

**Aus der Universitäts Klinik für
Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer**

**Nachweis der sechs IGF-Bindungsproteine
(IGFBP 1-6)
in verschiedenen Organen der Maus
mit Hilfe einer neu etablierten RT-PCR**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Joachim Peitz
aus
Schleswig**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Dannecker

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Pawelec

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
2. Material	6
3. Methoden	9
4. Ergebnisse	
4.1. Etablierung der PCR	20
4.2. Messung der IGFBP mRNA	36
5. Diskussion	59
6. Zusammenfassung	81
7. Literaturverzeichnis	83
8. Lebenslauf	91

1. Einleitung

Die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF I+II = insulin like growth factor I+II), die IGF-Rezeptoren (IGF I+II- Rez.), die IGF- Bindungs- Proteine (IGFBPs), die IGFBP-Proteasen (IGFBP-Pr) sowie die IGFBP verwandten (related) Proteine (IGFBP-rP) sind an der Regulierung von somatischem Wachstum und der Proliferation von Zellen in vivo und in vitro beteiligt.

Die wachstumsbezogenen Effekte des Wachstumshormons (growth hormone = GH) werden hauptsächlich über die Produktion von IGF-I in der Leber vermittelt. IGF-I und IGF-II sind einkettige Polypeptide mit einer Länge von 70 bzw. 67 Aminosäuren. Ihren Namen verdanken sie ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Proinsulin (1,2). Im Gegensatz zu Insulin werden sie von fast allen Geweben produziert (3,4,5). Dadurch haben sie das Potential endo- sowie auto- und/oder parakrin zu wirken. Sie sind potente, mitogene Substanzen und ihre Wirkung wird durch die Verfügbarkeit von freiem IGF, das an die IGF-Rezeptoren binden kann, reguliert. Die Spiegel von freiem IGF innerhalb eines Systems werden durch die Menge an produziertem IGF, dem Abbau sowie dem Bindungsgrad an IGFBPs beeinflusst. Einer der Hauptregulatoren von IGF-I ist das GH. IGF-II ist im Gegensatz dazu weitgehend von GH unabhängig (6).

Der IGF-I-Rezeptor vermittelt den Großteil der Wirkungen von IGF-I und IGF-II und ist in einer Vielzahl von Geweben und Zelllinien vorhanden. Er ist dem Insulin-Rezeptor sehr ähnlich und ist wie dieser ein $\alpha_2\beta_2$ -transmembranöses Glykoprotein. Seine Affinität zu IGF-I ist ungefähr doppelt bis zehnmal so groß wie die zu IGF-II und um den Faktor 100 - 500 mal größer als die zu Insulin.

Der IGF-II-Rezeptor ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Rezeptor. Dieser besteht aus einer einzigen Polypeptid-Kette mit einer großen extrazellulären Domäne, mit mehreren Bindungsstellen für IGF-II und M6P, einer sehr kurzen zytoplasmatischen Region, sowie einer einzigen transmembranösen Domäne. Der Großteil der IGF-II-vermittelten Effekte geschieht aber über den IGF-I- oder den Insulin-Rezeptor. Die Funktion des IGF-II-Rezeptors bei der Vermittlung von IGF-II-bedingten Wachstumsaktivitäten ist schwer zu interpretieren (7).

Die IGFBPs sind eine Familie von Proteinen, die die IGFs mit hoher Affinität und Spezifität binden. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie haben strukturelle Ähnlichkeiten untereinander sowie mit den IGFBPs anderer Spezies, die auf ein hohes ontogenetisches Alter hinweisen. Strukturell haben alle sechs IGFBPs eine N-terminale cysteinreiche Region (16 - 18 Cysteine), die auf Disulfidbrücken in der tertiären Struktur schließen lassen. Untereinander haben die sechs IGFBPs eine Homologie von mindestens 50% und die einzelnen IGFBPs der verschiedenen Spezies eine Übereinstimmung von mindestens 80 % (8,9).

Funktionell regulieren die IGFBPs nicht nur die Bioverfügbarkeit der IGFs, sondern besitzen zum Teil auch eigene Rezeptoren über die sie IGF-unabhängige Wirkungen vermitteln. Ihrerseits werden die IGFBPs über eine Vielzahl von Proteasen (s.u.) deaktiviert und damit reguliert.

IGFBPs werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe produziert, von denen jedes eine eigene spezifische Konzentration der verschiedenen IGFBPs aufweist.

In der Folge werden die einzelnen Bestandteile des IGFBP-Systems kurz vorgestellt.

IGFBP-1

IGFBP-1 wird von verschiedenen Geweben produziert. Die Hauptproduktionsorte sind Leber, Niere und Dezidua (10). Außer vom Ernährungszustand, verschiedenen Hormonen und Zytokinen wird der IGFBP-1-Spiegel auch von tageszeitlichen Schwankungen beeinflusst (11). Die Wirkung des IGFBP-1 wird durch Phosphorylierung verändert. Durch ein langsames, gleichmäßiges Freisetzen sowie eine Verstärkung des IGF am Rezeptor unterstützt IGFBP-1 die IGF-Wirkung (12,13). Zusätzlich transportiert IGFBP-1 das IGF-I durch Membranen und Zellwände.

IGFBP-2

Der IGFBP-2-Spiegel ist von der Tageszeit, vom Alter des Individuums, vom Ernährungszustand und Metabolismus des Körpers sowie von verschiedenen Hormonen

abhängig (11,14,15). Es wird im Körper ubiquitär gebildet und in allen Körperflüssigkeiten gefunden. Zusätzlich scheint es von verschiedenen Tumoren gebildet zu werden (16,17).

Die Funktion des IGFBP-2 ist nach wie vor relativ unerforscht und wird im Falle eines Verlustes von IGFBP-2 im Körper sehr gut kompensiert, wie Versuche an Knockout Mäusen gezeigt haben (18). Eine mögliche Funktion ist der Transport von IGF durch Zellmembranen. Zudem sind IGF-unabhängige Effekte wie Wachstumssteigerung in Tumoren beschrieben worden (19).

IGFBP-3

IGFBP-3 spielt als wichtigstes Transportprotein für IGF-I eine wichtige Rolle als dessen Regulator und Reservoir. IGFBP-3 verhindert eine „Down“-Regulierung des IGF-Rezeptors (20). Hauptbildungsort und -reservoir für IGFBP-3 als das im Körper meisten vorhandene IGFBP ist die Leber (21-23). Die Wirkung von IGFBP-3 zusammen mit den IGF ist gewebespezifisch potenzierend, zum Beispiel bei der Wundheilung und beim Wachstum (24,25), oder inhibierend. IGFBP-3 allein hat IGF-unabhängige meist inhibitorische Effekte. Es hemmt Zellwachstum, vermittelt Apoptose (25) und bindet über Oberflächenproteine an Tumorzellen (26-28).

IGFBP-4

Man weiß, dass die Spiegel des IGFBP-4 alters-, Vitamin D- und hormonabhängig sind. Obwohl das IGFBP-4 bisher wenig erforscht ist, ist bekannt, dass es durch verschiedene Zelltypen (29) gebildet wird und in allen Körperflüssigkeiten enthalten ist (30). Als einziges rein inhibitorisches BP ist IGFBP-4 in vivo faktisch ein IGF-Antagonist (31). IGFBP-4 bindet IGF-unabhängig an Zellmembranen (32), verlangsamt Tumorstadium und erhöht die Apoptoserate in Tumorzelllinien (33,34). Zusätzlich verringert es gewebespezifisch die Produktion von Hormonen und die Zelldifferenzierung (35,36).

IGFBP-5

Wie das IGFBP-3 kann IGFBP-5 die Wirkung von IGF sowohl unterstützen als auch hemmen (36-38). Seine Spiegel sind altersabhängig (39,40), mit einem Maximum in der Pubertät und werden durch verschiedene Hormone und Faktoren reguliert (40). IGFBP-5 ist das Haupt-IGFBP der Niere (11). IGFBP-5 bindet IGF-unabhängig an verschiedene Zellen und kann direkt Zellwachstum vermitteln, wobei auch wachstumshemmende Effekte beschrieben wurden. Desweiteren wurde gezeigt, dass IGFBP-5 in den Zellkern transportiert wird und mit viralen Onko-Proteinen interagiert (41-45).

IGFBP-6

Da IGFBP-6 IGF-II mit einer vielfach höheren Affinität als IGF-I bindet (46-48), scheint seine Hauptfunktion die Regulation des IGF-II zu sein (49,50).

Verschiedene Mediatoren (Vitamin A, IGF-II) regulieren die IGFBP-6-Spiegel (11,51,52), die zudem altersabhängig sind (39,53,54). IGFBP-6 wird in verschiedenen Geweben und auch von einigen Carzinomen gebildet (45,51). Hauptsächlich kommt IGFBP-6 in Liquor und Serum vor (11).

IGFBP-Proteasen

Mehrere Proteasen sind entdeckt worden, die in der Lage sind, IGFBPs zu zerschneiden. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der IGFBP-Spiegel und somit indirekt auch bei der Änderung der Spiegel des freien IGF (55).

Sie entstammen mindestens drei verschiedenen Familien. Bisher wurden Kallikreine, Cathepsine sowie Matrix-Metalloproteinasen beschrieben, die IGFBPs spalten und damit inaktivieren oder zumindest ihre Wirkung verändern (56).

IGFBP-related Proteins

Die IGFBP-rP sind eine wachsende, heterogene Gruppe von Proteinen innerhalb der IGFBP-Superfamilie, die mit den IGFBPs die cysteinreiche N-terminale-Region gemeinsam haben. Deren Affinität zu den IGFs ist aber um ein Vielfaches geringer als die der IGFBPs (57). Es wird vermutet, dass die IGFBPs und die IGFBP-rP ontogenetisch miteinander verwandt sind (58,59).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die vielfältigen Funktionen des IGF-Systems sind in das noch viel komplexere endokrinologische System eingebunden. Das endokrinologische System und das Immunsystem haben viele Ähnlichkeiten bezüglich ihres Funktionsmechanismus: Beide Systeme sind in einzelnen Organen über den ganzen Körper verteilt und in beiden Systemen erfolgt die Kommunikation teilweise durch spezifische Botenstoffe. Diese werden je nach System Hormone oder Zytokine genannt. Zusätzlich bestehen zwischen den beiden Systemen viele Schnittstellen, und es gibt zahlreiche Hinweise in der Literatur über die gegenseitige Abhängigkeit und Beeinflussung (60-62). Eine dieser Schnittstellen zwischen endokrinologischem und immunologischem System ist im IGF-System zu sehen, da die IGFs und IGFBPs direkt an der Proliferation von Zellen beteiligt sind. So wurden zum Beispiel hohe Werte von IGFBP-2 in humanen T-Zellen, nachgewiesen, die unter Stimulation noch weiter anstiegen. Dies könnte auf eine wichtige Rolle von IGFBP-2 bei der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen hinweisen (63).

Um den Einfluß des IGF-Systems auf lymphatische Gewebe, insbesondere der T-Zellen in vivo oder ex vivo zu messen, musste als Voraussetzung hierfür die Expression der IGFBPs in den verschiedenen Geweben und Altersgruppen untersucht werden, da altersabhängige Schwankungen bekannt sind. Dabei erschien uns der Nachweis der IGFBP-mRNA mit Hilfe einer RT-PCR am geeignetsten. Da die Untersuchungen der einzelnen Organe im Menschen nicht durchführbar gewesen wären, untersuchten wir die altersabhängige organspezifische Expression der IGFBPs im Mausmodell.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung	Roth
Ammoniumperoxidsulfat	Roth
Ampuwa	Fresenius
DNA Marker V+VI	Boehringer Mannheim
Ethidiumbromid	Roth
Optiprep Kit	Biometra
dNTPs	Serva
Random Primer	Gibco
Reverse Transcriptase M-MLV	Gibco
Restriktions-Enzyme und zugehörige Puffer	Boehringer Mannheim
Taq Polymerase und zugehöriger Puffer	Promega
Temed	Roth
Mouse β -actin Control amplimer Set	Clontech
MgCl ₂ (1,5 mM)	Promega
PCR-Primer	Roth, Clontech
PCR-Reaktionspuffer	Promega

2.2 Puffer und Lösungen

2.3.1 5x TBE:

27g TRIS
 13,75 g Borsäure
 10 ml EDTA 0,5M
 in 500 ml Ampuwa ph = 8,0

2.3.2 APS:

10 g Ammoniumperoxiddisulfat in 10 ml Ampuwa (10 %)

2.3.3 DEPC Wasser:

500 µl DEPC (97 %) in 500 ml Ampuwa einen Tag auf dem Magnetrührer vermischen und anschließend autoklavieren

2.3.4 Ethidiumbromidlösung:

40 µl Stammlösung (Ethidiumbromid 1 % in Aqua bidest.) gelöst in 500 ml Aqua dest.

2.3 Instrumente

Zur Präparation der Mäuse werden folgende Instrumente benötigt:

Klemme:	1 groß, schwer
Pinzetten, steril:	2 chirurgische 1 anatomisch 1 spitz
Scheren, steril:	3 spitze, klein, gerade 1 spitz, groß, stabil 1 spitz, klein, gebogen
„Präparationstisch“:	Styroporplatte (30 x 30 cm) mit Alufolie überspannt

8-10 sterile Kanülen (grau oder gelb) zur Fixation der Maus auf der Unterlage

2.4 Geräte

Photometer (DNA/RNA)	Pharmacia Biotech
Schüttler	Eppendorf
Tischzentrifuge (kühlbar)	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckmann
Thermocycler Trio Thermoblock	Biometra
Elektrophorese Kammer	Hoefer
UV-Videosystem und WINCAM Software	Cybertech

3. Methoden

3.1 Mäuse

3.1.1 Aufzucht und Hege

Es wurden C57BL6-Mäuse der Firma Charles River Deutschland verwendet, von denen ursprünglich 6 Weibchen und 2 Männchen bestellt wurden. Von diesen ca. 12 Wochen alten Mäusen dienten zwei Weibchen als Versuchstiere, die anderen wurden zur Aufzucht der folgenden Generationen benutzt. Aus dieser ursprünglichen Population wurden neugeborene Mäuse und Tiere im Alter von 4, 8 und 12 Wochen gezogen, die zur Gewinnung der Gewebepreparate dienten.

Die Tiere waren normalerweise geschlechtlich getrennt in Käfigen untergebracht. Zu Fortpflanzungszwecken wurde ein Männchen solange mit zwei Weibchen in einem Käfig gehalten, bis diese trächtig waren. Danach wurde das Männchen wieder aus dem Käfig entfernt. Nach der Tragezeit von 20 Tagen kamen die Jungen zur Welt. Diese wurden entweder im Fall der „0-Wochen“-Tiere gleich der RNA-Gewinnung zugeführt oder noch ca. zwei Wochen bei den Muttertieren gelassen, bevor sie, nach Geschlecht getrennt, in Käfigen bis zum Erreichen des nötigen Alters gehalten wurden.

3.1.2 Tötung der Versuchstiere zur Materialgewinnung

Die Mäuse wurden durch spinale Dislokation getötet, mit Desinfektionslösung besprüht und auf einer Präparationsunterlage mit Hilfe von Kanülen fixiert. Die neugeborenen Mäuse wurden in einem Glasgefäß mit Hilfe von einem mit Äther getränkten Schwamm getötet.

Anschließend wurde das Fell durch einen ventralen Medianschnitt mit einer sterilen Schere geöffnet und vorsichtig abgelöst. Danach wurde mit einer zweiten sterilen, spitzen Schere das Peritoneum in einem T-Schnitt eröffnet.

Die Leber wurde im rechten Oberbauch aufgesucht und vorsichtig mit Pinzette und Schere unter besonderer Berücksichtigung der Gallenblase entfernt. Als nächstes wurde

die Milz im linken Oberbauch aufgesucht und ebenfalls vorsichtig entfernt.

Anschließend wurden vorsichtig die beiden Nieren aus ihrem Bett frei präpariert und entnommen. Als letzter Schritt im Bauchraum wurden die mesenterialen Lymphknoten aufgesucht und, falls auffindbar, entnommen.

Zur Entnahme der Brustorgane wurde der Thorax entlang des Sternums an der Rippen-Sternumgrenze mit Hilfe einer sterilen Schere eröffnet und aufgespreizt. Der Thymus wurde als oberflächlichstes Organ als erstes entnommen. Die beiden Lungenflügel wurden vorsichtig am Hilus abgetrennt und aus dem Brustkorb entfernt.

Zur Gewinnung des Knochenmarkes war es notwendig, die langen Röhrenknochen der Vorder- und Hinterläufe freizulegen und zu entnehmen. Dabei wurden die beiden Enden mit einer spitzen, scharfen und sterilen Schere entfernt und das Knochenmark mit Hilfe einer Insulinspritze und etwas PBS ausgespült.

Als letztes wurde das Gehirn freigelegt. Hierzu wurde der knöcherne Schädel freipräpariert. Der Schädel wurde mit Hilfe einer stabilen, sterilen Schere in einem zirkulären Schnitt eröffnet und die Kalotte abgehoben. Das Gehirn wurde vorsichtig unter Zuhilfenahme einer gebogenen, spitzen Schere vom Rückenmark abgetrennt und aus dem Schädel gehoben.

Alle Organe wurden sofort nach der Entnahme gewogen und in eine bereitgestellte sterile Petrischale (\varnothing 5 cm) mit gekühltem PBS gelegt und der mRNA-Isolierung zugeführt.

3.2 mRNA-Isolierung

Bei der Isolierung von RNA ist auf das ubiquitäre Vorkommen von RNAsen zu achten. Diese Enzyme sind nur schwer zu denaturieren. Aus diesem Grund wurde die ganze Zeit mit Handschuhen gearbeitet. Zusätzlich wurden soweit wie möglich sämtliche verwendeten Materialien durch Autoklavieren sterilisiert und in gesonderten Schränken aufbewahrt. Alle Schritte bis auf die Zentrifugation wurden in einem nur für diese Versuche verwendeten Abzug durchgeführt.

Für die Isolierung von RNA aus den Geweben wurde ein modifizierter Kit der Firma Biometra (Biometra Optiprep 1) verwendet. Dafür wurden die Organe zuerst direkt nach der Organentnahme mit einer sterilen, spitzen Schere zerteilt und anschließend im Homogenisator zerkleinert. Alle Schritte wurden auf Eis oder unter Kühlung durchgeführt.

10^7 Zellen wurden mit 1500 μl Denaturierungslösung mittels einer 5 ml Spritze und einer 0,9 Kanüle lysiert und suspendiert. Durch die Scherkräfte in der Kanüle wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde eine Minute lang bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellsuspension in ein 4 ml Ultrazentrifugen-Röhrchen eingebracht. Nach Zusatz von 150 μl Natriumacetat-Lösung und Mischen wurden 1500 μl gesättigte Phenollösung sowie 400 μl Chloroform hinzugefügt und durch Schwenken vermischt. Danach wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Durch Zentrifugieren in der auf 4 °C abgekühlten Ultrazentrifuge (20 min, 14.000 U/min) löste sich die mRNA in der oberen wäßrigen Phase. Von dieser Phase wurden 1300 μl mit 1300 μl kaltem Isopropanol in einem neuen 4 ml Röhrchen gemischt und anschließend für mindestens eine Stunde, besser über Nacht, bei -20 °C stehen gelassen. In dieser Zeit fiel die RNA aus.

Während des erneuten Abzentrifugierens (14.000 U/min, 4 °C, 25 min) konzentrierte sich die RNA im Pellet. Der Überstand wurde sehr vorsichtig mit Hilfe einer Kanüle abgesaugt und das Pellet mit 300 μl Denaturierungslösung resuspendiert und in vorbereitete 1,5 ml Röhrchen mit 300 μl Isopropanol überpipettiert. Erneut wurde der Ansatz bei -20 °C mindestens 1,5 h stehen gelassen.

Nach der Ruhezeit wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge (14.000 U/min, 4 °C, 20 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 500 μl 75 %igem Ethanol gemischt. Es folgten erneutes Zentrifugieren (14.000 U/min, 4 °C, 20 min) und Absaugen des Überstandes. Das entstandene Pellet wurde 7 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurden 30 μl DEPC-Wasser zugegeben, der Ansatz bei 65 °C 10 Minuten lang geschüttelt und die so entstandene RNA-Lösung sofort wieder auf Eis gepackt.

3.3 Messung des RNA-Gehaltes

Von den erhaltenen 30µl RNA-Lösung wurden 3 µl entnommen und mit 997 µl Aqua bidest. verdünnt. Diese 1000 µl wurden in einer Quarzküvette im Photometer bei 260 nm und 280 nm gegen Aqua bidest. gemessen. Die Extinktion bei 260 nm war ein Maß für den RNA-Gehalt, während die Extinktion bei 280 nm ein Maß für die Verunreinigung durch Proteine war. Der Quotient $Ext_{.260}/Ext_{.280}$ war somit ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich aus der Extinktion bei 260 nm wie folgt:

$$Ext_{.260} \times \text{Verdünnungsfaktor} (3 \mu\text{l Probe} / 1000 \mu\text{l Meßansatz} = 333,3) \times 0,04 \\ = \text{Menge RNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Diese Menge multipliziert mit 27 (27 µl Rest) ergab den Gesamt-RNA-Gehalt der verbliebenen Probe. Um später in der RT weiterverarbeitet werden zu können, musste die RNA auf eine einheitliche Konzentration gebracht werden. Dafür boten sich 1 µg/µl an. Dies erreichte man, indem man von der Gesamtmenge der RNA die Zahl 27 für das bereits vorhandene Volumen subtrahierte. Das Ergebnis muss in µl Aqua bidest. zur Probe zugegeben werden. Wenn zum Beispiel in der verbliebenen Probe (27 µl) 40 µg RNA enthalten waren, mussten noch 13 µl H_2O_{bidest} hinzu gegeben werden. In Einzelfällen bot es sich auf Grund der geringen RNA-Menge an, die Probe auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl zu bringen. Hierbei wurde die Gesamtmenge der RNA mit 2 multipliziert und anschließend die 27 subtrahiert und wie oben beschrieben weiterverfahren. Beispielsweise waren in einer Probe nur insgesamt 15 µg RNA enthalten. $15 \times 2 = 30 - 27$ (bereits vorhandenes Volumen) = 3 µl Restvolumen. Nach dem Verdünnen wurden die Proben bei -80°C weggefroren.

3.4 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Bei der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird aus RNA mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ (RT), aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus, eine DNA-Kopie (cDNA) angefertigt. Als Startmoleküle für die Reverse-Transkriptase werden unspezifische Hexanucleotide, sog. Random primer, eingesetzt. Als Produkt erhält man ein cDNA/RNA-Gemisch.

Die Anzahl der Ansätze ergab sich aus der Anzahl der Proben plus zwei Kontrollansätzen. Ein Kontrollansatz war RNA-frei, der andere RT-frei. Sämtliche Schritte wurden auf Eis ausgeführt. Das hier angegebene „Rezept“ galt für RNA-Proben mit einer Konzentration von 1 µg/µl. Bei einer Konzentration von 0,5µg/µl musste dementsprechend die doppelte Menge der Probe eingebracht und die Menge des H₂O um 1 µl reduziert werden.

Sämtliche Reagenzien wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Für den Mastermix wurden die folgenden Reagenzien (Menge jeweils pro Ansatz) in der auf der nächsten Seite beschriebenen Reihenfolge in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zusammengegeben:

Buffer	4 µl/Ansatz
DTT	2 µl/Ansatz
H ₂ O	9,7 µl/Ansatz
(bei einer Probenkonzentration von 0,5 µg RNA/µl nur 8,7 µl)	
RNase-Inhibitor	0,6 µl/Ansatz
dNTP	0,4 µl/Ansatz
Random Primer	0,3 µl/Ansatz

An dieser Stelle musste die Menge von 17 µl für den RT-freien Kontrollansatz entnommen werden (bei 0,5µg/µl RNA ergaben sich 16 µl). Bei der Zugabe der RT musste beachtet werden, dass sich die Anzahl der Ansätze um eins reduziert hat.

RT	2 µl/Ansatz
----	-------------

Alles wurde noch einmal gut gemischt und zu je 19 μl auf die vorbereiteten und beschrifteten 500 μl Eppendorf-Röhrchen verteilt. Zum zweiten Kontrollansatz (RNA-frei) wurde nun statt der RNA-Probe 1 μl H_2O hinzugegeben und zum RT-freien Kontrollansatz 2 μl H_2O anstatt der RT.

Jetzt wurden die RNA-Proben zu den Ansätzen zupipettiert (1 μg). Zur RT-freien Kontrolle wurde eine gesichert positive RNA-Probe hinzugegeben. Die Proben wurden noch einmal gut gemischt, abzentrifugiert und anschließend bei 37 °C 1 h unter Rütteln inkubiert. Danach wurde sofort das Enzym durch 7 Minuten kochen bei 95 °C inaktiviert. Die Proben konnten nun bei -20 °C eingefroren werden.

3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction ~ PCR) wird ein bestimmter Nukleinsäure-Bereich vorgewählter Länge und Sequenz mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase unter definierten Bedingungen selektiv angereichert. Die DNA-Polymerase benötigt dazu einen DNA-Einzelstrang und ein kurzen doppelsträngigen Bereich als Startsequenz. Für die PCR haben wir die hitzestabile DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) verwendet. Die Taq-DNA-Polymerase kann nur unter optimalen Voraussetzungen arbeiten. Diese beinhalten bestimmte pH-Voraussetzungen sowie Elektrolyt-Konzentrationen. Insbesondere die Konzentration des Mg^{2+} spielt eine wichtige Rolle. Das pH-Optimum wird durch einen bereits mit der Taq-DNA-Polymerase mitgelieferten Puffer gewährleistet. Die Mg^{2+} -Konzentration muss in Gegensatz dazu durch Versuchsreihen ermittelt werden. Die genannten Mengen waren somit nur als Ausgangszusammensetzung zu verstehen und wurden gewählt, da sie sich in unserer Forschungsgruppe in anderen Versuchen als gut geeignet erwiesen hatten.

Sämtliche Reagenzien wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gut gemischt und kurz anzentrifugiert. Sämtliche Schritte wurden mit Handschuhen, extra Pipetten und Pipettenspitzen sowie auf Eis durchgeführt. Zur Vereinfachung wurde auch hier pro Primerpaar ein Mastermix wie folgend gemischt:

Puffer	5 µl/Ansatz
Magnesium	3 µl/Ansatz
H ₂ O	37,4 µl/Ansatz
dNTP	0,4 µl/Ansatz
Primer-Sense	0,8 µl/Ansatz
Primer-Antisense	0,8 µl/Ansatz

[An dieser Stelle konnten Proben mit anderen Primern vorbereitet werden.]

Taq-Polymerase	0,6 µl/Ansatz
----------------	---------------

Nach jeder Zugabe einer neuen Substanz wurde gut gemischt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz auf vorbereitete und beschriftete 0,5 ml Eppendorf-Tubes verteilt. In unserem Fall ergaben sich durch die Konzentrationen der verschiedenen Ausgangssubstanzen eine Menge von 48 µl/Ansatz. Nun wurden die cDNA-Produkte zu je 2 µl in die Ansätze pipettiert. Für diesen Schritt wurden die Handschuhe und das Eis gewechselt.

Für die eigentliche Reaktion wurde ein Thermozykler der Firma Biometra verwendet. Zu Beginn wurden die Nukleinsäuren zur Vermeidung von unspezifischer Bindung der Primer bei 95°C 6 min lang denaturiert. Anschließend schloss sich das zyklische Temperaturprogramm an. Dieses sah in unserem Fall wie folgt aus:

Denaturierung	95 °C 1 min.
Hybridisierung (Annealing)	60 °C 45 sec.
Polymerase-Reaktion	72 °C 2 min.

Dieses Programm wurde in der Regel 30 mal durchlaufen bevor sich eine abschließende Polymerasereaktion von 6 Minuten bei 75 °C anschloß. Danach wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und entweder bei -20 °C weggefroren oder gleich in der Gelelektrophorese ausgewertet.

Um einen relativen Eindruck über die Stärke der Expression einer bestimmten cDNA innerhalb eines bestimmten Gewebes zu bekommen, wurde diese mit einem sogenannten internen Standard verglichen. Dies ist ein Protein, von dem angenommen wird, dass es in sämtlichen Geweben ähnlich stark exprimiert wird. In unserem Fall wählten wir β -actin.

Die Primer wurden allesamt bis auf die β -actin-Primer mit Hilfe des Computersuchprogramms „Primer Detective“ (Clontech, 1990) herausgesucht und anschließend handverlesen, d.h. auf möglichst wenige sonst bindende Basenpaare untersucht.

3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurden die Amplifikate auf 8 %-igem Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Gel wandern die Proben ihrer Größe entsprechend entlang der angelegten Spannung. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Hilfe von Ethidiumbromid gefärbt und die Banden densitometrisch ausgewertet.

3.6.1 Gießen der Polyacrylamid-Gele

Die Polyacrylamid-Gele wurden ohne Sammelgel in einer Elektrophoresekammer 20 x 20 cm der Firma Hoefer gegossen. Sie setzten sich wie folgt zusammen:

Acrylamidlösung (Rothiphorese)	13,3 ml
TBE 5-fach	10,0 ml
Aqua bidest.	31,5 ml
APS 10 %	350 μ l
Temed	60 μ l

Die Reagenzien wurden im Abzug in der oben angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert, gut gemischt und möglichst schnell in die zuvor vorsichtig zusammengesetzte Elektrophoresekammer gegossen. Sofort im Anschluss wurde der Kamm mit den Auftrags Taschen in das noch flüssige Gel eingesetzt und danach das Auspolymerisieren des Geles abgewartet (ca. 30 Minuten). Nach der Polymerisation wurde der Kamm

entfernt, die obere Kammer aufgesetzt, mit TBE gefüllt und die Taschen des Gels sorgfältig mit einer Pipette und langen Pipettenspitzen gespült.

3.6.2 Vorbereiten der Proben

Die PCR-Proben wurden auf Eis aufgetaut, gut gemischt und kurz anzentrifugiert oder aber direkt von der PCR übernommen. Zu je 10 µl der Probe wurden 2 µl Ladepuffer hinzugegeben, gut gemischt und abzentrifugiert. Die Mischung (je 12 µl/Probe) wurde mit einer extra langen Pipettenspitze vorsichtig in die Gel-Taschen pipettiert. Die Größe der Taschen erlaubte bis zu 5 Proben (insgesamt 60 µl) auf einmal parallel im Gel laufen zu lassen.

Zur Bestimmung der Länge der PCR-Amplifikate wurden zwei DNA-Molekularmarker mit in jedes Gel pipettiert. Diese wurden jeweils zu 2 µl mit 8 µl TBE und mit 2 µl Ladepuffer gemischt und entsprechend den Proben ins Gel eingebracht. Folgende DNA-Molekularmarker kamen zur Anwendung:

DNA-Molekular Weight Marker V mit 22 Fragmenten (8 - 587 Basenpaare)

DNA-Molekular Weight Marker VI mit 15 Fragmenten (150 - 2100 Basenpaare)

3.6.3 Elektrophorese

Während der Vorbereitung der Proben ließen wir das Gel bei 120 V vorlaufen um vorhandene Ladungen auszurichten. Nach dem Beschicken des Gels wurde zunächst bei 150 V abgewartet bis die Proben ins Gel eingelaufen waren. Dies war durch die Färbung der Proben mittels des Markers zu erkennen. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blauen Markierungsbanden des Puffers unten aus dem Gel herausgelaufen waren (ungefähr 2 h). Die gesamte Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.6.4 Färben und Einscannen der Gele

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus seiner Halterung genommen und bis zum Färben in Aqua bidest. aufbewahrt. Die Ethidiumbromidlösung wurde frisch aus 40 µl Stammlösung (Ethidiumbromid 1 % in Aqua bidest.) und 500 ml Aqua dest. hergestellt.

Das Gel wurde nun in der Ethidiumbromidlösung für 10 Minuten unter leichtem Schütteln gefärbt. Anschließend wurde zur Verminderung der Hintergrundfärbung das Gel nochmals 10 - 15 Minuten in Aqua dest. gewaschen.

Zum Scannen des Gels wurde dieses auf einen feuchten UV-Leuchttisch gelegt und mit einem UV-Videosystem aufgenommen. Die Bilddaten konnten dann auf Diskette gespeichert und/oder ausgedruckt werden. Zur einfacheren Darstellung zeigten wir alle Gele als „Negativ“, also mit schwarzen Banden und mit weißem Hintergrund.

Außerdem bildeten wir alle Gele so ab, dass es zu einer einheitlichen Reihenfolge der Organe auf den Gelen kam.

Als Problem erwies sich im Nachhinein, dass die Gele, durch die verschiedene Anzahl der Proben bedingt, unterschiedlich groß eingescannt wurden und somit später ein einheitliches Bild nicht mehr gewährleistet war.

3.7 Restriktions-Enzyms-Analyse der PCR-Produkte

Zum Nachweis der Richtigkeit der Amplifikate wurden diese mit spezifischen Endonukleasen gespalten. Endonukleasen sind Enzyme, die an ganz spezifischen Basenpaarsequenzen die DNA spalten.

Dazu benötigten wir 8 PCR-Proben à 50 µl => 400 µl PCR-Produkt-Lösung.

Zu dieser wurden 40 µl 3 molare Na-Acetat-Lösung sowie 1100 µl Ethanol 96 % gegeben.

Dieser Ansatz wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mindestens 10 Minuten bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C 20 Minuten mit

14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vorsichtig abgesaugt und das Pellet zweimal mit Ethanol 70 % (4 °C, 5 min, 14.000 U/min) gewaschen.

Jetzt wurde das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und anschließend wieder in 40 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Die jetzt entstandene wässrige DNA-Lösung wurde bei 65 °C 15 Minuten lang unter Rütteln gemischt.

Die eigentliche Enzym Reaktion fand dann anschließend bei 37 °C unter Rütteln (2,5 h) statt. Hierzu mussten 5 µl cDNA mit 30 µl H₂O_{DEPC}, 1 µl Enzym und 4 µl eines enzymespezifischen Puffers vermischt werden.

Nach Abschluß der Reaktion wurde das Produkt in einer Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (siehe Kapitel 3.6).

3.8 Messung der relativen Expression der einzelnen IGFbps im Vergleich zum internen Standard β -actin

Um eine ungefähre Vorstellung der Menge der exprimierten mRNA eines Proteins zu haben, verglichen wir es mit einem sogenannten internen Standard. Dies ist ein Protein, dessen Expression in verschiedenen Organen oder Zellen auch im Laufe der Zeit als konstant angesehen wird. Wir wählten dafür β -actin. Die Schwächen dieser Methode werden später noch diskutiert.

Hierzu wurden die eingescannten Gele mit Hilfe des Programmes WINCAM im Computer untersucht. Die Flächen sowie die Intensität der verschiedenen Banden wurden mit der jeweils zugehörigen Bande des internen Standards desselben Organs densitometrisch verglichen.

Als Ergebnis bekamen wir dann den prozentualen Anteil des untersuchten Proteins verglichen zum Standard, der einem ermöglicht, die erhaltenen Daten graphisch und tabellarisch miteinander zu vergleichen. Dieser Vergleich erleichterte uns mögliche Rückschlüsse auf Veränderungen der IGFBP-Expression im Verlauf des Alterungsprozesses sowie im Vergleich zwischen den Geweben.

4. Ergebnisse

4.1 Etablieren der PCR

4.1.1 Auswahl der Primer

Die mRNA-Sequenzen der IGF1Ps sind allesamt aus Schuller et al (64) entnommen. Nachdem die Primerpaare mit Hilfe des Suchprogramms „Primer detective“ herausgesucht wurden, wurden sie zusätzlich auf mehrfach bindende Basenpaare geprüft. Wir suchten uns dann, wenn möglich zwei Sense/Antisense-Paare aus, von denen das besser geeignete, mit weniger Seitenbanden und stärkerem Signal zur Fortführung der Versuche genommen wurde (s. Abbildungen 1 - 4). Um bei den Ergebnissen der PCR eine Vergleichsmöglichkeit der Stärke der mRNA-Expression der verschiedenen Proteine zu haben, wurde ein sogenannter „interner Standard“ benutzt. Wir wählten in unserem Fall β -actin, welches in verschiedenen Zellen und in verschiedenen Altersgruppen als relativ konstant angesehen wurde. Der Primer des β -actin entspricht dem Original-Primer der Firma Clontech.

Folgende Primerpaare kamen zum Einsatz:

mRNA	bp	5'-3' Sequenz	3'-5' Sequenz
IGFBP-1	309	TCCCAGCATGAAGAG GCAAAGG	TCCATTCTTGTTGCA GTTTGGC
IGFBP-2	165	CAGGTTGCAGACAGT GATGACG	GTGCTGTTTCATTGAC CTTCTCC
IGFBP-3	377	TGACCGATTCCAAGT TCCATCC	GCAATGTACGTCGTC TTTCCCC
IGFBP-4	198	TGCGTACATTGATGC ACGGG	CCACGATCTTCATCT TGCTCCG
IGFBP-5	190	TGAGACAGGAATCCG AACAAGG	TTGTCCACACACCAG CAGATGC
IGFBP-6	191	CTTTGCCAGTGTCTC CAGATGG	AAGGGTGACAGGGAC AATGG
β -actin	540	GTGGGCCGCTCTAGG CACCAA	CTCTTTGATGTCACG CACGATTTC

4.1.2 Grundrezept der PCR

Um schnell zu ersten aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen, begannen wir die PCR mit einem Grundrezept, das sich in unserer Forschungsgruppe als Ausgangsschema in der Vergangenheit als sehr geeignet erwiesen hat.

Dies setzte sich wie folgt jeweils pro Ansatz zusammen:

5,0 µl Buffer (zur Polymerase gehörend, mitgeliefert)

3,0 µl Mg

37,4 µl H₂O

0,4 µl dNTP

0,8 µl Primer-Sense

0,8 µl Primer-Antisense

0,6 µl Taq-Polymerase

2,0 µl cDNA

50,0 µl

In der Vergangenheit hatten sich folgende Temperaturzyklen als gut geeignet erwiesen:

	Temp.	Zeit
Denaturierung:	95 °C	60 sec.
Annaeling:	63 °C	45 sec.
Polymerase Reaktion:	72 °C	120 sec.

4.1.3 Wahl der Etablierungs-Proben

Zur Etablierung unserer PCR wurden zuerst Proben von Organen mit aus der Literatur bekannt hoher mRNA-Expimierung des jeweiligen Bindungsproteins ausgewählt (64).

Folgende IGFBP → Organ Zuordnungen erschienen vielversprechend:

Bindungsprotein	Organ
IGFBP-1	Leber
IGFBP-2	Leber/Niere
IGFBP-3	Leber/Niere
IGFBP-4	Leber
IGFBP-5	Niere
IGFBP-6	Lunge

Nach anfänglich frustranen Versuchen, die sich auf einen falschen Puffer in der Reversen-Transkriptase-Reaktion zurückführen ließen, ergaben sich nach der Fehlerbehebung folgende Ergebnisse: (Abb.1- 4)

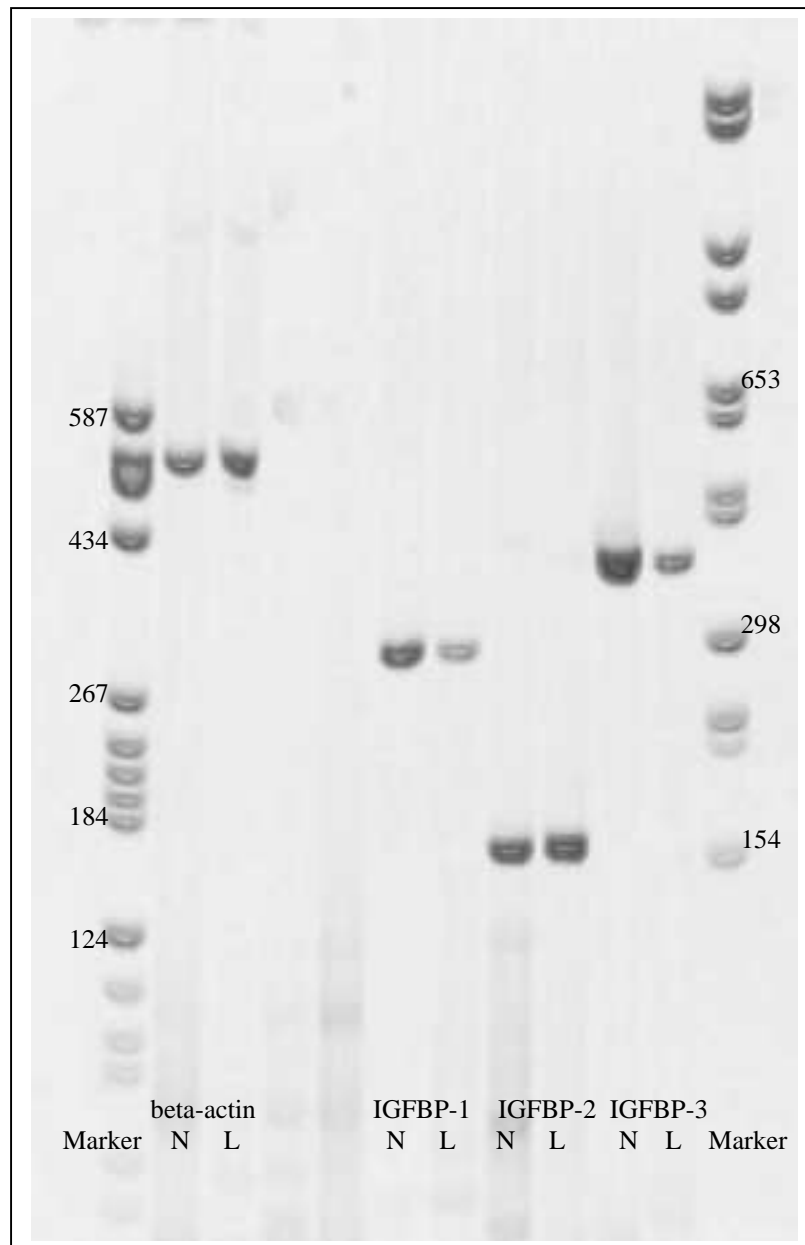
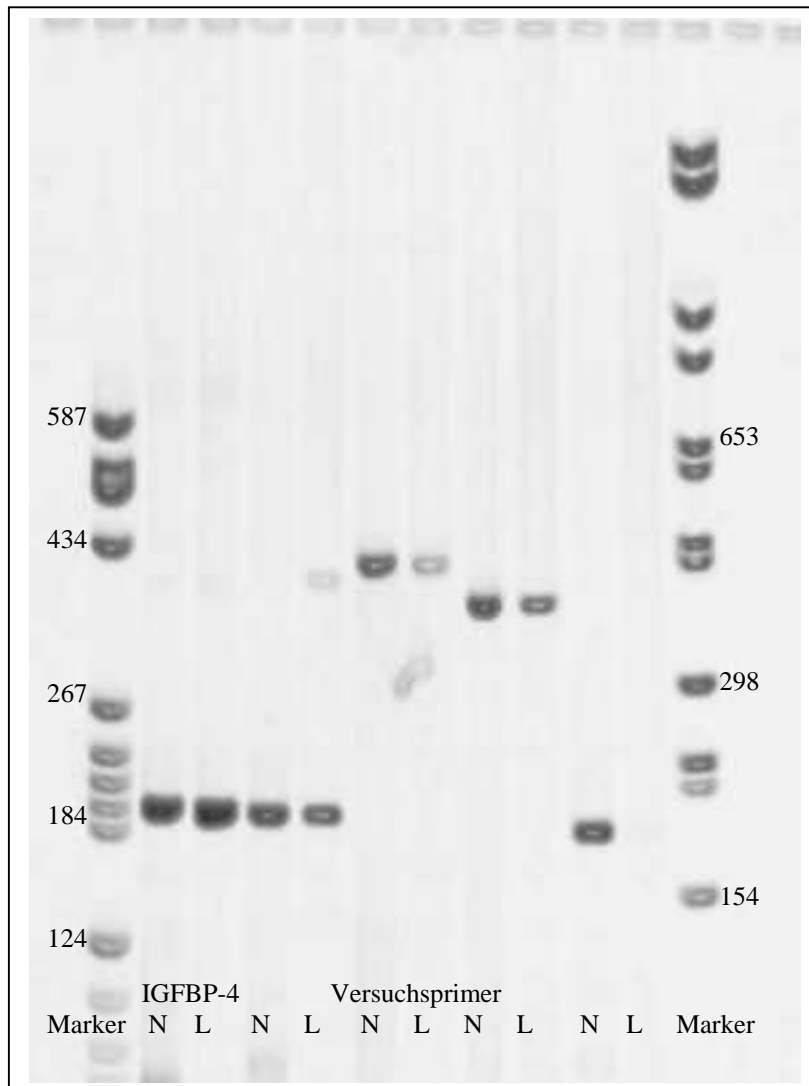


Abbildung 1:

Eingesanntes Polyacralamid-Gel nach RT-PCR für beta-actin, IGFBP-1;-2;-3,: jeweils mit den Organen N = Niere und L = Leber

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

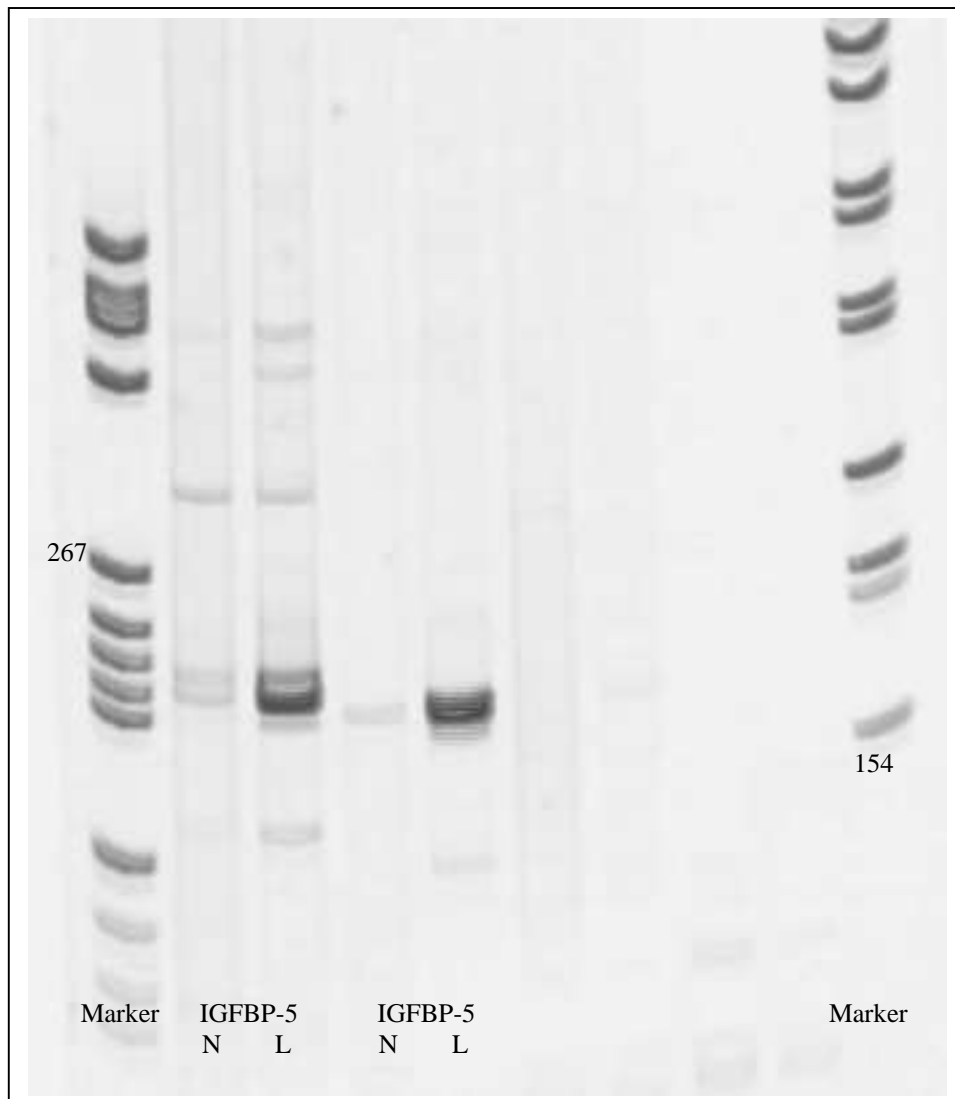
Beta-actin: 540 bp, IGFBP-1: 309 bp, IGFBP-2: 165 bp, IGFBP-3: 377 bp

**Abbildung 2:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel nach RT-PCR für IGFBP-4 sowie Versuchsprimer, die nicht verwertet oder nochmals getestet wurden für IGFBP-2;-3;-4;-5, jeweils mit N = Niere und L = Leber

IGFBP-4: 198 bp

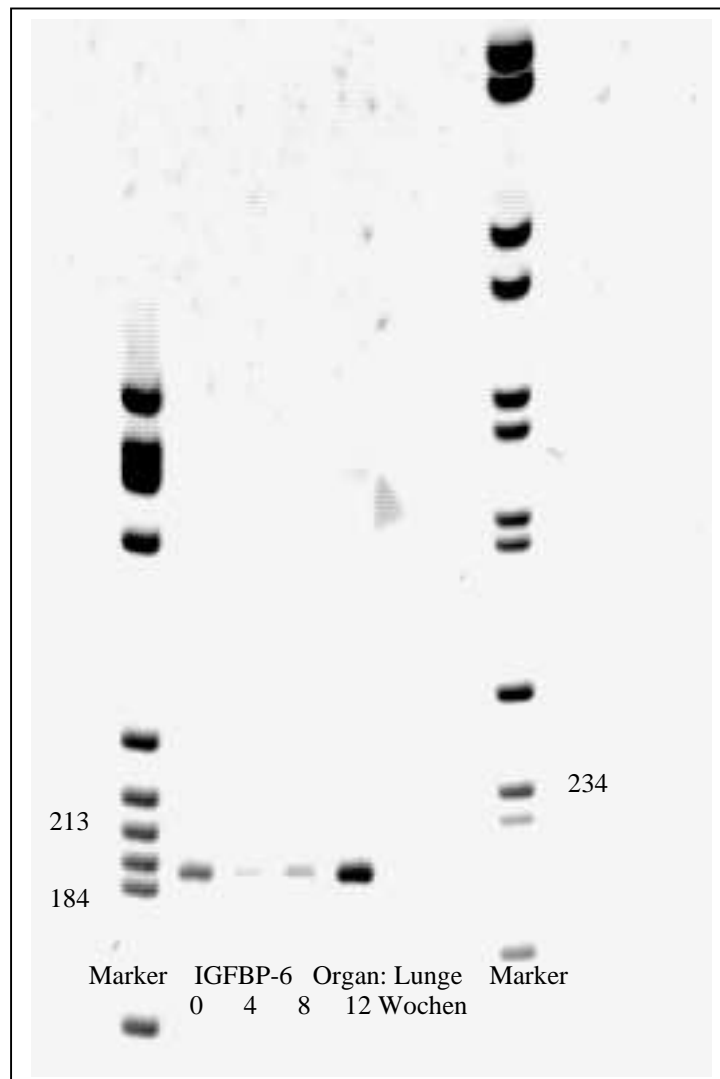
Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 3:**

Eingesanntes Polyacrylamid-Gel nach RT-PCR für IGFBP-5 mit Niere = N und
Leber = L

IGFBP-5: 190 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 4:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel nach RT-PCR für IGFBP-6 mit Organ Lunge aus verschieden alten Tieren zur Primeretablierung

IGFBP-6: 191 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

4.1.4 Restriktions-Enzym-Analyse

Zum Beweis, dass es sich bei den polymerisierten Fragmenten um die gesuchten handelt, wurde die Eigenschaft von hochspezifischen Restriktionsenzymen genutzt, die DNA an ganz bestimmten Sequenzstellen zerschneiden. Somit kann bei bekannter DNA-Sequenz des PCR-Produktes, welches als Ausgangssubstanz dient, die Anzahl und Größe der Bruchstücke vorausgesagt werden.

Mit Hilfe eines Programmes der Firma Boehringer Mannheim wurde nach Eingabe der DNA-Sequenz und der Lage der Primer eine Anzahl von verschiedenen Restriktionsenzymen mit den Bindungsstellen ausgedruckt. Aus den gefundenen Enzymen mussten dann die für uns Geeignetsten herausgesucht werden. Wir haben uns in diesem Fall von der Spezifität (max. 2 Schnittstellen) und von der Größe der Spaltprodukte (gut zu unterscheiden; nicht zu groß – nicht zu klein) leiten lassen. Aus finanziellen Gründen versuchten wir außerdem Enzyme zu wählen, die wir mehrfach verwenden konnten.

Dies führte uns zu folgenden Enzymen für die verschiedenen Bindungsproteine:

Bindungsprotein	Enzym	Größe der Produkte
IGFBP-1	Ava I	166/ 142
	Fok I	38/ 270
IGFBP-2	Alu I	37/ 127
	Fok I	56/ 108
IGFBP-3	Alu I	299/ 97
	Ava II	86/ 310
IGFBP-4	Fok I	85/ 114
	ScrF I	58/ 141
IGFBP-5	Alu I	43/ 146
	ScrF I	52/ 137
IGFBP-6	Alu I	145/ 75
	ScrF I	34/ 47/ 110

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Gel-Elektrophorese ausgewertet und führten zu folgenden Ergebnissen: (Abb. 5, 6)

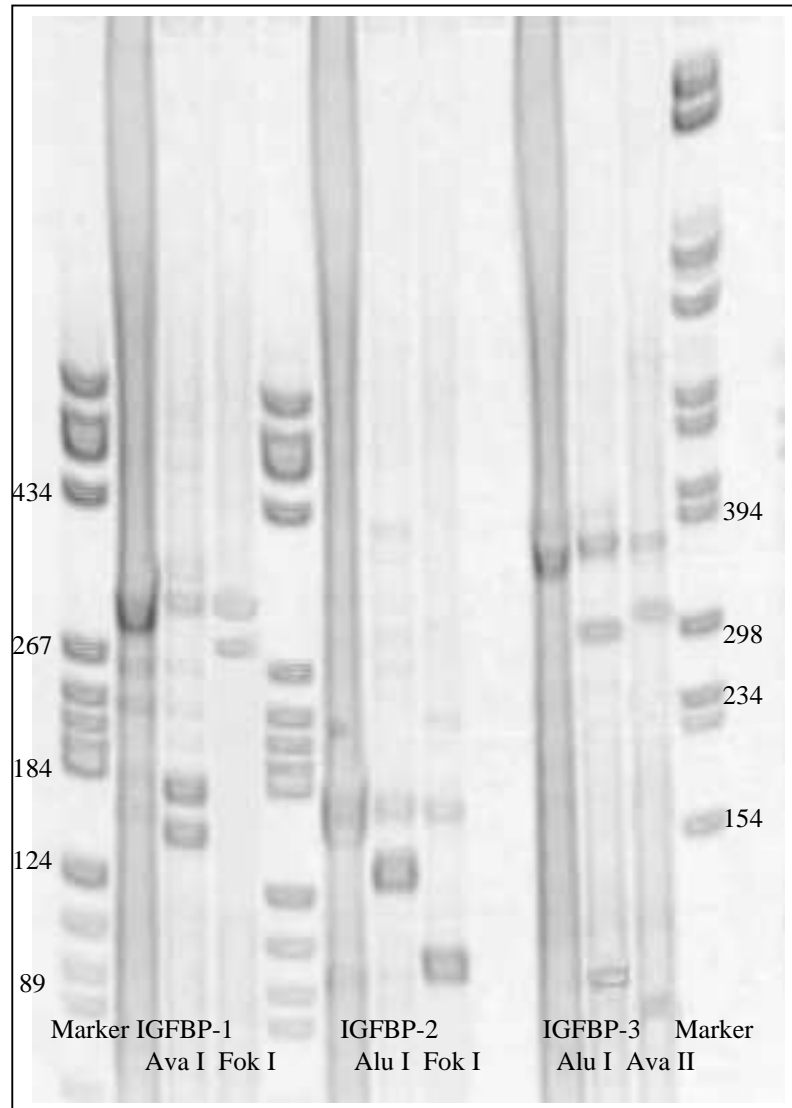
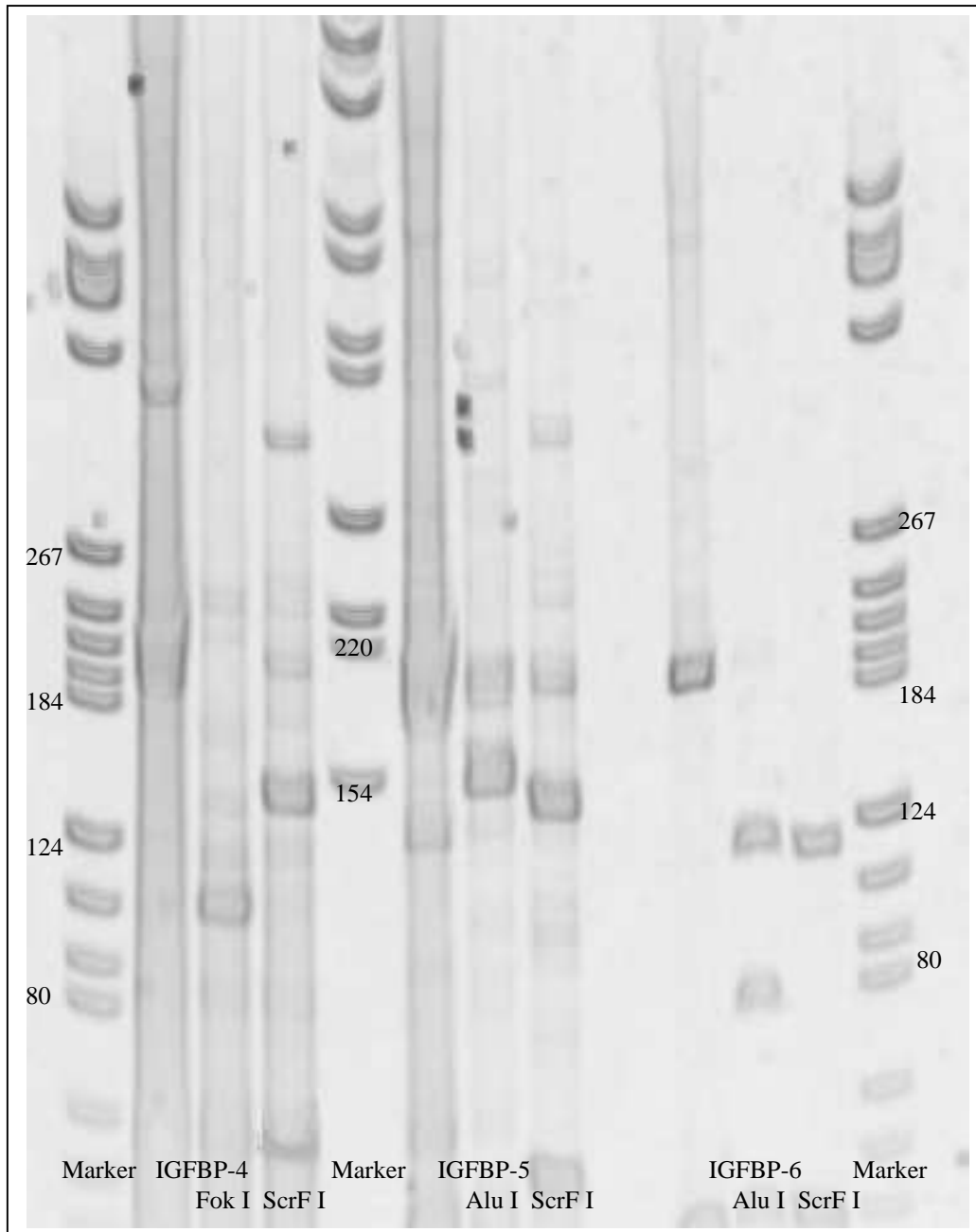


Abbildung 5:

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel nach Restriktions-Enzymanalyse der RT-PCR-Produkte für IGFBP-1, -2, -3 mit den oben genannten Enzymen
Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 6:**

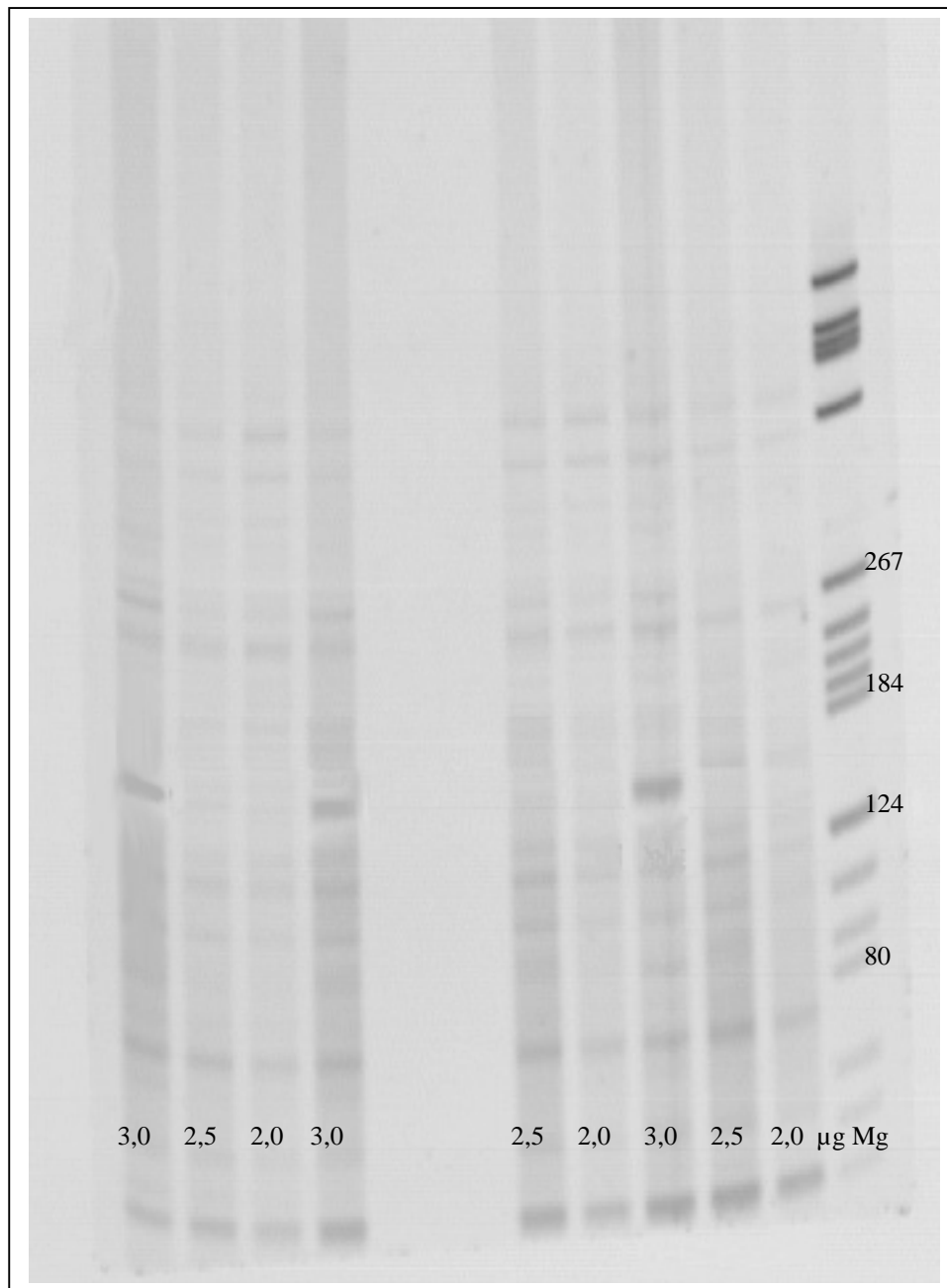
Eingescanntes Polyacrylamid-Gel nach Restriktions-Enzymanalyse der RT-PCR-Produkte für IGFBP-4, -5, -6 mit den oben genannten Enzymen
Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Bei der hohen Spezifität der Enzyme und der Lage der Banden, die den vorhergesagten Größen der Bruchstücke entsprach, war dies der Beweis, dass die polymerisierten Fragmente tatsächlich die gesuchten IGFbps waren.

4.1.5 Optimierung der PCR:

Zur Optimierung einer jeden PCR gehört die Suche nach der besten Mg^{2+} -Konzentration und der richtigen Anzahl der Zyklen. Andere Parameter hingegen sind durch die verwendeten Komponenten, zum Beispiel durch die Verwendung einer bestimmten Polymerase mehr oder weniger festgelegt. Die Bestimmung dieser Parameter wurden am Beispiel des IGFbp-2 stellvertretend für die anderen IGFbps dargestellt.

Die Mg^{2+} -Konzentration mit den besten Ergebnissen wurde mittels einer so genannten Mg^{2+} -Kinetik bestimmt, dabei wurden alle Variablen bis auf die Mg^{2+} -Konzentration konstant gehalten.

**Abbildung 7:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der Mg^{2+} -Kinetik mit 2,0 μg , 2,5 μg und 3,0 μg mit unterschiedlichen Organen

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Als optimaler Mg^{2+} -Zusatz erwies sich eine Menge von 3,0 μl pro Ansatz, da hierbei das beste Signal zu bekommen war.

Des Weiteren wurde zur Ermittlung der optimalen Zyklenzahlen eine Zyklenkinetik gefahren in unserem Fall mit 24, 27, 30 und 33 Zyklen (s. Abb. 8 und 9). Hierbei wird ähnlich der Mg^{2+} -Kinetik als einzige Variable die Anzahl der Zyklen variiert und sämtliche anderen konstant gehalten. Dies führte zu folgenden Ergebnissen:

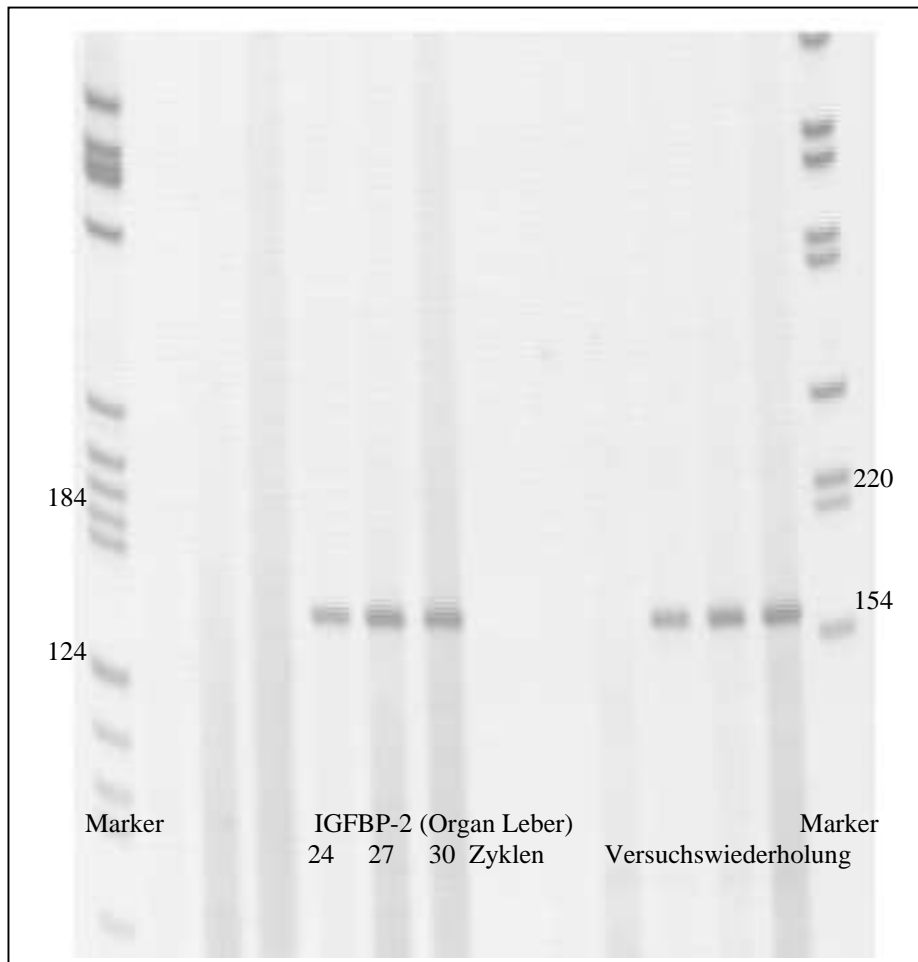
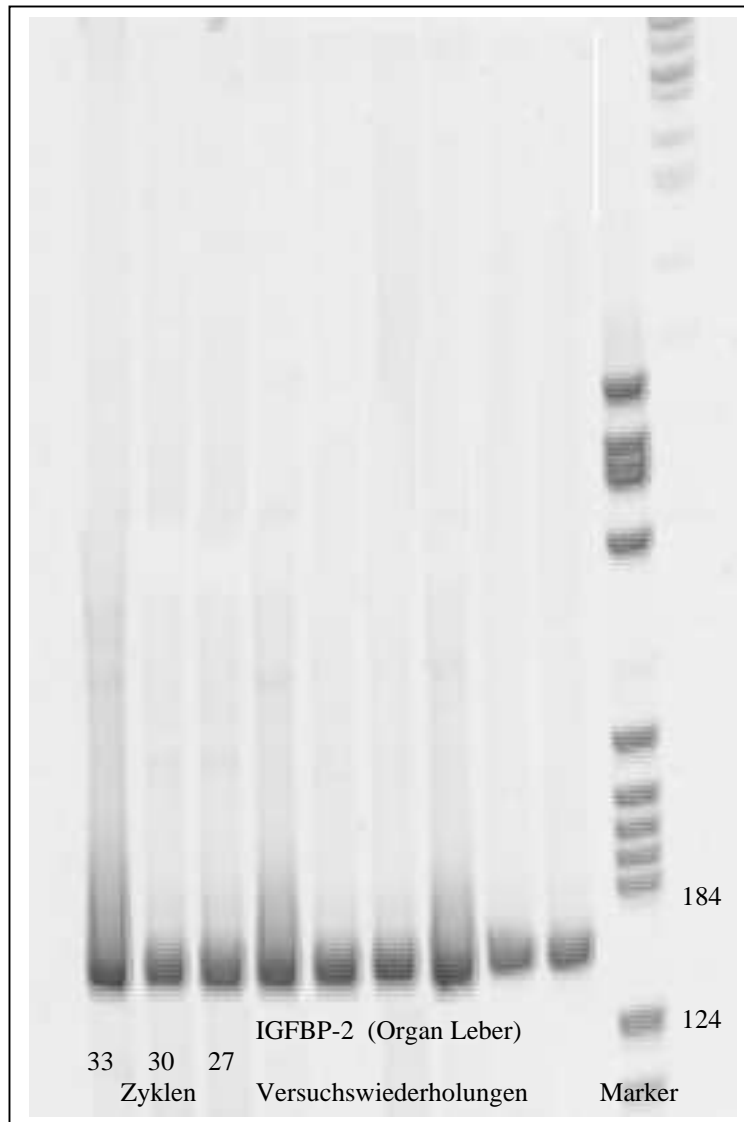


Abbildung 8:

Begleittext siehe folgende Seite.

**Abbildung 8 & 9:**

Eingescannte Polyacrylamid-Gele der Zykluskinetik. Dieselbe PCR (IGFBP-2 mit Organ Leber) wurde mit unterschiedlichen Zykluszahlen gefahren, um deren Optimum zu bekommen.

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Auch hier zeigte sich, dass mit der ursprünglichen Anzahl von 30 Zyklen ein optimales Ergebnis erzielt werden konnte. Das Signal hierbei war stark genug ohne aber zu viele Nebenbanden aufzuweisen.

Als letzte wesentlich beeinflussbare Variable der PCR wurde die „Annealing“-Temperatur optimiert. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Anlagerung der Primer an die DNA und deren Bruchstücke. Da sich diese Temperatur nur in einem gewissen Spielraum zwischen Nichtanlagern und Schmelzen der Primer bewegen kann, wählten wir auf Grund unserer mit 20 – 22 Nukleotiden eher kurzen Primern als Ausgangstemperatur 63 °C. Auf diesen Wert kamen wir über die Formel (65):

$$[(\text{Anzahl von A+T}) \times 2 + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4] \text{ } ^\circ\text{C}$$

Diese Formel berechnet grob den Schmelzpunkt eines Primers. Bei uns ergab sich minimal ein Wert von 62 °C für IGFBP-4 Sense und IGFBP-6 Antisense (jeweils $9 \times 2 + 11 \times 4$) und maximal ein Wert von 70 °C für β -actin Sense ($7 \times 2 + 14 \times 4$) und Antisense ($13 \times 2 + 11 \times 4$). Der Durchschnitt für alle Primer ergab einen Wert von 66,7 °C. Diesen korrigierten wir aus Rücksicht auf die niedrigsten Temperaturen auf 63 °C, wie wir sie auch schon in unserem Ausgangs PCR Schema verwendet hatten. Dies schien auch aus Handhabungsgründen ein vernünftiger Wert für alle PCRs zu sein.

4.2 Messung der IGFBP-mRNA in Organen in Abhängigkeit vom Alter

Nach der Etablierung der verschiedenen RT-PCRs untersuchten wir in verschiedenen Organen von Mäusen des Alters 0, 4, 8, 12 Wochen derselben Familie die Expressierung der sechs verschiedenen IGFFBPs. Ziel war es dabei, eine mögliche Alterspezifität der verschiedenen IGFFBPs zu finden.

Hierzu wurden aus der ursprünglichen Lieferung von sechs weiblichen und zwei männlichen C57BL6-Mäusen die verschiedenen Altersgruppen gezüchtet und am Stichtag die Mäuse getötet und die Organe entnommen. Aus ethischen Gesichtspunkten haben wir nur eine geringe Anzahl von Mäusen getötet, mit dem Wissen, dass unsere möglicherweise gefundene Aussage dadurch an Signifikanz verlieren würde.

Wir gingen ursprünglich von lymphatischem Gewebe (Lymphknoten, Thymus, Milz) aus und erweiterten diese Auswahl später durch weitere Gewebe, sodass wir letztendlich bei jeder Altersgruppe mindestens sechs verschiedene Gewebe auf die Expressierung der verschiedenen IGFBP-mRNA untersuchten.

Dies waren für alle Altersgruppen Leber, Milz, Niere, Lunge, Gehirn und Thymus. Bei den 8 und 12 Wochen alten Mäusen untersuchten wir zusätzlich Lymphknoten und Knochenmark. Es wurden jeweils die Gewebe von mehreren Mäusen gleichen Alters gepoolt, um zum einen bei den Neugeborenen genügend Material zu bekommen und zum anderen den interindividuellen Unterschied etwas auszugleichen. Auf Grund der geringen Menge an Probenmaterial wurden die PCRs nur bei auffälligen Werten mehrfach kontrolliert (mindestens 2 mal), erbrachten dann aber identische Ergebnisse. Um zirkadiane Unterschiede weitgehendst auszugleichen entnahmen wir die Organe immer zu etwa gleichen Uhrzeiten, zwischen 10 und 11 Uhr vormittags.

Durch die Wahl der Primer und die dadurch resultierende Länge unseres polymerisierten Fragmentes waren wir in der Lage, die verschiedenen Proben aller sechs BPs in drei Gelen laufen zu lassen, sodass in einem Gel IGFBP-2,-3,-4, in einem weiteren IGFBP-1,-5 und in einem dritten Gel IGFBP-6 alleine dargestellt werden konnten. Ansonsten bestünde die Möglichkeit, dass zwei Banden zusammenfallen würden und somit eine korrekte Auswertung nicht möglich wäre.

Die Ergebnisse sahen wie folgt aus:

Alter 0 Wochen:

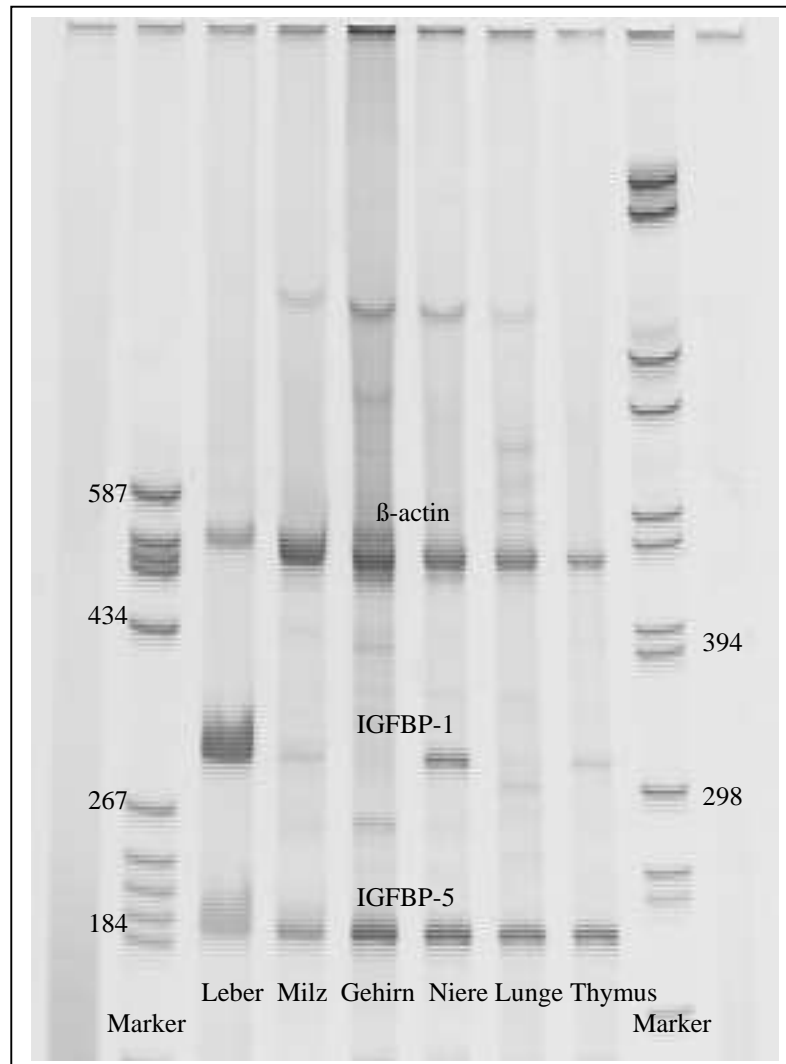


Abbildung 10:

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-1,-5 und β -actin von neugeborenen Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Knochenmark und Lymphknoten konnten wir preparatorisch nicht isolieren.

β -actin: 540 bp, IGFBP-1: 309 bp, IGFBP-5: 190 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

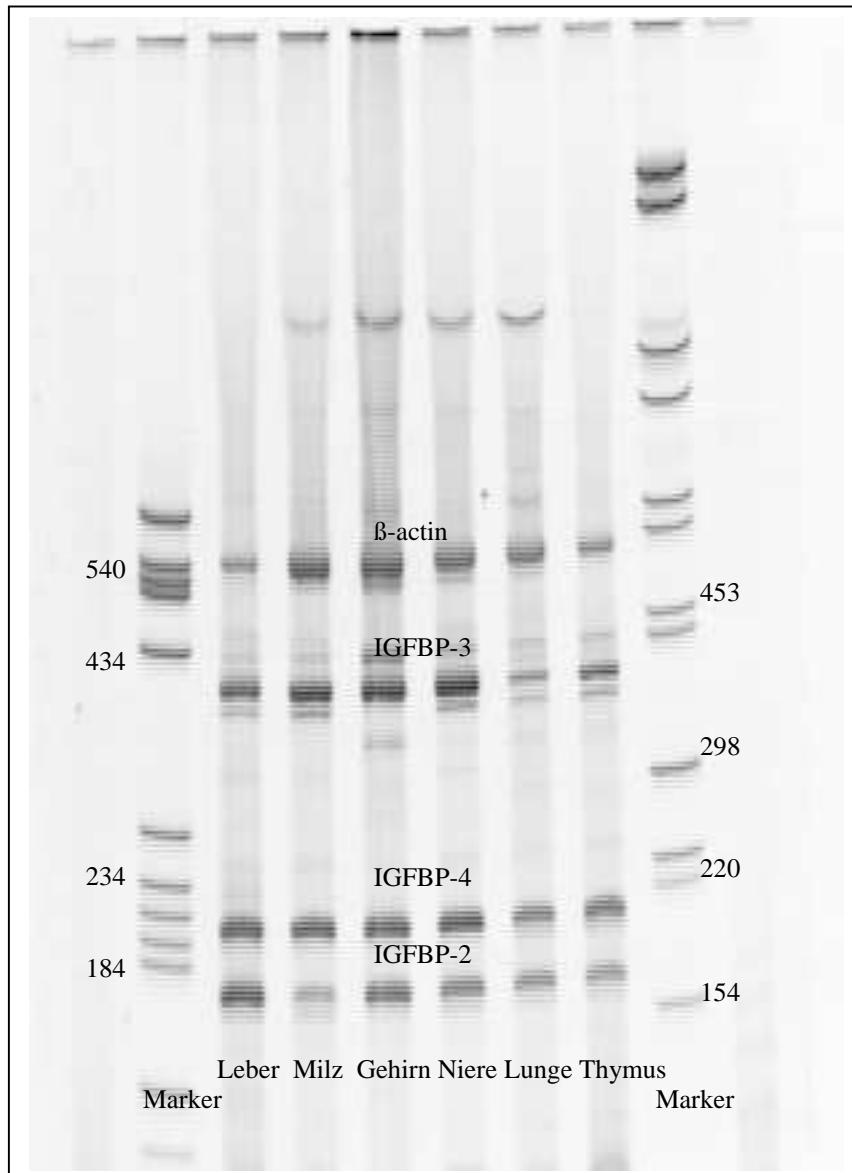
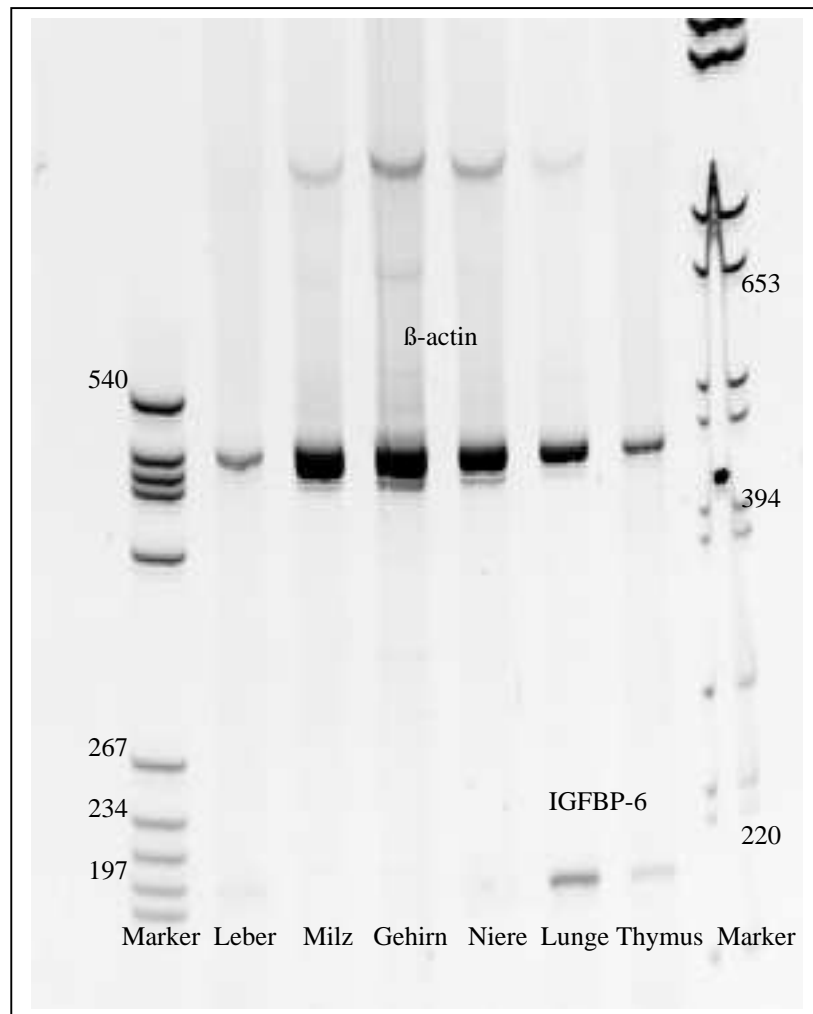


Abbildung 11:

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-2,-3,-4 und β -actin von neugeborenen Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge und Thymus

β -actin: 540 bp, IGFBP-2: 165 bp, IGFBP-3: 377 bp, IGFBP-4: 198 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 12:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-6 und β -actin von neugeborenen Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus. Knochenmark und Lymphknoten konnten wir präparatorisch nicht isolieren.

β -actin: 540 bp, IGFBP-6: 191 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Wenn man die Banden densitometrisch zum internen Standard vergleicht, erhält man relative Zahlenwerte, die in Abb. 13 dargestellt sind:

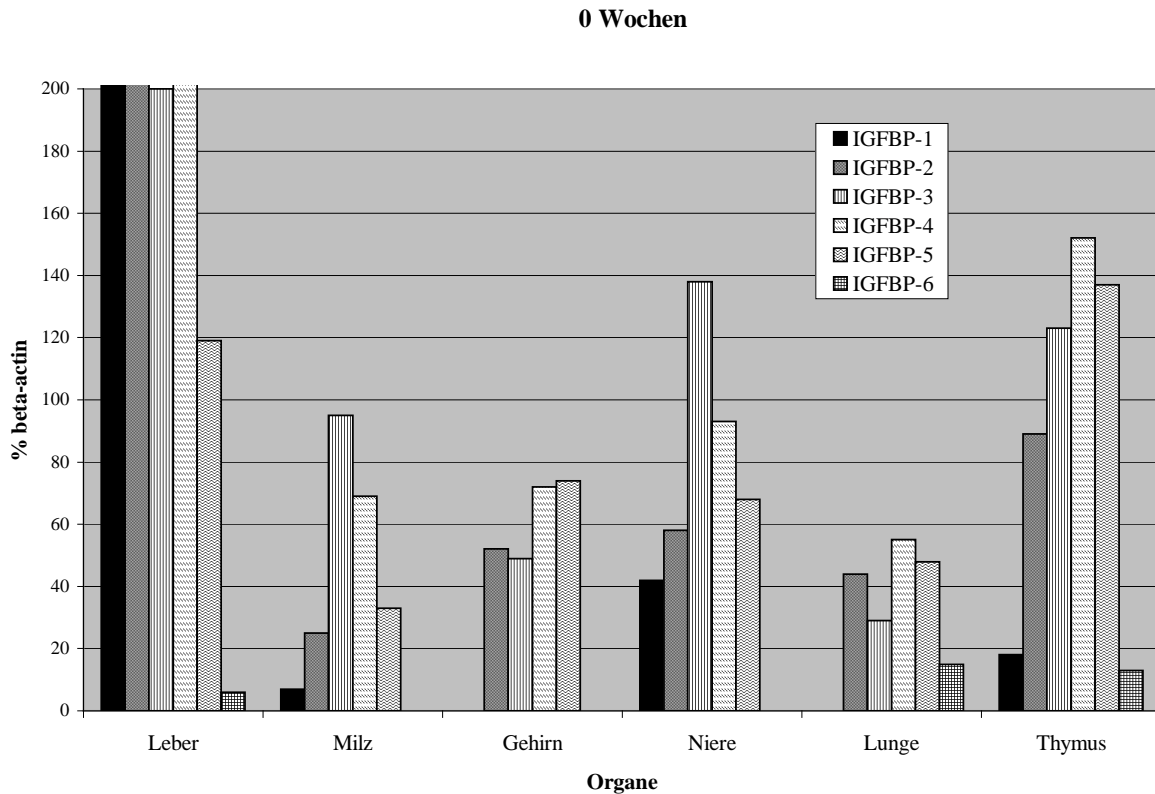
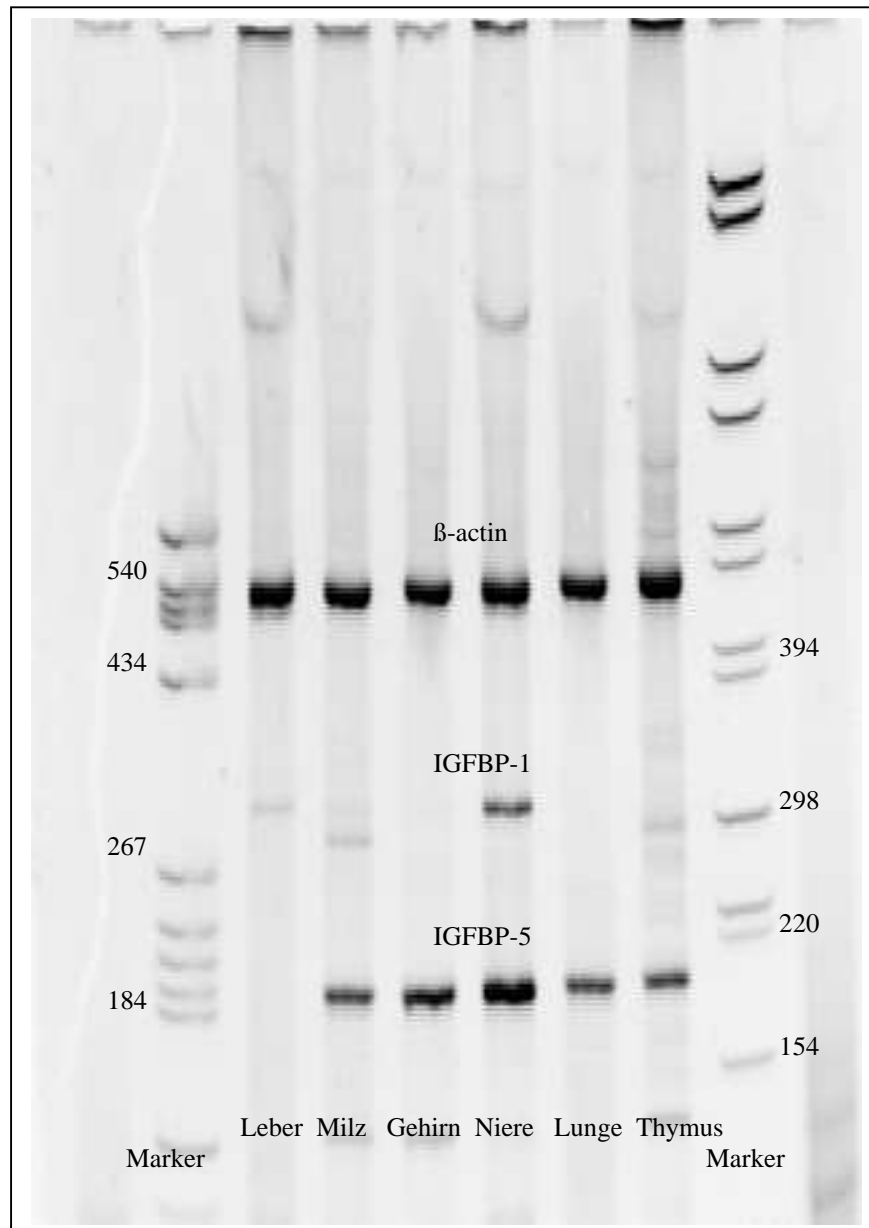


Abbildung 13:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse der verschiedenen IGFBPs für die untersuchten Organe bei neugeborenen Mäusen. Werte ausserhalb des Schaubildes bei Organ Leber: IGFBP-1: 352 %, IGFBP-2: 240 %, IGFBP-3: 200%, IGFBP-4: 214 %

Allen Anschein nach waren in dieser Altersgruppe IGFBP-2 bis -5 in allen untersuchten Organen, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, vorhanden, während IGFBP-1 und -6 sehr unterschiedlich exprimiert wurden. IGFBP-1 war in der Leber das am stärksten exprimierte BP, wurde aber im Gegensatz dazu in Milz und Thymus nur gering, in Gehirn und Lunge gar nicht exprimiert.

IGFBP-6 wurde allgemein nur in geringem Maße produziert, wobei es in Milz, Gehirn und Niere bei neugeborenen Mäusen überhaupt nicht nachweisbar war.

Alter 4 Wochen:**Abbildung 14:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-1,-5 und β -actin von 4 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus.

Knochenmark und Lymphknoten konnten wir präparatorisch nicht isolieren.

β -actin: 540 bp, IGFBP-1: 309 bp, IGFBP-5: 190 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

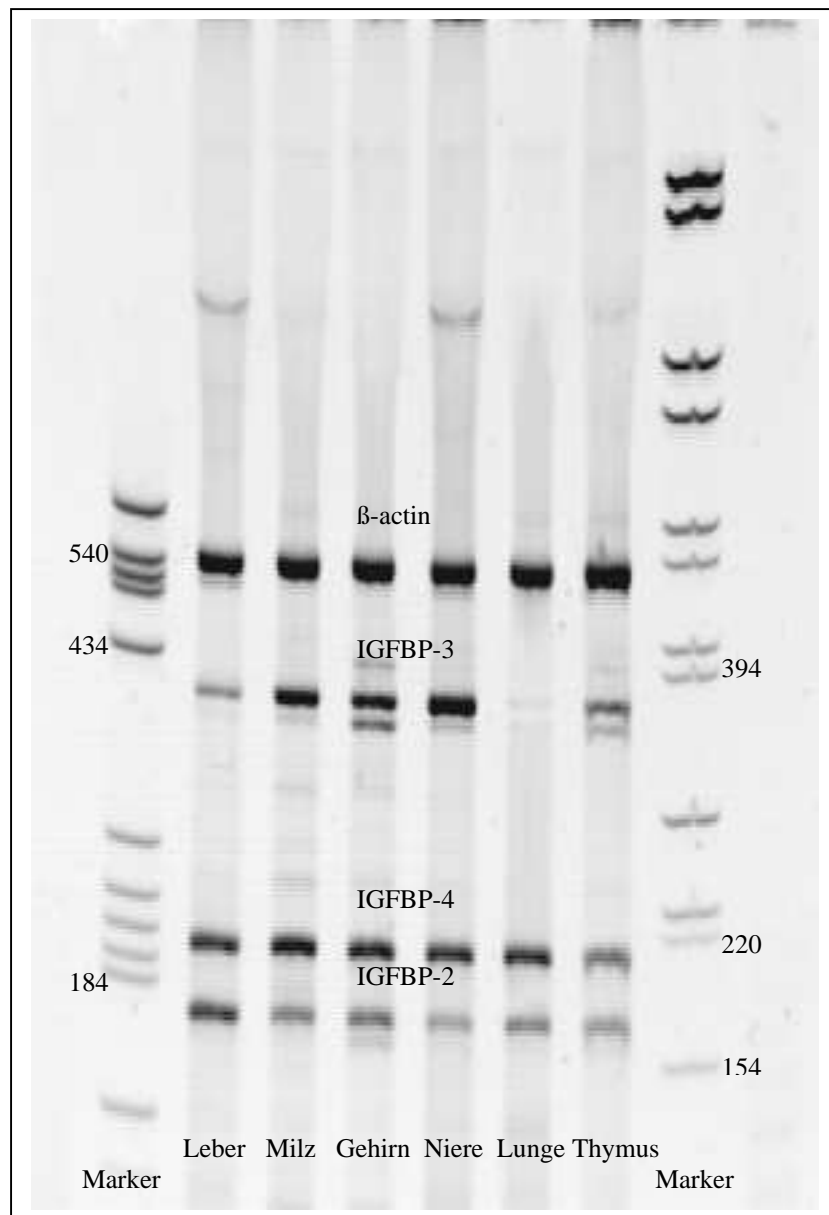
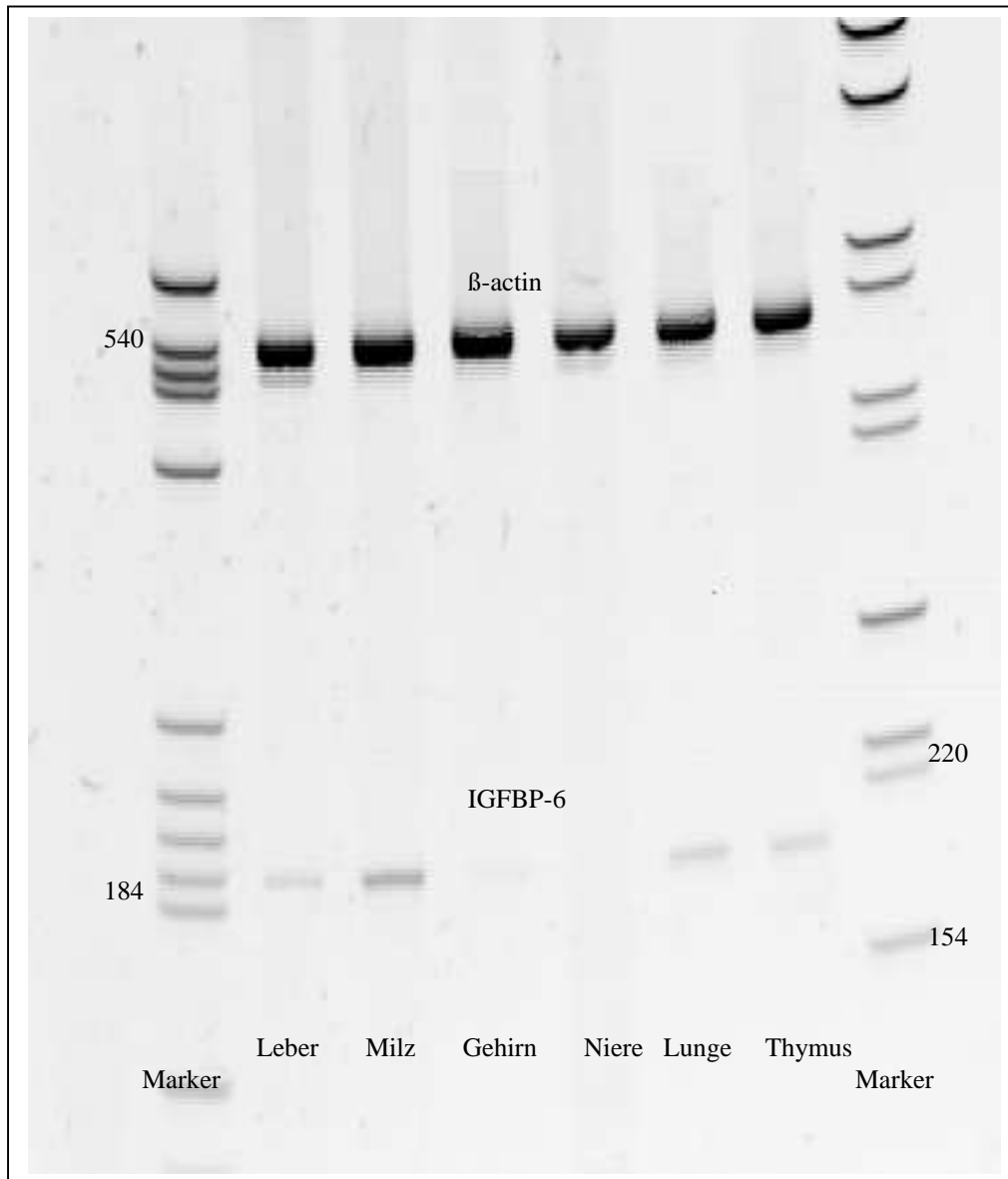


Abbildung 15:

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-2,-3,-4 und β -actin von 4 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge und Thymus

β -actin: 540 bp, IGFBP-2: 165 bp, IGFBP-3: 377 bp, IGFBP-4: 198 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 16:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-6 und β -actin von 4 Wochen Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus. Knochenmark und Lymphknoten konnten wir präparatorisch nicht isolieren.

β -actin: 540 bp, IGFBP-6: 191 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Auch hier haben wir die Banden densitometrisch ausgewertet und zum internen Standard in Relation gesetzt. Graphisch erbrachte dies folgendes Schaubild:

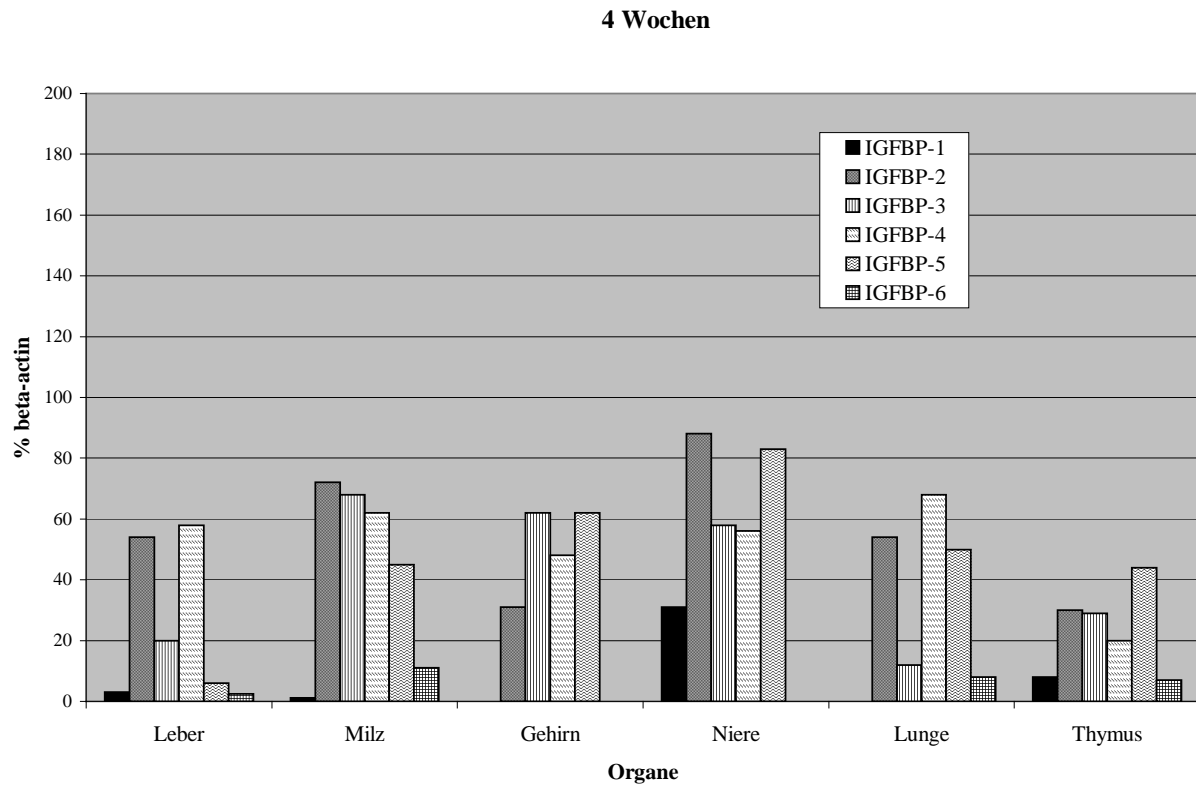
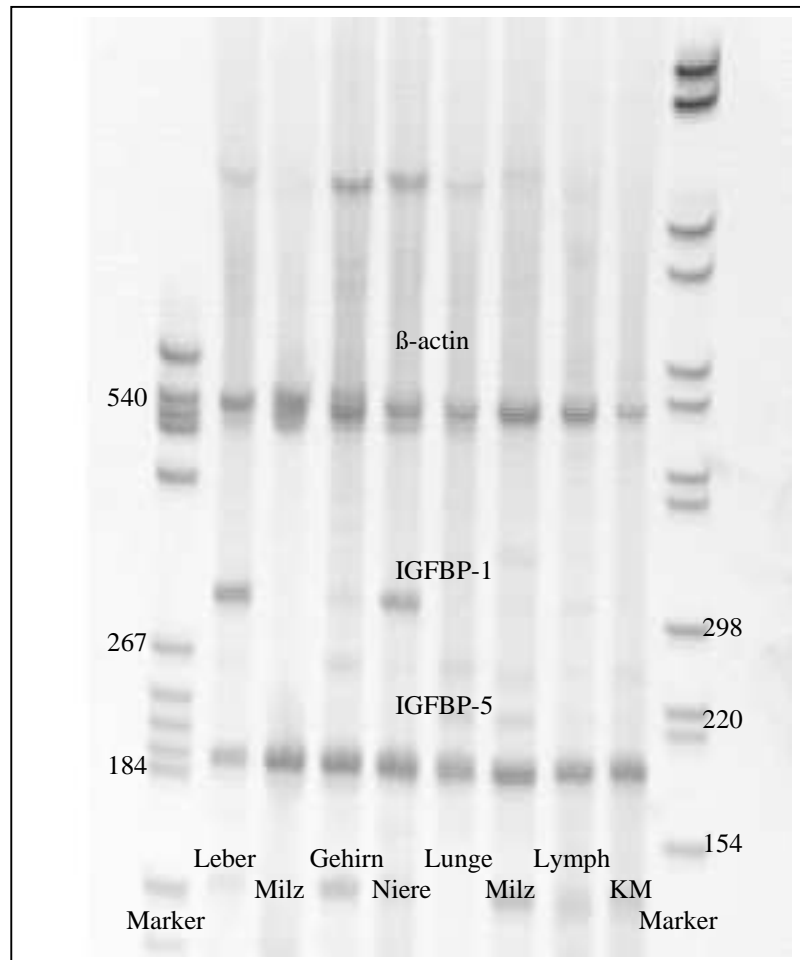


Abbildung 17:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse der verschiedenen IGFBPs für die untersuchten Organe bei 4 Wochen alten Mäusen.

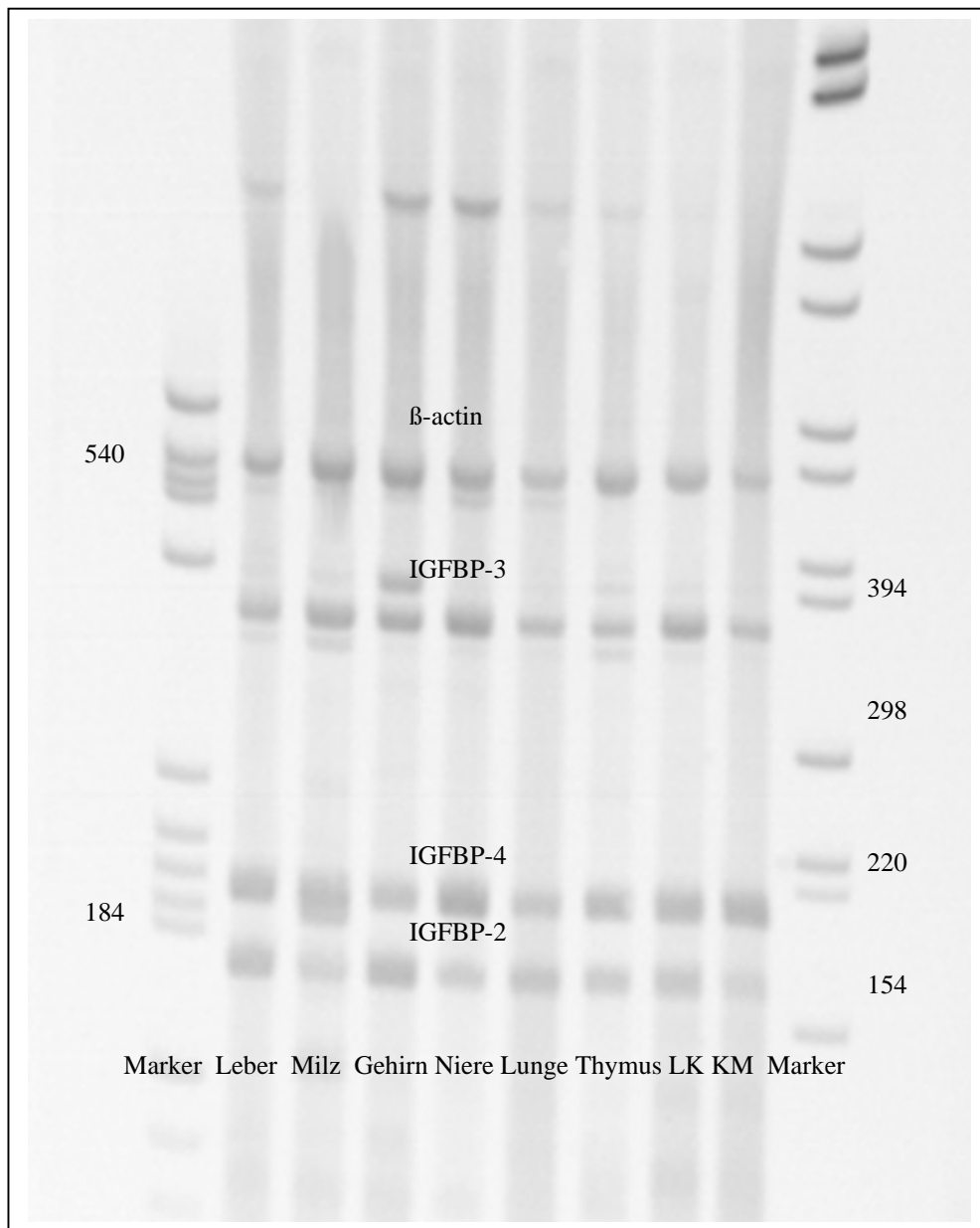
In dieser Altersgruppe schien IGFBP-1 bis auf in der Niere nur gering oder gar nicht exprimiert zu werden. IGFBP-2 bis -5 wurden von allen untersuchten Organen gebildet, wenn auch in unterschiedlicher Menge. IGFBP-6 hingegen, wurde in Gehirn und Niere überhaupt nicht, sowie in der Leber in nur ganz geringem Maße gebildet. Jedoch war die Expression in Milz, Lunge und Thymus auch nur gering.

Alter 8 Wochen:**Abbildung 18:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-1,-5 und β -actin von 8 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark

β -actin: 540 bp, IGFBP-1: 309 bp, IGFBP-5: 190 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 19:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-2,-3,-4 und β -actin von 8 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten und Knochenmark

β -actin: 540 bp, IGFBP-2: 165 bp, IGFBP-3: 377 bp, IGFBP-4: 198 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

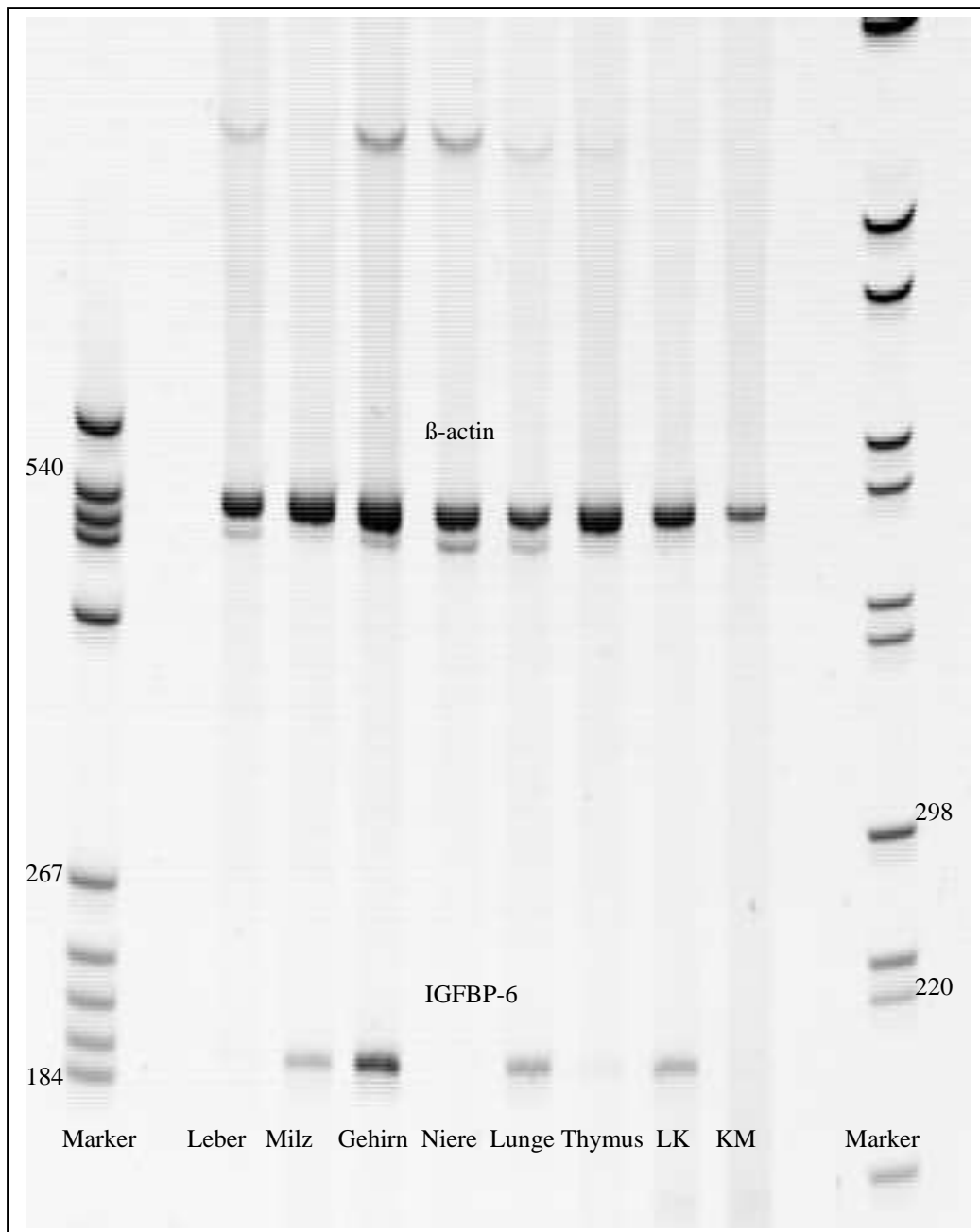


Abbildung 20:

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-6 und β -actin von 8 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM)

β -actin: 540 bp, IGFBP-6: 191 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Densitometrische Auswertung erbrachte hier folgende Graphik:

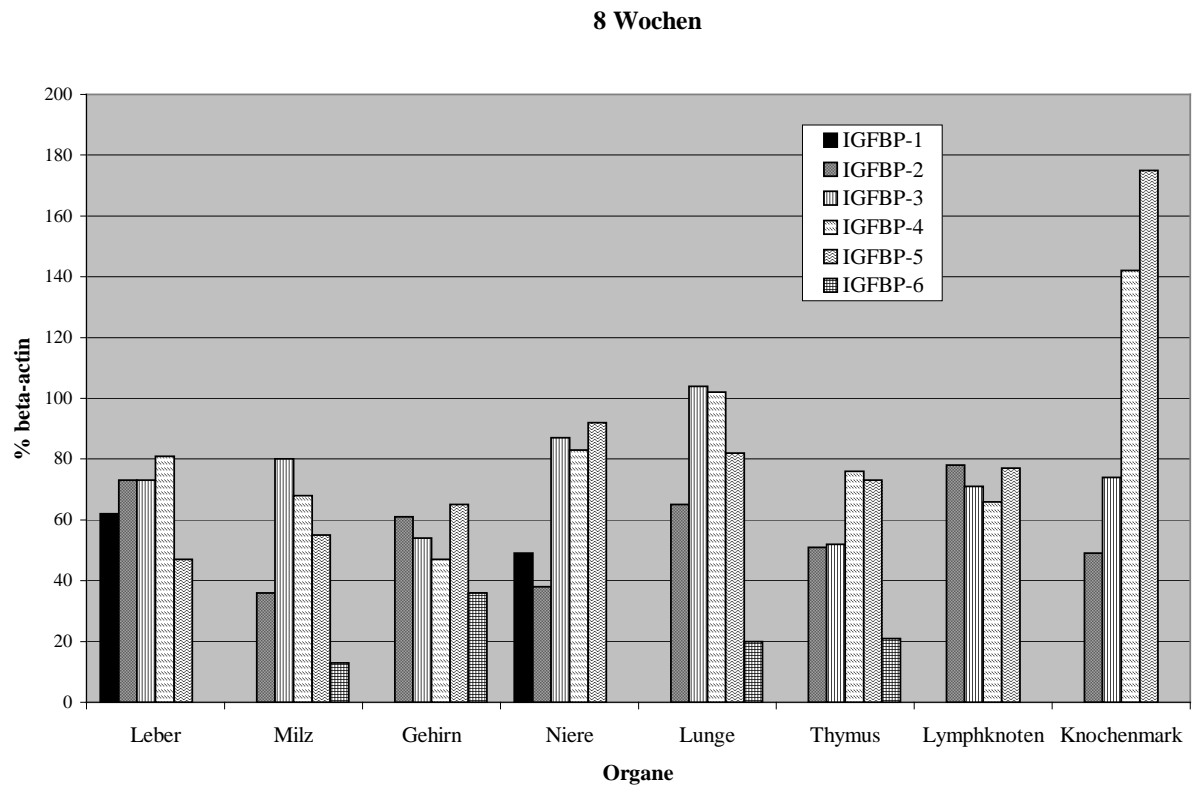
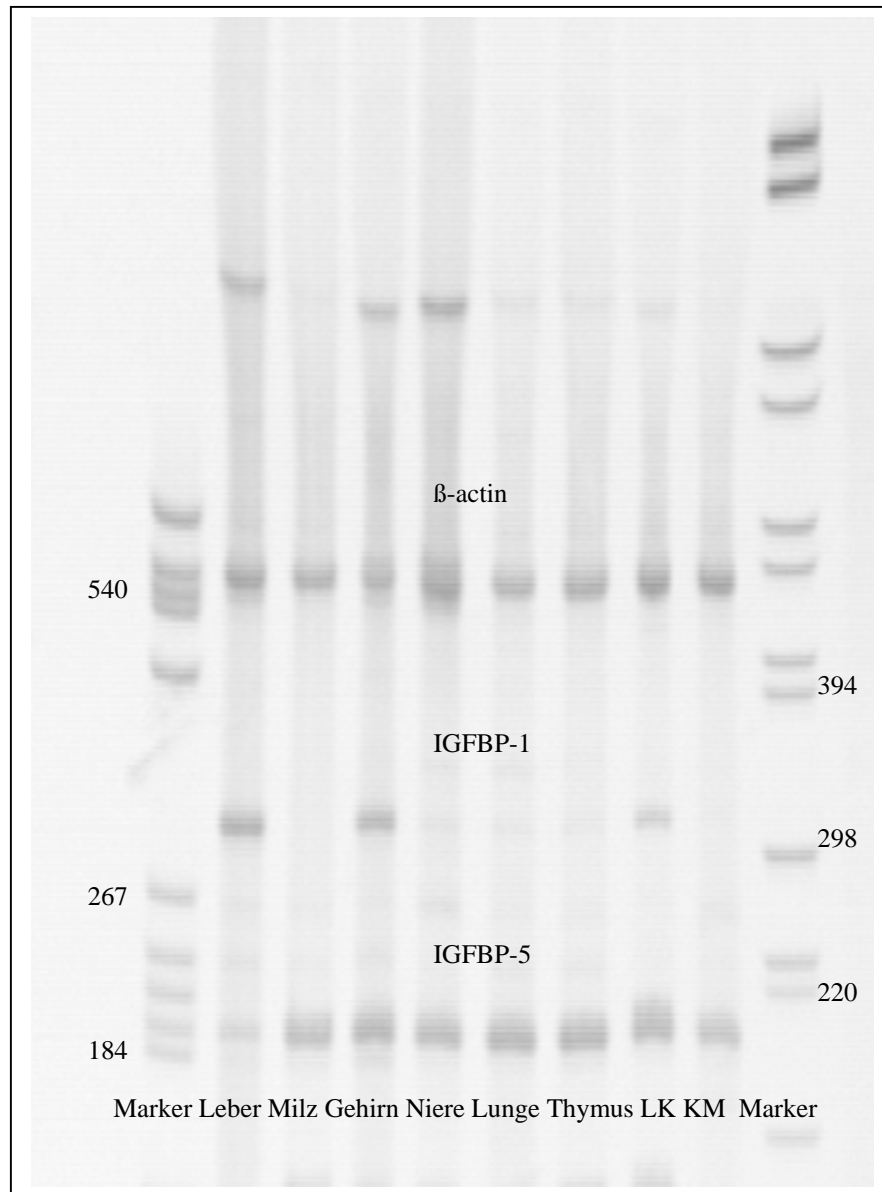


Abbildung 21:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse der verschiedenen IGFBP's für die untersuchten Organe bei den 8 Wochen alten Mäusen.

In dieser Altersgruppe betrachteten wir auch erstmals zu den anderen bereits untersuchten Organen zusätzlich Lymphknoten und Knochenmark.

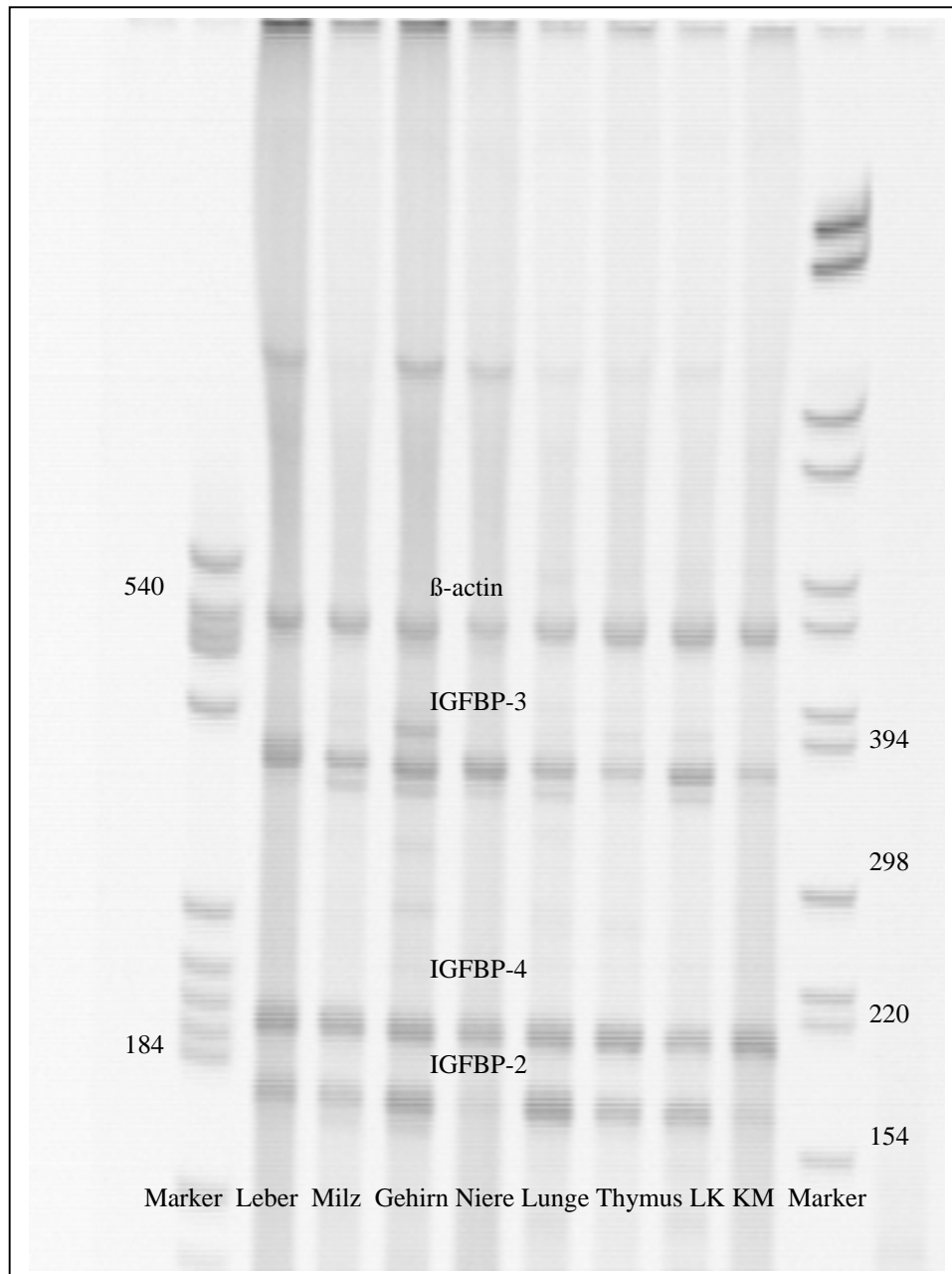
Auffällig erschien hierbei, dass IGFBP-1 nur noch in Leber und Niere zu finden war, dort aber in relativ hoher Konzentration. IGFBP-2 bis -5 waren in allen untersuchten Organen nachweisbar. Neu war auch, dass IGFBP-6 im Gehirn erstmals und deutlich nachzuweisen war. Ansonsten war IGFBP-6 in Milz, Lunge und Thymus vorhanden.

Alter 12 Wochen:**Abbildung 22:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-1, -5 und β -actin von 12 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM).

β -actin: 540 bp, IGFBP-1: 309 bp, IGFBP-5: 190 bp

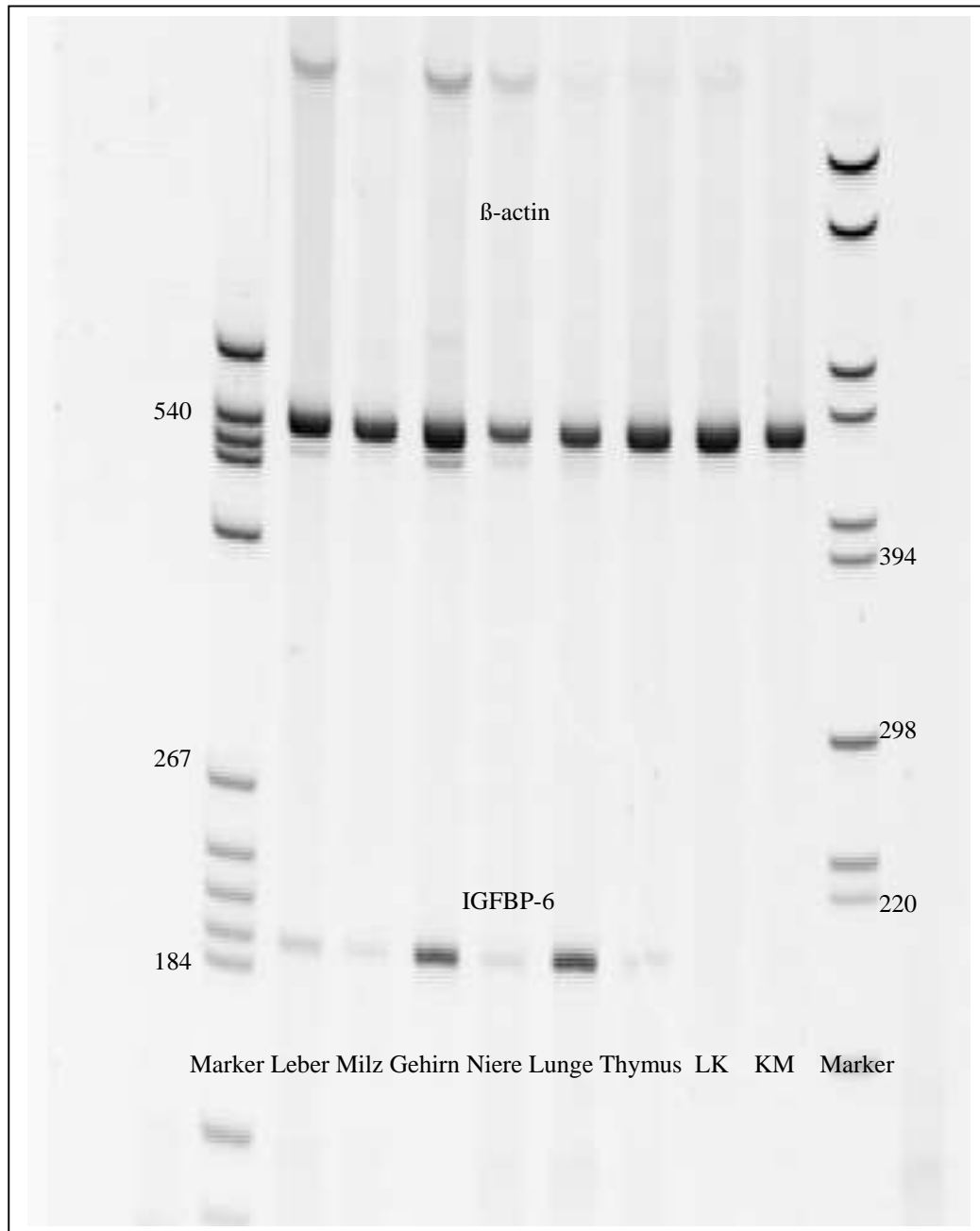
Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 23:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-2,-3,-4 und β -actin von 12 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM)

β -actin: 540 bp, IGFBP-2: 165 bp, IGFBP-3: 377 bp, IGFBP-4: 198 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

**Abbildung 24:**

Eingescanntes Polyacrylamid-Gel der PCR für IGFBP-6 und β -actin von 12 Wochen alten Mäusen mit den Organen: Leber, Milz, Gehirn, Niere, Lunge, Thymus, Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM)

β -actin: 540 bp, IGFBP-6: 191 bp

Marker: Fragmente definierter Länge zur Größenbestimmung

Auch bei den 12 Wochen alten Mäusen verglichen wir die Intensität der Banden densitometrisch mit dem internen Standard und bekamen folgende Werte, die wir zum besseren Verständnis graphisch darstellten:

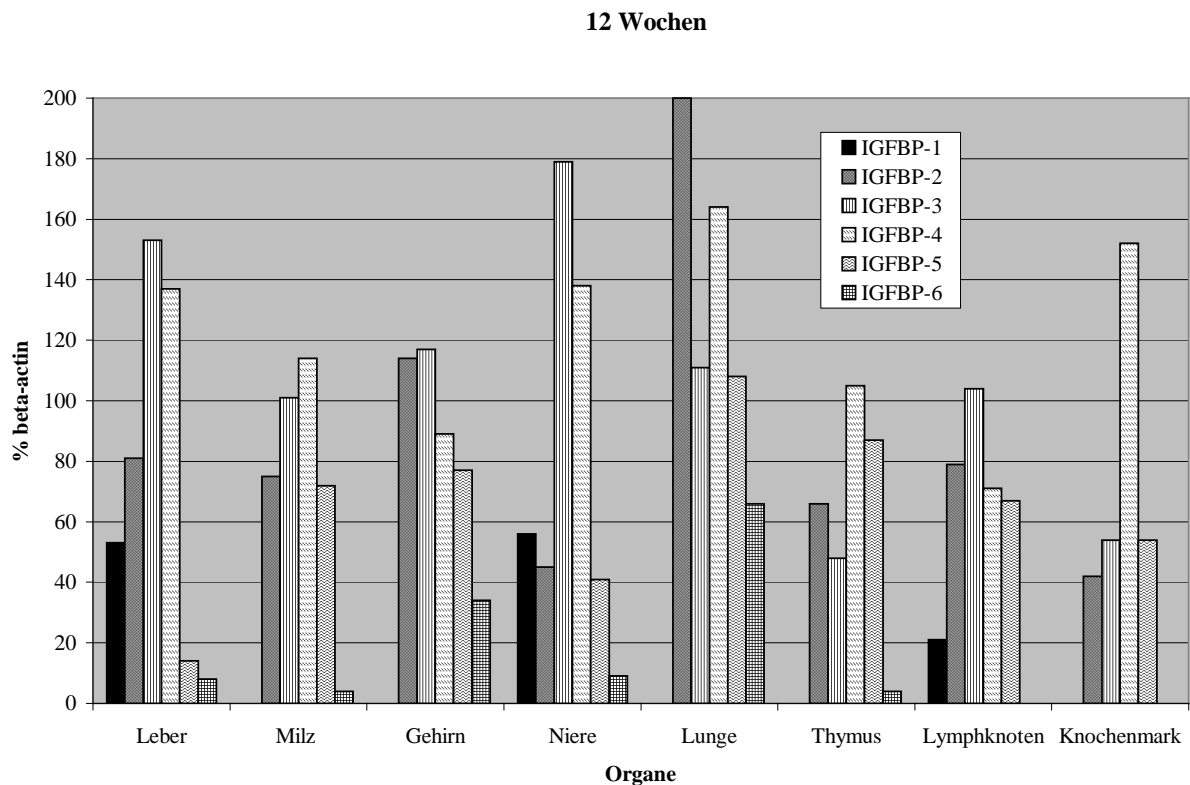


Abbildung 25:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse der verschiedenen IGFBPs für die untersuchten Organe bei 12 Wochen alten Mäusen. Werte ausserhalb des Schaubildes: Lunge- IGFBP-2: 200%

Es zeigte sich auch bei den 12 Wochen alten, also ausgewachsenen Mäusen, dass IGFBP-2 bis -5 in allen untersuchten Organen vorhanden waren. Lediglich IGFBP-1, das wir nur in Leber, Niere und Lymphknoten nachweisen konnten, sowie IGFBP-6, welches schwach in Leber, Milz, Niere und Thymus sowie mit kräftiger Expression in Gehirn und Lunge nachgewiesen werden konnte, zeigten sich nur in einzelnen Organen.

Von großem Interesse war für uns noch der Zeitverlauf. Deswegen stellten wir an dieser Stelle noch mal die Expression der IGFBPs jeweils relativ zu β -actin in den verschiedenen Organen über die Zeit dar.

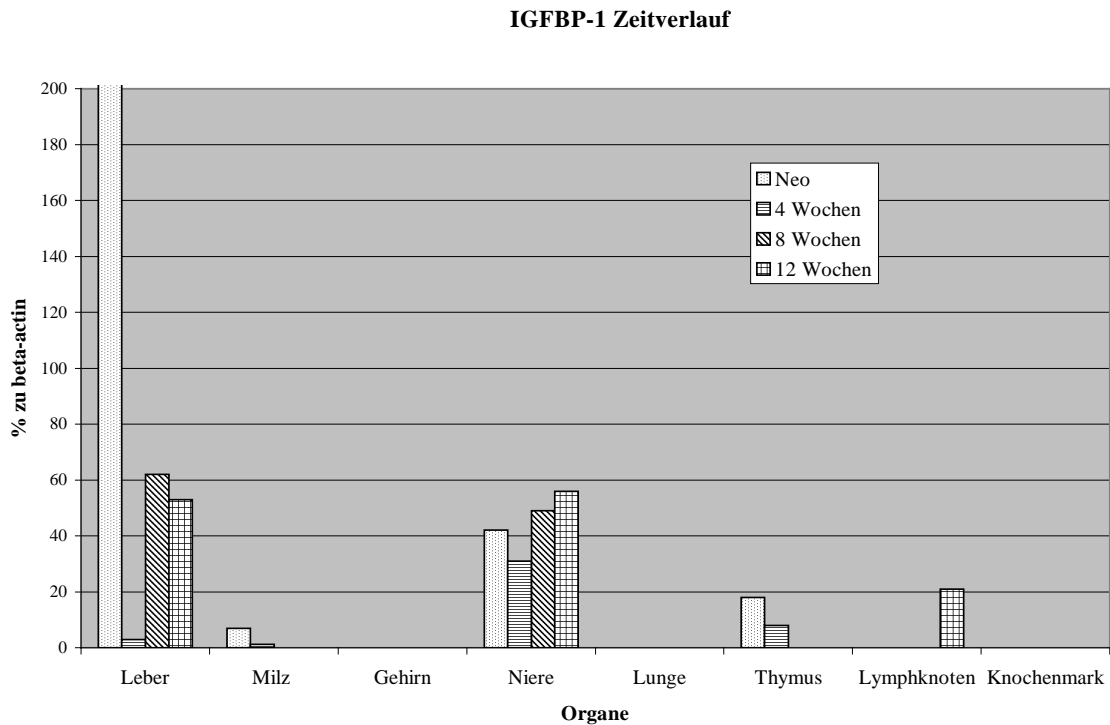
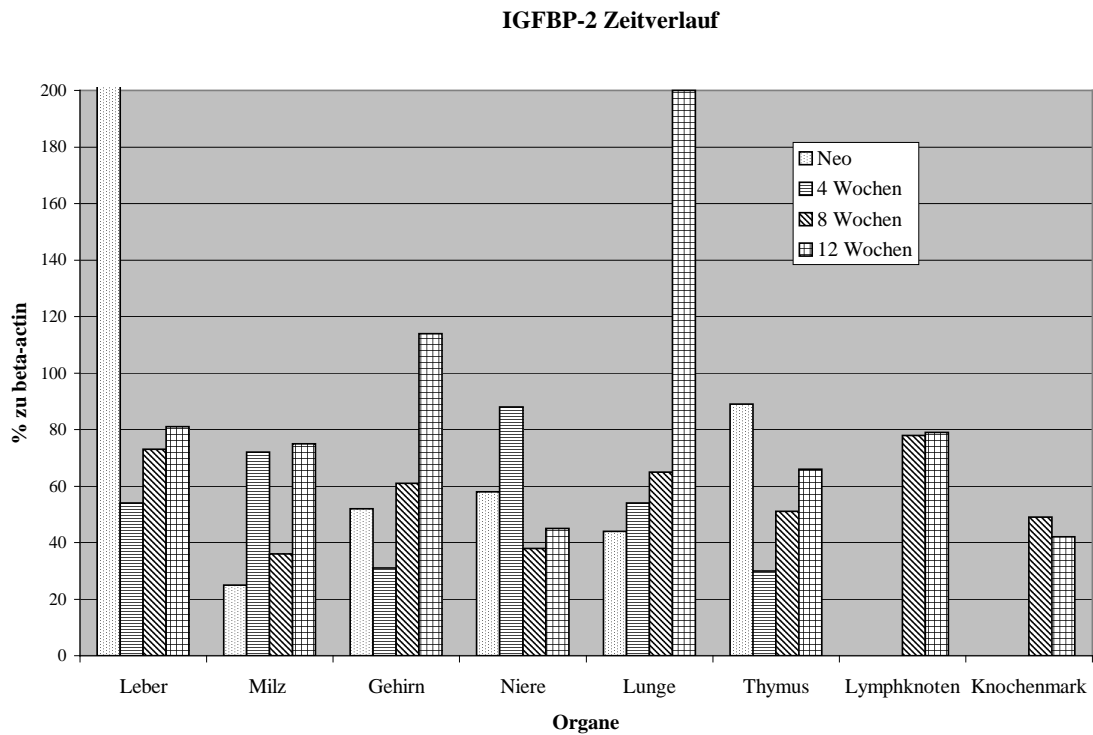


Abbildung 26:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGFBP-1 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen). Werte ausserhalb des Schaubildes: Leber Neugeborene: 352 %

Es zeigte sich, dass IGFBP-1 nur in Leber sowie Niere über den kompletten Untersuchungszeitraum hin nachweisbar war. In der Niere wurde es relativ konstant bei allen vier untersuchten Altersgruppen gebildet, während in der Leber nach der Neonatalzeit ein steiler Abfall darzustellen war. Die Werte bei 8 und 12 Wochen ergaben wieder mittlere Expressionsraten. In Milz und Thymus konnten wir mit 0 Wochen die höchsten Werte messen, die bei 4 Wochen bereits geringer und später gar nicht mehr vorhanden waren. In Gehirn, Lunge und Knochenmark war in den untersuchten Zeiträumen keine Expression von IGFBP-1-mRNA nachweisbar.

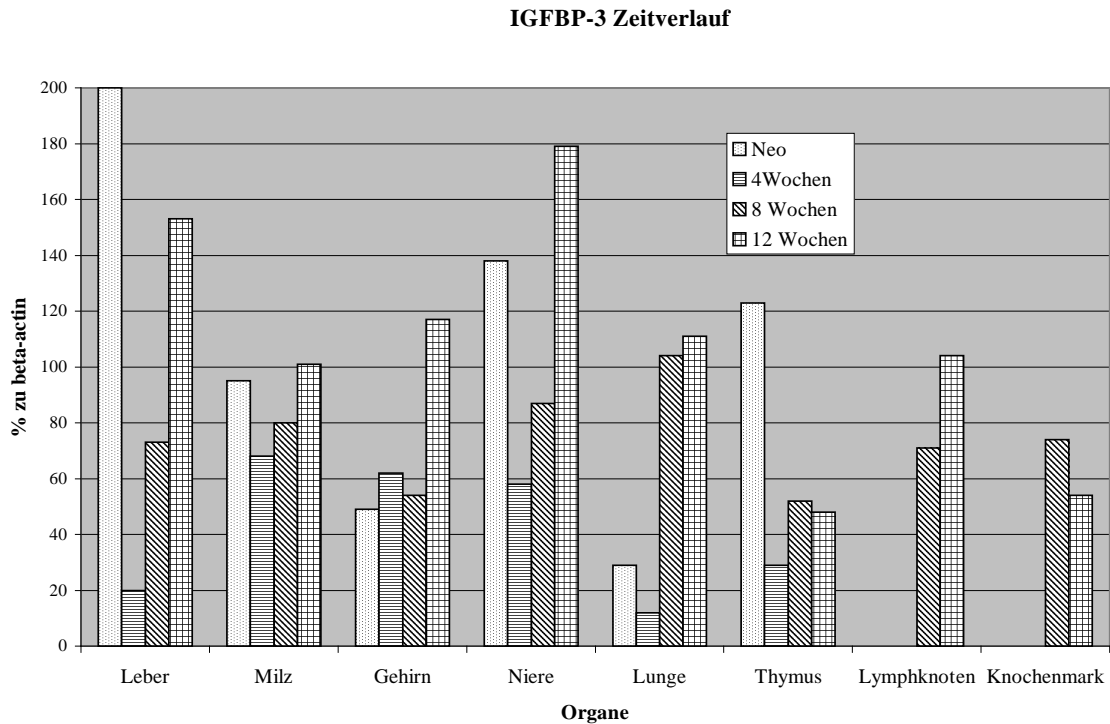
**Abbildung 27:**

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGFBP-2 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen).

Werte ausserhalb des Schaubildes: Leber-Neo: 240 %, Lunge-12 Wochen: 200 %

Im Gegensatz zu IGFBP-1 konnte eine Expression von IGFBP-2-mRNA in allen untersuchten Organen bei allen Altersgruppen festgestellt werden. In der Leber wurde auch hier während der Neonatalzeit ein Maximum nachgewiesen, das sich dann auf relativ konstante Werte einpendelte.

In der Lunge wie im Gehirn ergab sich ein Maximum bei den 12 Wochen alten Mäusen. Insgesamt erhielten wir für IGFBP-2 relativ konstante Werte, die etwa der Hälfte der für β -actin gemessenen Expressionen entsprach.

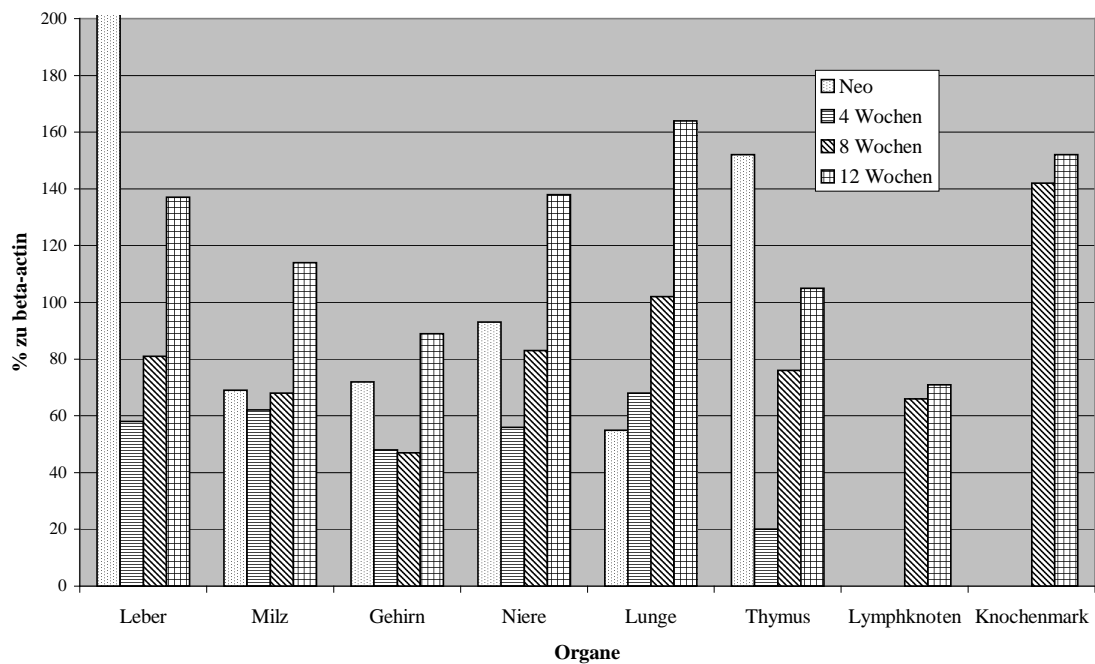
**Abbildung 28:**

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGF3 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen). Werte ausserhalb des Schaubildes: Leber-Neo: 200 %

IGFBP-3 war wie IGF2 in allen untersuchten Organen nachzuweisen. Prinzipiell waren die ermittelten Werte bei den neugeborenen sowie den 12 Wochen alten Mäusen am höchsten.

In der Leber zeigte sich ein deutlicher Abfall der Expression der IGF3-mRNA zwischen den 0 und 4 Wochen alten Mäusen, während anschließend ein erneuter Anstieg darzustellen war. In Milz und Gehirn zeigten sich relativ konstante Werte. In der Niere fanden wir ein Expressionsminimum bei 4 Wochen alten Mäusen, und ein Maximum bei den 12 Wochen alten. In der Lunge zeigten sich relativ geringe Werte bei 0 und 4 Wochen und konstant hohe Werte bei 8 und 12 Wochen. Im Thymus war ein Maximum bei den neugeborenen Mäusen festzustellen, sowie relativ niedrige Werte bei den älteren Mäusen.

IGFBP-4 Zeitverlauf

**Abbildung 29:**

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGFBP-4 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen). Werte ausserhalb des Schaubildes: Leber- Neo: 214 %

Auch IGFBP-4 war in allen untersuchten Organen nachweisbar. In Leber und Thymus fanden sich Maxima bei 0 Wochen sowie ein Abfall bei 4 Wochen. Ansonsten waren jeweils die im Alter von 12 Wochen pro Organ ermittelten Werte die Höchsten. Die Werte für IGFBP-4 waren für alle Organe relativ konstant und verglichen mit der β -actin-Expression meist knapp unter dieser.

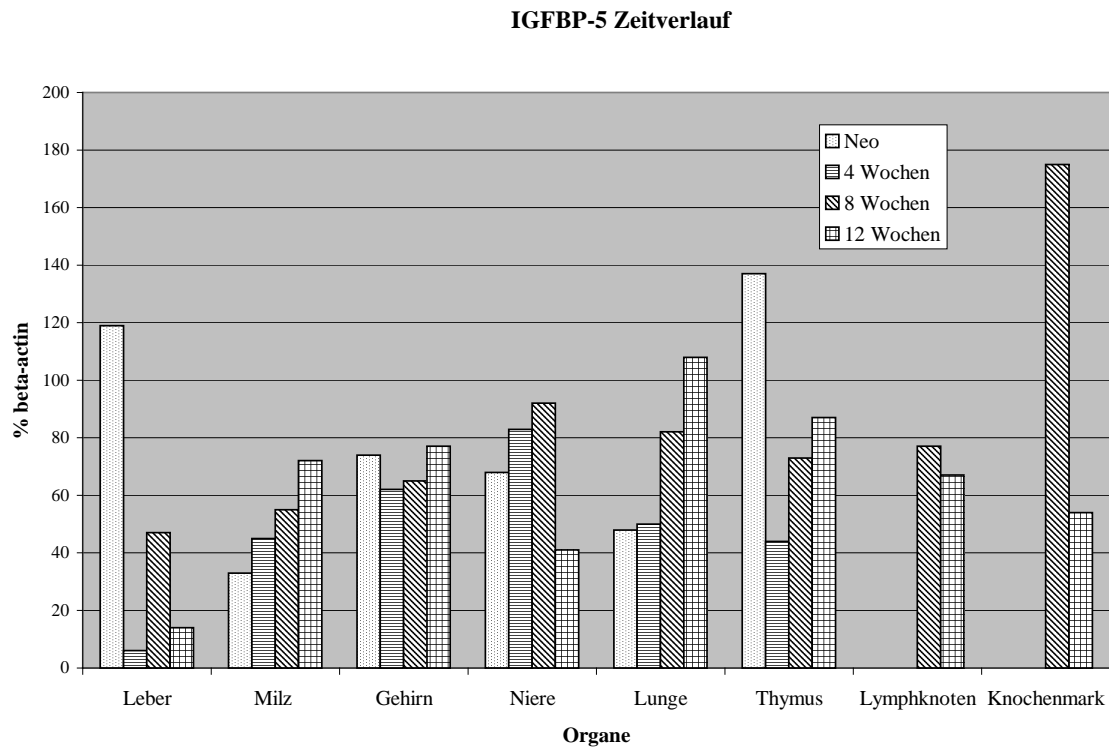
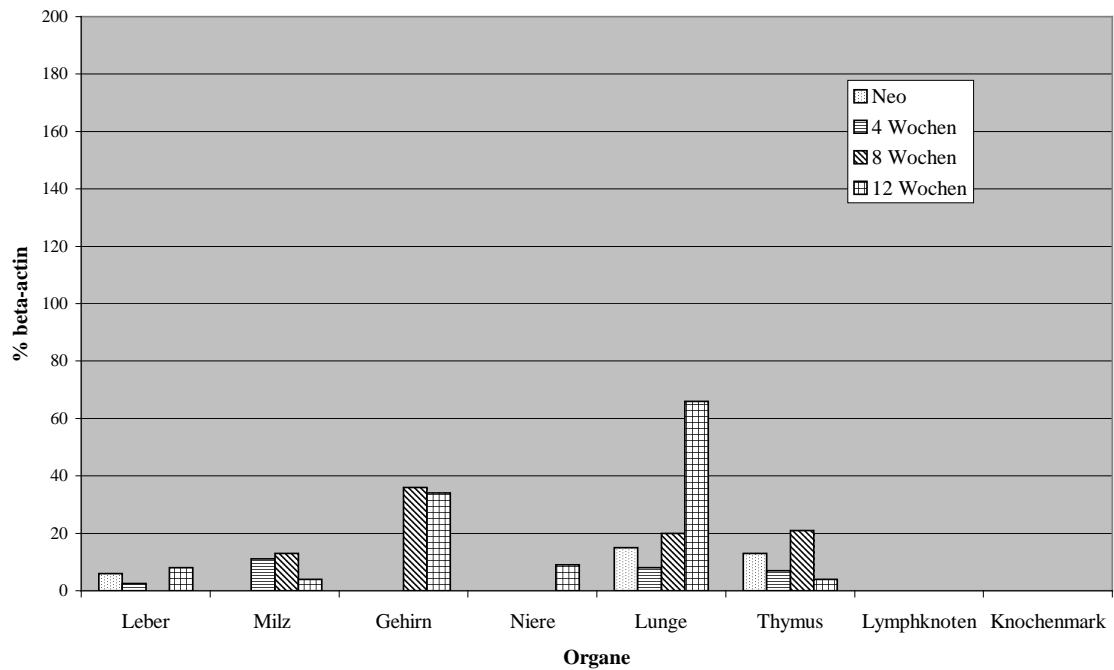


Abbildung 30:

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGFBP-5 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen).

Auch IGFBP-5 war in allen Zeiten in allen Organen nachweisbar. Insgesamt zeigte IGFBP-5 einen annähernd konstanten Spiegel in den einzelnen Organen mit einer relativ zu β -actin gesehen Expression von 40-80 %. Ausnahmen hierzu bildeten Leber, Thymus und Knochenmark mit einzelnen Höchstwerten.

IGFBP-6 Zeitverlauf

**Abbildung 31:**

Graphische Darstellung der relativ zu beta-actin densitometrisch gemessenen Werte der PCR-Ergebnisse von IGFBP-6 für die untersuchten Organe im Zeitverlauf (0, 4, 8, 12 Wochen).

IGFBP-6 wurde allgemein nur gering exprimiert. Die relativen Zahlen im Vergleich zu β -actin lagen meistens im einstelligen Prozentbereich. Nur bei den älteren Tieren konnten im Gehirn (8 und 12 Wochen) sowie in der Lunge (12 Wochen) deutliche Werte gemessen werden. In Lymphknoten und Knochenmark konnten wir es gar nicht nachweisen.

5. Diskussion

5.1 Etablierung der RT-PCR

Wie schon in der Einleitung beschrieben interessierte uns der Einfluss des IGF-Systems auf das lymphatische Gewebe. Als Voraussetzung hierfür mussten wir die Expression der IGF-BPs zunächst im Mausmodell in den verschiedenen Geweben, sozusagen als Leerwert, untersuchen. Da hierbei altersabhängige Schwankungen bekannt sind, untersuchten wir zusätzlich unterschiedliche Altersgruppen. Im Hinblick auf die zu erwartenden sehr geringen Probenmengen und die unterschiedliche Beschaffenheit der verschiedenen Gewebe erschien uns als Nachweismethode der IGF-BP-mRNA eine RT-PCR am geeignetsten.

Die allgemeinen Vorteile der PCR im Gegensatz zu anderen Nachweismethoden liegen auf der Hand. Sie ist deswegen nicht umsonst heute oftmals als Gold-Standard angesehen (65). Sie zeichnet sich bei geeigneter Primer-Wahl vor allem durch ihre hohe Sensitivität und zusätzlich durch ihre hohe Spezifität aus (65). Dadurch eignet sie sich auch für kleinste Probenmengen an DNA. Im Idealfall reicht ein Strang DNA, da dieser durch die PCR stark vermehrt wird. In unserem Falle war dies besonders wichtig bei der Bestimmung der Werte sowohl im Knochenmark als auch in den Lymphknoten. Ein weiterer entscheidender Vorteil der PCR ist die relativ einfache Handhabung und Auswertung, da sie ohne radioaktiv Substanzen oder aufwendige Feinschnitte, wie z.B. bei der In-situ-Hybridisierung, auskommt.

Der Hauptnachteil der PCR ist allerdings, dass schon durch geringste Verunreinigungen (z.B. durch Rest-DNA in Gefäßen oder Pipetten) falsche Ergebnisse erhalten werden, da diese mit amplifiziert werden können. Deshalb muss zum einen sehr sauber und sorgfältig gearbeitet werden und zum anderen empfiehlt es sich, die durchgeführte PCR mehrfach zu wiederholen.

Ein weiterer Nachteil vor allem der RT-PCR ist die doch recht eingeschränkte Aussagekraft im Bezug auf die Quantität. Zwar gibt es für die PCR mittlerweile verschiedene real-time quantitative PCRs wie zum Beispiel Taqman (65), jedoch sind diese für die RT-PCR nur begrenzt einsetzbar und standen ohnehin zum Zeitpunkt der Experimente in unserem Labor nicht zur Verfügung.

Der zentrale Schwachpunkt der RT-PCR ist die der PCR vorgeschaltete unpräzise Transkription durch die Reverse Transkriptase (RT). Während dieses Schrittes wird die mRNA der ursprünglichen Probe in cDNA umgewandelt, jedoch lediglich mit einer Rate zwischen 5 % und 90 %. Dieser Schritt ist sehr aufwändig und dennoch nur ungenau zu quantifizieren (65). Bei einer kompetitiven PCR, welche für jedes untersuchte DNA-Stück ein künstliches Vergleichsstück anderer Länge braucht, an das die Primer mit derselben Affinität binden, kann durch das Verhältnis der Amplifikate (Probe und Vergleichs-DNA) auf die Menge der ursprünglich untersuchten DNA rückgeschlossen werden. Jedoch ist im Hinblick auf die Ungenauigkeit der reversen Transkriptase nur eine Aussage darüber möglich, wieviel cDNA in die PCR eingebracht wurde und nicht über die ursprünglich eingebrachte Menge an mRNA. Außerdem macht die große Anzahl der verschiedenen Proben und Kontrollansätze (Verdünnungsreihen mit definierten Mengen der Vergleichs-DNA) diese Methode schwer praktikabel. Unsere Ergebnisse sind für die untersuchten Organe pro IGFBP meist aus einem, gemeinsamen Ansatz, so daß bei gleichen Bedingungen innerhalb dieses Ansatzes auch von einer relativ konstanten Umwandlungsrate der RT ausgegangen werden kann.

Zur Optimierung der quantitativen Aussagekraft setzten wir ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen ein. Diese, als interner Standard gewählte Vergleichs-mRNA, unterliegt aber ebenfalls metabolischen Schwankungen und ist somit nur bedingt als Kontrolle zu gebrauchen. Im Falle des von uns gewählten bis dahin allgemein anerkannten β -actin ist zum Beispiel mittlerweile bekannt, dass die Menge der mRNA in sich teilenden Zellen beträchtlich schwanken kann (66-69). Eine von Selvey et al veröffentlichte Studie hierzu aus dem Jahr 2001 (67) erschien erst nachdem unsere Versuchsreihen bereits abgeschlossen waren. Insgesamt haben jedoch alle genutzten

„Housekeeping“-Gene solche Schwächen und wir hatten in unserer Forschungsgruppe gute Erfahrungen im Umgang und hinsichtlich der Ergebnisse mit β -actin.

Die von uns gewählte Taq-Polymerase ist weitläufig etabliert und wurde auch in unserem Labor mehrfach erfolgreich eingesetzt. Sie hat eine gute Syntheserate von 2800 Nucleotiden/min bei einem Temperaturoptimum von 74 °C und den Vorteil, dass sie bei niedrigen Temperaturen noch eine gute Restaktivität aufweist, ohne jedoch Primer und/oder Produkt zu zerstören.

Zusammenfassend muss man jedoch, hinsichtlich der kleinen Anzahl der Versuchstiere und der oben beschriebenen Gesichtspunkte, insbesondere der Ungenauigkeit des von uns gewählten Housekeeping Genes alle relativ dazu gemessene Ergebnisse mit einem gewissen Vorbehalt ansehen. Lediglich sicher negative Ergebnisse und Ergebnisse mit sehr starker Expression können als wirklich aussagekräftig angesehen werden, Ergebnisse mit nur geringer Expression können zwar wegen der hohen Spezifität als Nachweis der jeweiligen IGFBP-mRNA gesehen werden, müssen aber mit sehr großem Vorbehalt vor allem Hinsichtlich der Quantität interpretiert werden. Trotzdem werden wir diese im Folgenden vorsichtig diskutieren.

5.2 Diskussion der PCR-Ergebnisse

Zur Vereinfachung der Diskussion haben wir

1. die einzelnen IGFbps der Reihenfolge nach abgehandelt.
2. eine kurze Zusammenfassung über das jeweilige IGFbp allgemein vorangestellt und
3. die Ergebnisse anderer Studien mit den unseren zunächst in Tabellenform verglichen, wobei die Einteilung der Symbole für unsere Ergebnisse so wie die Übertragung der Ergebnisse aus der Literatur frei, jedoch, auch mit Hintergrund der oben besprochenen Ungenauigkeiten, relativ grob gewählt wurde.

Allgemein: Ein durchgängiges Problem für uns waren die niedrigen β -actin-Expressions-Werte bei den neugeborenen Mäusen. Wir führten dies auf die bekannten Schwankungen der β -actin-Synthese in proliferierenden Zellen zurück (66-69). Die in Relation dazu gesehenen IGFbp-Expressionen erschienen dadurch sehr hoch. Des Weiteren gab es weder Artikel, die etwas über die IGFbp-Expression in Lymphknoten oder Knochenmark aussagten, noch Daten, in denen Expressionsverläufe der IGFbps im Menschen außerhalb der Embryonalzeit dargestellt waren. Dadurch fiel uns eine Interpretation der Daten der beiden obengenannten Organe sowie eine Übertragung der Daten auf den Menschen schwer. Zusätzlich ergab sich das Problem, dass wir aus präparationstechnischen Gründen Knochenmark und Lymphknoten erst aus 8 bzw. 12 Wochen alten Tieren gewinnen konnten.

IGFBP-1

Die Hauptproduktionsorte für IGFBP-1 sind außer Leber noch Niere und Dezidua (10), aber auch andere Gewebe können IGFBP-1 produzieren. Der Spiegel ist von der Tageszeit und vom Ernährungszustand abhängig (70,71). Nach dem Essen sinkt der IGFBP-1-Spiegel deutlich ab und steigt während Fastenzeiten auf Höchstwerte an (11). Außer von den oben genannten Faktoren wird der IGFBP-1-Spiegel auch von verschiedenen Hormonen und Zytokinen beeinflusst. Insulin wirkt z.B. hemmend (11,53,72-74) auf die Synthese von IGFBP-1 während Glukagon, Glukokortikoide (11) sowie TNF- α , IL-1 β und IL 6 die Produktion von IGFBP-1 stimulieren (30,75-78). IGFBP-1 liegt in unterschiedlichen Formen vor. Phosphoryliert hemmt es die IGF-I-Wirkung, während es nicht phosphoryliert die Wirkung verstärkt. Anscheinend unterstützt IGFBP-1 die IGF-I-Wirkung über zwei unterschiedliche Wege: Zum einen bewirkt es über ein langsames und gleichmäßiges Freisetzen von IGF-I einen gleichbleibend konstanten Spiegel, zum anderen verstärkt es zumindest in vitro die Wirkung von IGF-I am Rezeptor (12,13).

Die Wirkung von IGF zusammen mit IGFBP-1 bei der Wundheilung übertrifft die Wirkung von IGF alleine, vor allem zusammen mit dem Integrin-Rezeptor ($\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor), an den IGFBP-1 über eine RGD-Sequenz bindet (9,79).

Eine weitere Funktion des IGFBP-1 scheint der Transport von IGF durch Kapillarmembranen und von intra- nach extrazellulär und umgekehrt zu sein.

Tabelle 1: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-1-Daten mit der Literatur

Schuller et al, Lindbergh-Kortleve et al: Maus; Babajako et al: Ratte; Cerro et al: Ratte und Maus; Liu et al: Rhesus-Affe: ++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar; Leerfeld: nicht untersucht

Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β -actin; +: < 100 % β -actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar;

IGFBP-1	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK					
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12				
Schuller et al (64)	+				-				-				-				-															
Cerro et al (80)	+			+													+	±														
Liu et al (81)	+			+																												
Babajako et al (82)	+			±																												
Lindbergh-Kortl. (83)													±																			
Eigene Daten	+	±	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	-	+		

Wie unten nochmals ausführlich beschrieben, konnten wir in Gehirn, Lunge, Thymus und Knochenmark kein IGFBP-1 nachweisen, bekamen aber gute Ergebnisse in Leber, Knochenmark und Niere, sowie schwache Signale in der Milz.

Wir fanden in der Leber in unseren Untersuchungen eine sehr starke Expression von IGFBP-1 in den ersten Lebensstunden (s. Abb. 26). Diese könnte zum Teil auf eine erstaunlich geringe β -actin-Expression in der Leber der neugeborenen Mäuse zurückzuführen sein (s. Abb. 11), was durch die bekannten Schwankungen in proliferierenden Geweben erklärbar ist (68). Anschließend haben wir ein Minimum bei den vier Wochen alten Mäusen gefunden. Bei älteren Mäusen war nochmals ein kleiner Rückgang zu dokumentieren. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Cerro et al (80) und Babajako et al (82) bei der Ratte, sowie von Liu et al (81) beim Rhesus-Affen überein, die alle einen Rückgang der IGFBP-1-Expression in der Leber von sehr hohen

Werten in der Neonatalzeit zu niedrigen Werten in der Adoleszenz beschreiben.

Schuller et al (64) beschreiben ebenfalls bei der Maus einen Rückgang des mRNA-Levels für IGFBP-1 in der Leber.

Wie in Abb. 11 gut zu sehen, fanden wir in der Milz nur bei den neonatalen sowie 4 Wochen alten Mäusen eine sehr geringe Expression von IGFBP-1-mRNA. Bei den älteren Mäusen konnten wir keine IGFBP-1-mRNA nachweisen. Schuller et al fanden ebenfalls bei adulten Mäusen keine mRNA von IGFBP-1 in der Milz.

Wie von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (64,81,82), konnten wir im Gehirn, im Knochenmark und auch in der Lunge der Maus keine IGFBP-1-mRNA nachweisen (s. Abb. 26).

Lindenbergh-Kortleve et al (83) beschrieben einen schwachen Nachweis von IGFBP-1-mRNA in der Mausniere. Schuller et al (64) konnten bei erwachsenen Mäusen keine IGFBP-1-mRNA in der Niere nachweisen. Im Gegensatz dazu wiesen jedoch Cerro et al (80) in der Niere von adulten Ratten IGFBP-1-mRNA nach. Wir fanden in allen Altersgruppen eine konstante IGFBP-1-mRNA Aktivität (s. Abb. 26).

Im Thymus konnte nur bei den 0 und 4 Wochen alten Mäusen eine Expression von IGFBP-1-mRNA festgestellt werden und diese auch nur in geringem Ausmaß (s. Abb. 26). Dies könnte darauf hindeuten, dass IGFBP-1 etwas mit der Reifung des Thymus und der Milz, also möglicherweise des lymphatischen Systems zu tun haben könnte. Zusätzlich fanden wir eine IGFBP-1-mRNA Expression in Lymphknoten bei 12 Wochen alten Tieren.

Insgesamt fanden wir eine gute Übereinstimmung mit den bisher publizierten Daten aus der Literatur.

IGFBP -2

Der IGFBP-2-Spiegel ist im Laufe des Tages vom Ernährungszustand, dem Insulinspiegel, wenn auch in schwächerem Maße als IGFBP-1 (14), vom Metabolismus des Körpers, sowie wahrscheinlich von verschiedenen Hormonen, z.B. GH, abhängig. Obwohl GH scheinbar keinen direkten Einfluß auf den IGFBP-2-Spiegel zu haben scheint, werden in vivo bei GH-Insuffizienz erhöhte IGFBP-2-Spiegel gefunden

(11,15). Als ein weiterer Hinweis auf eine Steuerung von IGFBP-2 durch Mediatoren wurde in Neuroblastomzellen eine Verringerung der IGFBP-2-Produktion durch Vitamin A beschrieben (84).

Bisher ist unklar, ob die in vitro erhöhten IGFBP-2-Spiegel in aktivierten T-Lymphozyten (63) nur einen wachstumsstimulierenden Effekt oder weitere Funktionen haben.

Reduzierte Proteinaufnahme erhöht den IGFBP-2-Spiegel mehr als allgemeines Fasten (71). Erhöhte IGFBP-2-Spiegel sind bei Unterernährung und Anorexia nervosa beschrieben worden. Im Verlauf des Lebens verändert sich der IGFBP-2-Spiegel ebenfalls. Er ist bei Kindern relativ hoch, erreicht bei jungen Erwachsenen ein Minimum um dann im Alter wieder anzusteigen.

IGFBP-2 wird im Körper weder glykolysiert noch phosphoryliert und wird in allen Körperflüssigkeiten gefunden. Hierbei ist der IGFBP-2-Spiegel im Seminal-Plasma der höchste und IGFBP-2 ist durch die Produktion in neuralem Gewebe das Haupt-IGFBP im Liquor (84).

Ein direkter Zellkontakt von IGFBP-2 ist über Glykosaminglykane möglich. Weiter konnte gezeigt werden, dass IGFBP-2 eine heparinbindende Domäne hat (85).

IGFBP-2 enthält wie IGFBP-1 eine RGD-Sequenz, die eine Bindung an einen Integrin-Rezeptor ermöglichen würde. Eine solche Bindung ist aber bisher nicht nachgewiesen (86).

Die Funktion des IGFBP-2 ist nach wie vor relativ unerforscht. Im Falle eines Verlustes von IGFBP-2 ist der Körper sehr gut in der Lage dies zu kompensieren, wie Versuche an Knockout-Mäusen, die phenotypisch unauffällig waren, gezeigt haben (18). Jedoch fanden sich in solchen Mäusen eine größere Leber und eine kleinere Milz, sowie erhöhte IGFBP-1, -3, und -4 Level (87). Eine mögliche Funktion ist der Transport von IGF-I durch Zellmembranen. Ein wachstumssteigernder Effekt von IGFBP-2 wurde für Prostata-Carzinomzelllinien in vitro gezeigt (19). In vivo wurden in Prostata-Carzinomen bis zu dreifach der Norm entsprechende IGFBP-2-Spiegel (16) und bei verschiedenen ZNS-Tumoren erhöhte Spiegel von IGFBP-2 im Liquor gemessen (17).

Tabelle 2: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-2 Daten mit der Literatur

Schuller et al, Lindbergh- Kortleve et al: Maus; Babajako et al, Chernausek et al, Van de Wetering et al: Ratte; Liu et al: Rhesus-Affe: ++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar; Leerfeld: nicht untersucht

Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β -actin; +: < 100 % β -actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar

IGFBP-2	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK			
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12		
Schuller et al (64)	++				+				+				+				++													
Babajako et al (82)	+																													
Chernausek (88)									+			+																		
Van de Weter. (89)																				±										
Liu et al (81)	+			±																										
Lindbergh-Kortl. (83)													+																	
Eigene Daten	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Im Gegensatz zum IGFBP-1 konnten wir das IGFBP-2 (s. Abb. 27) in allen Organen und zu allen Zeiten mit, verglichen zu β -actin, relativ konstanter Stärke nachweisen. Bei IGFBP-2 fanden wir in der Leber ebenfalls ein Maximum zum Zeitpunkt der Geburt. Die Werte der anderen Altersgruppen zeigten mit zunehmendem Alter einen leichten Anstieg. Dies stand scheinbar im Gegensatz zu Liu et al (81) und Babajako et al (82) die einen Abfall der IGFBP-2-mRNA Spiegel von den Neugeborenen zu den Adoleszenten hin beim Rhesus-Affen wie bei der Ratte beschrieben. Jedoch sind in beiden Publikationen nur neugeborene und ausgewachsene Tiere untersucht worden. Wenn wir nur diese Werte vergleichen, stimmen unsere Ergebnisse mit denen dieser Forschungsgruppen überein. Schuller et al (64) beschreiben bei Mäusen eine starke

IGFBP-2-mRNA-Aktivität in der Leber 3 Tage nach der Geburt mit einem raschen Rückgang im weiteren Verlauf auf einen relativ konstanten Level. Das entspricht in etwa den von uns ermittelten Werten.

Die IGFBP-2-mRNA-Spiegel in der Milz bei den 4 und 12 Wochen alten Mäusen sind annähernd identisch, während bei Neugeborenen der Niedrigste von uns gemessene Level von IGFBP-2-mRNA in allen untersuchten Organen überhaupt zu verzeichnen war (s. Abb. 27). Der Spiegel bei den 8 Wochen alten Mäusen war etwa halb so groß wie der von 4 oder 12 Wochen alten Mäusen. Schuller et al (64) wiesen IGFBP-2 in der Milz nach, untersuchten aber leider keine altersabhängige Verteilung.

Chernausk et al (88) beschreiben eine deutliche Expression von IGFBP-2-mRNA in Zellen des neuronalen Systems der Ratte mit ansteigenden Leveln im Laufe des Lebens. In Einklang hiermit fanden wir in allen Altersgruppen ein deutliches Signal für IGFBP-2-mRNA im Gehirn, wobei wir ein Minimum bei 4 Wochen alten Tieren fanden. Insgesamt zeigte sich jedoch ein deutlich ansteigender Trend (s. Abb. 27) mit einem Maximum bei 12 Wochen. Schuller et al (64) fanden ebenfalls ein deutliches Signal für IGFBP-2-mRNA im Mäusegehirn.

Dieselbe Forschungsgruppe fand in der Niere bei erwachsenen Mäusen eine deutliche Expression von IGFBP-2-mRNA. Lindenbergh-Kortleve et al (83) beschreiben einen nachgeburtlichen Rückgang von IGFBP-2-mRNA in der Niere der Maus, untersuchten jedoch nur Mäuse bis zum 14. Lebensstag. Wir fanden in der Niere für IGFBP-2 ein Maximum bei 4 Wochen alten Mäusen bei sonst durchschnittlichen Werten (s. Abb. 27). Im Gegensatz zu van de Wetering et al (89), die einen relativ niedrigen Level von IGFBP-2-mRNA in der Lunge von ausgewachsenen Mäusen fanden, bekamen wir ein deutliches Maximum bei 12 Wochen alten Mäusen, was den Ergebnissen von Schuller et al (64) entspricht, die in der Lunge große Mengen IGFBP-2 nachweisen konnten. Während die Werte von der Geburt an ständig gleichmäßig in kleinen Schritten anzusteigen schienen, verdreifachte sich der Level der IGFBP-2-mRNA zwischen der achten und der zwölften Lebenswoche.

Wir fanden im Thymus erwartungsgemäß auch beim IGFBP-2 ein Maximum für den neonatalen Wert. Der niedrigste Wert wurde für die 4 Wochen alten Tiere bestimmt mit anschließend wieder ansteigenden Leveln. (s. Abb. 27). Leider gibt es zu IGFBP-2 keine präzisen Daten von Kecha et al (90), sodass ein Vergleich nicht möglich ist.

Im Knochenmark und in Lymphknoten konnten wir IGFBP-2-mRNA mit mittleren Expressionswerten nachweisen.

Zusammenfassend sahen wir die von uns ermittelten Werte durch die bisher vorhandene Literatur bestätigt.

IGFBP-3

Der IGFBP-3-Spiegel ist im Tagesverlauf relativ konstant (11,70,71) und wird hauptsächlich über GH (11,91) auf drei verschiedene Arten reguliert: 1. direkt (92), 2. über IGF (93) und 3. über aktiviertes Gewebe. Weitere Regulatoren sind IL-1, TNF α , TGF β und andere (94-96).

IGFBP-3 ist das am meisten gebildete IGFBP. Sein Spiegel zeigt im Laufe des Lebens ein Maximum während der Pubertät (53,97). Das Hauptreservoir für IGFBP-3 im Körper ist die Leber (21). Dort wird es hauptsächlich von Endothel und Kupferzellen gebildet (22,23).

IGFBP-3 spielt eine wichtige Rolle als IGF-Regulator und -Reservoir. Es wird angenommen, dass es als Haupttransportprotein der IGFs deren Spiegel über eine langsame, gleichmäßige Freisetzung konstant hält und somit Hypoglykämien verhindert (20,98). IGFBP-3 bindet die IGFs zusammen mit einem als ALS (= acid labile subunit) bezeichnetem Glykoprotein mit einer Größe von 150 kd. Durch die Bindung von freiem IGF und dem Umstand, dass IGF-I eine höhere Affinität zu IGFBP-3 als zum IGF-Rezeptor hat (98), verhindert IGFBP-3 eine „Down“-Regulierung des IGF-I-Rezeptors (20). Umgekehrt schützen die IGFs das gebundene IGFBP-3 vor Proteolyse (99).

Eine weitere Aufgabe des IGFBP-3 scheint die Direktionierung der IGFs zu den Geweben zu sein, in denen es gebraucht wird (100). In jüngster Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass IGF zusammen mit IGFBP-3 zum Nukleus transportiert wird. Dies gilt als Hinweis, dass eine direkte Genregulation von IGF und IGFBP-3 ausgeht (24).

Die Wirkung von IGFBP-3 zusammen mit den IGFs ist gewebespezifisch potenzierend oder inhibierend. Einen besonderen Effekt scheint IGFBP-3 bei der Wundheilung zu spielen. Es wurde gezeigt, dass die Wundheilung mit IGF-I und IGFBP-3 zusammen den Effekt des IGF-I alleine um ein vielfaches übertrifft (25,100). Zudem wurde beschrieben, dass bei wachstumsgestörten Ratten der Effekt von IGF-I mit IGFBP-3 deutlich stärker war als der von IGF-I alleine (100).

Die IGF-unabhängigen Effekte von IGFBP-3 sind vielseitig. In vitro hemmt IGFBP-3 allein (25) Zellwachstum und vermittelt Apoptose in Fibroblastenkultur. Des Weiteren scheint die TGF- β - sowie Vitamin-A-induzierte Apoptose über IGFBP-3 zu laufen (26,96,101,102).

In vivo wurde gezeigt, dass die subkutane Injektion von IGFBP-3 bei Mäusen mit Colocarzinom die Splenomegalie reduzieren und die Lebermetastasierung verlangsamen konnte (103). Auch gibt es Hinweise, dass ein niedriger IGFBP-3-Spiegel bei hohem IGF-Spiegel ein Indikator für ein erhöhtes Colocarzinom Risiko darstellt. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass IGFBP-3 an östrogenrezeptornegative Mammacarcinomzellen (27,28) wie auch an Prostatacarcinomzellen über Oberflächenproteine bindet (26). Dies legt die Vermutung eines eigenen IGFBP-3-Rezeptor nahe. Auch beim nichtkleinzelligen Lungencarcinom konnte eine Tumor zerstörende Wirkung über Apoptose für IGFBP-3 nachgewiesen werden (104).

Tabelle 3: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-3-Daten mit der Literatur

Schuller et al, Lindbergh- Kortleve et al: Maus; Van de Wetering et al: Ratte; Cerro et al: Ratte und Maus; Liu et al: Rhesus-Affe: ++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar; Leerfeld: nicht untersucht

Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β -actin; +: < 100 % β -actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar

IGFBP-3	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK	
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12
Schuller et al (64)	+				+				±				++				+											
Cerro et al (80)				+								±				+				+								
Liu et al (81)	±			+																								
Van de Weter. (89)																	+			+								
Lindbergh-Kortl. (83)													±	+														
Eigene Daten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+

IGFBP-3 (s. Abb. 28) konnten wir ebenfalls in allen von uns untersuchten Organen nachweisen, mit teilweise erheblichen Unterschieden der Expressierung zwischen den verschiedenen Altersgruppen.

Bei unseren Untersuchungen zeigte sich auch beim IGFBP-3 ein Maximum an mRNA-Expression in der Leber zum Zeitpunkt der Geburt. Der 4-Wochen-Wert war im Vergleich dazu sehr niedrig. Bei 8 und 12 Wochen fand sich ein deutlicher Anstieg der Expressierung. Liu et al (81) beschrieben bei Rhesus-Affen einen stetigen Anstieg von der Geburt bis zur Adoleszenz hin. Auch Schuller et al (64) berichten ähnliche Ergebnisse bei der Maus mit eher geringen Werten bei Geburt und Cerro et al (80) wiesen ebenfalls IGFBP-3-mRNA bei Mäusen wie bei Ratten in der Leber nach. In der Milz ermittelten wir für IGFBP-3 durchschnittliche Werte. Ein bei Geburt durchschnittlicher Wert senkte sich auf ein Minimum bei 4 Wochen und stieg bis zum

12-Wochen-Wert, der ungefähr wieder den 0-Wochen-Wert entsprach an (s. Abb. 28). Schuller et al (64) wiesen IGFBP-3-mRNA in der Mäuse Milz nach, ohne jedoch auf Altersunterschiede zu achten.

Im Gegensatz zu selbiger Forschungsgruppe, die wie Cerro et al (80) für IGFBP-3 im Gehirn der Maus nur ein schwaches Signal erhalten haben, bekamen wir über alle 4 Zeitpunkte hinweg ein etwa gleich starkes Signal für IGFBP-3-mRNA. Das Maximum, das wir bei 12 Wochen fanden, war jedoch deutlich stärker als die anderen ermittelten Werte und relativ gesehen ähnlich hoch wie der Wert für IGFBP-2 (s. Abb. 27/28).

Wir bekamen in der Niere sehr starke Signale für IGFBP-3-mRNA für die Neonatalzeit sowie auch ein absolutes Maximum bei den 12 Wochen alten, adulten Tieren, das fast doppelt so stark war wie das verglichene Signal für β -actin. Die Werte für die 4 und 8 Wochen alten Tiere betrug nur etwa die Hälfte der Werte für 0 und 12 Wochen (s. Abb. 28). Schuller et al (64) und Cerro et al (80) beschrieben im Einklang mit unseren Daten eine starke Expression von IGFBP-3-mRNA bei adulten Mäusen. Lindenbergh-Kortleve et al (83) beschrieben wiederum einen starken Anstieg der IGFBP-3-mRNA Expression unmittelbar nach der Geburt, der unterschiedlich ist zu unseren Daten. Allerdings zeigt sich eine Schwierigkeit beim Vergleich der Ergebnisse, da unsere Altersabstände mit 4 Wochen möglicherweise relativ groß gewählt wurden und somit sehr kurzfristige Schwankungen nicht oder nur zum Teil erfaßt werden konnten.

Wir fanden in der Lunge eine deutlich höhere Expression der IGFBP-3-mRNA nach 8 und 12 Wochen, als in den Organen der neugeborenen oder 4 Wochen alten Tiere (s. Abb. 28). Das ist ein Gegensatz zu den Ergebnissen von van de Wetering et al (89), die bei der Ratte einen Rückgang der IGFBP-3-mRNA-Expression von der Geburt an bis zur Adoleszenz beschreiben. Allerdings wurden keine Zwischenwerte angegeben, sodass ein Verlauf nicht nachvollziehbar ist. Auch ist das genaue Alter seiner adoleszenten Ratten nicht definiert.

Auch im Thymus fand sich ein Maximum bei den neonatalen Mäusen, während die Werte der älteren Tiere deutlich niedriger waren. Dies ließ sich mit der Funktion des Thymus in der Kindheit und seiner Degeneration während des Heranwachsens vereinbaren.

Im Knochenmark wie auch in Lymphknoten fanden wir bei den 8 und 12 Wochen alten Tieren eine mittlere Expression der IGFBP-3-mRNA. Daten aus der Literatur gibt es hierzu keine.

Verglichen mit den bisher beschriebenen IGFBP-3 ist die gefundene Literatur für IGFBP-3 nicht einheitlich. Dies machte einen Vergleich unserer Daten schwer. Mit den oben beschriebenen Einschränkungen stimmten die Daten aus der Literatur jedoch mit den von uns ermittelten Ergebnissen überein. Hierbei zeigte sich erstmalig, dass die Einteilung für die unterschiedlichen Stärken der Expression bei uns möglicherweise mit zu großen Abständen gewählt wurde, wobei eine engere Wahl schon allein durch die Ungenauigkeit der Ergebnisse nicht gerechtfertigt wäre.

IGFBP-4

Das IGFBP-4 sowie seine Wirkungen sind bisher wenig erforscht. Man weiß, dass seine Konzentration alters- und GH-abhängig ist und wie bei allen IGFBP-4 durch Proteasen reguliert wird (41,105). Im Knochengewebe wird IGFBP-4 über Vitamin D und Parathormon reguliert.

IGFBP-4 wird durch verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten, Prostata- und Knochenzellen aber auch von Neuroblastomzelllinien produziert (29) und ist in allen Körperflüssigkeiten enthalten (30). In Neuroblastomzellen läßt sich die IGFBP-4-Produktion durch Vitamin A inhibieren (8).

IGFBP-4 ist das einzige rein inhibitorische IGFBP. Durch die Bindung an IGF mit hoher Affinität wird eine Bindung der IGFs an den IGF-Rezeptor verhindert (14).

IGFBP-4 ist in vivo ein IGF-Antagonist (31) und bindet von IGF unabhängig an die Zellmembran (32).

In vitro konnte eine vermehrte Apoptoserate in Prostatatumorzelllinien sowie eine Verlangsamung des Tumorwachstums durch IGFBP-4 gezeigt werden (33). Nach der Transfektion von IGFBP-4 in die Colocarzinomzelllinie HAT-29 kam es in diesen Zellen zu einem signifikanten Wachstumsrückgang (34). An biologischen Effekten verschiedener Organsysteme wurde beschrieben, dass IGFBP-4 die Steroidsynthese im Ovar (106) sowie die Differenzierung in Myoblasten reduziert (35,36).

Tabelle 4: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-4-Daten mit der Literatur

Schuller et al, Lindbergh- Kortleve et al: Maus; Chernausek et al; Van de Wetering et al: Ratte; Cerro et al: Ratte und Maus; Kecha et al: Mensch: ++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar; Leerfeld: nicht untersucht
Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β -actin; +: < 100 % β -actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar

IGFBP-4	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK	
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12
Schuller et al (64)	++				++				+				+				++											
Cerro et al (80)				+								+				+				+								
Chernausek et al (88)									+			±																
Van de Weter. (89)																	+			+								
Lindbergh-Kortl. (83)													+															
Kecha et al (90)																					+							
Eigene Daten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+

Wie bei IGFBP-2 und IGFBP-3 konnten wir auch IGFBP-4 (s. Abb. 29) in allen untersuchten Organen zu allen untersuchten Zeitpunkten sicher nachweisen.

Wir fanden bei Geburt einen sehr hohen mRNA-Wert in der Leber. Die Werte der älteren Gruppen stiegen in unserer Untersuchung stetig von einem mittleren Niveau ausgehend bis zur Adoleszenz an, was für den adulten Wert gesehen, den Aussagen von Schuller et al (64), wie auch denen von Cerro et al (80) entspricht.

Wir fanden in der Milz der Maus in den ersten drei Altersgruppen (0, 4, 8 Wochen) einen relativ konstanten Level von IGFBP-4-mRNA. Lediglich der 12-Wochen-Wert lag höher. Schuller et al (64) beschrieben ein deutliches Signal für IGFBP-4 bei adulten Mäusen. Dies konnten wir bestätigen.

Chernausk et al (88) beschrieben im Gehirn einen gleichmäßigen Rückgang der IGFBP-4-mRNA-Expression bei der Ratte. In unserer Untersuchung fanden wir relativ konstante Level mit einem leichten Maximum bei neugeborenen Mäusen, sowie ein zweites etwas stärkeres Maximum bei 12 Wochen alten Tieren, wobei die Expression immer unter der des β -actin lag (s. Abb. 29).

Ähnlich wie beim IGFBP-3 fanden wir in der Niere ein absolutes Maximum für IGFBP-4-mRNA bei den 12 Wochen alten Mäusen. Ein bei Geburt recht starkes Signal schien auf ein Minimum bei 4 Wochen alten Tieren abzufallen und dann wieder mit dem Alter anzusteigen (s. Abb. 29). Schuller et al (64) sprachen von einem sehr starken Signal für IGFBP-4-mRNA bei adulten Mäusen, während Lindenbergh-Kortleve et al (83) nur beschrieben, dass bei neonatalen Mäusen die mRNA in der Niere nachweisbar war. Somit gehen wir davon aus, dass unsere Ergebnisse, auch wegen der Reliabilität der IGFBP-4-Ergebnisse der anderen Organe, den realen Verlauf wiedergeben.

Wie schon beim IGFBP-2 fanden wir in der Lunge bei der Expression der IGFBP-4-mRNA einen stetigen Anstieg der Werte von Geburt an bis zu den 12 Wochen alten Tieren (s. Abb. 29). Der für 12 Wochen alte Tiere ermittelte Wert entsprach sogar dem zweithöchsten Wert überhaupt für IGFBP-4 in allen Organen. Van de Wetering et al (89) gaben nur jeweils einen neonatalen und einen erwachsenen Wert an, die in ihrer Größe jedoch nicht sehr unterschiedlich sind. Schuller et al (64) und Cerro et al (80) beschrieben ebenfalls nur eine durchschnittliche Expression von IGFBP-4-mRNA in der Mäuselunge.

Im Thymus findet sich beim IGFBP-4, wie auch schon bei den vorherigen IGFBP, ein deutliches Maximum bei den neugeborenen, sowie ein Minimum bei den 4 Wochen alten Tieren. Anschließend schien die Expression mit dem Alter wieder anzusteigen (s. Abb. 29). Laut Kecha et al (90) ist IGFBP-4 das am stärksten exprimierte IGFBP des Thymus.

Im Knochenmark fanden wir für IGFBP-4 bei den 8 Wochen alten Mäusen ein überdurchschnittliches Signal, das bei den 12 Wochen alten noch stärker wurde.

In den Lymphknoten konnten wir IGFBP-4-mRNA in β -actin vergleichbarer Menge nachweisen.

Zusammenfassend sahen wir unsere Daten durch die Literatur, soweit vorhanden bestätigt, auch wenn erneut kleine Abweichungen über die Intensitäten der

beschriebenen Signale bestehen, die aber zum einen durch die mögliche Streubreite unserer Ergebnisse, wie auch wahrscheinlich durch unterschiedliche Definitionen zustande kamen.

IGFBP-5

Die Spiegel des IGFBP-5 sind altersabhängig (39,40), mit sehr hohen Werten in fetalen Geweben (11,107), einem Maximum in der Pubertät und einem anschließendem Abfall mit zunehmendem Lebensalter (39,54). Der IGFBP-5-Spiegel einer alten Frau beträgt nur noch ca. 30 % von denen einer Teenagerin (39,108). Die Spiegel werden durch verschiedene Hormone und Faktoren beeinflusst. So wirken IGF-I und -II sowie Vitamin A stimulierend (109-111) auf die IGFBP-5-Produktion, während Glukokortikoide (91,105), Fibroblasten-Wachstums-Faktor, TGF- β und auch platelet derived factor (109) den IGFBP-5-Spiegel senken. IGFBP-5 ist das Haupt-IGFBP der Niere (11).

Wie IGFBP-3 bildet IGFBP-5 mit IGF und ALS Komplexe (112). Zudem bindet es selbst an die Oberflächen von verschiedenen Zellen wie von Knochen- und Endothelzellen (14). Außerdem bindet IGFBP-5 ionisch an extrazelluläre-Matrix (ECM), dadurch nimmt die Affinität zu den IGFs um den Faktor 7 - 12 ab (113-115). IGFBP-5 kann die Wirkung von IGF verstärken oder abschwächen (24,36-38). In vitro wurde gezeigt, dass IGFBP-5 über seine Zellmembranbindung oder die Bindung an ECM die IGF-Wirkung verstärkt (20,37). Dieser Effekt ist wahrscheinlich durch eine stärkere Bindung des IGFs an seinen Rezeptor (114,116) zu erklären.

IGFBP-5 bindet an Knochenzellen wegen seiner hohen Affinität für Hydroxyapatite (14) und stimuliert in diesen das Wachstum IGF unabhängig (26,37,117). Für IGFBP-5 sind jedoch eine ganze Reihe inhibitorischer Eigenschaften bekannt. So hemmt es z.B. in der Niere das Zellwachstum, die Steroidproduktion in den Granulosazellen (118) und im Ovar das Follikelwachstum (14). Die Wirkung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) am Ovar wird über eine Reduktion des IGFBP-5 vermittelt (14).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass IGFBP-5 in den Zellkern transportiert wird und mit viralen Onkoproteinen interagiert (41-45). Die Frage nach einem Zusammenhang mit der Entstehung von Carzinomen liegt deswegen nahe, ist aber bisher unbeantwortet.

Tabelle 5: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-5-Daten mit der Literatur

Schuller et al, Lindbergh- Kortleve et al: Maus; Van de Wetering et al: Ratte

++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar;

Leerfeld: nicht untersucht

Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β -actin; +: < 100 % β -actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar

IGFBP-5	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK			
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12		
Schuller et al (64)	-				±				+				++				+													
Van de Weter. (89)																	±			+										
Lindbergh-Kortl. (83)													±	+																
Eigene Daten	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+		

Auch im Falle des IGFBP-5 konnten wir zu jeder Zeit in allen Organen eine mRNA Expressierung nachweisen. Beim IGFBP-5 fanden wir, verglichen mit den anderen Organen, relativ geringe mRNA Levels in der Leber (s. Abb. 30). Nach, verglichen zu β -actin, erneut extrem hohem neonatalem Wert zeigte sich ein „peak“ bei den 8 Wochen alten Mäusen. Die Werte der 4 und 12 Wochen alten Tiere waren sehr niedrig. Schuller et al (64) konnten in der Leber der Maus keine IGFBP-5-mRNA nachweisen. Da die von uns gewählte PCR eine deutlich höhere Sensitivität hat als die von Schuller et al verwendete Northern blot Hybridisierung aufweist, stellt dies bei den teils sehr geringen Levels unserer Untersuchung bei den von Schuller et al primär untersuchten erwachsenen Mäusen keinen Widerspruch dar.

Schuller et al (64) beschreiben eine Bande bei der IGFBP-5-mRNA-Bestimmung in der Mäusemilz nach verlängerter Bebrütung. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch eine

deutliche Expression, auch wenn die Werte nur etwa 1 - 2/3 der β -actin-Expression ausmachten. Wir sahen eine stetig ansteigende Expression der IGFBP-5-mRNA von 0 bis 12 Wochen (s. Abb. 30).

Für das Gehirn gibt es beim IGFBP-5 nur Daten von Schuller et al (64), die zeigen, dass eine starke Expression der mRNA vorhanden ist. Wir fanden einen über die untersuchten Zeiträume fast konstanten Spiegel, der unterhalb der Expression des β -actins lag (s. Abb. 30).

Lindenbergh-Kortleve et al (83) beschrieben für das IGFBP-5 einen nachgeburtlichen Anstieg der mRNA und Schuller et al (64) berichteten von einem starken Signal für IGFBP-5-mRNA in der Niere bei adulten Mäusen. Dem zustimmend zeigte sich in unserem Fall eine schwache aber gleichmäßige Zunahme der Expression von Geburt an bis zur achten Lebenswoche, die knapp unter dem Vergleichswert des β -actin lag, mit einem anschließenden Rückgang bei den 12 Wochen alten Tieren (s. Abb. 30).

In der Lunge zeichnete sich erneut beim IGFBP-5 der Trend ab, den wir schon beim IGFBP-2 und IGFBP-4 beschrieben haben. Von Geburt an steigt die Expression bis zum Maximalwert bei 12 Wochen an (s. Abb. 30). Ähnliche Daten publizierten auch van de Wetering et al (89), bei denen der Wert der Neugeborenen deutlich kleiner war als der bei erwachsenen Tieren.

Im Thymus fanden wir für IGFBP-5 bei unseren Untersuchungen ein deutliches Maximum bei den neonatalen Mäusen. Die Werte der älteren Tiere lagen unterhalb der β -actin-Expression, waren aber deutlich nachweisbar.

Im Knochenmark wie in Lymphknoten konnten wir IGFBP-5-mRNA nachweisen. Der Wert im Knochenmark der 8 Wochen alten Mäuse übertraf die β -actin-Expression deutlich, während die restlichen ermittelten Werte nicht ganz der Expression von β -actin entsprachen.

Als Fazit konnten wir auch beim IGFBP-5 eine Übereinstimmung mit der Literatur finden, auch wenn zu diesem IGFBP nur relativ wenig Publikationen gefunden wurden, die für uns von Bedeutung waren und somit herangezogen werden konnten..

IGFBP-6

IGFBP-6 ist das einzige IGFBP, das IGF-II mit einer vielfach (~100x) höheren Affinität bindet als IGF-I (46-48). Seine Hauptfunktion ist somit auch in der Regulation des IGF-II zu sehen (49,50,53,119).

Die Spiegel von IGFBP-6 sind altersabhängig (39,53,54) und werden von verschiedenen Mediatoren reguliert. Vor allem Vitamin A (51,52) scheint hier neben IGF-II eine entscheidende Rolle zu spielen. Es wird in unterschiedlichen Geweben gebildet wie z.B. im Ovar, in der Prostata, in Fibroblasten u.a. (45). IGFBP-6 ist hauptsächlich im Liquor und Serum zu finden (11).

Eine interessante Beobachtung ist, dass östrogenrezeptornegative Mammacarcinome IGFBP-6 produzieren (51). Diese Produktion wird durch Vitamin A verstärkt (51,52). Allerdings konnte gezeigt werden, dass in vivo intratumorale Injektionen von IGFBP-6 die Größe des nichtkleinzelligen Lungencarcinoms deutlich verkleinern konnten (120). In vitro inhibiert IGFBP-6 die IGF-II-Bindung an den Rezeptor und die IGF-II abhängige Myoblastendifferenzierung und -proliferation ohne dabei die IGF-I-Wirkung zu beeinflussen (49,50).

Tabelle 6: Tabellarischer Vergleich unserer IGFBP-6-Daten mit der Literatur
 Schuller et al: Maus; Van de Wetering et al.: Ratte: ++: stark nachweisbar; +: nachweisbar; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar; Leerfeld: nicht untersucht
 Bei unseren Ergebnissen gilt: ++: > 100 % β-actin; +: < 100 % β-actin; ±: schwach nachweisbar; -: nicht nachweisbar

IGFBP-6	Leber				Milz				Gehirn				Niere				Lunge				Thymus				KM		LK	
	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	0	4	8	12	8	12	8	12
Schuller et al (64)	±				±				±				-				+											
Van de Weter. (89)																	±			+								
Eigene Daten	±	±	-	±	-	+	+	±	-	-	+	+	-	-	-	±	±	±	+	+	±	±	+	±	-	-	-	-

Insgesamt waren alle Ergebnisse, die wir für IGFBP-6 bekamen, von eher schwacher Qualität. IGFBP-6 war jedoch bis auf Knochenmark und Lymphknoten in allen untersuchten Organen nachweisbar, wenn auch nicht in allen Altersgruppen. Schuller et al (64) beschreiben ein schwach positives Signal für IGFBP-6 in der Leber nach verlängerter Bebrütung. Wir fanden ebenfalls in der Leber nur sehr geringe Mengen von IGFBP-6-mRNA bei den 0, 4, 12 Wochen alten Tieren (s. Abb 31). Bei den 8 Wochen alten Mäusen konnten wir gar keine IGFBP-6-mRNA nachweisen. IGFBP-6 wird nach unseren Ergebnissen in der Milz zu allen Zeiten nur schwach bzw. gar nicht exprimiert. (s. Abb 31). Bei 0 Wochen bekamen wir überhaupt kein Signal, bei 4 und 8 Wochen ein schwaches, das bei 12 Wochen noch geringer ausfiel. Schuller et al (64) fanden ebenfalls nur nach verlängerter Bebrütung ein Signal für IGFBP-6-mRNA. Im Gehirn konnten wir IGFBP-6-mRNA nur bei den 8 und 12 Wochen alten Tieren und auch hier nur, verglichen mit β -actin und den anderen IGFBP-6s, in relativ geringen Mengen nachweisen. Die Daten von Schuller et al (64) zeigen, dass bei erwachsenen Mäusen IGFBP-6-mRNA exprimiert wird, jedoch konnten wir keine Publikation finden, die die Level für IGFBP-6 im Mäusegehirn bei neugeborenen oder jungen Mäusen beschreibt.

Ein Nachweis von IGFBP-6-mRNA in der Mausniere ist in der Literatur nicht beschrieben. Wir finden lediglich ein schwaches Signal bei 12 Wochen alten Mäusen, was aber auch nur etwa 1/10 der β -actin-Expression entspricht.

In der Lunge fanden wir IGFBP-6 in allen Altersgruppen, mit einem Maximum bei den 12 Wochen alten Tieren, welches im Rahmen unserer Untersuchung den höchsten gemessenen Wert für IGFBP-6 überhaupt darstellt (s. Abb. 31). Dies ist vereinbar mit den Daten, die von van de Wetering et al (89) berichtet werden. Diese Forschungsgruppe fand eine Zunahme der IGFBP-6-Expression in der Lunge von neugeborenen Mäusen zu den erwachsenen Tieren. Im Thymus war IGFBP-6-mRNA nur in sehr geringen Mengen in allen untersuchten Altersgruppen nachzuweisen. Das Maximum lag hier bei ca. 1/5 des β -actin- Vergleichswertes. In Lymphknoten und im Knochenmark konnten wir keine IGFBP-6-mRNA nachweisen.

Im Falle des IGFBP-6 ist zusammenfassend zu sagen, dass unsere Ergebnisse mit den wenigen Ergebnissen, die wir in der Literatur finden konnten, übereinstimmen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Wir waren in unserer Arbeitsgruppe in vorausgegangenen Untersuchungen auf einen weiteren Zusammenhang zwischen dem IGF-IGFBP-System und dem immunologischen System gestoßen. Für nachfolgende Arbeiten suchten wir deswegen nach einer Nachweismethode für die sechs IGFBPs, zum anderen brauchten wir ein geeignetes Tiermodell, um die in vitro gefundenen Ergebnisse auch in vivo verifizieren zu können. Dafür benötigten wir als Voraussetzung jedoch „Leerwerte“ der Organe in diesem Tiermodell. Wir entschieden uns für die RT-PCR als Nachweismethode der mRNA der IGFBPs als Maß für die Expression des Genes, mit ihren in der Diskussion dargestellten Stärken und Schwächen. Als Tiermodell wählten wir die Maus.

Wir konnten zeigen, dass die von uns als Nachweismethode für die mRNA der sechs IGFBPs etablierten RT-PCRs Daten für die untersuchten Organe erbrachten, die, soweit sie bei den in der Diskussion erläuterten Ungenauigkeitsfaktoren eine sinnvolle Interpretation zuließen, mit der bisher bekannten Literatur übereinstimmten. Die Etablierung der RT-PCR zeigten wir hier ausführlich am Beispiel des IGFBP-2. Prinzipiell war diese jedoch für alle IGFBPs gleich.

Speziell im Falle von IGFBP-5 und -6 war die publizierte Datenlage sehr gering. Bei den in der Literatur häufiger untersuchten IGFBPs konnten wir eine breite Übereinstimmung mit unseren Werten zeigen. Durch die Unterschiede in den Methoden, wie auch die unterschiedlichen Alterseinteilungen der untersuchten Tiere der verschiedenen Arbeitsgruppen, sowie auch nicht zuletzt durch Schwächen unserer Methode sind die Abweichungen der Ergebnisse zu interpretieren. Bei den Altersgruppen und Organen, für die wir keine Vergleichsliteratur finden konnten, gingen wir auf Grund der guten Korrelation der Ergebnisse der anderen Organe und der Eindeutigkeit der Signale von der Richtigkeit auch dieser Werte aus.

Unterschiede in den Spezies (Maus, Ratte, Rhesus-Affe) erlaubten wir uns bei der großen Übereinstimmung der verschiedenen IGFBPs zwischen den Spezies zu vernachlässigen. Dies könnte aber in detaillierteren Fragestellungen von Bedeutung sein.

Insgesamt konnte eine Nachweismethode für die sechs IGFBPs im Mausmodell etabliert werden.

Die zweite Fragestellung nach Ausgangswerten für die verschiedenen Altersgruppen und Organen in der Maus konnten wir nur teilweise beantworten. Wir konnten zeigen, dass es organ- und altersspezifische IGFBP-Muster gibt, wobei eine mengenmäßige Diskussion nur mit sehr großen Vorbehalten auf Grund der doch erheblich ungenauen Teilschritte und der nur bedingten Zuverlässigkeit des internen Standards geführt werden kann. Diese Informationen könnten somit nur unter Vorbehalt und nach einer Modifikation der Methode, z.B. anderer interner Standard, Taqman, Optimierung der RT, als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Zusätzlich wäre es dafür auch sinnvoll, die unterschiedlichen Zelltypen in den bestimmten Organen noch weiter zu unterscheiden, um möglichst genaue Aussagen über die untersuchten IGFBPs machen zu können.

7. Literatur

1. Rinderknecht E, Humbel RE (1978) The amino sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253: 2769-2776
2. Rinderknecht E, Humbel RE (1978) Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89: 283-286
3. Hahn VK, D'Ercole AJ, Lund PK (1987) Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236: 193-197
4. Gosteli-Peter MA, Winterhalter KH, Schmid C, Froesch ER, Zapf J (1994) Expression and regulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 135: 2558-2567
5. Sussenbach JS, Steenberg PH, Holthuisen P (1995) Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes. *Growth Regul* 2:1-9
6. Danghaday WH, Rotwein P (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures. *Endocr. Rev.* 10: 68-91
7. Nissley P, Kiess W, Sklar M (1991) The insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor. In LeRoith D: *Insulin-like growth factors: molekular and cellular aspects*, Boca Raton CRC Press 111-150
8. Lamson G, Guidice LC, Rosenfeld RG (1991) Insulin-like growth factor binding proteins: Structural and molecular relationships. *Growth Factors* 5: 19-28
9. Shimasaki S, Ling N (1991) Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3: 243-266
10. Coverley JA, Baxter RC (1997) Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 128: 1-5,
11. Katz LEL, Rosenfeld RG, Cohen P (1995) Clinical significance of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). *The Endocrinologist* 5: 36-43
12. Koistinen R, Ikonen O, Selenius P, Seppala M (1990) Insulin-like growth factor-binding protein-1 inhibits binding of IGF-I on fetal skin fibroblasts but stimulates their DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 408-415
13. Clemmons DR, Cascieri MA, Camacho-Hubner C, Mc-Cusker RH, Bayne ML (1990) Diskrete alterations of the insulin-like growth factor I molecule which alter its affinity for insulin-like growth factor-binding proteins result in changes in bioactivity. *J Biol Chem* 265: 12210-12216
14. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucef Z, Matsumo T, Hwa I, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG (1996) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Intern J Biochem Cell Biol* 28: 619-637
15. Hardouin S, Gurmelem M, Noguez P, Seurin D, Roghani M, Le Bouc Y, Povoas G, Merimee TJ, Hossenlopp P, Binoux M (1989) Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in man: relationship with growth hormone and IGFs in physiologic significance. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 1291-1301

16. Cohen P, Peehl DM, Satamey 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. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 1031-1035
17. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 428-434
18. Cohen P, Rosenfeld RG (1995) The IGF axis In Rosenbloom AL (ed): *Human Growth Hormone, Basic and Scientific Aspects*. Boca Raton, FL, CRC Press, 43-58
19. Chatterjee S, Dai B, Owlia A, Singh P (1999) Novel Strategy for growth inhibition of human prostatic cancer cells: Endogenous insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) suppression. In *Programs & Abstracts of the 81st Annual meeting of the Endocrine Society, San Diego, CA*. Bethesda: The Endocrine Society, 169
20. Conover CA, Clarkson JT, Durham DK, Bale LK (1994) Cellular actions of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3). In *Current Directions in Insulin-like Growth Factor Research* (Le Roith D, Raizada MK, Eds.) New York: Plenum Press, 255-265
21. Arany E, Afford S, Strain AJ, Winwood PJ, Arthur MJ, Hill DJ (1994) Differential cellular synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 within human liver. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1871-1876
22. Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA (1994) Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 134: 2498-2504
23. Conover CA, Powell DR (1991) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 blocks IGF-I-induced receptor down-regulation and cell desensitization in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* 129: 710-716
24. Hamon GA, Hunt TK, Spencer EM (1993) In vivo effects of systemic insulin-like growth factor-I alone and complexed with insulin-like growth factor binding protein-3 on corticosteroid suppressed wounds. *Growth Regul* 3: 55-56
25. Valentini B, Bhalka A, DeAngelis T, Basergea R, Cohen P (1995) The insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-1 receptor gene. *Mol Endocrinol* 9: 361-367
26. Rajah R, Valentini B, Cohen P (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β 1 on programmed cell death via p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 272: 12181-12188
27. Oh Y, Müller 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
28. Oh Y, Müller HL, Pham H, Rosenfeld RG (1993) Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. *J Biol Chem* 268: 26045-26048
29. DiBattista JA, Dore S, Morin N, Aribat T (1996) Prostaglandin E2 up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: Role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* 63: 320-333

30. Conover CA, Lee PD, Riggs BL, Powell DR (1996) Insulin-like growth factor-binding protein-1 expression in cultured human bone cells: regulation by insulin and glucocorticoid. *Endocrinology* 137: 3295-3301
31. Wang J, Niu W, Witte DP, Chernaused SD, Nikiforox YE, Clemes TL, Sharifi B, Strauch AR, Fagin JA (1998) Overexpression of insulin-like growth factor-binding-protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle-alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia. *Endocrinology* 139: 2605-2314
32. Hasegawa T, Cohen P, Rosenfeld RG (1995) Characterization of the insulin-like growth factor axis in TM 3 Leydig cells. *Growth Regul* 5: 151-159
33. Damon SE, Maddison L, Ware JL, Plymate SR (1998) Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation. *Endocrinology* 139: 3456-3464
34. Singh P, Dai B, Dhurva B, Widen SG (1994) Episomal expression of sense and antisense insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 complementary DNA alters the mitogenic response of a human colon cancer cell line (HT-29) by mechanisms that are independent of and dependent upon IGF-I. *Cancer Res* 54: 6563-6570
35. Damon SE, Hauck KL, Birnbaum RS, Quinn LS (1998) Retrovirally mediated overexpression of IGFBP-4: Evidence that insulin-like growth factor is required for skeletal muscle differentiation. *J Cell Phys* 175: 109-120
36. Ewton DZ, Coolican SA, Mohan S, Chernaused SD, Florini JR (1998) Modulation of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: A dual role for IGFBP-5. *J Cell Phys* 177: 47-57,
37. Andress DL, Birnbaum RS. (1992) Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J Biol Chem* 267: 22467-22472
38. Clemmons DR (1997) Insulin-like growth factor-binding proteins and their roles in controlling IGF actions. *Cytol Growth Factor Rev* 8: 45-62
39. Mohan S, Farley JR, Baylink DJ (1995) Age related changes in IGFBP-4 and IGFBP-5 levels in human serum and bone: Implications for bone loss with aging. *Prog Growth Factor Res* 6: 465-473
40. Thoren M, Hilding A, Brismar T, Magnusson P, Degerblad M, Larsson L, Saaf M, Baynick D, Mohan S (1998) Serum levels of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP)-4 and -5 correlate with bone mineral density in growth hormone (GH)-deficient adults and increase with GH replacement therapy. *J Bone Miner Res* 13: 891-899
41. Rees C, Clemmons DR, Horvitz GD, Clarkes JB, Busby WH (1998) A protease-resistant form of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 inhibits IGF-I actions. *Endocrinology* 139: 4182-4188
42. Jacques G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K (1997) Nuclear localisation of insulin-like growth factor-binding protein-3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 1389: 1767-1770
43. Noll K, Wegmann B, Havemann K, Jacques G (1996) Insulin-like growth factors stimulate the release of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and degradation of IGFBP-4 in nonsmall cell lung cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2653-2662
44. Schedlich LJ, Young TF, Firth SM, Baxter RC (1998) Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 273: 18347-13852

45. Wraight CJ, Liepe IJ, Werther GA (1998) Intranuclear localisation of insulin-like growth factor-binding protein-3 during cell division in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111: 239-242
46. Duan C, Hawes SB, Prevette T, Clemmons DR (1998) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates IGF-binding protein-5 synthesis through transcriptional activation of the gene in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 16836-16842
47. Bach LA, Thotakura NR, Rechler MM (1993) Insulin-like growth factor-binding protein-6 is O-glycosylated. *Growth Regul* 3: 59-62
48. Claussen M, Buergisser D, Schuller AG, Matzner U, Braulke T (1995) Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 and mannose 6-phosphate/IGF-II receptor expression in IGF-II over expression NIH 3T3 cells. *Mol Endocrinol* 9: 902-912
49. Bach LA (1999) Insulin-like growth factor-binding protein-6: The forgotten binding protein? *Horm Metab Res* 31: 226-234
50. Bach LA, Hsieh S, Brown AL, Rechler MM (1994) Recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II induced differentiation of L6A1 myoblasts. *Endocrinology* 135: 2168-2176
51. Sheik MS, Shao ZM, Hussain A, Clemmons DR, Chen JC, Roberts CT Jr, LeRoith D, Fontana JA (1993) Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1,-2,-3,-4,-5, and -6: Synthesis, secretion and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol* 155: 556-567
52. Zhou Y, Mohan S, Linkhart TA, Baylink DJ, Strong DD (1996) Retinoic acid regulates Insulin-like growth factor-binding protein expression in human osteoblast cells. *Endocrinology* 137: 975-983
53. Baxter RC, Saunders H (1992) Radioimmunoassay of insulin-like growth factor-binding protein-6 in human serum and other body fluids. *J Endocrinol* 134: 133-139
54. Mohan S, Libanati C, Dony C, Lang K, Srinivasan N, Baylink DJ (1995) Development, validation and application of a radioimmunoassay for insulin-like growth factor binding protein-5 in human serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2638-2645
55. Collet-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
56. Rajah R, Katz I, Nunn S, Solberg P, Beers T, Cohen P (1995) Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog Growth Factor Res* 6: 273-284
57. Baxter RC, Binoux MA, Clemmons DR, Conover CA, Drop SLS, Holly JMP, Mohan S, Oh Y, Rosenfeld RG (1998) Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *Endocrinology* 139: 4036
58. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) Insulin-like growth factor-binding proteins: A proposed superfamily. *Acta Paediatr Suppl* 428: 37-45
59. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999) Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily: Structure, function and evolution. In: *Programs & Abstracts of the 81st Annual Meeting of the Endocrine Society*. San Diego, CA. Bethesda: The Endocrine Society 407
60. Glick B (1984) Interrelation of the avian immune and neuroendocrine systems. *J Exp Zool* 232: 671-682

61. Sternberg EM (1998) Overview of the conference and the field. *Ann N Y Acad Sci* 840: 1-8
62. Weetman AP (1999) Autoimmunity and endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107 Suppl 3: S63-66
63. Föll J, Dannecker L, Zehrer C, Hettmer S, Berger J, Elminger M, Niethammer D, Ranke MB, Dannecker GE (1998) Activation-dependent expression of the insulin-like growth factor binding protein-2 in human lymphocytes. *Immunology* 94: 173-180
64. Schuller AGP, Groffen C, van Neck JW, Zwarthoff EC, Drop SLS (1994) CDNA cloning and mRNA expression of the six mouse insulin-like growth factor binding proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 104: 57-66
65. Mühlhardt C (2002) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
66. Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Methods* 20;46: 69-81
67. Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR (2001) Beta-actin – an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 15: 307-11
68. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75: 291-295
69. Zhong H, Simons JW (1999) Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 16; 259(3): 523-526
70. Underwood LE, Thissen JP, Lemozy S, Ketelslegers JM, Clemmons DR (1994) Hormonal and nutritional regulation of IGF-I and its binding proteins. *Hormone Res* 42: 145-151
71. Smith WJ, Underwood LE, Clemmons DR (1995) Effects of caloric or protein restriction on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 443-449
72. Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LM, Lesem M, Cutler GB jr. (1992) The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein, the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 762-767,
73. Strasser-Vogel B, Blum WF, Past R, Kessler U, Hoeflich A, Meiler B, Kiess W (1995) Insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and IGF-binding proteins -1, -2 and -3 in children and adolescent with diabetes mellitus: correlation with metabolic control and height attainment. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1207-1213,
74. Unterman TG, Oehler DT, Murphy LJ, Lacson RG (1991) Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in rat H4IIE hepatoma cells: the dominant role of insulin. *Endocrinology* 128: 2693-2701
75. Conover CA, Divertie GD, Lee PD (1993) Cortisol increases plasma insulin-like growth factor binding protein-1 in humans. *Acta Endocrinol* 128: 140-143,
76. Lee PDK, Conover CA, Powell DR (1993) Regulation and function of insulin-like growth factor binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med* 204: 4-29
77. Price WA, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ (1992) Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type I IGF receptor and the IGF-binding proteins in dexamethason-induced fetal growth retardation. *Endocrinology* 130: 1424-1432

78. Samstein B, Hoimes ML, Fan J, Frost RA, Gelato MC, Lang CH (1996) IL-6 stimulation of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) production. *Biochem Biophys Res Commun* 228: 661-615
79. Ruosalthi E, Pierschlaber MD (1987) New perspectives in cell adhesions RGD and integrins. *Science* 238: 491-497
80. Cerro JA, Grewal A, Wood TL, Pintar JE (1993) Tissue-specific expression of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) mRNAs in mouse and rat development. *Regul Pept* 48: 189-198
81. Liu F, Powell DR, Styne DM, Hintz RL (1991) Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the developing rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 905-911
82. Babajako S, Hardouin S, Segovia B, Groyer A, Binoux M (1993) Expression of insulin-like growth factor binding protein-1 and -2 genes through the perinatal period in the rat. *Endocrinology* 132: 2586-2592
83. Lindenbergh-Kortleve DJ, Rosato RR, van Neck JW, Nauta J, van Kleffens M, Groffen C, Zwarthoff EC, Drop SLS (1997) Gene expression of the insulin-like growth factor system during mouse kidney development. *Endocrinology* 132: 81-91
84. Bernadini S, Cianfarani S, Spagnoli A, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, Massoud R, Boscherini B, Finazzi-Agro A, Rosenfeld RG, Federici G (1994) Expression and down-regulation by retinoic acid of IGF binding protein-2 and -4 in medium from human neuroblastoma cells. *J Neuroendocrinol* 6: 409-413
85. Firth SM, Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23: 824-854
86. Cohen P, Noveral JP, Bhala A, Nunn SE, Herrick DJ, Grunstein MM (1995) Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis. *Am J Physiol* 269: L151-L157
87. Wood TL, Rogler LE, Czick ME, Schuller AG, Pintar JE (2000) Selective alterations in organ sizes in mice with targeted disruption of the insulin-like growth factor binding-protein-2 gene. *Mol Endocrinol* 14: 1472-1482
88. Chernausk SD, Murray MA, Cheung PT (1993) Expression of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) by rat neural cells- comparison to other IGFBPs. *Regul Pept* 48: 123-132
89. Van der Wetering JK, Elfring RH, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Mol JA, Haagsman HP, Batenburg JJ (1997) Perinatal expression of IGFBPs in rat lung and its hormonal regulation in fetal lung explants. *Am J Physiol* 273: L1174-1181
90. Kecha O, Martens H, Franchimont N, Achour I, Hazée-Hagelstein MT, Charlet-Renard C, Geenen V, Winkler R (1999) Characterization of the Insulin-like Growth Factor Axis in the Human Thymus. *J Neuroendocr* 11: 435-440
91. Conover CA, Clarkson JT, Bale LK (1995) Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor (IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. *Endocrinology* 136: 1403-1410
92. Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Labarta JI, Vorwerk P, Rosenfeld RG (1997) Evidence for insulin-like growth factor (IGF)-independent transcriptional regulation of IGF binding protein-3 by growth hormone in SKHEP-1 human hepatocarcinoma cells. *Endocrinology* 138: 1464-1470

93. Kanety H, Karasik A, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z (1993) Long term treatment of Laron type dwarfs with insulin-like growth factor-1 increases serum insulin-like growth factor-binding protein-3 in the absence of growth hormone activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 128: 144-149
94. Olney RC, Wilson DM, Mohtai M, Fiedler PJ, Smith RL (1995) Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha increase insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) production and IGFBP-3 protease activity in human articular chondrocytes. *J Endocrinol* 146: 279-286
95. Besset V, Le Magueresse-Battistoni B, Collett J, Benhamed M (1996) Tumor necrosis factor alpha stimulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression in cultured porcine Sertoli cells. *Endocrinology* 137: 296-303
96. Oh Y, Müller HL, Ng L, Rosenfeld RG (1995) Transforming growth factor- β -induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J Biol Chem* 270: 13589-13592
97. Huynh H, Yang YF, Pollak M (1996) Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein-3 autocrine loop in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 271: 1016-1021
98. Clark RG, Mrtensen D, Reisfynder D, Mohler M, Echteverry T, Mukku V (1993) Recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3 (rhIGFBP-3): Effects on the glycemic and growth promoting activities of rhIGF-1 in the rat. *Growth Regul* 3: 5-52
99. Zapf J, Hauric C, Waldvogel M, Futo E, Hasler H, Binz K, Guler HP, Schmid C, Froesch ER (1989) Recombinant human IGF-I induces its own specific carrier proteins in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3813-3817
100. Li W, Fawcett J, Widmer HR, Fiedler PJ, Rabkin R, Keller GA (1997) Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138: 1763-1766
101. Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Rosenfeld RG (1996) Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates retinoic acid and transforming growth factor β 2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res* 56: 1545-1550
102. Erondü NE, Dake BL, Moser DR, Lin M, Boes M, Bar RS (1996) Regulation of endothelial IGFBP-3 synthesis and secretion by IGF-1 and TGF- β . *Growth Regul* 6: 1-9
103. Protera CA, Shinohara H, Mima T, Miller A, Tsan R, Mascarenhas D, Radinsky R (1999) Targeting insulin-like growth factor-I-receptor (IGF-I-R) signaling in the therapy of colorectal carcinoma (CRC) liver metastasis. *Proc Am Assoc Cancer Res* 40: 2252
104. Lee HY, Chun KH, Liu B, Wiehle SA, Cristiano RJ, Hong WK, Cohen P, Kurie JM (2002) Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Cancer res.* 62: 3530-3537
105. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR, Conover CA (1999) The insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3149-3153
106. Mason HD, Cwyfan-Hughes S, Molly JMP, Franks S (1998) Potent inhibition of human ovarian steroidogenesis by insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4). *J Clin Endocrinol Metab* 83: 284-287
107. Cohen P, Rosenfeld RG (1994) Physiological and clinical relevance of the insulin-like growth factor binding proteins. *Curr Opin Pediatr* 6: 462-467

108. Okasaki R, Riggs BL, Conover CA (1994) Glucocorticoid regulation of insulin-like growth factor-binding protein expression in normal human osteoblast-like cells: *Endocrinology* 134: 126-132
109. Canalis E, Gabbitas B (1995) Skeletal growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures *J Biol Chem* 270: 10771-10776
110. Conover CA, Bale LK, Clarkson JT, Topping O (1993) Regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 messenger ribonucleic acid expression and protein availability in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology* 132: 2525-2530
111. Gabbitas B, Canalis E (1998) Insulin-like growth factors sustain insulin-like growth factor-binding protein-5 expression in osteoblasts. *Am J Physiol* 275: E222-E228
112. Twigg SM, Baxter RC (1998) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid labile subunit. *J Biol Chem* 273: 6074-6079
113. Clemmons DR (1994) Role of post-translation modifications in modifying the biologic activity of insulin-like growth factor-binding proteins. In LeRoith D, Raizada MK (eds): *Current directions in insulin-like growth factor research*. New York, Plenum Press, 245-253
114. Jones JJ, 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
115. Booth BA, Boes M, Andress DL, Dake BL, Kiefer MC, Maack C, Linhart 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
116. Miyakoshi N, Richman C, Kasukawa Y, Linkhart TA, Baylink DJ, Mohan S (2001) Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* 107: 73-81
117. Jones JJ, Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins. Biological actions. *Endocrinol Rev* 16: 3-34
118. Ling NC, Liu XJ, Malkowski N, Guo YL, Erickson GF, Shimasaki S (1993) Structural and functional studies of insulin-like growth factor binding proteins in the ovary. *Growth Regul* 3: 70-74
119. Bach LA, Salemi R, Leeding KS (1995) Roles of insulin-like growth factor (IGF) receptors and IGF-binding protein in IGF-II induced proliferation and differentiation of L6A1 rat myoblasts. *Endocrinology* 136: 5061-5069
120. Sueoka N, Lee HY, Wiehle S, Cristiano RJ, Fang B, Ji L, Roth JA, Hong WK, Cohen P, Kurie JM (2000) Insulin-like growth factor binding protein-6 activates programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 19: 4432-4436

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Joachim Peitz
Anschrift Piflaserweg 18
84034 Landshut
Tel.: 0871-1437810
Mobil: 0163 - 27 11 077
Email: joachim.peitz@t-online.de
Geburtsdatum/-ort 11. Juli 1970, Schleswig
Familienstand verheiratet, 1 Sohn
Beruf Arzt

Schulbildung

09/77 – 07/81 Grundschule Waldenbuch
09/81 – 05/90 Kepler-Gymnasium, Tübingen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

11/90 – 01/92 Kreiskrankenhaus Ludwigsburg, Abteilung für Sozialpädiatrie

Hochschulbildung

04/92 – 11/99 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
08/94 Ärztliche Vorprüfung
02/95 – 03/95 Famulatur Unfallchirurgie, Krankenhauszweckverband Augsburg
08/95 – 09/95 Famulatur Kinderheilkunde St. John's Hospital, Livingston, Schottland
03/96 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/96 Famulatur Innere Medizin, Gilbert Bain Hospital, Lerwick, Shetlandinseln, Schottland
03/97 – 04/97 Praxisfamulatur Allgemeinmedizin, Dr. F. Rohn, Windhoek, Namibia
10/97 – 02/98 Studentischer Tutor an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen

09/98 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03.11.1999 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Abschluss des
Medizinstudiums.

Praktisches Jahr

10/98 – 12/98 Chirurgie, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika
12/98 – 11/99 Kreiskrankenhaus Böblingen, Wahlfach: Pädiatrie

Arzt im Praktikum

03/00 – 08/01 AiP an der Kinderklinik des Zentralklinikums Augsburg, davon
03/00 – 11/00 Kinderchirurgische Klinik
12/00 – 08/01 II. Kinderklinik / Neonatologie

Assistenzarzt

09/01 – 09/02 Assistenzarzt im Kinderkrankenhaus St. Nikolaus, Ravensburg
seit 10/02 Assistenzarzt im Kinderkrankenhaus St. Marien, Landshut

Hobbies

Sport Triathlon, Squash, Skifahren
Musik Gitarre, Gesang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Dannecker und Dr. J. Föll für die gute Betreuung dieser Arbeit sowie L. Dannecker stellvertretend für das alte „Häma II“-Team.

Weiterer Dank gebührt meinen Eltern und meiner Frau, ohne deren Zuspruch und Ausdauer diese Arbeit wohl nie beendet worden wäre, sowie den geduldigen Computer-Helfern und Freunden für Ihren support.