waldvogel M, Froesch ER** 1975 Nonsuppressible insulin-like activity: biological activity and receptor binding. *Isr J Med Sci* 11(7):664-678
  40. **Ranke MB, Elmlinger MW** 1997 Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone Research* 48 Suppl 4:9-15

41. **Spagnoli A, Rosenfeld RG** 1997 Insulinlike growth factor binding proteins. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* 4:1-9
42. **Shimasaki S, Ling N** 1991 Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3:243-266
43. **Spagnoli A, Rosenfeld RG** 1996 The mechanisms by which growth hormone brings about growth. The relative contributions of growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:615-631
44. **Leon SR, Baxter RC, Camerato T, Dai J, Wood WI** 1992 Structure and functional expression of the acid labile subunit of the - binding protein complex. *Mol Endocrinol* 6:870-876
45. **Baxter RC** 1994 Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Hormone Research* 42:140-144
46. **Rosenfeld RG, Hwa V, Wilson L, Lopez-Bermejo A, Buckway C, Burren C, Choi WK, Devi GR, Ingermann A, Graham D, Minniti G, Spagnoli A, Oh Y** 1999 The Insulin-like Growth Factor Binding Protein Superfamily: New Perspectives. *Pediatrics* 104:1018-1021
47. **Collett-Solberg PF, Cohen P** 1996 The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:591-614
48. **Rajah R, Katz L., Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P** 1995 Insulin-like growth factor- binding protein (IGFBP) proteases: Functional regulation of growth. *Growth factor reasearch* 6:273-284
49. **Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G** 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J* 8:2497-2502
50. **Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E** 2001 Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* 61:8601-8610
51. **Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Wilson TA** 1995 Insulin-like growth factor binding protein-2 and insulin: studies in children with type 1 diabetes mellitus and maturity-onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3647-3652
52. **Hossenlopp P, Seurin D, Sgovia-Quinson S, Binoux M** 1986 Identification of an insulin-like growth factor-binding protein in human cerebrospinal fluidwith a selektive affinity for IGF-II. *FEBS Lett* 208:439-444
53. **Wang JF, Hampton B, Mehlman T, Burgess WH, Rechler MM** 1988 Isolation of a biologically active fragment from the carboxy terminus of the fetal rat binding protein for insulin-like growth factors. *Biophys Res Commun* 157:718-726

54. **Zapf J, Born W, Chang JY, James P, Froesch ER, Fischer JA** 1988 Isolation and NH<sub>2</sub>- terminal amino acid sequence of rat serum carrier proteins of insulin-like growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 156:1187-1194
55. **Kuang Z., Yao S., Keizer DW, Wang C.C., Bach LA, Forbes BE, Wallace JC, Norton RS** 2006 Structure, dynamics and heparin binding of the c-terminal domain of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2). *J Mol Biol* 364:690-704
56. **Baxter RC** 1995 Insulin-like growth factor binding proteins as glucoregulators. *Metabolism* 44:12-17
57. **Oh Y, Muller HL, Pham H, Rosenfeld RG** 1993 Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 on Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 268:26045-26048
58. **Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT** 1995 Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130:1181-1187
59. **Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR** 1995 Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res* 6:319-327
60. **Ruoslathi E, Pierschlaber MD** 1987 New perspectives in cell adhesions: RGD and integrins. *Science* 491-497
61. **Booth BA, Boes M, Andress DL, Dake BL, Kiefer MC, Maack C, Linhardt RJ, Bar K, Caldwell EE, Weiler J** 1995 IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C- terminal heparin binding domain. *Growth Regul* 5:1-17
62. **Rauschnabel U, Koscielniak E, Ranke MB, Schuett B, Elmlinger MW** 1999 RGD-specific binding of IGFBP-2 to  $\alpha 5\beta 1$ -integrin of Ewing sarcoma cells. *Growth Horm.IGF* 9:369-370
63. **Schutt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW** 2004 Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 32:859-868
64. **Delhanty PJ, Han VKM** 1993 An RGD to RGE mutation in the putative membrane binding domain of IGFBP-2 inhibits its potentiation of IGF-II induced thymidine uptake by SCP cells. Program of the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society, Las Vegas,NV
65. **Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL, Werther GA** 1997 Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 138:4858-4867
66. **Arai T, Busby WJ, Clemmons DR** 1996 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* 137:4571-4575
67. **Jones JI, Clemmons DR** 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Review* 16:3-34

68. **Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Jr., Camacho-Hubner C, Clemmons DR** 1993 Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J Cell Biol* 121:679-687
69. **Firth SM, Baxter RC** 2002 Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Review* 23:824-854
70. **Lalou C, Lassarre C, Binoux M** 1996 A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF- I and insulin. *Endocrinology* 137:3206-3212
71. **Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG** 1993 Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* 268:14964-14971
72. **Collet C, Candy J** 1998 How many insulin-like growth factor binding proteins? *Mol Cell Endocrinol* 139:1-6
73. **Swishelm K, Ryan K, Tsuchiya K, Sager R** 1995 Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4472-4476
74. **Hwa V, Tomasini-Sprenger C, Bermejo AL, Rosenfeld RG, Plymate SR** 1998 Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 in prostate cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:4355-4362
75. **Murphy LJ** 1998 Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 21:97-107
76. **Rosenfeld RG, Hwa V, Wilson E, Plymate SR, Oh Y** 2000 The insulin-like growth factor-binding protein superfamily. *Growth Horm IGF Res* 10 Suppl A:S16-S17
77. **Cohen P, Clemmons DR, Rosenfeld RG** 2000 Does the GH-IGF axis play a role in cancer pathogenesis? *Growth Horm IGF Res* 10:297-305
78. **Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ** 1999 Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 91:620-625
79. **Gray A, Tam AW, Dull TJ, Hayflick J, Pintar J, Cavenee WK, Koufos A, Ullrich A** 1987 Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene. *DNA* 6:283-295
80. **Shi LH, Zhu XQ, Zhao GH, Xia Y.B., Zhang Y.S.** 2006 Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 in gastric carcinoma and its relationship with cell proliferation. *World J Gastroenterol* 12:6285-6289
81. **Zhang L, Huang W, Chen J, Zhou X, Lu Z, Zhou H** 2006 Expression of IGFBP-2 in gastric carcinoma and relationship with clinicopathologic parameters and cell proliferation. *Dig Dis Sci* 52:248-253

82. **Gansler T, Furlanetto T, Gramling TS, Robinson KA, Blocker N, Buse MG, Sens DA, Garvin AJ** 1989 Antibody to type I insuline like growth factor receptor inhibits growth of Wilms' tumor in culture and in athymic mice. *Am J Pathol* 135:961-966
83. **Lahm H, Amstad P, Wyniger J, Yilmaz A, Fischer JR, Schreyer M, Givel JC** 1994 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* 58:452-459
84. **Raile K, Hille R, Laue S, Schulz A, Pfeifer G, Horn F, Kiess W** 2003 Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates proliferation but also increases caspase-3 activity, Annexin-V binding, and DNA-fragmentation in human MG63 osteosarcoma cells: co-activation of pro- and anti-apoptotic pathways by IGF-I. *Horm Metab Res* 35:786-793
85. **McCubrey JA, Steelman LS, Mayo MW, Algate PA, Dellow RA, Kaleko M** 1991 Insulin-like growth factor I improves height in growth hormone insensitivity: two years' results. *Blood* 4:921-929
86. **Engstrom W, Zetterberg A** 1983 Phosphate and the regulation of DNA replication in normal and virus-transformed 3T3 cells. *Biochem J* 214:695-702
87. **Singh P, Rubin N** 1993 Insulinlike growth factors and binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* 105 (4):1218-1237
88. **Zapf J, Hauri C, Waldvogel M** 1989 Recombinant human insulin-like growth factor-I induces ist own carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (10):3813-3817
89. **Reeve JG, Brinkman A, Hughes S, Mitchell J, Schwander J, Bleehen NM** 1992 Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 84:628-634
90. **Muller HL, Oh Y, Lehrnbecher T, Blum WF, Rosenfeld RG** 1994 Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79:428-434
91. **Mohnike K, Kluba U, Mittler U, Aumann V, Vorwerk P, Blum W** 1996 Serum levels of insulin-like growth factor-I, -II and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 in children with acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Pediatrics* 155:81-86
92. **Wex H, Vorwerk P, Mohnike K, Bretschneider D, Kluba U, Aumann V, Blum WF, Mittler U** 1998 Elevated serum levels of IGFBP-2 found in children suffering from acute leukaemia is accompanied by the occurrence of IGFBP-2 mRNA in the tumour clone. *Br J Cancer* 78:515-520
93. **Vorwerk P, Mohnike K, Wex H, Röhl FW, Zimmermann M, Blum W, Mittler U** 2005 IGFBP-2 at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia and the prediction of relapse risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (5):3022-7

94. **Kalus W, Zweckstetter M, Renner C, Sanchez Y, Georgescu J, Grol M, Demuth D, Schumacher R, Dony C, Lang K, Holak TA** 1998 Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions. *EMBO J* 17:6558-6572
95. **Imai Y, Morales A, Andag U, Clarke JB, Busby WH, Jr., Clemmons DR** 2000 Substitutions for hydrophobic amino acids in the N-terminal domains of IGFBP-3 and -5 markedly reduce IGF-I binding and alter their biologic actions. *J Biol Chem* 275:18188-18194
96. **Saiki RK, Scharf SP, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N** 1985 Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriktion site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 1350-1354
97. **Mullis KB, Faloona FA** 1987 Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 335-350
98. **Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR** 1989 Site-directed mutagenesis by overlap-extension using polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59
99. **Vorwerk P, Yamanaka Y, Spagnoli A, Oh Y, Rosenfeld RG** 1998 Insulin and IGF binding by IGFBP-3 fragments derived from proteolysis, baculovirus expression and normal human urine. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83:1392-1395
100. **Vorwerk P, Hohmann B, Oh Y, Rosenfeld RG, Shymko RM** 2002 Binding Properties of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-3 N- and C-Terminal Fragments, and Structurally Related Proteins mac25 and Connective Tissue Growth Factor Measured Using a Biosensor. *Endocrinology* 143:1677-1685
101. **Galanis M, Firth SM, Bond J, Nathanielsz A, Kortt AA, Hudson PJ, Baxter RC** 2001 Ligand-binding characteristics of recombinant amino- and carboxyl-terminal fragments of human insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Endocrinol* 169:123-133
102. **Spencer EM, Chan K** 1995 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* 6:209-214
103. **Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G, Wallace JC** 1998 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* 273:4647-4652
104. **Standker L, Wobst P, Mark S, Forssmann WG** 1998 Isolation and characterization of circulating 13-kDa C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-5. *FEBS Lett* 441:281-286
105. **Buckway CK, Wilson EM, Ahlsen M, Bang P, Oh Y, Rosenfeld RG** 2001 Mutation of three critical amino acids of the N-terminal domain of IGF-binding protein-3 essential for high affinity IGF binding. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86:4943-4950

106. **Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, Riggs JL, Gardner MB** 1977 Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J Natl Cancer Inst* 58:1795-1806
107. **Yang YF, Ingermann AR, Kim HS, Walker GE, Oh Y**, Identification of a putative IGFBP-3 receptor (IGFBP-3R): A new class of cell-death receptor. San Francisco, 2002, Abstract "The Endocrine Society's 84th annual meeting"
108. **Perks CM, Bowen S, Gill ZP, Newcomb PV, Holly JM** 1999 Differential IGF-independent effects of insulin-like growth factor binding proteins (1-6) on apoptosis of breast epithelial cells. *J Cell Biochem* 75:652-664
109. **Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, III, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND** 1976 Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36:4562-4569
110. **Baserga R** 1997 The path less traveled by. *Endocrinology* 138:2217-2218
111. **Vorwerk P**. Das IGF-System bei akuter lymphatischer Leukämie im Kindesalter - klinische und physiologische Bedeutung unter besonderer Berücksichtigung von IGFBP-2 2005 Habilitationsschrift
112. **Oh Y, Rosenfeld RG** 1999 IGF-independent actions of the IGF binding proteins. In: Rosenfeld RG, Roberts CT, Jr. (eds). *The IGF-System, Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*. Humana Press, Totowa, NJ, USA:257-272
113. **Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, Mahlamaki E, Schraml P, Moch H, Willi N, Elkahoul AG, Pretlow TG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP** 1999 Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst* 91:1758-1764
114. **Russo VC, Rekaris G, Baker NL, Bach LA, Werther GA** 1999 Basic fibroblast growth factor induces proteolysis of secreted and cell membrane-associated insulin-like growth factor binding protein-2 in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 140:3082-3090
115. **Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN, Zhang W** 2003 Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* 63:4315-4321
116. **Michell NP, Langman MJ, Eggo MC** 1997 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* 76:60-66
117. **Menouny M, Binoux M, Babajko S** 1998 IGFBP-2 expression in a human cell line is associated with increased IGFBP-3 proteolysis, decreased IGFBP-1 expression and increased tumorigenicity. *Int J Cancer* 77:874-879

118. **Menouny M, Binoux M, Babajko S** 1997 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* 138:683-690
119. **Giovannucci E** 1999 Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Hormone Research* 51 Suppl 3:34-41
120. **Chen X, Ferry JR** 2006 Novel actions of IGFBP-3 on intracellular signaling pathways of insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 16:41-48
121. **Russo VC, Schu, Schuett BS, Andaloro E, Ymer SI, Hoeflich A, Ranke M.B., Bach LA, Werther GA** 2006 Insulin-like growth factor binding protein-2 Binding to Extracellular Matrix plays a critical role in Neuroblastoma Cell Proliferation, Migration and Invasion. *Endocrinology* 146:4445-4455
122. **Hoeflich A, Reisinger R, Vargas GA, Elmlinger MW, Schuett B, Jehle PM, Renner-Muller I, Lahm H, Russo VC, Wolf E** 2002 Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 in vivo. *FEBS Lett* 523:63-67
123. **Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W** 2006 An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2(IGFBP-2) and Integrin alpha5 is essential for IGFBP-2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 281:14085-14091
124. **Schuett BS, Langkamp M, Ranke MB, Elmlinger MW** 2000 Intracellular signalling of insulin-like growth factor binding protein-2. *Growth Horm IGF Res* 10: 29-33
125. **Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, Rossjohn J, Price JT** 2004 Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res* 64:977-984
126. **Slootweg MC, Ohlsson C, Salles JP, de Vries CP, Netelenbos JC** 1995 Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 136:4210-4217
127. **Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H, Blum WF, Kolb HJ, Engelhardt D, Wolf E, Weber MM** 2000 Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 60:834-838
128. **el Atiq F, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Sastre B, Pommier G** 1994 Alterations in serum levels of insulin-like growth factors and insulin-like growth-factor-binding proteins in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 57:491-497
129. **Lee DY, Kim SJ, Lee YC** 1999 Serum insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J Korean Med Sci* 14:401-404
130. **Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG** 1993 Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of

- prostate cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76:1031-1035
131. **Zumkeller W, Schwander J, Mitchell CD, Morrell DJ, Schofield PN, Preece MA** 1993 Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in the plasma of children with Wilms' tumour. *Eur J Cancer* 29A:1973-1977
  132. **Nordqvist AC, Peyrard M, Pettersson H, Mathiesen T, Collins VP, Dumanski JP, Schalling M** 1997 A high ratio of insulin-like growth factor II/insulin-like growth factor binding protein 2 messenger RNA as a marker for anaplasia in meningiomas. *Cancer Res* 57:2611-2614
  133. **Wang H, Shen SS, Wang H, Diwan AH, Zhang W, Fuller GN, Prieto VG** 2003 Expression of insulin-like growth factor-binding protein 2 in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* 30:599-605
  134. **Vorwerk P, Wex H, Hohmann B, Mohnike K, Schmidt U, Mittler U** 2002 Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Pathol* 55:40-45
  135. **Reeve JG, Kirby LB, Brinkman A, Hughes SA, Schwander J, Bleehen NM** 1992 Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines. *Int J Cancer* 51:818-821
  136. **Sprenger CC, Vail ME, Evans K, Simurdak J, Plymate SR** 2002 Over-expression of insulin-like growth factor binding protein-related protein-1(IGFBP-rP1/mac25) in the M12 prostate cancer cell line alters tumor growth by a delay in G1 and cyclin A associated apoptosis. *Oncogene* 21:140-147
  137. **Dawczynski K, Kauf E, Schlenvoigt D, Gruhn B, Zintl F** 2006 Elevated serum IGFBP-2 levels are associated with a high relapse risk after hematopoietic stem cell transplantation in childhood AML. *Bone Marrow Transplant* 37:589-594
  138. **Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B, Karasik A** 1993 Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77:229-233
  139. **Ho PJ, Baxter RC** 1997 Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:333-342
  140. **Renahan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM, O'Dwyer ST** 2000 Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 83:1344-1350
  141. **Herold Geal** 2004 *Innere Medizin*.:429-430
  142. **Werner H, Le Roith D** 1997 The insulin-like growth factor-I receptor signaling pathways are important for tumorigenesis and inhibition of apoptosis. *Crit Rev Oncog* 8:71-92

## 7. Anhang

### IGFBP-2-Aminosäuresequenz (Wildtyp)

01  
EVLFRCPCT            PERLAACGPP  
PVAPPAAVAA         VAGGARMPCA  
41  
ELVREPGCGC         CSVCARLEGE  
ACGVYTPRCG         QGLRCYPPHG  
81  
SELPLQALVM         GEGTCEKRRD  
AEYGASPEQV         ADNGDDHSEG  
121  
GLVENHVDST         MNMLGGGGSA  
GRKPLKSGMK         ELAVFREKVT  
161  
EQHRQMGKGG         KHHLGLEEPK  
KLRPPPARTP         CQQELDQVLE  
201  
RISTMRLPDE         RGPLEHLYSL  
HIPNCDKHGL         YNLKQCKMSL  
241  
NGQRGECWCV         NPNTGKLIQG  
APTIRGDPEC         HLFYNEQQEA  
281  
CGVHTQRMQ

Rot: auszutauschende Aminosäuren an Stelle 64, 88 und 89 der Aminosäuresequenz

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des kinderonkologischen Forschungslabors der Universitätskinderklinik Magdeburg für die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer meiner Arbeit Herrn PD Dr. med. Peter Vorwerk für die Überlassung des Themas, die vielen Ideen während der Entstehung und Umsetzung sowie der Anregung zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Heike Wex bedanken, die mir detailliert bei der praktischen Umsetzung geholfen und geduldig alle Methoden erklärt hat.

Dank gilt auch den beiden MTA Nadine Klappoth und Beatrix Kramer für die vielen großen und kleinen Hilfen bei der Laborarbeit.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. rer. nat. Martin Bernheiden für die Hilfe beim Umgang mit dem *Reference Manager*.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und mir in vielerlei Hinsicht den Rücken gestärkt hat während der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Konstruktion einer nicht-IGF-bindenden Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2-Variante und Untersuchung ihrer Wirkung auf das Tumorzellwachstum

im kideronkologischen Forschungslabor der Universitätskinderklinik, Arbeitsbereich Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

mit Unterstützung durch

Herrn PD Dr. med. P. Vorwerk und Fr. Dr. rer. nat. H. Wex ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 03.03.2008

## Lebenslauf

Name: Meichsner  
Vorname: Anke  
Geburtsdatum: 27.05.1981  
Geburtsort: Leipzig  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09 / 1987 - 08 / 1992 Polytechnische Oberschule „Clara Zetkin“ Leipzig  
09 / 1992 - 07 / 1996 „Thomasschule zu Leipzig - Gymnasium“  
08 / 1996 - 07 / 1999 „Theodor-Mommsen-Gymnasium“ Leipzig  
07 / 1999 Abitur  
  
09 / 1999 - 08 / 2000 „Freiwilliges Soziales Jahr“, St.-Elisabeth-Krankenhaus Leipzig

### Studium

10 / 2000 - 11 / 2006 Studium der Humanmedizin Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg  
  
Abschluss 11 / 2006 Gesamtnote: 1,16

### Facharztausbildung

seit 01 / 2007 Assistenzärztin Universitätskinderklinik Magdeburg

### Preise / Stipendien

Fakultätspreis 2007  
Reisestipendium der Dr.-Carl-Duisberg-Stiftung für Famulatur in Litauen  
Reisestipendium der Kommission zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der  
Universität Magdeburg für European Students' Conference Berlin

### Veröffentlichungen / wissenschaftliche Vorträge

Meichsner A., Vorwerk P., Hohmann B., Redlich A., Wex H.  
Konstruktion einer nicht IGF-bindenden IGFBP-2-Variante und Charakterisierung im  
Hinblick auf proliferationsverändernde Eigenschaften bei Tumorzellen,  
Arbeitstagung für pädiatrische Forschung 2005 Göttingen (Vortrag)

Vorwerk P., Meichsner A., Wex, H., Hohmann B., Mittler, U.  
Growth promoting effect of IGFBP-2 in tumor cell lines is independent of IGF-Binding,  
New Orleans, 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society 2004 (Poster)

Meichsner A., Vorwerk P., Wex H.  
Growth promoting effect of IGFBP-2 in tumor cell lines is independent of IGF-Binding  
15<sup>th</sup> European Students' Conference Charité Berlin 2004 (Vortrag)

Meichsner A., Pöttsch S., Mohnike K.  
Zystinose - neue Therapieoptionen und Fallvorstellung  
Kinderärztliche Weiterbildung, Unikinderklinik Madgeburg 2006 (Vortrag)