

**IGFBP-2 vermittelte Änderungen der Genexpression und
Auswirkungen auf die Apoptose in humanen
Tumorzelllinien**

D I S S E R T A T I O N

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2006

vorgelegt von

Klaus Frommer

Tag der mündlichen Prüfung:	7. Juli 2006
Dekan:	Prof. Dr. Stefan Laufer
1. Berichterstatter:	Privat-Dozent Dr. Martin W. Elmlinger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gabriele Dotz

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

Frommer KW, Reichenmiller K, Schutt BS, Hoeflich A, Ranke MB, Dodt G & Elmlinger MW 2006 IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J Mol Endocrinology* (im Druck befindlich)

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung	5
2.1 Das Insulin-Like Growth Factor (IGF)-System	5
2.1.1 Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I).....	5
2.1.2 Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II).....	6
2.1.3 Die IGF-Rezeptoren.....	7
2.1.4 Die IGF-Bindeproteine (IGFBPs).....	8
2.1.5 IGFBP-2.....	9
2.1.5.1 Biochemische Eigenschaften des IGFBP-2.....	9
2.1.5.2 Zelluläre Lokalisation von IGFBP-2.....	10
2.1.5.3 Synthese und Expression von IGFBP-2.....	10
2.1.5.4 Assoziation mit pathologischen Veränderungen.....	10
2.1.5.5 IGFBP-2 und Krebs.....	11
2.1.5.6 Wirkungen des IGFBP-2 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	12
2.2 Methodische Grundlagen	13
2.2.1 Radioimmunoassays.....	13
2.2.2 „Small Interfering RNA“ (siRNA) – Grundlagen und Anwendungen.....	14
2.2.3 Microarray-Technologie.....	16
2.2.4 Real-Time PCR.....	24
2.2.5 Durchflußzytometrie.....	32
3. Aufgabenstellung	35
4. Material und Methoden	37
4.1 Geräte, Materialien, Reagenzien	37
4.1.1 Geräte.....	37
4.1.2 Software.....	39
4.1.3 Materialien.....	40
4.1.4 Chemikalien.....	40
4.1.5 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien und Kits.....	41
4.1.6 Antikörper und Seren.....	41
4.1.7 Radioaktiv markierte Substanzen.....	42
4.1.8 Zellkultur-Medien, Medienzusätze und andere Zellkulturlösungen.....	42
4.1.9 Zelllinien.....	42

4.2	Methoden	43
4.2.1	Kultivierung und Ernte von Säugetierzellkulturen.....	43
4.2.2	Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen.....	44
4.2.3	Transfektion mit siRNA.....	44
4.2.4	Radioimmunoassays zur Bestimmung der IGFBP-2-, IGFBP-3- und IGF-II-Konzentrationen im Zellkulturüberstand	46
4.2.5	Gesamt-RNA- und mRNA-Isolierung	49
4.2.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	49
4.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	50
4.2.8	Affymetrix Microarray-Expressionsanalyse.....	51
4.2.9	Oligo GEArray [®] Microarray-Expressionsanalyse	52
4.2.10	Primer-Design.....	53
4.2.11	Real-Time RT-PCR.....	54
4.2.12	Herstellung von Zelllysaten.....	55
4.2.13	Bestimmung der Proteinkonzentration	55
4.2.14	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	56
4.2.15	Quantitative Western-Immunoblotanalyse.....	56
4.2.16	TGF β -1-Immunoassay	57
4.2.17	Assays zur quantitativen Apoptose-Bestimmung	58
4.2.18	Statistische Analyse.....	59
5.	Ergebnisse	61
5.1	IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen auf der mRNA-Ebene	61
5.1.1	Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression in Hs578T-Zellen mit Hilfe der Affymetrix Human Genome U133A GeneChips [®]	61
5.1.2	Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression in Hs578T-Zellen mit Hilfe von Oligo GEArray [®] Human Cancer Microarrays.....	73
5.1.3	Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR.....	97
5.2	IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen auf der Proteinebene	101
5.2.1	Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die NF κ B- und p53-Proteinexpression mittels Western Blotting	101
5.2.2	Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die TGF β -1 Proteinexpression mit Hilfe eines Immunoassays.....	103
5.3	Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose in Zellkulturmodellen	105
5.3.1	Untersuchung der apoptotischen Wirkung von IGFBP-2 mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	105
5.3.2	Untersuchung der apoptotischen Wirkung von IGFBP-2 mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits.....	107
5.4	Transfektion von A673-Zellen mit siRNAs zur Herunterregulierung der IGFBP-2-Expression	109

5.5	Bestimmung der Konzentration von IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturmedium mittels Radioimmunoassays	111
6.	Diskussion	115
6.1	Objektive Einschätzung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen	116
6.2	IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen	117
6.2.1	IGFBP-2-induzierte Expressionsänderungen von proliferationsrelevanten Genen	118
6.2.2	IGFBP-2-induzierte Expressionsänderung von adhäsions- und migrationsrelevanten Genen.....	119
6.2.3	IGFBP-2-induzierte Expressionsänderung von apoptoserelevanten Genen.....	121
6.2.4	Wechselwirkungen zwischen den IGFBP-2-regulierten Genen: ein mögliches Regulationsnetzwerk.....	122
6.3	Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose in Zellkulturmodellen	127
6.4	Transfektion der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 mit siRNAs zur Herunterregulierung der IGFBP 2 Expression	128
6.5	Bestimmung der Konzentration von IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturmedium mittels Radioimmunoassays	128
7.	Zusammenfassung	131
8.	Literatur	135
9.	Anhang.....	151
10.	Abkürzungsverzeichnis	162
11.	Abbildungsverzeichnis	165
12.	Tabellenverzeichnis	167
13.	Danksagung	169
14.	Liste der akademischen Lehrer	171

2. Einleitung

2.1 Das Insulin-Like Growth Factor (IGF)-System

Das IGF-System setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren I und II (IGF-I und IGF-II), den IGF-Rezeptoren (IGF1R und IGF2R), den IGF-Bindeproteinen (IGFBPs), den IGFBP-verwandten Proteinen („IGFBP-related Proteins“ = IGFBP-rP) und den IGFBP-Proteasen. Es besitzt eine Vielzahl an physiologischen Funktionen im Bereich des Wachstums, des Stoffwechsels, der Entwicklung und der Gewebedifferenzierung (Stewart & Rotwein 1996), doch auch bei der Tumorigenese spielt es eine Rolle. Auf der zellulären Ebene nimmt es Einfluß auf die Proliferation, Adhäsion/Migration und Apoptose. Das IGF-System ist eng mit dem Wachstumshormon (GH)-System verknüpft.

2.1.1 Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I)

IGF-I, welches die erste entdeckte Komponente des IGF-Systems war, wurde zuerst als Sulfatierungsfaktor identifiziert, der für die Sulfatierung von Chondroitinsulfat in Knorpelgewebe erforderlich war (Salmon & Daughaday 1957, Daughaday & Reeder 1966). Da diese neue Substanz als Vermittler der Wirkungen des hypophysären Wachstumshormons (damals auch Somatotropin genannt) agierte, wurde sie später als Somatomedin bezeichnet (Daughaday *et al.* 1972). Dieser Name wurde ersetzt durch die Bezeichnung „Insulin-Like Growth Factor I“ (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I), als sich durch Sequenzierung und strukturelle Analysen herausstellte, dass IGF-I und IGF-II in bezug auf Struktur und Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu Proinsulin aufwiesen (Rinderknecht & Humbel 1978a, Blundell *et al.* 1983). Zudem war die Substanz auch in der Lage war, die Glucose-Aufnahme in Fett- und Muskelzellen zu stimulieren (Randle 1954). Trotz Homologie zum Insulin und teilweise ähnlicher Funktion wird die Wirkung von IGF-I durch Insulin-Antikörper nicht antagonisiert (Zapf *et al.* 1986). Chemisch betrachtet ist IGF-I ein basisches Polypeptid aus 70 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 7,6 kDa (Rinderknecht & Humbel 1978a). Der überwiegende Anteil des zirkulierenden IGF-I wird in der Leber gebildet, aber auch andere Gewebe synthetisieren IGF-I (Han *et al.* 1988). Die Bildung von IGF-I wird u.a. vom hypophysären Wachstumshormon reguliert (Mathews 1986, Roberts 1987). Umgekehrt

wirkt IGF-I inhibierend auf die Wachstumshormon(GH-)freisetzung und übt damit eine Feedback-Regulation aus (Brazeau *et al.* 1982). Die Serumkonzentration des IGF-I ist beim Menschen stark alters- und entwicklungsabhängig. Sie steigt bis zur Pubertät an und nimmt danach mit zunehmendem Alter ab (Clemmons *et al.* 1984, Ranke *et al.* 1988). Das in Zirkulation und im Gewebe befindliche IGF-I ist vorwiegend an die IGFBPs gebunden (Sara & Hall 1990, Rotwein 1991), liegt also im Gegensatz zu Insulin nicht in freier Form vor. Durch die Wirkung der IGFBP-Proteasen werden die IGFBPs in diskrete Fragmente zerlegt und die IGFs dadurch wieder freigesetzt. Die Bedeutung des IGF-I bei Wachstumsvorgängen zeigt sich u.a. in Form der positiven Korrelation der IGF-I-Serumkonzentration mit dem Körperwachstum (Gourmelin *et al.* 1984, Blum 1993) und verschiedenen Abweichungen vom normalen Körperwachstum. So ist die Serumkonzentration von IGF-I erniedrigt bei hypophysärem Kleinwuchs (Furlanetto *et al.* 1977, Zapf *et al.* 1981) und den zwergwüchsigen Pygmäen (Merimee *et al.* 1981), während sie bei unbehandelter Akromegalie stark erhöht ist (Clemmons *et al.* 1981, Zapf *et al.* 1981). Eine weitere Korrelation besteht zwischen IGF-I und dem Geburtsgewicht bzw. dem Gestationsalter (Bennett *et al.* 1983, Gluckman *et al.* 1983). Die unmittelbare Wirkung auf das Wachstum konnte *in vivo* an Ratten mit ausgeprägtem GH-Mangel gezeigt werden: Bei diesen verdoppelte sich der Wachstumshormonspiegel im Vergleich zur alleinigen Gabe einer geringen Menge an GH, wenn dieses zusammen mit IGF-I zugeführt wurde (Daughaday & Rotwein 1989). Der IGF-I-Spiegel hängt ferner von diversen pathologischen Veränderungen ab, wie z.B. der Leberzirrhose (Zapf *et al.* 1978), Nierenversagen (Goldberg *et al.* 1982), Diabetes mellitus (Ashton *et al.* 1983, Merimee *et al.* 1983), Hypothyroidismus (Draznin *et al.* 1980, Marek *et al.* 1981) und Mangelernährung (Clemmons *et al.* 1985). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass IGF-I die Proliferation, Adhäsion/Migration und Apoptose verschiedener Zelltypen beeinflusst. IGF-I bewirkt eine Zunahme der Zellgröße und fördert die Proliferation; es besitzt eine ausgeprägt antiapoptotische Wirkung (Baserga *et al.* 2003), vermag die Migration zu induzieren (Stracke *et al.* 1989, Klemke *et al.* 1994, Long *et al.* 1998) und beeinflusst Synthese und Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) (Lupia *et al.* 1999, Svegliati-Baroni *et al.* 1999). IGF-I spielt aber auch eine Rolle bei der Transformation und Differenzierung von Zellen (Baserga 1999, Gilbert *et al.* 2000, Kurihara *et al.* 2000).

2.1.2 Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II)

IGF-II ist ein leicht saures Polypeptid aus 67 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 7,5 kDa (Rinderknecht & Humbel 1978b). Seine Aminosäuresequenz zeigt 60 %

Identität mit der des IGF-I. Es wird ebenfalls vorwiegend in der Leber gebildet, aber steht weniger unter dem Einfluss des Wachstumshormons als IGF-I. IGF-II ist wahrscheinlich vorwiegend in der intrauterinen und frühkindlichen Entwicklung wichtig. Man schließt dies aus der Tatsache, dass der IGF-II-Spiegel im Laufe der ersten Lebensmonate rapide ansteigt, aber danach bereits ein Niveau erreicht, wie es bei Erwachsenen gemessen wird (Luna *et al.* 1983). Im weiteren Lebensverlauf ändert sich der IGF-II-Spiegel kaum noch. Hohe IGF-II-Konzentrationen finden sich entsprechend auch in fötalem Gewebe (Hill *et al.* 1987). IGF-II kann – wie IGF-I – stoffwechselregulierende Aufgaben übernehmen: sowohl im Fett- als Muskelgewebe kann es insulinähnliche Wirkungen ausüben, was vermutlich zumindest teilweise auf eine, wenngleich auch schwache Interaktion mit dem Insulin-Rezeptor zurückzuführen ist. Die biologische Wirksamkeit liegt jedoch etwa zwei Zehnerpotenzen unter der des Insulins (Zapf *et al.* 1981). Im Tierexperiment wurde für IGF-II eine stimulierende Wirkung auf die Synthese von DNA, RNA, Proteoglykane, Kollagene und nicht-kollagene Proteine in Knorpelgewebe nachgewiesen (Canalis & Raisz 1983). Aus weiteren Tierexperimenten und Experimenten *in vitro* wurde geschlossen, dass die unkontrollierte Expression von IGFs, insbesondere von IGF-II, bei der Tumorprogression eine Rolle spielt (D'Ercole 1996, Weber *et al.* 2000). Dabei stellte u.a. heraus, dass das IGF-II von Weichteilsarkomzelllinien in Formen höheren Molekulargewichts sezerniert wird (Elmlinger *et al.* 1999).

2.1.3 Die IGF-Rezeptoren

Es existiert sowohl ein IGF-I-Rezeptor (IGF1R) als auch ein IGF-II-Rezeptor (IGF2R). Der IGF1R besitzt seine höchste Affinität für IGF-I, während der IGF-II-Rezeptor mit höchster Affinität IGF-II bindet. Beide Rezeptoren besitzen aber auch eine schwache Affinität für das jeweils andere IGF-Molekül. Der IGF1R besitzt zudem eine gewisse Kreuzreaktivität mit dem Insulin-Rezeptor, was durch die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Rezeptoren bedingt ist (Ulrich *et al.* 1986). Die Affinität des IGF1R für Insulin ist jedoch um den Faktor 1000 niedriger als für IGF-I (D'Ercole 1996). Der IGF1R hat ein Molekulargewicht von etwa 450 kDa und weist eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf (Pilch *et al.* 1986), welche in Verbindung mit dem MAPK- und PI3K-Signaltransduktionsweg steht (Kurihara *et al.* 2000). Eine Affinität für Insulin ist beim IGF2R, einem ca. 260 kDa schweres Glykoprotein, im Gegensatz zum IGF1R nicht nachgewiesen worden. Der IGF2R ist identisch mit dem kationenunabhängigen Mannose-6-phosphat-Rezeptor (Kiess *et al.* 1988, MacDonald *et al.* 1988) und besitzt drei Bindungsstellen: zwei Bindungsstellen für Proteine mit dem

lysosomalen Marker, für Mannose-6-phosphat, und eine Bindungsstelle für IGF-II (Kornfeld 1992). Der Großteil der IGF2R-Moleküle liegt intrazellulär vor und steht in ständigem Austausch mit den IGF2R-Molekülen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Proteine mit Mannose-6-phosphat-Marker (z.B. β -Galaktosidase) sowie IGF-II sind in der Lage, an den IGF2R zu binden, woraufhin sie internalisiert werden (Morgan & Edelman 1987). In Anschluß daran werden sie degradiert oder zu den Lysosomen transportiert. Der IGF2R ist dabei nicht nur für die Internalisierung von extrazellulär vorliegenden Proteinen verantwortlich, sondern ist auch am intrazellulären Proteintransport beteiligt (Nissley & Lopeszinsky 1991). Möglicherweise existiert noch ein weiterer IGF-Rezeptor, welcher in Funktion und Struktur dem IGF1R ähnelt, jedoch mit hoher Affinität IGF-II bindet (Shier & Watt 1989). Es wird spekuliert, dass dieser Rezeptortyp an der wachstumsfördernden Wirkung des IGF-II beteiligt ist.

2.1.4 Die IGF-Bindeproteine (IGFBPs)

Die IGF-Bindeproteine gehören zu einer Familie von sechs strukturell ähnlich aufgebauten Proteinen, welche mit unterschiedlicher Affinität an die IGFs binden und auf diese Weise deren Wirkung modulieren (Clemmons 1997). Hierfür werden verschiedene mögliche Wirkmechanismen diskutiert:

- a) Die IGFBPs binden an die Zelloberfläche und dienen dadurch als Trägermoleküle, welche die IGFs an ihren Wirkort transportieren;
- b) die IGFBPs komplexieren die IGFs vollständig und schirmen sie dadurch von der Bindung an ihre Rezeptoren ab;
- c) die IGFBPs schützen die IGFs vor schnellem proteolytischen Abbau.

Wahrscheinlich kommen in verschiedenen Systemen die genannten Wirkungsmechanismen in unterschiedlichem Ausmaß zum Tragen, denn je nach experimentellem System zeigten sich für einige IGFBPs sowohl stimulatorische als auch inhibierende Wirkungen (Rechler und Nissley 1990). Einige IGFBPs liegen zudem als phosphorylierte und dephosphorylierte Varianten vor, wobei die phosphorylierten Formen scheinbar stärker an die Zelloberflächen binden (Rechler & Brown 1992). Die IGFBPs bestehen grundsätzlich aus einer konservierten N- und C-terminalen Region (Forbes *et al.* 1998, Neumann *et al.* 1998), die miteinander durch eine variable Linker-Region verknüpft sind (Zapf 1995). Für die feste Bindung der IGFs durch die IGFBPs, die generell um ein Vielfaches stärker ist als die Bindung der IGFs durch die IGF-Rezeptoren, scheint sowohl die N- als auch die C-terminale Domäne erforderlich zu

sein (Hwa *et al.* 1999); IGFBP-Fragmente vermögen IGFs nur noch mit verminderter Affinität zu binden. Diese Eigenschaft spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Freisetzung der IGFs von den IGFBPs bedingt durch die proteolytische Wirkung der IGFBP-Proteasen. Das Molekulargewicht der IGFBPs reicht von 24 kDa bis 31 kDa. Mit Ausnahme von IGFBP-1 und -2 handelt es sich bei den IGFBPs um Glykoproteine.

Die meisten Zelltypen produzieren mehrere IGFBPs, daher ist das Vorkommen der IGFBPs generell eher ubiquitärer Natur. Jedoch produzieren spezielle Zelltypen bzw. Gewebe vermehrt bestimmte IGFBPs: Der Großteil der zirkulierenden IGFBPs wird in der Leber gebildet, dies gilt v.a. für IGFBP-3 aber auch für IGFBP-1, -2 und -4 (Scharf *et al.* 1996); zudem werden IGFBP-3, -4 und -6 verstärkt in glatten Muskelzellen (Boes *et al.* 1996) und IGFBP-4 und -5 in verschiedenen Osteoblastenzellen gebildet (Malpe *et al.* 1997).

Wie auch die IGFs sind einige der IGFBPs mit physiologischen oder pathophysiologischen Veränderungen assoziiert: zum Beispiel ist ein erniedrigter IGFBP-3-Spiegel mit Wachstumshormonmangel, ein erhöhter IGFBP-3-Spiegel hingegen mit Typ I Diabetes mellitus (Rajaram *et al.* 1997) assoziiert. IGFBP-1 und -2-Level zeigten z.B. eine Abhängigkeit vom Ernährungsstatus, von der Insulinsekretion und von der fötalen Entwicklung (Ranke 1997).

Neben der Modulation der Wirkungen der IGFs konnten für einige IGFBPs auch IGF-unabhängige Wirkungen gezeigt werden (Oh & Rosenfeld 1999). Auf die IGF-unabhängigen Effekte des IGFBP-2, dem IGF-Bindeprotein, welches Hauptthema dieser Arbeit lag, wird im folgenden noch genauer eingegangen.

2.1.5 IGFBP-2

2.1.5.1 Biochemische Eigenschaften des IGFBP-2

IGFBP-2 ist ein 289 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 31 kDa, welches aus einem längeren Primärtranskript mit einer 39 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz für die Sekretion hervorgeht (Martin & Baxter 1999). IGFBP-2 ist weder glykosyliert noch phosphoryliert. Es besitzt ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp-Sequenz) und eine Heparin-Bindedomäne (HBD). Über sein RGD-Motiv ist IGFBP-2 in der Lage, an $\alpha_5\beta_1$ -Integrinrezeptoren zu binden (Rauschnabel *et al.* 1999), während die Heparin-Bindedomäne die Bindung an andere Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM)

ermöglicht (Arai *et al.* 1996, Russo *et al.* 1997). Seine Affinität für IGF-II ist deutlich höher als für IGF-I (Gourmelen *et al.* 1994).

2.1.5.2 Zelluläre Lokalisation von IGFBP-2

IGFBP-2 wird sezerniert, findet sich also u.a. im extrazellulären Raum. Zudem weiß man seit kurzem, dass es aufgrund seiner Bindungseigenschaften auf der Zelloberfläche (Pereira *et al.* 2004, Schuett *et al.* 2004, Russo *et al.* 2005) haftet. IGFBP-2 ist aber auch im Cytoplasma, auf der Oberfläche des Zellkerns (Hoefflich *et al.* 2004) und sogar innerhalb des Zellkerns nachgewiesen worden (Terrien *et al.* 2005).

2.1.5.3 Synthese und Expression von IGFBP-2

IGFBP-2 ist nach IGFBP-3 das zweithäufigste IGFBP im menschlichen Blut, wobei der Großteil aus der Leber stammt. IGFBP-2 während der fötalen Entwicklung stark exprimiert und folgt dabei eng dem Expressionsmuster von IGF-II (Blum *et al.* 1993, Carr *et al.* 1995, Lindenbergh-Kortleve *et al.* 1997). Im Erwachsenen finden sich die höchsten Konzentrationen an IGFBP-2 in zerebrospinaler Flüssigkeit (Binoux *et al.* 1991, Arnold *et al.* 1999), in Muttermilch (Elmlinger *et al.* 1999) und in Seminalplasma (Rosenfeld *et al.* 1990).

2.1.5.4 Assoziation mit pathologischen Veränderungen

Eine Vielzahl von Erkrankungen scheint mit veränderten IGFBP-2-Serumpegeln einherzugehen. Die folgende Tabelle gibt diese Änderungen im IGFBP-2-Pegel sowie deren Richtung an:

Tabelle 1: Erkrankungen des Menschen, welche mit einem veränderten IGFBP-2-Serumpegel einhergehen

Erkrankung	IGFBP-2-Pegel	Referenz(en)
Hypothalamische Hypophysen-Erkrankung	IGFBP-2 ↓	Toogood <i>et al.</i> 1998
Interstitielle Lungenerkrankung	IGFBP-2 ↑	Chadelat <i>et al.</i> 1998
Lebererkrankung im Endstadium	IGFBP-2 ↑	Holt <i>et al.</i> 1996, Holt <i>et al.</i> 1997
Leberzirrhose	IGFBP-2 ↑	Kratzsch <i>et al.</i> 1995, Ross <i>et al.</i> 1996
Multizystische renale Dysplasie	IGFBP-2 ↑	Matsell <i>et al.</i> 1997
Chronisches Nierenversagen	IGFBP-2 ↑	Tonshoff <i>et al.</i> 1995, Tonshoff <i>et al.</i> 1997
Hepatitis-assoziierte Osteosklerose	IGFBP-2 ↑	Khosla <i>et al.</i> 1998
Proliferative diabetische	IGFBP-2 ↑	Meyer-Schwickerhardt <i>et al.</i> 1993

Retinopathie		
Diabetes mellitus, Typ I (IDDM = insulin-dependent DM), unbehandelt	IGFBP-2 ↓	Blum <i>et al.</i> 1993
Akromegalie	IGFBP-2 ↓	Blum <i>et al.</i> 1993
Wachstumshormonmangel	IGFBP-2 ↑	Blum <i>et al.</i> 1993
Leberversagen	IGFBP-2 ↑	Blum <i>et al.</i> 1993
Inselzelladenome	IGFBP-2 ↑	Blum <i>et al.</i> 1993
Nicht-Inselzelltumor-induzierte Hypoglykämie	IGFBP-2 ↑	Blum <i>et al.</i> 1993
Leukämien	IGFBP-2 ↑	Blum <i>et al.</i> 1993

2.1.5.5 IGFBP-2 und Krebs

IGFBP-2 scheint insbesondere in der Biologie von Tumorerkrankungen eine Rolle zu spielen, denn bei vielen Tumorarten konnten in Patienten erhöhte IGFBP-2-Pegel (vgl. Tabelle 2) bei klinischen Untersuchungen festgestellt werden. Eine erhöhte Expression des IGFBP-2 fand sich auch in entsprechenden Tumormodellen, z.B. Zelllinien.

Tabelle 2: Tumorarten mit erhöhten IGFBP-2-Leveln

Tumorart	Referenz(en)
Prostatakrebs	Cohen <i>et al.</i> 1993, Kanety <i>et al.</i> 1993, Yu <i>et al.</i> 2001, Kiyama <i>et al.</i> 2003, Moore <i>et al.</i> 2003
Lungenkrebs	Kiefer <i>et al.</i> 1991, Lee <i>et al.</i> 1999
Kolorektalkrebs	el Atiq <i>et al.</i> 1994, Renehan <i>et al.</i> 2000
Melanome	Wang <i>et al.</i> 2003a
Tumore des Zentralnervensystems	Mueller <i>et al.</i> 1994, Elmlinger <i>et al.</i> 2001
Nebennierentumore	Boulle <i>et al.</i> 1998
Wilms Tumore	Vincent <i>et al.</i> 1994
Leberzellkarzinome	Ranke <i>et al.</i> 2003
Ovarialtumore	Flyvbjerg <i>et al.</i> 1997, Baron-Hay <i>et al.</i> 2004
Brustkrebs	Zumkeller <i>et al.</i> 1993, McGuire <i>et al.</i> 1994
Schilddrüsenkrebs	van der Laan <i>et al.</i> 1995

Eine Remission des Tumors war in den meisten Fällen von einem Rückgang zu normalen IGFBP-2-Leveln begleitet. Darüberhinaus konnte bei einigen Tumorentitäten eine positive Korrelation zwischen den IGFBP-2-Leveln und der Tumormalignität nachgewiesen werden (Boulle *et al.* 2001, Elmlinger *et al.* 2001, Baron-Hay *et al.* 2004). Keine solche Korrelation

hingegen fand sich beim Auftreten eines Sekundärtumors der Prostata (Yu *et al.* 2001). Interessanterweise war auch vor der klinischen Manifestation einiger Krebsarten keine solche Korrelation nachweisbar. Diese Fakten sprechen dafür, dass IGFBP-2 möglicherweise eher eine Funktion bei der Tumorprogression als bei der Tumoringenition inne hat.

2.1.5.6 Wirkungen des IGFBP-2 *in vivo* und *in vitro*

Neben der Aufgabe, die biologische Aktivität der IGFs zu modulieren (Abschnitt 2.1.4), besitzt IGFBP-2 weitere Funktionen (Hoeflich *et al.* 2001a). In Tierexperimenten konnte *in vivo* ein Einfluß auf das GH-stimulierte Wachstum nachgewiesen werden (Hoeflich *et al.* 2001b, Eckstein *et al.* 2002), *in vitro* wurden zahlreiche Effekte auf Proliferation, Adhäsion, Migration und Invasivität humaner Zellen festgestellt (Abschnitte 6.2.1 und 6.2.2). Nach heutiger Erkenntnis ist IGFBP-2 in der Lage zusätzlich unabhängig vom IGF-Rezeptor zu wirken. Die experimentellen Daten sprechen dafür, dass es durch Bindung an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine eine oder mehrere Signaltransduktionsketten auslöst, an welchen u.a. die fokale Adhäsionskinase und die p42/44 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) beteiligt sind (Schuett *et al.* 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass IGFBP-2 an Glykosaminoglykane, Heparin und Proteoglykane binden kann (Arai *et al.* 1996, Russo *et al.* 1997, Conover & Khosla 2003). Laut der Arbeit von Russo *et al.* (2005) spielt diese Bindung eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration und Invasion von Neuroblastomzellen. Pereira *et al.* (2003) fanden für IGFBP-2 noch einen weiteren Wirkmechanismus, bei dem die durch IGF-I und EGF (= epidermaler Wachstumsfaktor) induzierte Signaltransduktion über bimolekulare Wechselwirkungen mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrine moduliert wird.

2.2 Methodische Grundlagen

2.2.1 Radioimmunoassays

Zur Bestimmung der IGF- und IGFBP-Konzentrationen wurden in dieser Arbeit Radioimmunoassays (RIAs) eingesetzt. Im folgenden soll kurz das Prinzip dieser Radioimmunoassays erklärt werden: Eine zentrale Komponente des Radioimmunoassay ist der Tracer, der hier die radioaktiv markierte Variante der zu quantifizierenden Substanz darstellt. Da es sich im Falle der IGF(BP)-RIAs bei den zu quantifizierenden Substanzen um Proteine handelt, werden die Proteine mit Hilfe der Chloramin-T-Methode markiert, bei welchem Tyrosinreste des Proteins selektiv iodiert werden. Chloramin T (bzw. die von diesem in wässriger Lösung freigesetzte Hypochlorige Säure) hat hierbei die Funktion, die Iodid-Ionen in eine hochreaktive Form (elementares I₂ oder ICl) umzuwandeln, welche mit den Tyrosinresten des Proteins reagiert. Als radioaktives Isotop wird üblicherweise ¹²⁵I eingesetzt. Des weiteren ist für die RIAs ein für das zu quantifizierende Protein spezifischer Antikörper (= Primärantikörper) erforderlich. Da sowohl der Tracer als auch das äquivalente unmarkierte Protein als Antigene an diesen Antikörper binden können, kommt es in einem Gemisch aus beiden zu einer Competition um die Bindung an den Primärantikörper. Dabei gilt: Je größer die Menge an „kaltem“ (unmarkiertem) Protein, desto größer die Menge an verdrängtem Tracer und desto geringer die Menge an Antikörper-gebundenem Tracer. Diese Proportionalität wird bei den RIAs ausgenutzt, indem der Antikörper-gebundene Tracer quantifiziert wird. Dazu muss der Antikörper-gebundene Tracer von freiem Tracer getrennt werden. Dies geschieht durch Präzipitation des Antigen/Primärantikörper-Komplexes mittels eines geeigneten Präzipitationsreagenzes, bei welchem es sich hier um einen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (in einer 4 %igen Polyethylenglykol-Lösung als Fällungshilfe) handelt. Durch Abzentrifugation und Waschen des Präzipitats wird freier Tracer entfernt. Der im Präzipitat befindliche Antikörper-gebundene Tracer wird mit Hilfe eines Gamma-Zählers quantifiziert. Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen, wird parallel eine Eichkurve erstellt, indem neben den eigentlichen Messproben Ansätze mit bekannten Antigen-Mengen erstellt und gemessen werden. Der IGF-II-RIA besitzt im Gegensatz zu den IGFBP-RIAs einige Besonderheiten, die auf die IGF-IGFBP-Bindung zurückzuführen sind. Da die Bindung des IGF-II an IGFBPs die Quantifizierung mittels RIA stört, muss eine Dissoziierung herbeigeführt werden. Diese geschieht mittels einer leicht modifizierten Säure-Alkohol-Extraktionslösung nach Daughaday et al. (Daughaday *et al.* 1980). Da die Primärantikörper-Lösung das saure Milieu aber wieder neutralisiert, was zu

einer Reassoziaton des IGF-II mit den IGFBPs führen würde, enthält die Primärantikörper-Lösung des IGF-II-RIAs zusätzlich einen hohen Überschuß an IGF-I. Dieses besetzt die Bindungsstellen der IGFBPs und sorgt dafür, dass IGF-II nicht erneut an sie bindet. Auf diese Weise kann das nun freie IGF-II analog zu den IGFBP-RIAs bestimmt werden.

2.2.2 „Small Interfering RNA“ (siRNA) – Grundlagen und Anwendungen

Als RNA-Interferenz (RNAi) wird der durch „Small Interfering RNAs“ (siRNAs) induzierte Abbau spezifischer mRNAs bezeichnet, gegen welche die siRNAs gerichtet sind. Die bisherigen Erkenntnisse legen nahe, dass siRNAs in ihrer natürlichen Funktion als Schutz gegen Viren und die unkontrollierte Mobilisierung von Transposons dienen (Brantl 2002, Cogoni und Macino 2000, Fjose *et al.* 2001) sowie möglicherweise an der Genregulation beteiligt sind (Moss 2001, Voinnet 2002). In zellulären Systemen gehen sie aus dem Abbau längerer doppelsträngiger RNAs durch eine spezielle Ribonuclease III (auch Dicer genannt) hervor (Bernstein *et al.* 2001, Elbashir *et al.* 2001, Scherr *et al.* 2003). Bei den Produkten dieses Abbaus, den siRNA-Molekülen, handelt es sich um etwa 21 bis 23 Nucleotide lange RNA-Duplicates mit 5'-Phosphat-/3'-Hydroxylende und symmetrischen Zwei-Nucleotid-Überhängen an den 3'-Enden (Caplen *et al.* 2001, Scherr *et al.* 2003). Die siRNA-Moleküle lagern sich mit einer Multikomponenten-Nuclease zum sog. „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) zusammen und üben die Funktion einer Leitsequenz aus (Abb. 1). Über diese Leitsequenz bindet der Komplex spezifisch an komplementäre mRNAs und führt zu deren Abbau (Bernstein *et al.* 2001).

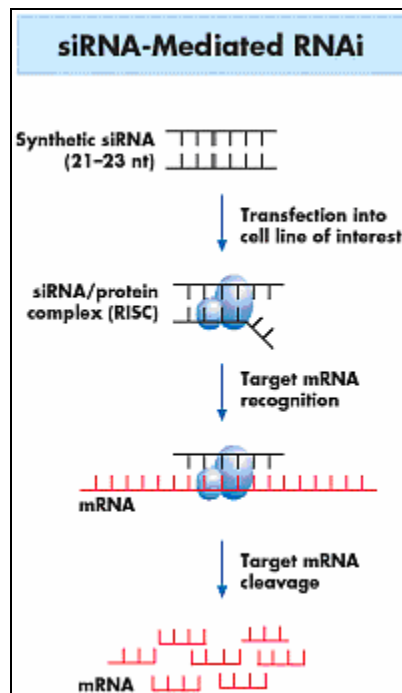


Abb. 1: Mechanismus der siRNA-Wirkung

Die Zusammenlagerung der siRNA-Moleküle mit einer Multi-komponenten-Nuclease führt zur Bildung des sog. „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC). Dieser Komplex bindet spezifisch an komplementäre mRNAs und führt letztlich zu deren Abbau (Bernstein *et al.* 2001).

[Quelle: <http://www.qiagen.com>]

Neben ihrer Sequenzspezifität besitzen die siRNAs eine weitere besondere Eigenschaft: Im Verlauf der Ausübung ihrer RNAi-Wirkung kommt zu einer Amplifikation der siRNA-Moleküle, wahrscheinlich durch Wirkung einer RNA-spezifischen RNA-Polymerase in Verbindung mit den siRNAs selbst und den mRNAs, gegen welche die siRNAs gerichtet sind (Sijen *et al.* 2001). Dieser Amplifikationseffekt führt zu einer deutlichen Effizienzsteigerung der RNAi-Wirkung. Es hat sich gezeigt, dass einzelsträngige Anti-Sense-mRNA-Moleküle gegenüber siRNAs die Genexpression weitaus weniger (Caplen *et al.* 2001) oder überhaupt nicht (Bertrand *et al.* 2002) herunterregulieren. Ursachen hierfür sind wahrscheinlich der genannte Amplifikationseffekt der siRNAs und die geringere Nuclease-Resistenz der Anti-Sense-mRNA-Moleküle (Bertrand *et al.* 2002). Es wurde rasch erkannt, dass siRNAs auch als Werkzeuge zur gezielten Herunterregulierung der Expression bestimmter Gene eingesetzt werden können (→ sog. „Gene Silencing“). Das „Hauptproblem“ beim Einsatz von siRNAs als Werkzeug zur Herunterregulierung von Genexpressionen ist der Beförderung der siRNAs in die Zelle. Insbesondere bei der Anwendung auf Zellkulturen werden chemisch synthetisierte siRNAs via Transfektion in die Zellen befördert. Leider schwankt die Effizienz dieser Methode sehr stark in Abhängigkeit von der Zelllinie und der Transfektionsmethode,

und die Herunterregulation der Genexpression bleibt nur für einen relativ kurzen Zeitraum bestehen. Zudem sind die Transfektionsmethoden i.d.R. mit (unerwünschtem) Streß für die Zellen verbunden. Eine alternative Strategie versucht daher, die siRNAs nicht von außen in die Zellen zu befördern, sondern sie bereits an ihrem Einsatzort, d.h. intrazellulär, zu synthetisieren. Zu diesem Zweck werden geeignete Expressionskassetten ebenfalls via Transfektion in die Zellen geschleust, deren Induktion dann zur Synthese der siRNAs führt (Hinweis: Da es sich bei siRNAs um RNA-Duplices handelt, müssen für jedes siRNA-Molekül zwei Expressionskassetten erstellt werden.). Vorteile dieser Vektor-basierten Methode bestehen darin, dass die chemisch synthetisierten siRNAs nicht limitierend sind und dass bei stabiler Transfektion eine Herunterregulierung der Genexpression über einen längeren Zeitraum sowie zeitgesteuert möglich ist.

Neben dem Einsatz als Werkzeug im Bereich der Forschung hofft man derzeit, siRNAs in absehbarer Zeit zur Vorbeugung oder Behandlung menschlicher Krankheiten einsetzen zu können. So wurden zum Beispiel bereits einige Studien durchgeführt, bei denen siRNAs dazu verwendet wurden, um das Eindringen und/oder die Replikation des „Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)“ zu stoppen oder zumindest hemmen (Das *et al.* 2004, Lee *et al.* 2002, Martinez *et al.* 2002, Novina *et al.* 2002). Auch eine Anwendung bei Hepatitis C-Virus-Infektionen (McCaffrey *et al.* 2002) wurde untersucht. Nicht zuletzt glauben Li *et al.* (2003a), dass über die Herunterregulierung von Oncogen-Überproduktionen siRNAs Anwendung bei der Therapie von Karzinomen finden könnten.

2.2.3 Microarray-Technologie

Nukleinsäure-Microarrays sind präzise lokalisierte Anordnungen einer großen Zahl an definierten Oligo- oder Polynucleotiden, welche auf einem Trägermaterial fixiert sind. Neben den Nukleinsäure-Microarrays gibt es mittlerweile auch Antikörper-basierte Protein-Microarrays, auf welche aber im folgenden nicht eingegangen werden soll. Im Prinzip handelt es sich bei Nukleinsäure-Microarrays um reverse „Dot Blots“ im Mikroformat, d.h. die „Sonden“ (= definierte Sequenzen) werden unmarkiert auf das Trägermaterial (z.B. Glas oder Nylonmembran) aufgetragen, während die unfraktionierten Nukleinsäuren in ihrer Gesamtheit markiert und mit dem gesamten Microarray hybridisiert werden. Es existieren zwei Haupt-Typen an Nukleinsäure-Microarrays, die sich u.a. in den zur Hybridisierung eingesetzten Nucleotiden unterscheiden: die cDNA-Microarrays und die Oligonucleotid-Microarrays. In beiden Fällen ist das Ausgangsmaterial mRNA (oder Gesamt-RNA): Für cDNA-Microarrays wird diese in markierte cDNA transkribiert. Im Falle der Oligonucleotid-Microarrays

hingegen wird mRNA in unmarkierte cDNA umgeschrieben, welche dann wiederum als Vorlage für die Synthese markierter cRNA dient. Das heißt, im Falle der cDNA-Microarrays wird mit markierter cDNA hybridisiert (Abb. 2), im Falle der Oligonucleotid-Microarrays mit markierter cRNA (Abb. 3).

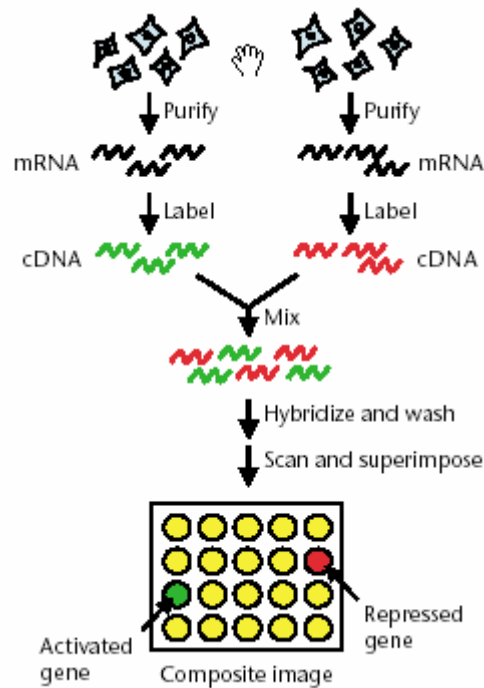


Abb. 2: Ablaufschema eines cDNA-Microarray-Experiments

Gezeigt ist der Ablauf eines „Zweifarbenn“-cDNA-Microarray-Experiments von der RNA-Isolierung bis zur Messung der Fluoreszenzintensitäten incl. Erstellung eines Pseudofarbenplots (vgl. Abb. 5).

[Quelle: Stears *et al.* 2003]

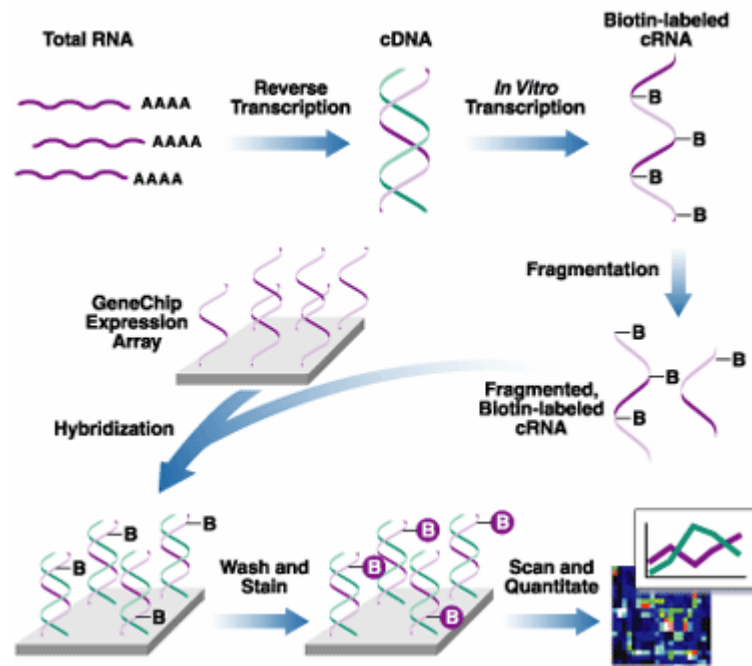


Abb. 3: Ablaufschema eines Oligonucleotid-Microarray-Experiments

Die schematische Darstellung zeigt den Ablauf eines Oligonucleotid-Microarray-Experiments von der RNA-Isolierung bis zur Messung von Signalintensitäten. Alternativ zu biotinylierten Nucleotiden können auch Fluorophor-gekoppelte oder radioaktiv markierte Nucleotide eingesetzt werden.
[Quelle: <http://www.affymetrix.com>]

Zur Markierung werden bei der direkten Detektion Fluorophor-gekoppelte oder radioaktiv markierte Nucleotide eingesetzt. Bei der indirekten Detektion werden biotinylierte Nucleotide verwendet. Diese können dann indirekt detektiert werden:

- über (Strept-)Avidin-gekoppelte Fluorophore (Beispiel: Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugate im Falle der Affymetrix Microarrays)
- über (Strept-)Avidin-gekoppelte Enzyme, die eine Detektion (z.B. via Chemilumineszenz) erlauben (Beispiel: Alkalische Phosphatase-konjugiertes Streptavidin in Verbindung mit CDP-Star im Falle der Oligo GEArray[®] Microarrays)
- über (Strept-)Avidin-gekoppelte Antikörper, an welche ein Sekundärantikörper binden kann, der wiederum an eines der obengenannten Detektionssysteme gekoppelt ist

Die cDNA-Microarrays werden hergestellt, indem PCR-amplifizierte oder klonierte Sequenzen in winzigen Mengen auf das Trägermaterial „gespottet“ werden. Hierzu werden mit hoher Präzision arbeitende Pipettier-Roboter eingesetzt. Die Art der Bindung ist vom Trägermaterial abhängig. Die Länge der Sequenzen liegt üblicherweise in einem Bereich von 500 bis 5000 bp. Im Gegensatz dazu werden bei Oligonucleotid-Microarrays synthetisch hergestellte Oligonucleotide verwendet, die i.d.R. nur 20 bis 50 Nucleotide lang sind. Die

Oligonukleotide der Affymetrix GeneChips[®] werden mit Hilfe eines ganz speziellen Verfahrens hergestellt: Sie werden direkt *in situ* auf dem Silizium-Träger („Wafer“) synthetisiert. Hierbei werden Prinzipien der Photolithographie und der chemischen DNA-Synthese angewandt. Photolabile Schutzgruppen werden durch Bestrahlung mit Licht und nur an bestimmten Stellen lichtdurchlässige Masken selektiv entfernt. An die von den Schutzgruppen befreiten Stellen können dann chemisch Nukleotide gekoppelt werden. Auf diese Weise werden Schritt für Schritt und unter Einsatz einer Vielzahl von Masken die Oligonukleotide direkt auf dem Träger synthetisiert (Abb. 4).

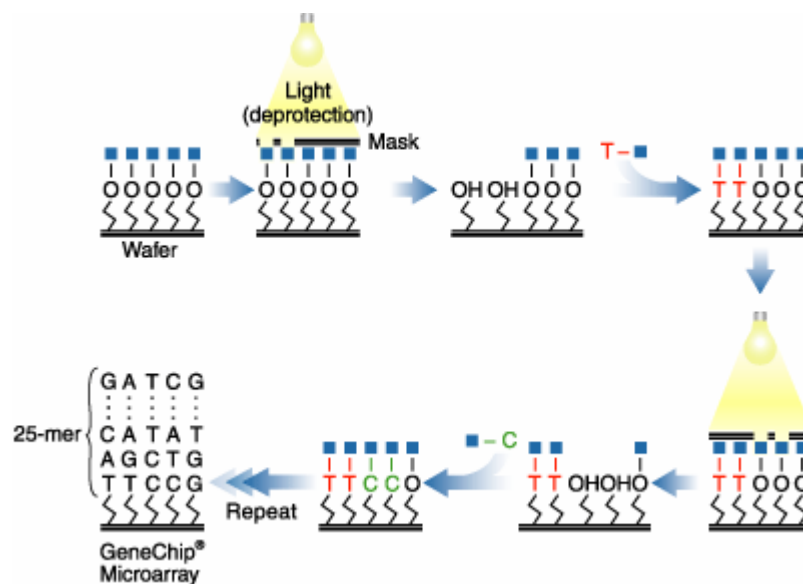


Abb. 4: Photolithographische *in situ* Synthese von Oligonukleotiden zur Herstellung von Affymetrix GeneChips[®]

Die Oligonukleotide auf Affymetrix GeneChips[®] werden nicht auf das Trägermaterial „gespottet“, sondern *in situ* auf diesem synthetisiert (hier: Silizium-Träger, auch „Wafer“ genannt). Durch Einsatz photolabiler Schutzgruppen, die mittels lichtundurchlässiger Masken selektiv entfernt werden können, werden Schritt für Schritt Nukleotide an die jeweils von Schutzgruppen befreiten Stellen angeknüpft. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis alle gewünschten Oligonukleotide synthetisiert worden sind. [Quelle: <http://www.affymetrix.com>]

cDNA-Microarrays werden meistens mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten cDNA-Proben gleichzeitig hybridisiert, wobei die Gesamtmengen an eingesetzter cDNA gleich sind. Dadurch kommt es zu einer Konkurrenz der unterschiedlich markierten cDNAs um die Bindestellen innerhalb eines Spots. Befindet sich in einer cDNA-Probe eine größere Menge einer bestimmten cDNA-Sequenz als in der anderen Probe, so wird von dieser innerhalb eines Spots mit der komplementären Sequenz auch mehr gebunden. Infolgedessen überwiegt die Fluoreszenzintensität eines Fluorophors. Beide Fluoreszenzintensitäten werden separat gemessen. Weist man den einzelnen Fluorophoren eine Farbe zu, erhält man durch

Überlagerung der zwei Fluoreszenzmessungen einen sogenannten Pseudofarbenplot. In solch einem Plot sind Spots, die nur eine Art Fluoreszenz-markierte cDNA gebunden haben, beispielsweise rot oder grün, während Spots, die beide Fluoreszenz-markierte cDNAs gebunden haben, eine Mischfarbe besitzen, beispielsweise Gelb (Abb. 5). Diese Methode besitzt den Vorteil, dass für die Analyse zweier zu vergleichender cDNA-Proben nur 1 Array benötigt wird.

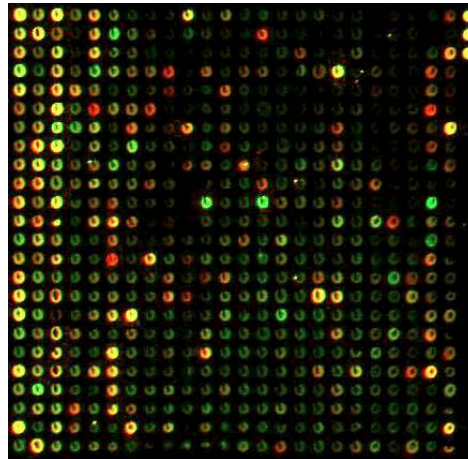


Abb. 5: Pseudofarbenplot eines cDNA-Microarrays

Gezeigt ist hier ein sogenannter Pseudofarbenplot eines cDNA-Microarrays, welchen man durch Überlagerung der Fluoreszenzsignalintensitäten zweier unterschiedlicher Fluorophore (z.B. Cy3 und Cy5) erhält.

Oligonucleotid-Microarrays und Microarrays, bei denen radioaktivmarkierte Nukleotide verwendet werden, werden getrennt mit identisch markierten cDNA- oder cRNA-Proben hybridisiert, d.h. für jede Probe ist ein separater Microarray erforderlich. Hier findet also keine Konkurrenz um Bindungsstellen statt, sondern die Intensität der Fluoreszenz, Chemilumineszenz oder Radioaktivität wird für identische Spots auf unterschiedlichen Microarrays verglichen. Eine größere Menge an gebundener, markierter cDNA oder cRNA führt zu einem höheren Messwert (visualisierbar als hellerer Spot, vgl. Abb. 6 und Abb. 7). Daraus wird geschlossen, dass das Gen in einem System stärker exprimiert wird als im anderen.

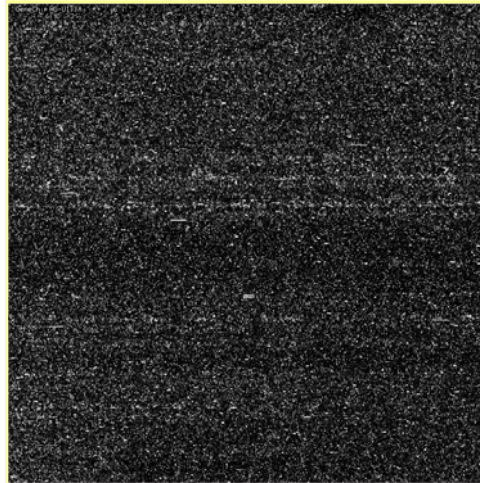


Abb. 6: Visualisierung eines Affymetrix-Microarrays

Die mit Hilfe eines hochauflösenden Laser-Konfokal-Scanners elektronisch erfaßten Fluoreszenzintensitäten eines Affymetrix-Microarrays können mittels geeigneter Software in Form eines Bild bestehend aus Spots (Zellen) unterschiedlicher Helligkeit visualisiert werden. Die Zellen eines solchen Arrays sind jedoch so klein, dass sie mit bloßem Auge ohne lokale Vergrößerung nicht erkennbar sind. Der Zweck einer solchen Darstellung liegt daher vor allem in der Erkennung von Artefakten, die auf einem Array auftreten können, wie z.B. Kratzern, Verunreinigungen oder ungleichmäßigen Hybridisierungen.

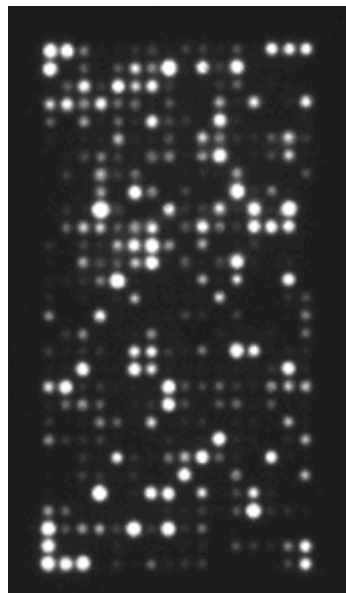


Abb. 7: Visualisierung eines Oligo GEArray[®]

Diese Abbildung zeigt die Visualisierung eines Oligo GEArray[®] Microarrays, dessen chemilumineszierende Spots mit einer CCD-Kamera erfaßt wurden. Ähnlich, nur mit inverser Farbverteilung, d.h. schwarzen Spots auf hellem Hintergrund, würde einer entwickelter Röntgenfilm bei einem Oligonucleotid-Microarray bei Verwendung von radioaktiv markierten Nukleotiden aussehen.

Affymetrix GeneChips[®] besitzen einen speziellen Aufbau: Da die Spezifität der Hybridisierung aufgrund der nur sehr kurzen Oligonukleotide für sich allein betrachtet relativ gering ist, wird jede definierte Sequenz auf dem Microarray durch 11 bis 20 Oligonukleotid-Paare beschrieben. Diese Oligonukleotide decken verschiedene Abschnitte einer längeren Sequenz ab. Die Oligonukleotide bestehen jeweils aus einem „Perfect Match“- und einem „Mismatch“-Oligonukleotid. Das „Perfect Match“-Oligonukleotid ist perfekt komplementär zur bekannten Sequenz, während das „Mismatch“-Oligonukleotid eine falsche Base aufweist.



Abb. 8: Beispiel eines „Perfect Match“-/ „Mismatch“-Oligonukleotid-Paars

Auf Affymetrix Microarrays liegt jedes Oligonukleotid in Form eines „Perfect Match“-/„Mismatch“-Paares vor. Während bei einem „Perfect Match“-Oligonukleotid alle Basen mit der definierten Sequenz übereinstimmen, ist bei einem „Mismatch“-Oligonukleotid eine falsche Base eingebaut. Diese befindet sich üblicherweise in der mittleren Region des Oligonukleotids.

Die mit einem bestimmten Oligonukleotid bedeckten Bereiche werden bei den Affymetrix GeneChips[®] üblicherweise nicht als Spots, sondern als Zellen bezeichnet. Die zusammengehörigen Zellintensitäten einer definierten Sequenz werden mit Hilfe der Affymetrix-Datenanalyse-Software jeweils zu einem einzelnen Genexpressionsparameter verrechnet. Das Verhältnis zweier Genexpressionslevel wird bei Affymetrix GeneChips[®] und der Analyse mit der Affymetrix Microarray Analysis Suite-Software i.d.R. in logarithmierter Form (\log_2) als sogenanntes „Signal Log Ratio“ (SLR) ausgegeben. Auf der Basis der Zellintensitäten der „Perfect Match“- und „Mismatch“-Oligonukleotide werden zusätzlich Parameter berechnet, die ein Maß für die Spezifität der Hybridisierung darstellen. Dem Genexpressionsparameter wird durch die Software auch ein sogenannter „Detection Call“ zugewiesen: Der qualitative „Detection Call“, welcher auf den quantitativen Parametern basiert, kann „Present“, „Absent“ oder „Marginal“ lauten und soll angeben, ob eine Sequenz in einer Probe vorhanden ist („Present“), nicht vorhanden ist („Absent“) oder nur marginal exprimiert wird („Marginal“). Der „Detection Call“ „Absent“ muss nicht in jedem Fall bedeuten, dass das Gen nicht exprimiert wird, sondern kann auch nur darauf hinweisen, sich dass das Signal nicht ausreichend vom Hintergrund unterscheidet. Die Sinnhaftigkeit und Verlässlichkeit der „Detection Calls“ sowie die Verwendung von „Mismatch“-Signalintensitäten wird aber von

einigen Seiten kritisiert. Daher wurden alternative Modelle (Algorithmen) entwickelt, welche die „Mismatch“-Signale nicht berücksichtigen und ohne „Detection Calls“ arbeiten (Li und Wong 2001).

Prinzipiell müssen bei zu vergleichenden Microarrays eine Hintergrundkorrektur sowie eine Normalisierung durchgeführt werden. Die Hintergrundkorrektur kann lokal oder global erfolgen. Bei einer lokalen Hintergrundkorrektur wird einer definierter, den Spot umgebender Bereich als Hintergrund betrachtet und vom Intensitätswert des zugehörigen Spots subtrahiert. Als Intensitätswerte zur globalen Hintergrundkorrektur können leere Spots, Spots mit einer künstlichen Sequenz (ohne reales Äquivalent) oder der minimale Intensitätswert auf dem Microarray herangezogen werden. Die Normalisierung ist erforderlich, um verschiedenste Variabilitäten, die bei Microarray-Experimenten auftreten können, zu kompensieren, zum Beispiel:

- Unterschiede in der Menge der aufgetragenen cDNA-/cRNA-Proben
- Unterschiede in der Effizienz der Markierung
- Unterschiede bei der Hybridisierung

Zur Normalisierung von Microarrays mit einer sehr großen Anzahl an Genen/Sequenzen (vgl. Affymetrix Microarrays) wird häufig die Multiplikation aller Signalintensitäten mit einem Skalierungsfaktor, welcher den arithmetischen Mittelwert aller Fluoreszenzintensitäten eines Arrays auf einem gemeinsamen konstanten Zielwert bringt, eingesetzt. Es wird nämlich davon ausgegangen, dass nur ein relativ geringer Anteil der Gene differentiell exprimiert wird und größere Unterschiede in der Gesamtsignalintensität eines Arrays auf die oben genannten Variabilitäten zurückzuführen sind. Bei Microarrays mit einer geringeren Anzahl an Genen/Sequenzen (vgl. Oligo GEArray[®] Microarrays) kann diese Annahme nicht gemacht werden; daher werden hier zur Normalisierung vorwiegend konstitutiv exprimierte Haushaltsgene oder der Median aller Signalintensitäten herangezogen.

Durch Auswahl geeigneter „Filterkriterien“ und ggf. statistische Analysen werden auf der Grundlage der Microarray-Daten potentiell differentiell exprimierte Gene identifiziert. Hierbei soll berücksichtigt werden, dass die Microarray-Technologie vorwiegend als Screening-Methode zu betrachten ist, die immer auch eine gewisse Anzahl an falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen liefern kann. Die Regulationsfaktoren von Genen, welche in Hinblick auf die experimentelle Fragestellung von besonderem Interesse sind, sollten daher mit anderen Methoden zur Genexpressionsanalyse verifiziert werden.

Neben ihrer typischen Anwendung bei der Analyse von Genexpressionsänderungen (i.d.R. als Reaktion auf die Stimulation mit einer bestimmten Substanz) können Microarrays auch zur Identifizierung von Karzinogenen (Afshari *et al.* 1999) und Pathogenen (Al Khaldi *et al.* 2002) sowie zur Subklassifizierung von Tumoren, d.h. zum „Gene Profiling“ (Sallinen *et al.* 2000, Pusztai *et al.* 2003) eingesetzt werden.

2.2.4 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine spezielle PCR-Methode, die zur Quantifizierung von DNA oder cDNA, aber auch zur Mutationsanalyse und Genotypisierung (z.B. Allel-Diskriminierung, Detektion von „Single Nucleotide Polymorphisms“) eingesetzt werden kann. Mit ihrer Hilfe können zum Beispiel Pathogene wie Bakterien und Viren über ihr genetisches Material, ganz gleich ob DNA oder RNA, bei geringem Titer noch detektiert und sogar quantifiziert werden. Die Real-Time RT-PCR ermöglicht vor allem die relativ einfache Quantifizierung von mRNA-Expressionsleveln und stellt damit eine nützliche Alternative oder Ergänzung zu aufwendigeren Methoden wie Northern Blotting, RNase Protection Assays und kompetitiven PCR-Assays dar. Besonders häufig findet die Methode neuerdings Verwendung zur Verifizierung von DNA-Microarray-Ergebnissen. Ihr Namen erhielt die Real-Time PCR aufgrund der Möglichkeit, die Amplifikation während der PCR in Echtzeit, also „Real-Time“, mitverfolgen zu können.

Das Grundprinzip der Real-Time PCR ist je nach Hauptanwendungsbereich unterschiedlich. In ihrer Anwendung als quantitative PCR-Methode basiert die Real-Time PCR auf der Fluoreszenz-Detektion bei der Amplifikation des Zielgens („Targets“), wobei die gemessene Fluoreszenz proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt ist. Um diese zur Menge an gebildetem PCR-Produkt proportionale Fluoreszenz zu erzeugen, werden verschiedene Methoden eingesetzt, die jeweils Vor- und Nachteile besitzen. Im folgenden werden kurz die vier gängigsten Detektionsmethoden („Detection Chemistries“) diskutiert:

- 1) Der sog. Taqman[™] Assay (auch 5'-Nuclease-Assay genannt) gehört zur Gruppe der Sonden-basierten Assays. Bei der zur Detektion verwendeten Taqman-Sonde handelt es sich um ein zu einem Abschnitt des DNA-Templates komplementäres Oligonukleotid mit Fluorophor am 5'-Ende und Quencher am 3'-Ende. Solange die Sonde intakt ist, kommt es aufgrund der räumlichen Nähe von Fluorophor und Quencher zu einer Fluoreszenzauslöschung. Ein 100 bis 200 Basen vor der Anlagerungssequenz der Taqman-Sonde bindender Forward-Primer sorgt für eine Elongation in Richtung Taqman-Sonde.

Trifft das Enzym Taq-Polymerase mit seiner doppelstrangspezifischen 5'-Nuclease-Aktivität nun auf die an das Template gebundene Taqman-Sonde, so wird diese abgebaut. Dies führt zur Abspaltung des Fluorophors vom Quencher, so dass nun beide frei und unabhängig voneinander in Lösung diffundieren können. Auf diese Weise vergrößert sich der räumliche Abstand von Fluorophor und Quencher beträchtlich, die Fluoreszenzauslöschung wird aufgehoben, und in Abhängigkeit der Menge an abgebauter Taqman-Sonde ist infolgedessen eine erhöhte Fluoreszenz messbar.

- 2) Beim Hybridization Probe-Assay werden neben den für die eigentliche Amplifikation erforderlichen Primern zwei Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide mit aneinandergrenzenden komplementären Sequenzen im DNA-Template eingesetzt, wobei das Fluorophor des ersten Oligonukleotids (= Fluorophor 1) in der Lage ist, bei ausreichender räumlicher Nähe (und Anregung durch eine Lichtquelle von außen) das Fluorophor des zweiten Oligonukleotids (= Fluorophor 2) zur Emission anzuregen. Diese räumliche Nähe ist im denaturierten Zustand nicht gegeben. Sobald sich jedoch beide Oligonukleotide während der Annealing-Phase gleichzeitig an das DNA-Template anlagern, liegen das Fluorophor 1 und Fluorophor 2 so nahe zusammen, dass eine Anregung von Fluorophor 2 durch Fluorophor 1 möglich ist. Diese induzierte Fluoreszenz wird beim Hybridization Probe-Assay gemessen.
- 3) Der Molecular Beacon-Assay beinhaltet – ähnlich dem Taqman-Assay – die Verwendung eines zu einem Abschnitt des DNA-Templates komplementären Oligonukleotids mit einem vor Nuclease-Abbau geschütztem Fluorophor am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Diese als „Molecular Beacon“ bezeichnete Sonde muss jedoch eine spezielle Eigenschaft aufweisen: eine Haarnadelschleifenstruktur, welche Fluorophor und Quencher in direkte Nachbarschaft bringt. Solange diese Haarnadelschleifenstruktur ausgebildet ist, kommt es zu einer Fluoreszenzauslöschung. In der Denaturierungsphase der PCR wird diese Struktur aufgebrochen; danach lagert sich die Sonde während der Annealing-Phase an das Template an. In diesem „entfalteten“ Zustand ist der Abstand zwischen Fluorophor und Quencher ausreichend vergrößert, so dass keine Fluoreszenzauslöschung mehr stattfindet. Diese hierdurch verursachte Fluoreszenzzunahme wird beim Molecular Beacon-Assay gemessen.
- 4) Der für die quantitative Analyse am häufigsten verwendete SYBR Green I Assay basiert auf dem interkalierenden Farbstoff SYBR Green I, welcher nur bei Einlagerung in doppelsträngige DNA fluoresziert. Durch die Zunahme an doppelsträngiger DNA im

Verlauf der Real-Time PCR kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Dieser Fluoreszenzanstieg wird bei diesem Assay gemessen.

Wie bereits zuvor erwähnt haben Sonden-basierte Assays und Interkalator-Assays jeweils Vor- und Nachteile. Sonden-basierte Assays besitzen den Vorteil, dass ihr Detektionssystem spezifisch für die Zielsequenz ist. Zudem ermöglichen sie Multiplex-PCRs, d.h. die Detektion mehrerer Zielsequenzen gleichzeitig (unter Verwendung verschiedener an die Sonden gekoppelter Fluorophore). Ihr Nachteile sind jedoch teure Sonden und teilweise schwieriges Sonden-Design. Die Interkalator-Assays hingegen benötigen keine teuren Sonden und erfordern kein spezielles Sonden-Design, sondern lediglich gewöhnliche Oligonukleotid-Primer (vgl. Primer-Design in Abschnitt 4.2.10). Mit Interkalator-Assays sind jedoch prinzipbedingt keine Multiplex-PCRs möglich. Darüberhinaus ist ihr Detektionssystem nicht nur spezifisch für die Zielsequenz, sondern für jegliche doppelsträngige DNA, was bei einer absoluten Quantifizierung genomischer DNA problematisch sein kann und generell eine Überprüfung der Spezifität der Amplifikation erfordert (d.h. Prüfung auf Bildung von Nebenprodukten).

Diese Spezifitätsprüfung kann mittels Agarose-Gelelektrophorese (durch Prüfung auf Banden korrekter Größe und eventuelle Nebenbanden) und/oder über eine sog. Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse ist folgendes: Im Anschluß an die eigentliche PCR wird die Fluoreszenzänderung während eines sehr langsamen Aufschmelzens der DNA-Doppelstränge gemessen. Die steigende Temperatur führt zu einer verstärkten thermischen Bewegung aller in Lösung befindlichen Moleküle. Dadurch sinkt im Rahmen eines dynamischen Gleichgewichts die Menge an DNA-gebundendem Interkalator vorerst nur sehr langsam. Doch sobald der gesamte Interkalator durch das Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge freigesetzt wird, kommt es zu einem starken Abfall der Fluoreszenzintensität. Trägt man die Temperatur gegen die Fluoreszenz („Background Subtracted RFU“) graphisch auf, so erhält man für jeden PCR-Ansatz, d.h. jedes einzelne gemessene Well oder Reaktionsröhrchen eine Kurve und damit letztendlich eine Kurvenschar wie in Abb. 9 beispielhaft dargestellt.

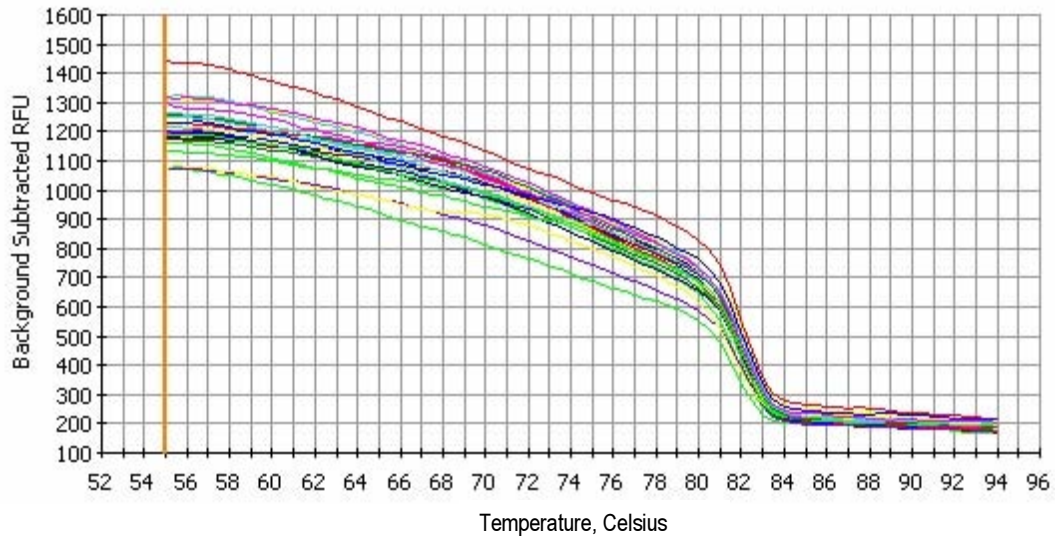


Abb. 9: Schmelzkurvenanalyse – Auftragung der Temperatur gegen die Fluoreszenz

Das Diagramm zeigt die untransformierten Daten (Fluoreszenzintensitäten in Form von Hintergrund-korrigierten RFU = Relative Fluorescence Units) der Schmelzkurvenanalyse.

In dieser Darstellungsform läßt sich nur schwer erkennen, ob Nebenprodukte gebildet wurden oder nicht. Werden diese Rohdaten jedoch einer mathematischen Transformation unterzogen, indem die 1. negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gebildet wird und diese anschließend in einem Diagramm gegen die Temperatur aufgetragen wird, dann werden die gebildeten Produkte als Peaks sichtbar, wobei der Schnittpunkt einer vertikalen Linie durch die Peakspitze mit der Abszisse dem Schmelzpunkt des gebildeten Produkts entspricht. In Abb. 10 ist ein solches Diagramm dargestellt. In diesem Beispiel ist nur ein einzelner Peak zu sehen. Daraus kann geschlossen werden, dass nur ein einzelnes Produkt gebildet wurde (abgesehen von dem unwahrscheinlichen Fall, dass zufällig zwei Produkte mit der selben Schmelztemperatur gebildet wurden). Wären hingegen mehrere Peaks sichtbar, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Nebenprodukte gebildet worden. In bestimmten Fällen werden auch Primer-Dimere als Peaks sichtbar, doch lassen sich diese durch ihre meist deutlich niedrigeren Schmelztemperaturen von regulären Nebenprodukten unterscheiden.

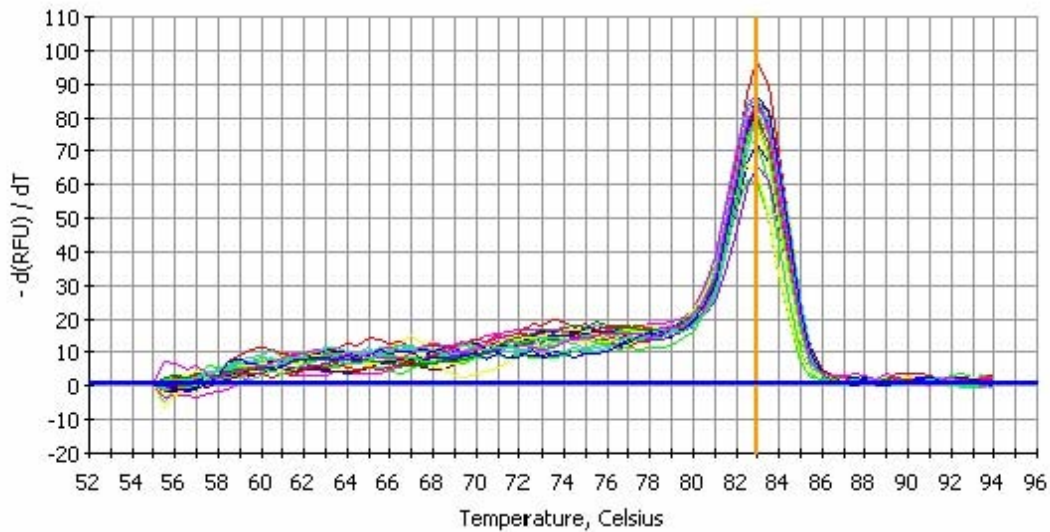


Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse – 1. negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gegen die Temperatur

Trägt man die 1. negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gegen die Temperatur auf, so erhält man ein wesentlich leichter interpretierbares Diagramm als bei der Auftragung Fluoreszenz gegen Temperatur (vgl. Abb. 9). Jedes Produkt mit einem individuellen Schmelzpunkt wird in diesem Diagrammtyp als Peak sichtbar. Dieses Beispiel für ein Schmelzkurvenanalyse-Diagramm zeigt nur einen einzelnen Peak, d.h. in diesem Fall wurde während der PCR nur ein einziges Produkt gebildet.

Als Quantifizierungsparameter der quantitativen Real-Time PCR dient der sog. C_t -Wert, welcher auf der Amplifikationskinetik der Polymerasekettenreaktion beruht. Es hat sich herausgestellt, dass die Fluoreszenz-Endwertbestimmung zur DNA-Quantifizierung ungeeignet ist, da die Plateau-Phase auch bei gleichen Mengen an Template-DNA sehr unterschiedlich ausfallen kann. Dagegen ist der Zeitpunkt (\Rightarrow Zyklus), an welchem die Fluoreszenz beginnt signifikant anzusteigen, (abgesehen von gewöhnlichen Messschwankungen) konstant. Hieraus leitet sich der C_t -Wert (C für „Cycle“ und t für „Threshold“) ab. In einem Amplifikationsdiagramm (Fluoreszenz vs Amplifikationszyklus) läßt sich dieser auf folgende Art und Weise graphisch veranschaulichen: Legt man einen zu überschreitender Schwellenwert („Threshold“) für die Fluoreszenz fest und zieht vom Schnittpunkt dieser Schwellenwertgeraden mit der Amplifikationskurve eine vertikale Linie zur Abszisse, so erhält man als Schnittpunkt den C_t -Wert (Abb. 11).

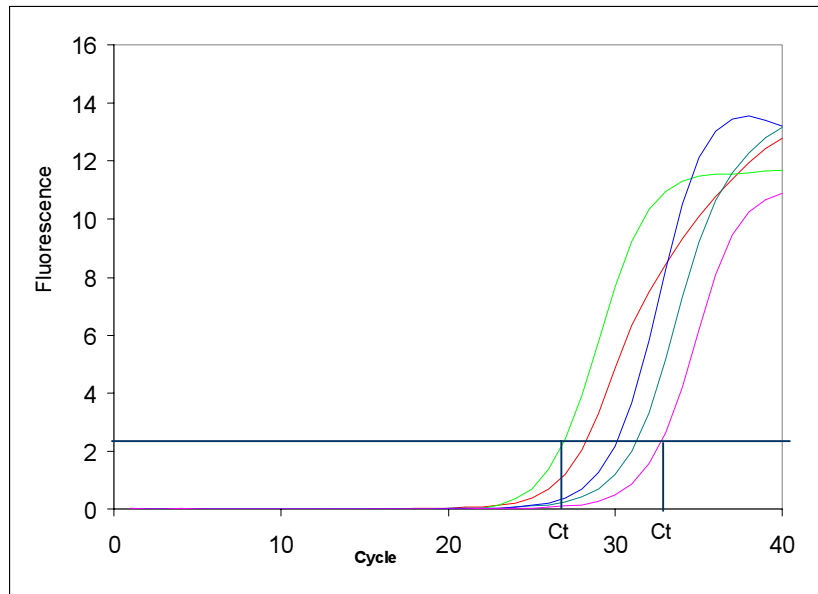


Abb. 11: Ermittlung des Ct-Wertes aus einem Amplifikationsdiagramm

Der C_t -Wert einer Probe ergibt sich aus einem Amplifikationsdiagramm folgendermaßen: Ausgehend vom Schnittpunkt der horizontalen Schwellenwertgeraden mit der Amplifikationskurve wird eine vertikale Linie nach unten gezogen. Der Schnittpunkt dieser Linie mit der Abszisse ergibt den jeweiligen C_t -Wert, der anschaulich betrachtet die Zykluszahl angibt, bei welcher der gewählte Fluoreszenzschwellenwert überschritten wird.

Der Schwellenwert kann nach unterschiedlichen Kriterien festgelegt werden, muss aber dann für zu vergleichende Resultate immer gleich gewählt werden. Eine Festlegung des Schwellenwerts kann folgendermaßen erfolgen:

- automatische Berechnung eines Schwellenwerts durch die Datenanalyse-Software des Real-Time PCR-Cyclers nach einem eingebauten Algorithmus (z.B. 10-facher Wert der Standardabweichung des Hintergrundrauschens von Zyklus 1 bis n)
- manuelle Einstellung des Schwellenwerts, so dass dieser deutlich über dem anfänglichen Hintergrundrauschen sowie in der exponentiellen Phase der PCR liegt

Im Rahmen der Real-Time PCR gibt es unterschiedliche Quantifizierungsmethoden:

- 1) Absolute Quantifizierung
 - a) ohne interne Kontrolle
 - b) mit interner Kontrolle
- 2) Relative Quantifizierung
 - a) ohne Effizienzkorrektur
 - b) mit Effizienzkorrektur

Die absolute Quantifizierung findet v.a. bei der quantitativen Detektion von Pathogenen Anwendung, da es hier auf Absolutmengen ankommt. Die absolute Quantifizierung basiert auf der Erstellung einer Standardkurve mittels entsprechender Nukleinsäure-enthaltender

Standards. Es werden die C_t -Werte mehrerer Standards gegen die zugehörigen logarithmierten (\log_{10}) Konzentrationen, Kopienzahlen o.ä. aufgetragen. Mittels linearer Regression wird die optimale Eichgerade ermittelt, die dann unter Verwendung des C_t -Werts zur Berechnung unbekannter Konzentrationen, Kopienzahlen o.ä. verwendet werden kann. Ein offenkundiger Vorteil der absoluten Quantifizierung besteht in der Möglichkeit, Mengenangaben in Form von Absolutwerten (z.B. pg, pmol, Kopienzahl) machen zu können. Sie besitzt jedoch auch Nachteile: sie ist relativ aufwendig, die Stabilität der Standards ist nicht unbedingt gewährleistet und die Bestimmung der Standardkonzentrationen ist nur mit sehr begrenzter Genauigkeit möglich. Um falsch negative Ergebnisse erkennen zu können, wird bei einer absoluten Quantifizierung mit interner Kontrolle jede Probe mit einer kleinen Menge Kontroll-Template versetzt, welches parallel zur Zielsequenz amplifiziert wird. Sollte das Kontroll-Template aus irgendeinem Grund (z.B. Verdunstung des PCR-Ansatzes, Pipettierfehler) nicht amplifiziert worden sein, besitzt auch das negative Ergebnis keinen Aussagewert. Die absolute Quantifizierung mit interner Kontrolle erfordert eine Multiplex-PCR (vgl. oben).

Die relative Quantifizierung wird v.a. bei der quantitativen Bestimmung von Genexpressionsleveln verwendet, wenn verschiedenen Systeme verglichen werden sollen und es nicht auf Absolutwerte selbst, sondern lediglich auf deren Relation ankommt. Die Berechnung relativer Expressionslevel basiert auf dem C_t -Wert und der Formel für die exponentielle Amplifikation von DNA-Molekülen, für welche gilt:

Die gebildete Anzahl an Molekülen nach n Zyklen ausgehend von $N(0)$ Ausgangsmolekülen während der exponentiellen Amplifikationsphase beträgt unter Annahme einer idealen Amplifikation:

$$N(n) = N(0) \times 2^n \quad (\text{mit } E = 2) \quad \Rightarrow \quad N(C_t) = N(0) \times 2^{C_t}$$

Bei einer nicht-idealen Amplifikation mit einer Effizienz $E < 2$ beträgt sie:

$$N(n) = N(0) \times E^n \quad (\text{mit } E < 2) \quad \Rightarrow \quad N(C_t) = N(0) \times E^{C_t}$$

Um lediglich mit diesen Formeln arbeiten zu können, müßte man davon ausgehen, dass die Ausgangsmenge $N(0)$ an cDNA-Template direkt proportional ist zur mRNA-Menge, aus welcher sie synthetisiert wurde. Diese Annahme ist nicht gerechtfertigt, weil die Konzentrationsbestimmung von RNA nur mit sehr begrenzter Genauigkeit möglich ist und Variationen in der Effizienz der reversen Transkription auftreten können. Um diese Effekte zu kompensieren, wird eine Normierung mittels eines parallel (aber in getrennten Ansätzen)

amplifizierten Referenzgens, welches unter den experimentellen Bedingungen konstitutiv exprimiert wird, durchgeführt. Referenzgene sind i.d.R. ubiquitär exprimierte Haushaltgene oder strukturelle Gene, wie zum Beispiel Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, β -Actin oder β_2 -Microglobulin. Die C_t -Werte der Referenzgene fließen bei der Normierung in die Berechnung der Genexpressionslevel mit ein. Zieht man die obigen Formeln für zwei zu vergleichende Systeme (einschließlich ihrer Referenzgene) heran, ergeben sich durch einfache mathematische Umformungen die folgenden Berechnungsformeln für das Verhältnis zweier Genexpressionslevel (RF = Regulationsfaktor / Target = Zielsequenz / Referenz = Referenzgen):

Ohne Effizienzkorrektur ($E = 2$):

$$RF = 2^{-\Delta\Delta C_t} \text{ mit } \Delta\Delta C_t = [C_t(\text{Target})_1 - C_t(\text{Referenz})_1] - [C_t(\text{Target})_2 - C_t(\text{Referenz})_2]$$

Mit Effizienzkorrektur ($E \neq 2$):

$$RF = \frac{E_{\text{Target}}^{\Delta C_t^{\text{Target}} (\text{System 1} - \text{System 2})}}{E_{\text{Referenz}}^{\Delta C_t^{\text{Referenz}} (\text{System 1} - \text{System 2})}}$$

Anstelle eines Regulationsfaktors lassen sich in analoger Weise auch dimensionslose relative Genexpressionslevel berechnen.

Die relative Quantifizierung besitzt wie die absolute Quantifizierung sowohl Vor- als auch Nachteile. Ein definitiver Vorteil ist der geringere Aufwand dieser Methode. Zudem wird durch die Normierung eine Vielzahl an Ungenauigkeiten (z.B. bei der RNA-Konzentrationsbestimmung, in der Effizienz der reversen Transkription, beim Pipettieren der cDNA) kompensiert. Deswegen ist die Methode weniger fehleranfällig als die absolute Quantifizierung. Ein Nachteil besteht darin, dass man nur Relativwerte erhält, was aber je nach Anwendungsbereich von geringerer Bedeutung ist. Des Weiteren muss bei dieser Methode aufgrund der erforderlichen Normierung durch ein Referenzgen grundsätzlich die doppelte Menge an Ansätzen erstellt werden.

Die Real-Time PCR als quantitative Methode besitzt im Vergleich zu Northern Blotting und den meisten anderen alternativen Methoden zur Genexpressionsanalyse eine ausgesprochen hohe Sensitivität: Es können auch sehr geringe Mengen an DNA/cDNA nachgewiesen werden, teilweise bis hinunter zu einer Anzahl von 10 Kopien pro Ansatz, wobei die Absolutwerte für die Sensitivität abhängig von der Zielsequenz, der Probenart und der Detektionsmethode sind. Ein weiterer Bereich, in welchem die Real-Time PCR den meisten

alternativen Methoden eindeutig überlegen ist, ist die dynamische Messbereichsabdeckung („Dynamic Range“): Messwerte über einen Bereich von 7 log-Stufen können mit ihr noch verlässlich erfaßt werden. Ein methodische Schwäche der Real-Time PCR hingegen ist die Diskriminierung von sich nur geringfügig unterscheidenden Genexpressionsleveln. Dies ist bedingt durch die höhere Variabilität der Endergebnisse, die daher rührt, dass der Quantifizierungsparameter C_t im Exponent der Berechnungsformeln auftritt. Selbst relativ geringe Schwankungen der C_t -Werte führen daher zu relativ großen Schwankungen der Genexpressionslevel. Dies ist weniger problematisch bei der Bestimmung von sehr unterschiedlichen C_t -Werten und somit stark verschiedenen Genexpressionsleveln, die Bestimmung geringer signifikanter Unterschiede in Genexpressionsleveln kann jedoch problematisch sein und ggf. eine hohe Anzahl an Replikaten erforderlich machen.

Die Mutationsanalyse und Genotypisierung mittels Real-Time PCR basiert im Wesentlichen auf dem Prinzip der Schmelzkurvenanalyse. Durch Einsatz geeigneter Sonden können mutierte Sequenzen und unterschiedliche Allele als individuelle Peaks sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise ist eine Unterscheidung von Mutanten und Genotypen möglich. Gegenüber der Sequenzierung, mit deren Hilfe diese Unterscheidung zwar ebenfalls möglich ist, kann die Mutationsanalyse und Genotypisierung mittels Real-Time PCR auch im Großmaßstab zum Screening eingesetzt werden.

2.2.5 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (auf englisch „Flow Cytometry“ oder „Fluorescence-Activated Cell Sorting“ = FACS) ist eine Methode, die es erlaubt, verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften und Zelloberflächenmarker zu unterscheiden und ggf. aufzutrennen (vgl. „Sorting“). Die dazu eingesetzten Durchflußzytometer bestehen aus folgenden Hauptkomponenten:

- 1) einer Lichtquelle, die zur Anregung fluoreszierender Moleküle dient (üblicherweise ein Laser, welcher Licht einer definierten Wellenlänge aussendet)
- 2) einem Durchflußsystem (Flußzelle) mit einer extrem dünnen Kapillare, durch welche in Suspension befindliche Zellen nacheinander hindurchgeleitet werden und dabei den Laserstrahl passieren
- 3) mehreren Detektoren, welche Streulicht und Fluoreszenzstrahlung messen
- 4) ggf. einem elektrostatischem Auftrennungssystem, mit dessen Hilfe die Zellen sortiert werden können.

Beim Bestrahlen einer Zelle, die die Flußzelle passiert, entsteht Streulicht. Dieses Streulicht wird in zwei unterschiedlichen Positionen gemessen: zum einen ungefähr in Richtung des ursprünglichen Strahls und zum anderen etwa im rechten Winkel zum ursprünglichen Strahl. Das in Richtung des ursprünglichen Strahls gemessene Streulicht, das sog. Vorwärtsstreulicht („forward scatter“), ist ausschließlich abhängig von der Größe der Zellen, während das im rechten Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessene Licht, das sog. Seitwärtsstreulicht („side scatter“), ein Maß für deren Granularität und Größe ist. Um diese morphologischen Eigenschaften der Zellen zu analysieren, ist keine spezielle Vorbehandlung der Zellen erforderlich. Sollen Zellpopulationen zusätzlich anhand spezifischer Zelloberflächenmarker charakterisiert werden, so müssen die Zellen vor der Analyse im Durchflußzytometer mit einem oder mehreren geeigneten Antikörpern, welche an Fluorophore gekoppelt sind, markiert werden. Diese Fluorophore senden bei Bestrahlung durch den Laser eine Fluoreszenzstrahlung aus, die von einem Fluoreszenzdetektor gemessen wird. Auf diese Weise können Zellpopulationen auf der Grundlage verschiedenster Zelloberflächenmarker analysiert werden; selbst eine Analyse auf der Grundlage intrazellulärer Marker ist möglich, sofern eine nicht-destruktive Permeabilisierung der Zellen den Antikörpern diese Moleküle zugänglich macht. Eine Auswertung der FACS-Daten erfolgt zumeist in Form von „Dot Plots“ (Punktwolken-Diagrammen) und Histogrammen. In den zwei- oder sogar dreidimensionalen „Dot Plots“ können die verschiedenen Messparameter gegeneinander aufgetragen werden. Unterschiedliche Zellpopulationen können auf diese Weise als Punktwolken sichtbar gemacht werden. Während bei „Dot Plots“ bis zu drei Messparameter gegeneinander aufgetragen werden können, kann in Histogrammen jeweils nur die Intensität eines Messparameters gegen die Häufigkeit der selbigen aufgetragen werden. Auf der anderen Seite sind Histogramme weitaus besser dazu geeignet, die unterschiedlichen Anteile bestimmter Zellen an der Gesamtzellpopulation darzustellen, also ein quantitatives Bild einer Zellverteilung zu liefern, als „Dot Plots“.

Anwendung findet die Durchflußzytometrie v.a. in der Hämatologie und Immunologie. Im Prinzip kann mit ihrer Hilfe aber jeder Zelltyp analysiert werden, sofern diese in Suspension gebracht werden können. Aufgrund der Vielzahl an detektierbaren Zelloberflächenmarkern besitzt die Durchflußzytometrie vielfältige Anwendungsbereiche. Beispielsweise wurde die Durchflußzytometrie im Rahmen dieser Arbeit über die Detektion von Phosphatidylserin zur Apoptosequantifizierung eingesetzt (Abschnitt 4.2.17).

3. Aufgabenstellung

Tier- und Zellkulturmodelle sowie klinische Studien haben gezeigt, dass IGFBP-2 vielfältige zelluläre und physiologische Funktionen ausüben kann. Entsprechend wurde beobachtet, dass bestimmte pathologische Veränderungen mit Veränderungen in der Expression von IGFBP-2 einhergehen (Abschnitt 2.1.5). Über die molekularen Grundlagen dieser Zusammenhänge ist jedoch noch wenig bekannt. In vorangegangenen Studien wurden in unserem Labor bereits erste Untersuchungen in Hinblick auf die Signaltransduktion gemacht. Dazu wurden in Zellkulturmodellen Änderungen des Phosphorylierungsgrades der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und der p42/p44-Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) als Reaktion auf erhöhte IGFBP-2-Pegel untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Phosphorylierungsgrade dieser Signaltransduktionsmoleküle tatsächlich von IGFBP-2 beeinflusst wurden.

Da IGFBP-2 unter anderem als Modulator der IGF-Wirkungen fungieren kann, ist es nicht einfach, direkte Wirkungen des IGFBP-2 von indirekten Wirkungen des IGFBP-2 zu unterscheiden. Neben Assays mit speziellen IGFs oder Integrin-Antikörpern können direkte IGF-unabhängige Wirkungen des IGFBP-2 mit Hilfe von IGF-insensitiven Zelllinien untersucht werden. Eine solche Zelllinie ist die Brustkrebszelllinie Hs578T. Um IGF-unabhängige Wirkungen des IGFBP-2, auf denen das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt, zu untersuchen, wurde daher diese Zelllinie ausgewählt. Einschließlich der Brustkrebszelllinie Hs578T sollten folgende zur Verfügung stehenden Zelllinien untersucht werden:

a) Hs578T: IGF-insensitive Brustkrebszelllinie (Tumorzelllinie)

Hs578T-Zellen produzieren selbst kaum IGFBP-2. Zellkulturen mit hohen IGFBP-2-Konzentrationen sollten hierbei durch direkte Zugabe von IGFBP-2 zum Zellkulturmedium realisiert werden.

b) A673: Ewing Sarkom-Zelllinie (Tumorzelllinie)

A673-Zellen produzieren bei höherer Zelldichte größere Mengen an IGFBP-2, dessen Expression durch konsekutive, transiente Transfektion mit gegen IGFBP-2 mRNA gerichteten siRNAs herunterreguliert werden sollte. Als Vergleichskontrolle dienen mock-transifizierte Zellkulturen.

c) HEK-293: humane embryonale Nierenzelllinie (immortalisierte Nicht-Tumorzelllinie)

Von dieser Zelllinie existieren zwei mit dem murinen IGFBP-2-Gen stabil transfizierte Varianten. Der als 293-10 bezeichnete Klon produziert große Mengen an IGFBP-2,

während der als 293-4 bezeichnete Klon nur sehr geringe Mengen an IGFBP-2 produziert (Hoeflich *et al.* 1998).

Über Genexpressionsuntersuchungen an oben genannten Zelllinien sollten im Rahmen dieser Arbeit die Wirkungsmechanismen von IGFBP-2 auf der molekularen Ebene näher untersucht werden.

Ergebnisse, welche im Laufe dieser Arbeit erhalten wurden, legten nahe, dass IGFBP-2 eine Wirkung in bezug auf die Apoptose haben könnte. Aus diesem Grund sollte im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht werden, ob IGFBP-2 tatsächlich eine apoptotische Wirkung besitzt.

Im Rahmen der IGFBP-2-Konzentrationsbestimmungen mittels Radioimmunoassay (RIA) sollte zudem die Konzentration zweier weiterer Komponenten des IGF-Systems, hier im speziellen IGF-II und IGFBP-3, bestimmt werden, um zu prüfen, ob IGFBP-2 Einfluß auf diese Parameter nimmt.

Hauptanliegen dieser Arbeit war es letztendlich, die molekularen Grundlagen der zellbiologischen Wirkungen des IGFBP-2 näher zu erforschen. Die dadurch – wenn auch bisher nur in *in vitro*-Systemen – gewonnenen Erkenntnisse könnten helfen, Mechanismen der pathophysiologische Veränderungen, welche mit veränderten IGFBP-2-Pegeln einhergehen, besser zu verstehen und damit neue Therapiemöglichkeiten aufzuzeigen. Dies könnte insbesondere im Bereich der Entwicklung und Progression von Tumoren von Bedeutung sein, die mit stark erhöhten IGFBP-2-Pegeln assoziiert sind (Abschnitt 2.1.5.5).

4. Material und Methoden

4.1 Geräte, Materialien, Reagenzien

4.1.1 Geräte

Zentrifugen

- Tischzentrifuge Mikro 22 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
- Tischzentrifuge 5415C, Eppendorf AG, Hamburg
- Rotixa 50 RS Großzentrifuge, Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen
- Rotanta 46 RSC, Hettich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen (Zellkulturlabor)

Spannungsquellen

- PowerPac 200 Spannungsquelle, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- PowerPac 1000 Spannungsquelle, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Waagen

- Tisch-Feinwaage sartorius BP1200, sartorius AG, Göttingen
- BP 121S Feinwaage, Sartorius AG, Göttingen

Mischer und Schüttler

- Vortexer, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
- Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich
- Polymax 1040 3D-Schüttler, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

Gelelektrophorese-Apparaturen

- MiniSub™ DNA Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- MiniPROTEAN II Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Blotting-Apparaturen

- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Heizgeräte

- Heizrührer IKAMAG RO, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG - IKA-Labortechnik, Staufen
- BIOBLOCK Scientific Magnetrührer mit Heizplatte, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
- Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg
- TRIO-Thermoblock, Whatman Biometra GmbH, Göttingen

pH-Messgeräte

- pH-Meter pH 538 MultiCal, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim

Zellzähler

- Advia[®] 120 Zellzähler, Bayer AG, Leverkusen
- Cobas Micros Zellzähler, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Fotografische Dokumentationssysteme

- CCD-Kamerasystem DIANA II[®], Raytest, Straubenhardt
- UV-Transilluminator (312 nm), Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen
- Cybertech C51 Fotoerfassungsanlage, Mitsubishi Imaging Products, Irvine, CA, USA
- Fotoapparatur, Dunco, Berlin

Mikroskope

- Olympus IX50 Mikroskop (Zellkultur), Olympus Co. GmbH, Hamburg

Inkubatoren und Wärmeschränke

- Bakterienerschüttelinkubator, Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL), Burgwedel
- HERAcell Zellkulturinkubatoren, Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart
- WTB Binder Wärmeschrank (meist 37 °C, Zellkulturlabor), WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen

Sterilbank

- Sterilbank HERAsafe, Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart

FACS-Geräte

- FACSCalibur Durchflußzytometer, BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

Real-Time PCR Cycler

- ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems
- BioRad iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Automatischer Mikrotiter-Platten-Leser (ELISA-Reader)

- Milenia Kinetic Analyzer, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim

Sonstige Geräte

- Gammazähler LB 2111, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbach
- GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems GmbH - PE Applied Biosystems, Weiterstadt
- Hybridisierungsöfen „Standard“ mit Schütteleinrichtung, Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen
- Milli-Q Reinstwasseranlage, Millipore GmbH, Schwalbach
- MPC-S Magnetic Particle Separator, Dynal Biotech GmbH, Hamburg
- SANOclav Autoklav, Wolf, Geislingen
- Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA
- Ultraspec 3000, Amersham Biosciences Europe GmbH (Pharmacia Biotech), Freiburg
- Vakuum-Geltrockner Model 543, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

4.1.2 Software

- Affymetrix Microarray Suite 5.0, MicroDB and Data Mining Tool 3.0
- ScanAlyze v2.50 (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>), Michael Eisen, Lawrence Berkeley National Lab, USA
- DIANA II[®], Raytest, Straubenhardt
- AIDA 2.1[®], Raytest, Straubenhardt
- SOFTmax[®] PRO, Molecular Devices GmbH, Ismaning/München
- Bio-Rad iCycler Software 3.0[®]
- ABI Prism 7700 Sequence Detection System Software Version 1.7
- CellQuest 3.3, BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
- WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>), Joe Trotter, Scripps Institute, La Jolla, CA, USA
- Microsoft Word 97, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
- Microsoft Excel 97, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

4.1.3 Materialien

- Affymetrix Human Genome U133A GeneChips[®], Affymetrix Inc., USA
- BLUE MAX[™] 50 ml Polypropylene Conical Tubes (Falcon Tubes), Becton Dickinson, Heidelberg
- CELLSTAR[®] Cryo.s Kryoröhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- CELLSTAR[®] PP-Test Tubes, 15 ml, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Costar serologische Einwegpipetten mit 2 / 5 / 10 / 25 / 50 ml Maximalvolumen, Corning Incorporated, Wiesbaden
- Eppendorf-Mikropipetten (50 – 200 µl / 100 – 1000 µl), Eppendorf AG, Hamburg
- Gilson-Mikropipetten „Pipetman“ (P100 / P200 / P1000), Middleton, WI, USA
- Kodak Biomax-Film, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays OHS-802, Superarray, Frederick, USA
- Pipettenspitzen (gestopft, DNase-/RNase-frei), BIOzym, Hamburg
- Pipettenspitzen (nicht gestopft), La Fontaine International GmbH & Co. KG, Waghäusel
- Plastik-Reaktionsgefäße mit 2,0 / 1,5 ml Maximalvolumen, Eppendorf AG, Hamburg
- Plastik-Reaktionsgefäße mit 500 µl Maximalvolumen (DNase-/RNase-frei), Roche GmbH, Mannheim
- Polystyren 96-Well- / 12-Well- / 6-Well-Platten, Becton Dickinson, Heidelberg
- Polystyren-Petrischalen für die Zellkultur (100 × 20 mm), BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg
- Polystyren-Zellkulturgefäße mit 25 cm², 75 cm² bzw. 162 cm² Grundfläche, BD Biosciences Discovery Labware, Heidelberg
- Polystyren-Zellkulturgefäße mit 25 cm², 75 cm² bzw. 162 cm² Grundfläche, Corning Incorporated, Wiesbaden
- Immobilon-P Transfer (PVDF) Membran, 0,45 µm, Millipore GmbH, Schwalbach
- Verschiedene Glaswaren, Schott AG, Mainz
- Verschiedene Glaswaren, Biochrom KG, Berlin
- Verschiedene Glaswaren, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt

4.1.4 Chemikalien

Anorganische und organische (Fein-)Chemikalien stammten von folgenden Firmen:

- Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Merck Feinchemikalien und Laborbedarf, Darmstadt
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

4.1.5 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien und Kits

- Acidification Buffer, Mediagnost GmbH, Reutlingen
- ArrayGrade cRNA Cleanup Kit, Superarray, Frederick, USA
- ArrayGrade mRNA Purification Kit, Superarray, Frederick, USA
- Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche GmbH, Mannheim
- BCA Protein Assay, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA
- Biotin-16-UTP, Roche GmbH, Mannheim
- Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche GmbH, Mannheim
- completeTM Mini EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail, Roche GmbH, Mannheim
- ECL Plus System, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Humanes rekombinantes IGFBP-2, Eigenbestand des Hormonlabors (Kinderklinik TÜ) sowie Sandoz Pharma, Basel, Schweiz
- Humanes rekombinantes IGFBP-3, Sandoz
- Humanes rekombinantes IGF II (> 95 %, Endotoxin-frei), Receptor Grade, Mediagnost GmbH, Reutlingen
- Human TGF β -1 ELISA Kit, Anogen, Ontario, Canada
- iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Kundenspezifisch hergestellte siRNA: zwei verschiedene Sequenzen (je ca. 20 Ribonucleotide) gegen IGFBP-2 mRNA; Qiagen-Xeragon, Germantown, MD, USA
- Oligonukleotid-Primer (unmodifiziert), MWG-Biotech AG, Ebersberg
- Omniscript (Reverse Transcription) Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- peqGOLD Universal Agarose, Peqlab, Erlangen
- RNeasy Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden
- RNasin (RNase-Inhibitor), Ambion Ltd., Huntingdon, Cambridgeshire, UK
- TransMessenger Transfection Reagent, Qiagen GmbH, Hilden
- TrueLabeling AMP Linear RNA Amplification Kit, Superarray, Frederick, USA

4.1.6 Antikörper und Seren

- HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
- Kaninchen-Anti-IGF II-Serum, Mediagnost GmbH, Reutlingen
- Kaninchen-Anti-IGFBP 2-Serum, laboreigene Produktion, Hormonlabor der Kinderklinik, Tübingen
- Kaninchen-Anti-IGFBP 3-Serum, laboreigene Produktion, Hormonlabor der Kinderklinik, Tübingen

- Kaninchen-Gammaglobulin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- NF- κ B p105/p50-Antikörper, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
- p53-Antikörper, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
- Ziege-Anti-Kaninchen-Immunoglobulin-Serum, IBL

4.1.7 Radioaktiv markierte Substanzen

- 125 I-IGBP-2-Tracer, Eigenproduktion des Hormonlabors der Kinderklinik, Tübingen
- 125 I-IGBP-3-Tracer, Mediagnost GmbH, Reutlingen
- 125 I-IGF-II-Tracer, Eigenproduktion des Hormonlabors der Kinderklinik, Tübingen

4.1.8 Zellkultur-Medien, Medienzusätze und andere Zellkulturlösungen

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Reinheit $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- DMEM:F12 (1:1) + GlutaMAX™ I, Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Fötale Kälberserum (FCS), Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- HEPES (1 M), Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2, Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- RPMI 1640 + Glutamin, Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Trypsin-EDTA (1X) in HBSS, Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.1.9 Zelllinien

- Ewing-Sarcoma-Zelllinie A673 (No. CRL-7910 und CCL-86 ATCC), American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
- Humane Brustkrebszelllinie Hs578T (No. 86082104 ECACC), European Collection of Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, UK
- Humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 in Form zweier stabil transfizierter Varianten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Andreas Höflich, Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie/Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung und Ernte von Säugetierzellkulturen

Es wurde mit drei verschiedenen adhärennten Zelllinien gearbeitet. Die Brustkrebszelllinie Hs578T und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 wurden im Zellkulturmedium DMEM:F12 (1:1) + GlutaMAX™ I kultiviert, welches mit 10 % fötalem Kälbersum (FCS) und HEPES (12,5 mM) komplementiert worden war. Die Ewing Sarkom-Zelllinie A673 wurde im Zellkulturmedium RPMI 1640 + Glutamin mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden je nach Bedarf oder weiterer Verwendung in T25- / T75- / T162-Polystyren-Zellkulturflaschen oder 100 × 20 mm Polystyren-Kulturschalen ausgesät und in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und erhöhter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die weitere Behandlung der Zelllinien erfolgte unterschiedlich: Die HEK-293-Zellen, welche aufgrund ihrer stabilen Transfektion mit dem IGFBP-2-Gen nicht mit IGFBP-2 behandelt werden mussten, wurden jeweils bei einer Konfluenz von ~90 % für die weitere Verwendung geerntet. Im Falle der mit IGFBP-2 zu behandelnden Hs578T-Zellen wurde hingegen nach Erreichen einer Konfluenz von ungefähr 70 % 24 h vor der Zellernte das Standard-Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt. Ungefähr 8 Stunden später wurden eine gleiche Anzahl an Zellkulturen mit 800 ng/ml bzw. 2000 ng/ml humanem rekombinantem IGFBP-2 behandelt bzw. als Vergleichskontrollen unbehandelt belassen (konkret: Zugabe einer äquivalenten Menge PBS). Dann wurde über Nacht inkubiert, bevor am nächsten Tag die Zellen geerntet wurden. Zellernte und Zell-Splitting erfolgten folgendermaßen: Nachdem das Kulturmedium abgenommen worden war, wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen, Trypsin-EDTA (1X) zugegeben und die Trypsin-EDTA-Wirkung nach etwa 5 min durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden schonend trituriert und in Polypropylen-Röhrchen überführt, ein kleines Aliquot wurde für die Zellzählung im Advia 120-Zellzähler abgenommen. Die Zellen in den Polypropylen-Röhrchen wurden 5 min lang bei 200×g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut 5 min lang bei 200×g zentrifugiert. Für die Weiterkultivierung im Falle eines Zell-Splittings wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Andernfalls wurde das Pellet je nach Art der darauffolgenden Verwendung unterschiedlich weiterverarbeitet.

4.2.2 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zellen

Um jederzeit für Experimente auf Zellen zurückgreifen zu können, wurden von jeder Zelllinie DMSO-Zellstocks hergestellt, d.h. die Zellen wurden kryokonserviert. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Ablösung der Zellen wurde analog zum Zell-Splitting durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.1). Nach der ersten Zentrifugation (5 min, 200×g) der Zellen wurde das Pellet jedoch mit Kulturmedium anstelle von PBS gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation (5 min, 200×g) wurde das Zellpellet vorsichtig in Kryokonservierungsmedium resuspendiert, welches sich aus 70 % serumfreiem Kulturmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO zusammensetzte. Die resuspendierten Zellen wurden in Form von 1 bis 2 ml Aliquots in speziellen Kryoröhrchen bei -80 °C eingefroren und gelagert. Bei Bedarf wurden Zellstocks revitalisiert, indem der Inhalt der Kryoröhrchen unter warmem Wasser möglichst schnell aufgetaut, in ein Polypropylen-Röhrchen überführt und mit FCS-haltigem Kulturmedium gemischt wurde. Die Zellen wurden daraufhin 5 min lang bei 200×g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit FCS-haltigem Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert und ausgesät. Nach einer Revitalisierung kryokonservierter Zellen wurde über zwei Passagen weiterkultiviert, bis die Zellen wieder für Experimente eingesetzt wurden.

4.2.3 Transfektion mit siRNA

Die Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 wurde einer transienten Transfektion mit siRNA unterzogen, um auf diese Weise eine Herunterregulierung der IGFBP-2-Proteinexpression zu bewirken. Zur Transfektion wurde das speziell für die Transfektion von siRNA entwickelte TransMessenger Transfection Reagent[®] von Qiagen verwendet. Die jeweils 21 Nucleotide langen siRNAs wurden auf der Grundlage der bekannten Zielsequenz und nach den Kriterien für das Design von siRNAs (Quellen: <http://www.ambion.com/techlib/tb/tb506.html> und <http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/3210.html>) bestimmt und von Xeragon Inc. synthetisiert. Um die Effizienz der Herunterregulierung zu erhöhen, wurden zwei siRNAs, die gegen unterschiedliche Sequenzabschnitte der IGFBP-2-mRNA gerichtet sind, gleichzeitig eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs befinden sich im Anhang (Tabelle 12). Die A673-Zellkulturen wurden jeweils in Triplikaten bis zu einer Konfluenz von ~80 % kultiviert, bevor die erste Transfektion mit siRNA durchgeführt wurde. Vor jeder Transfektion wurde etwa 1,5 ml Kulturmedium entnommen und bei -20 °C eingefroren, um

später mittels Radioimmunoassay die IGFBP-2-Konzentration darin bestimmen zu können. Die Transfektion wurde entsprechend der Kit-Anleitung durchgeführt (TransMessenger Transfection Reagent Handbook, Qiagen, 10/2002). Auch die Negativkontrollen (Mock-Kontrollen) wurden der Transfektionsprozedur unterzogen mit dem Unterschied, dass die Volumina der siRNA-Lösungen durch äquivalente Mengen an sterilem Wasser ersetzt wurden. Da die Reagenzienmengen des Transfektionskits zur Optimierung variabel eingesetzt werden können, sind im folgenden die tatsächlich eingesetzten Mengen aufgeführt:

- a) 40 µl Enhancer R + 1170 µl EC-R Buffer + je 10 µl siRNA (20 µM)
 - + 100 µl TransMessenger Transfection Reagent
 - + 3,6 ml Kulturmedium
- b) 100 µl Enhancer R + 3000 µl EC-R Buffer + je 25 µl siRNA (20 µM)
 - + 100 µl TransMessenger Transfection Reagent
 - + 2,0 ml Kulturmedium

Es wurde zuerst mit den geringeren Mengen (a) gearbeitet, später wurden diese dann erhöht (b). Die Zellkulturen wurden bei jeder Transfektion etwa 4 h mit dem Transfektionsmix unter normalen Wachstumsbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, erhöhte Luftfeuchtigkeit) inkubiert, danach wurde der Transfektionsmix durch frisches Kulturmedium ersetzt. Um eine ausreichende Herunterregulierung zu erzielen, wurde die Transfektion mehrmals zeitlich aufeinanderfolgend durchgeführt. Folgende Methoden der mehrfachen aufeinanderfolgenden Transfektion wurden getestet:

Methode 1:

- 1. Transfektion bei ca. 80 % Konfluenz der Zellkulturen
- 2. Transfektion ca. 48 h später
- ggf. 3. Transfektion ca. 48 h später

Methode 2:

- 1. Transfektion bei ca. 80 % Konfluenz der Zellkulturen
- Zell-Splitting ca. 24 h später
- 2. Transfektion ca. 48 h später

4.2.4 Radioimmunoassays zur Bestimmung der IGFBP-2-, IGFBP-3- und IGF-II-Konzentrationen im Zellkulturüberstand

Die Konzentrationen von IGFBP-2, IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturüberstand wurden mit Hilfe von etablierten Radioimmunoassays (RIAs) bestimmt. Die verwendeten Radioimmunoassays beruhen im Wesentlichen auf einer Kompetition von unmarkiertem mit radioaktiv markiertem (^{125}I) Protein (Tracer), welches quantifiziert werden soll (d.h. hier IGFBP-2, IGFBP-3 oder IGF-II). Eine genauere Beschreibung des Methodenprinzips findet sich in der Einleitung (Abschnitt 2.2.1).

Für die IGFBP-RIAs waren folgende Puffer und Lösungen erforderlich:

- A** Assay-Puffer: 0,05 M Natriumphosphat, 0,10 M NaCl, 0,05 % NaN_3 , 0,2 % fettsäurefreies BSA, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
- B** Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kaninchen-Gammaglobulin in Assay-Puffer
- C** 1. Antikörper für IGFBP-2-RIA: Kaninchen-Anti-IGFBP-2-Serum (hergestellt im Hormonlabor der Uniklinik Tübingen durch PD Dr. Elmlinger), 1 : 30 000 Verdünnung in B
1. Antikörper für IGFBP-3-RIA: Kaninchen-Anti-IGFBP-3-Serum, 1 : 5000 Verdünnung in B
- D** Tracer: Verdünnung der ^{125}I -IGFBP-2- bzw. ^{125}I -IGFBP-3-Stammlösung mit A auf ca. 150 000 cpm/ml
- E** 2. Antikörper (Präzipitationsreagenz): Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum, 1 : 300 Verdünnung in frisch hergestelltem, 4 °C kaltem 4 %igen Polyethylenglykol (Lösungsmittel: Wasser)
- F** 4 °C kaltes deionisiertes Wasser

Die Proben mussten vorher so mit Assay-Puffer verdünnt werden, dass die Konzentrationswerte in den (vorzugsweise mittleren) Bereich der Eichkurve fielen (Standard-Konzentrationen von 40 ng/ml bis 1,25 ng/ml für IGFBP-2 und 40 ng/ml bis 0,625 ng/ml für IGFBP-3). Standards sowie Proben wurden als Duplikate erstellt und gemessen.

Die Standards bzw. Proben wurden mit den obigen Reagenzien nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

Tabelle 3: Pipettierschema für die Radioimmunoassays zur Bestimmung von IGFBP-2, IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturüberstand

Messwert	Assay-Puffer (A) [µl]	Standards bzw. Proben [µl]	Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung (B) [µl]	1. Antikörper (C) [µl]	Radioaktiver Tracer (D) [µl]	2. Antikörper (E) [µl]
Maximalwert (Radioaktivität)	–	–	–	–	100	–
Unspezifische Bindung	100	–	100	–	100	500
B ₀ -Wert	100	–	–	100	100	500
Standards	–	100	–	100	100	500
Probe 1	–	100	–	100	100	500
Probe 2	–	100	–	100	100	500
Probe n	–	100	–	100	100	500

Bis auf den 2. Antikörper (E) wurden die Reagenzien wie oben angegeben zusammenpipettiert und gründlich gemischt. Daraufhin folgte eine zweitägige Inkubation im Kühlraum bei 4 °C. Anschließend wurde der 2. Antikörper hinzugegeben, wieder gründlich gemischt und 1 h bei 4 °C inkubiert. Mittels Zentrifugation (15 min, 3400×g, 4 °C) wurden die gebildeten Immunkomplexe sedimentiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe mit Waschflasche zum Auffangen des radioaktiven Überstandes abgesaugt (ausgenommen die Messröhrchen zur Bestimmung des Maximalwerts); die Präzipitate wurden mit je 1 ml 4 °C kaltem deionisiertem Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert (5 min, 3400×g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Die in den Messröhrchen verbliebene Radioaktivität wurde in einem Gamma-Zähler gemessen. Die zugehörigen Mengen an IGFBP-2 bzw. -3 wurden mit der Analyse-Software des an den Gamma-Zähler angeschlossenen Rechners ermittelt.

Der im Pipettierschema als Maximalwert bezeichnete Ansatz misst die maximale Radioaktivität und entspricht der in die Messröhrchen pipettierten Radioaktivität, da diese Messröhrchen keiner weiteren Behandlung unterzogen werden und keine Radioaktivität entnommen wird (d.h. keine Radioaktivitätsverluste abgesehen von dem bei ¹²⁵I in diesem Zeitrahmen vollkommen vernachlässigbaren natürlichen Zerfall). Der B₀-Wert hingegen misst die maximale Radioaktivität, welche gemessen wird, wenn kein unmarkiertes IGFBP-2 bzw. IGFBP-3 vorhanden ist und dadurch keine Verdrängung des radioaktiv markierten Tracers bei der Antikörper-Bindung erfolgt. Somit erhält man hiermit die maximale Menge an radioaktivem Präzipitat. Der Wert „Unspezifische Bindung“ beruht darauf, dass eine

Präzipitation zu einem gewissen Grad auch ohne spezifische Bindung von IGFBP-2 bzw. -3 an den Primärantikörper stattfindet. Diese unspezifische Bindung und Präzipitation wird dadurch erfaßt, dass der Primärantikörper, welcher ein spezifisch IGFBP-2 bzw. -3 bindendes Kaninchen-Gammaglobulin darstellt, durch ein IGFBP-unspezifisches Kaninchen-Gammaglobulin (B) ersetzt wird. Der Wert für die unspezifische Bindung wird am Ende von den gemessenen cpm-Werten abgezogen.

Der IGF-II-RIA erforderte folgende Puffer und Lösungen:

- A** Assay-Puffer: 0,05 M Natriumphosphat, 0,10 M NaCl, 0,05 % NaN₃, 0,2 % fettsäurefreies BSA, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4
- B** Kaninchen-Gammaglobulin-Lösung: 50 µg/ml Kaninchen-Gammaglobulin in Assay-Puffer
- C** 1. Antikörper: Kaninchen-Anti-IGF-II-Serum, 1 : 10 000 Verdünnung in B (mit 250 ng/ml rhIGF-I)
- D** Tracer: Verdünnung der ¹²⁵I-IGF-II-Stammlösung mit A auf ca. 150 000 cpm/ml
- E** 2. Antikörper (Präzipitationsreagenz): Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum, 1 : 300 Verdünnung in frisch hergestelltem, 4 °C kaltem 4 %igen Polyethylenglykol (Lösungsmittel: Wasser)
- F** 4 °C kaltes deionisiertes Wasser

Die Durchführung des IGF-II-RIAs erfolgte analog zur Durchführung der IGFBP-RIAs. Daher soll im folgenden nur auf die Unterschiede zu obenstehendem Protokoll hingewiesen werden. Der wichtigste Unterschied bestand hierbei in der vorangehenden Ansäuerung der Standards und Proben mit je 10 µl „Acidification Buffer“ (Säure-Alkohol) von Mediagnost, um eine Dissoziation der IGF-IGFBP-Komplexe zu bewirken (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das weitere Pipettierschema entsprach wiederum dem der IGFBP-RIAs und unterschied sich neben der verwendeten Primärantikörper-Lösung lediglich in den Standards (IGF-II-Standard-Konzentrationen von 25 ng/ml bis 0,39 ng/ml) und dem Tracer (¹²⁵I-IGF-II). Nach Zugabe des Tracers wurden die Messröhrchen (anstelle von 48 h im Falle der IGFBP-RIAs) 36 h bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Die Radioaktivität wurde – wie zuvor – in einem Gamma-Zähler bestimmt.

4.2.5 Gesamt-RNA- und mRNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits[®] von Qiagen isoliert, während mRNA mit Hilfe des ArrayGrade mRNA Purification Kits von Superarray isoliert wurde. Die Zellen wurden wie im Abschnitt „Kultivierung und Ernte von Säugetierzellkulturen“ (4.2.1) beschrieben abgeerntet und daraufhin gemäß den Kit-Anleitungen für die RNA-Isolierung weiterverarbeitet (RNeasy Mini Handbook, Qiagen, 06/2001; ArrayGrade mRNA Purification Kit User Manual Version 1.0, Superarray, 08/2004). Das Funktionsprinzip des RNeasy Mini Kits basiert auf der selektiven Bindung von RNA an die Kieselsäuremembran von zentrifugierbaren Filtersäulchen. Die Bindung ist abhängig vom pH-Wert und den im Puffer enthaltenen Salzen. Auf diese Weise können unerwünschte Substanzen durch Waschen mit mehreren verschiedenen Puffern entfernt werden. Beim Array Grade mRNA Purification Kit hingegen wird der Poly-A-Schwanz der mRNA, welcher an Oligo-dT-Moleküle binden kann, ausgenutzt. Die magnetischen Partikel dieses Kits sind mit Oligo-(dT)₁₄ beschichtet worden und sind somit in der Lage, mRNA zu binden. Ihre magnetischen Eigenschaften erlauben unter Verwendung eines Magneten eine Sedimentierung und ein Waschen der Partikel. Auf diese Weise können unerwünschte Substanzen wie beim RNeasy Mini Kit mit verschiedenen Waschpuffern entfernt werden. Die Lysepuffer der RNA-Isolierungskits enthalten einen oder mehrere RNase-Inhibitoren. Damit wird verhindert, dass die bei der Lyse freigesetzten RNA-verdauenden Enzyme sofort inaktiviert werden. Um RNasen zu inaktivieren, wurden Lösungen, die nicht als RNase-frei deklariert waren, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Verdünnung 1 : 1000, Rühren über Nacht) behandelt und anschließend zwecks Abbau des giftigen DEPCs autoklaviert. Materialien, die mit RNA-haltigen Lösungen in Kontakt kamen, wurden – sofern sie nicht bereits als RNase-frei deklariert waren – 24 h lang einer Temperatur von 100 °C ausgesetzt.

4.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- oder RNA-Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Extinktion (Optische Dichte = OD) bei 260 nm ermittelt. Als Leerwert und zur Verdünnung der Probe diente jeweils das entsprechende Lösungsmittel. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml oder 50 ng/µl und bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml oder 40 ng/µl.

Die Formel für die Konzentrationsberechnung lautet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times F$$

mit $F = 50 \mu\text{g/ml}$ für DNA und
mit $F = 40 \mu\text{g/ml}$ für RNA

Eine photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen ist zudem nur dann sinnvoll, wenn die zu untersuchende Lösung im Wesentlichen nur DNA oder RNA, aber nicht beide enthält, da die zwei Nukleinsäuretypen photometrisch nicht voneinander unterschieden werden können. Eine ungefähre Abschätzung der Reinheit der Probe ist anhand des Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ möglich. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 aufweisen. Jedoch ist die photometrische Bestimmung sowohl der Konzentration als auch der Reinheit kritisch zu betrachten, wie eine Publikation zeigte (Wilfinger *et al.*, 1997). Danach können die Werte für OD_{260} und das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bei der selben Nukleinsäurepräparation in Abhängigkeit von pH und Salzgehalt beträchtlich schwanken. Als Näherungswerte können die photometrisch bestimmten Konzentrationswerte dann verwendet werden, wenn die endgültige Auswertung einer quantitativen Analyseverfahren, bei der eine bestimmte Nukleinsäuremenge eingesetzt wurde, eine Normalisierung beinhaltet, die solche Schwankungen kompensiert. Dies ist sowohl bei den Microarray-Analysen (Abschnitt 4.2.8 und 4.2.9) als auch der quantitativen Real-Time RT-PCR (Abschnitt 4.2.11) der Fall.

4.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe von PCR-Produkten wurde eine nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TBE (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; Verdünnung einer kommerziellen 10x Stammlösung). Die Agarose-Konzentration des Gels betrug 1 %. Proben und DNA-Leiter wurden vor dem Auftragen mit 5x *peqlab*® Ladepuffer (mit Bromphenolblau) versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von etwa 80 V, solange bis die Bromphenolblau-Front ungefähr 2/3 der gesamten Laufstrecke zurückgelegt hatte. Das Gel wurde etwa 10 min im Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Die Banden wurden anschließend auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

4.2.8 Affymetrix Microarray-Expressionsanalyse

Für die Affymetrix Microarray-Experimente wurde Gesamt-RNA aus IGFBP-2 behandelten sowie unbehandelten Hs578T-Zellkulturen eingesetzt. Die Zellkulturen wurden in T25-Kulturfläschchen jeweils als Triplikate kultiviert. Die Inkubation mit humanem rekombinantem IGFBP-2 (Endkonzentration im Medium: 800 ng/ml) wurde wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde für jede Kultur getrennt isoliert (Abschnitt 4.2.5). Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNA wurden photometrisch bestimmt. Die RNA-Proben wurden für die weitere Verarbeitung an die „Microarray-Facility“ im Institut für Medizinische Genetik in Tübingen geliefert. Dort wurde die RNA nochmals auf Qualität und Integrität getestet und danach für die cDNA-Synthese verwendet. Die cDNA wurde dann via *in vitro*-Transkription zur Herstellung der UTP- und CTP-markierten cRNA-Sonden eingesetzt. Die cRNA-Sonden, welche aus den RNAs der einzelnen Zellkulturen hergestellt worden waren, wurden jeweils getrennt mit einem Affymetrix Human Genome U133A GeneChip[®] (Oligonucleotid-Microarrays) hybridisiert, d.h. es lagen Triplikate sowohl für die IGFBP-2 behandelten als auch die unbehandelten Hs578T-Zellen vor. Nach mehreren Waschschrritten wurden die Microarrays mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin gefärbt und die Fluoreszenz-Intensitäten mit Hilfe eines Laser-Konfokal-Scanners bestimmt. Die gescannten Arrays wurden mit der Affymetrix Microarray Analysis Suite (MAS) 5.0 analysiert. Die Normalisierung zum Ausgleich von Schwankungen bei der Inkorporierung markierter Nucleotide, der eingesetzten Sondenmenge und der Hybridisierung erfolgte durch Multiplikation der Signalintensitäten mit einem Skalierungsfaktor, welcher den Mittelwert aller Fluoreszenzintensitäten eines Arrays auf einem gemeinsamen konstanten Zielwert von 150 brachte. Die Signalintensität für jedes einzelne Gen auf einem Array wurde gemäß dem in der Software MAS 5.0 implementierten statistischen Algorithmus berechnet. Der Vergleich mehrerer Arrays zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde mit den Softwarepaketen Affymetrix MicroDB und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 durchgeführt. Die Daten wurden nach folgenden Kriterien gefiltert: Mindestens 2/3 der insgesamt 9 Kreuzvergleiche (3 Microarrays mit Proben behandelter Hs578T-Zellen verglichen mit 3 Microarrays mit unbehandelten Hs578T-Zellen) mussten übereinstimmen, d.h. einheitlich eine Hoch- oder Herunterregulation anzeigen, und die Regulationsfaktoren mussten betragsmäßig größer als 1,5 sein.

4.2.9 Oligo GEArray[®] Microarray-Expressionsanalyse

Die für diese Microarray-Analyse verwendeten Hs578T-Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben mit 2000 ng/ml humanem rekombinantem IGFBP-2 behandelt. Sofern nicht anders angegeben, wurden die im folgenden beschriebenen Prozeduren gemäß den Kit-Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Mit Hilfe des ArrayGrade mRNA Purification Kits wurde aus Hs578T-Zellkulturen mRNA isoliert (Abschnitt 4.2.5). Unter Verwendung des TrueLabeling-AMP Linear[®] RNA Amplification Kits (TrueLabeling-AMP Linear RNA Amplification Kit User Manual Version 1.2, Superarray, 11/2004) wurde die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, aus welcher wiederum durch *in vitro* Transkription Biotin-markierte cRNA synthetisiert wurde. Vor der Hybridisierung mit den Array-Membranen wurden die cRNA-Sonden mit dem ArrayGrade cRNA Cleanup Kit (TrueLabeling-AMP Linear RNA Amplification Kit User Manual Version 1.2, Superarray, 11/2004) gereinigt. Danach wurden die gereinigten cRNA-Sonden mit den vorbehandelten Oligo GEArray Human Cancer Microarrays OHS-802 von Superarray bei 60 °C und 7,5 Umdrehungen pro Minute (rpm) über Nacht hybridisiert (Oligo GEArray Microarrays User Manual Version 1.4, Superarray, 11/2004). Die Durchführung der Waschschrte musste im folgenden leicht modifiziert werden, da kein Hybridisierungsofen zur Verfügung stand, welcher eine Rotation von 20 bis 30 rpm ermöglichte, wie sie im Standardprotokoll der Kit-Anleitung angegeben war. Stattdessen war lediglich eine Rotation von 7,5 rpm möglich. Daher wurden die Arrays nach dem Dekantieren des Hybridisierungsmixes anstelle von 15 min bei 20 bis 30 rpm zweimal 10 min lang bei 7,5 rpm mit dem Waschpuffer niedriger Stringenz und anstelle von 15 min bei 20 bis 30 rpm einmal 20 min lang bei 7,5 rpm mit dem Waschpuffer hoher Stringenz gewaschen. In Anschluß an die Waschschrte wurden die Array-Spots, welche ihre komplementäre cRNA gebunden hatten, mittels Chemilumineszenz-Detektion sichtbar gemacht: Dazu wurden die Arrays zuerst mit einer speziellen Blockierungslösung zur Reduzierung des Hintergrunds (= unspezifische Bindung) vorbehandelt, dann mit Alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin inkubiert, mehrmals gewaschen und zuletzt mit CDP-Star als chemilumineszentem Substrat benetzt. Die Chemilumineszenz wurde unter Verwendung des Raytest CCD-Kamerasystems DIANA II elektronisch erfaßt. Die Bilddaten wurden anschließend mit Hilfe der Software ScanAlyze v2.50 in numerische Daten transformiert. Die weitere Auswertung der numerischen Daten wurde mit Microsoft Excel 97 durchgeführt. Die Datenverarbeitung beinhaltete eine Hintergrundkorrektur in Form der Subtraktion des jeweiligen minimalen Chemilumineszenz-

intensitätswertes eines Arrays und eine Median-Normalisierung (Abschnitt 2.2.3). Die Daten wurden nach folgenden Kriterien gefiltert: Mindestens eine von zwei zu vergleichenden Spot-Intensitäten musste das Doppelte der Hintergrund-Intensität betragen, und das Verhältnis der Intensitäten zweier zu vergleichenden Spots musste für eine potentielle Hochregulation der Genexpression größer als 1,5 und für eine potentielle Herunterregulation der Genexpression kleiner als $-1,5$ sein.

4.2.10 Primer-Design

Primer für die quantitative Real-Time RT-PCR mittels SYBR Green wurden dergestalt entworfen, dass folgende Kriterien so gut als möglich erfüllt waren:

- keine Dimer-Bildung der beiden Primer (Homo-Dimere oder Primer-Paar-Dimere)
- keine Sekundärstruktur-Bildung innerhalb eines Primers durch Selbstkomplementarität
- spezifische Amplifikation der gewünschten Sequenz (Überprüfung: Durchsuchung von Sequenzdatenbanken mit Hilfe von BLAST)
- die Schmelztemperatur T_m der beiden Primer soll ähnlich sein und zwischen 55 und 65 °C liegen
- der GC-Gehalt der Primer soll zwischen 30 und 80 % liegen
- die Primer sollen zwischen 18 und 28 bp lang sein
- die Länge der Amplikons sollen zwischen 70 und 180 bp betragen

Diese Kriterien sind notwendig, weil Primer-Dimere und Sekundärstrukturen das Annealing der Primer an das eigentliche DNA-Template behindern. Damit sich beide Primer bei der ungefähr gleichen Temperatur an das DNA-Template anlagern, sollen die Schmelztemperaturen der Primer ähnlich sein. Zu kurze Primer erhöhen aufgrund zu geringer Spezifität die Wahrscheinlichkeit von zufällig amplifizierten Sequenzen, während bei sehr langen Primern die Wahrscheinlichkeit der Dimer- und Sekundärstruktur-Bildung zunimmt. Zudem besitzen sehr lange Primer häufig eine hohe T_m . Die Länge der Amplikons sollte nicht zu groß sein, weil dadurch die Effizienz der Amplifikation sinkt; eine gleichmäßig hohe Amplifikationseffizienz ist für die quantitative Real-Time RT-PCR mittels SYBR Green jedoch erforderlich.

Die Ermittlung der Primer und ihrer Eigenschaften erfolgte mit Hilfe des frei zugänglichen Primer3 (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cgi-bin/primer/primer3.cgi>).

4.2.11 Real-Time RT-PCR

Für die Quantifizierung der Genexpression mittels Real-Time RT-PCR (Abschnitt 2.2.4) wurde Gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Abschnitt 4.2.5) aus Hs578T- und HEK-293-Zellen isoliert. Um normale (= uninduzierte) biologische Schwankungen der Genexpression auszugleichen, wurden RNA-Proben aus jeweils sechs gleich behandelten Zellkulturen, welche parallel zueinander unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, vereinigt. Die vereinigten RNA-Proben wurden mit Hilfe des Omniscript Kits gemäß der Anleitung des Herstellers in cDNA umgeschrieben (Omniscript Handbook Reverse Transcriptase Handbook, Qiagen, 11/2002). Für das Priming der reversen Transkription wurde ein Oligo-dT-Primer eingesetzt. β_2 -Microglobulin (B2M) wurde als Referenzgen ausgewählt und zur Normalisierung der Ergebnisse eingesetzt. Technisch bedingte Schwankungen der Ergebnisse der Real-Time PCR wurden kompensiert, indem parallel 12 Reaktionsansätze für jeden cDNA-Proben-Pool erstellt und gemessen wurden. Die Real-Time PCR wurde in einem Bio-Rad iCycler bzw. ABI Prism 7700 Sequence Detector unter Verwendung von SYBR Green I (in Form des iQ SYBR Green Supermix) als Detektionssystem durchgeführt. Das Volumen eines Ansatzes betrug 25 μ l. Dementsprechend wurde pro Ansatz 12,5 μ l des zweifach konzentrierten iQ SYBR Green Supermixes zugegeben. Jeder Ansatz enthielt zudem 2 μ l cDNA. Die Primer wurden in einer Konzentration von 500 nmol/l eingesetzt.

Das Temperaturprofil der Real-Time PCR umfaßte folgende Schritte:

- 1) 3 min bei 95 °C (*Polymerase-Aktivierung und Denaturierung*)
- 2) 40 Zyklen mit
 - a) 15 sec bei 95 °C (*Denaturierung*)
 - b) 1 min bei 60 °C (*Annealing und Extension*)
- 3) 1 min bei 95 °C (*Denaturierung als Vorbereitung für die Schmelzkurvenanalyse*)
- 4) 1 min bei 55 °C (*Annealing als Vorbereitung für die Schmelzkurvenanalyse*)
- 5) gradueller Temperaturanstieg von 55 °C auf 95 °C in Schritten von 0,5 K, wobei jede Temperatur 10 sec lang gehalten wird (*Schmelzkurvenanalyse*)
- 6) ∞ min bei 15 °C (*Ende des Programms*)

Die Datenerfassung zur Quantifizierung der Genexpression erfolgte während der Annealing- und Extensionsphase. Zusätzlich wurden die Daten für die Schmelzkurvenanalyse während des graduellen Temperaturanstiegs von 55 °C auf 95 °C erfaßt.

Die Resultate wurden mit der Bio-Rad iCycler Software 3.0[®] bzw. der ABI Prism 7700 Sequence Detection System Software Version 1.7 und Microsoft Excel 97 analysiert und ausgewertet. Das Design der Primer für die Real-Time PCR erfolgte wie in Abschnitt 4.2.10 beschrieben. Eine Liste der Primer-Sequenzen findet sich im Anhang (Tabelle 11). Die PCR-Produkte wurden mittels Schmelzkurvenanalyse (Abschnitt 2.2.4) und Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.7) analysiert, um sicherzustellen, dass keine Nebenprodukte gebildet wurden und die Amplikons die korrekte Größe besaßen.

4.2.12 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate wurden durch direkte Zugabe von je 500 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 30 mM Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, 50 mM NaF, 1 % (w/v) Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, complete[™] mini EDTA-freier Proteaseinhibitor-Cocktail, pH 7,6) auf den zuvor mit PBS gewaschenen Zellrasen der Zellkulturschalen (100 × 20 mm) hergestellt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen abgeschabt, trituriert und in 1,5 ml Polypropylenröhrchen überführt. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20 000×g, 20 min, 4 °C) entfernt. Die Zelllysate wurden – sofern sie nicht sofort weiterverwendet wurden – bei –20 °C gelagert.

4.2.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch unter Verwendung des kommerziellen BCA-200 Protein Assays der Firma Pierce bestimmt. Dieser zuerst von Smith *et al.* (1985) beschriebene Assay beruht auf der zur Proteinmenge proportionalen Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ im alkalischen Milieu und der Bildung eines farbigen Komplexes von Cu⁺ mit Bicinchoninsäure (BCA). Er ist im Vergleich zu anderen gängigen Proteinbestimmungsassays relativ unanfällig gegenüber den meisten in der Proteinbiochemie verwendeten Substanzen. Der Assay wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Als Standards für die Eichkurve wurden Verdünnungen einer selbst hergestellten BSA-Lösung (2000 µg/ml bis 25 µg/ml) verwendet. Der Assay wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt, welche in einem Milenia Kinetic Analyzer ELISA-Reader ausgelesen wurden. Die Datenauswertung erfolgte mit der zugehörigen Software SOFTmax PRO und Microsoft Excel 97. Um messtechnische Schwankungen auszugleichen, wurden 6 bis 9 Replikate pro Zelllysate gemessen.

4.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die löslichen Fraktionen der Zellysate wurden in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel (Laemmli 1970) mit 6 %igem Sammelgel (6 % Acrylamid mit Bisacrylamid [Rotiphorese® Gel 30], 0,1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) und 12 %igem Trenngel (12 % Acrylamid mit Bisacrylamid [Rotiphorese® Gel 30], 0,1 % (w/v) SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8) für eine Dauer von ungefähr 2 h bei 200 V nach ihrer Größe aufgetrennt. Als Laufpuffer diente ein SDS-haltiger Tris-Glycin-Puffer (0,1 % (w/v) SDS, 192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl, pH 8,8). Vor der Auftragung wurden die Proben mit einem denaturierenden Ladepuffer (2 % (w/v) SDS, 2 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 5 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 6,8) gemischt.

4.2.15 Quantitative Western-Immunoblotanalyse

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry Blotting bei 1 mA/cm² über den Zeitraum von etwa 1 h auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Membrane; 0,45 µm Porendurchmesser) transferiert. Für dieses Blotting-Verfahren wurde die „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ von Bio-Rad eingesetzt. Das Blotting erfolgte im „Sandwich“-Verfahren mit einem leicht modifizierten CAPS-Transferpuffer (10 mM CAPS, 0,005 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Methanol, pH 11,0) nach Matsudaira (1987): Der Größe des Gels entsprechend zugeschnittene Membranstücke wurden ca. 5 sec in 98 % Methanol aktiviert und 5 bis 10 min in 1x CAPS Transfer-Puffer mit 10 % Methanol unter Schütteln inkubiert. Dicke, saugfähige Filterpapiere wurden kurz in 1x CAPS Transfer-Puffer mit 10 % Methanol eingetaucht. Die erste Lage des Blotting-„Sandwichs“ bildete eine Schicht dickes Filterpapier. Darauf folgte die Membran, die luftblasenfrei auf das feuchte Filterpapier gelegt wurde. Auf die Membran wurde das Polyacrylamidgel gelegt, dessen Proteine auf die Membran transferiert („geblottet“) werden sollten. Die letzte Lage bildete wieder eine Schicht dickes, in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier. In Anschluß an das Blotting mussten die auf die Membranen transferierten Proteine detektiert und quantifiziert werden. Die Detektion der Proteine erfolgte unter Verwendung spezifischer Primärantikörper und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper; die Sekundärantikörper wiederum wurden mit Hilfe des ECL Plus®-Systems detektiert, das unter der Wirkung von Meerrettich-Peroxidase (HRP) chemiluminesziert. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen: Nachdem die Blots zur Verminderung unspezifischer Wechselwirkungen mit den Antikörpern 1 h lang in TBS-T

(0,01 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,1 % (w/v) Tween-20, pH 7,6) mit 10 % (v/v) Rotiblock[®] inkubiert worden waren, folgte eine Übernacht-Inkubation bei 4 °C mit einem p53- bzw. NF- κ B p105/p50-Primärantikörper (jeweils 1 : 4000 verdünnt in TBS-T mit 10 % (v/v) Rotiblock[®]). Nach Entfernung der Primärantikörper-Lösung wurden die Membranen dreimal je 15 min lang mit TBS-T gewaschen und daraufhin 2 h lang in HRP-gekoppeltem Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (= Sekundärantikörper) inkubiert, welcher 1 : 5000 in TBS-T mit 10 % (v/v) Rotiblock[®] verdünnt worden war. Der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper wurde mit Hilfe des ECL Plus[®] Chemilumineszenz-Detektionskits nach Herstellerangaben detektiert. Zur Visualisierung der Chemilumineszenz wurden die Blots 5 bis 10 min lang bei Raumtemperatur gegenüber Kodak Biomax-Filmen exponiert. Die Banden wurden unter Verwendung der AIDA 2.1[®]-Software densitometrisch analysiert. Für die Quantifizierung wurden jeweils 12 bis 16 technische Replikate (d.h. Bandenintensitäten) ausgewertet.

4.2.16 TGF β -1-Immunoassay

Die Menge an TGF β -1, welches durch Sekretion ins Zellkulturmedium abgegeben worden war, wurde mit Hilfe des kommerziellen „Human TGF β -1 ELISA Kits“ der Firma Anogen bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen photometrischen „Sandwich“-Immunoassay, bei dem die Multititerplatten mit einem monoklonalen Anti-TGF- β -1-Antikörper beschichtet sind. An das hieran gebundene, aus der biologischen Flüssigkeit stammende TGF β -1 bindet ein polyklonaler Biotin-gekoppelter Anti-TGF- β -1-Antikörper. An das Biotin wiederum bindet das Avidin-gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase. Dieses Enzym bewirkt bei Zugabe eines speziellen Substrats die Bildung eines bei 450 nm Licht absorbierenden Produkts, welches photometrisch quantifiziert werden kann.

Der Assay wurde nach Anleitung des Herstellers (Human TGF β -1 ELISA Kit Manual, Anogen, 07/2003) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden für IGFBP-2 behandelte bzw. IGFBP-2 produzierende Zellen und Vergleichskontrollen jeweils in Triplikaten erstellt. Zusätzlich wurde jede biologische Probe (= Überstand einer Zellkultur) doppelt gemessen. Um die Unterschiede der Zellzahl zu kompensieren, welche die Menge an sezerniertem TGF β -1 beeinflussen könnten, wurden die Zellen gezählt, so dass die Endwerte als mittlere Mengen an sezerniertem TGF β -1, die von 10^3 Zellen produziert werden, angegeben wurden. Die photometrischen Messungen erfolgten in einem Milenia Kinetic Analyzer[®]

ELISA-Reader. Die Daten wurden mit der zugehörigen Software SOFTmax PRO und Microsoft Excel 97 ausgewertet.

4.2.17 Assays zur quantitativen Apoptose-Bestimmung

Um den Apoptose-Grad in den untersuchten Zellkulturen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu bestimmen, wurden zwei verschiedene, voneinander unabhängige Apoptose-Assays eingesetzt: der „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ und der auf dem „Annexin-V-FLUOS Staining Kit“ basierende Apoptose-Assay.

Der „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ bestimmt den Apoptose-Grad über die Quantifizierung der im Verlauf der Apoptose ins Cytoplasma freigesetzten Histon-assoziierten DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen). Die Zellmembran wird mit Hilfe eines speziellen Lysepuffers selektiv solubilisiert, so dass die Hülle der Zellkerne intakt bleibt. Auf diese Weise können die Zellkerne mitsamt unfragmentierter DNA durch Zentrifugation vom Cytoplasma abgetrennt werden. Im Cytoplasma befinden sich die Histon-assoziierten DNA-Fragmente, an welche ein gegen die Histone gerichteter, Biotin-gekoppelter Antikörper bindet. Die Wells der für diesen Assay verwendeten Multititerplatten sind mit Streptavidin beschichtet, welches das Biotin bindet. Der zweite Antikörper bindet an die DNA der Histon-assoziierten DNA-Fragmente und ist mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Die Histon-assoziierten DNA-Fragmente befinden sich dadurch im gebundenen Zustand zwischen zwei Antikörpern (\Rightarrow sogenannter „Sandwich“-ELISA). Durch Zugabe eines speziellen Substrats für die Peroxidase, welches unter Einwirkung dieses Enzyms zu einem bei 405 nm Licht absorbierenden Produkt umgewandelt wird, kann die Menge an Mono- und Oligonukleosomen (und damit indirekt der Apoptose-Grad) photometrisch bestimmt werden.

Die praktische Durchführung des Immunoassays erfolgte nach Herstellerangaben (Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Instruction Manual Version 2, 03/2005). Sowohl IGFBP-2 behandelte bzw. IGFBP-2 produzierende Zellkulturen als auch die zugehörigen Kontrollen wurden jeweils in Form dreier paralleler Ansätze kultiviert. Die hieraus erhaltenen Proben wurden im Assay jeweils als Triplikate gemessen, so dass die Gesamtzahl an Replikatmessungen für jeden experimentell individuellen Ansatz 9 betrug. Um zellzahlbedingte Unterschiede auszugleichen, wurden die erhaltenen relativen apoptotischen Werte durch die Zellzahl dividiert. Die Assay-Multititerplatten wurde in einem Milenia Kinetic Analyzer

ELISA-Reader analysiert. Die resultierenden Daten wurden mit der zugehörigen Software SOFTmax PRO und Microsoft Excel 97 ausgewertet.

Beim zweiten verwendeten Apoptose-Assay handelte es sich um einen FACS-basierten Assay, der mit Hilfe des „Annexin-V-FLUOS Staining Kits“ durchgeführt wurde. Dieser Apoptose-Assay basiert darauf, dass bereits im frühen Verlauf der Apoptose Veränderungen in der Zellmembran stattfinden. Eine dieser Veränderungen ist die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Membran auf deren Außenseite. Dadurch kann auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen dieses bei nicht-apoptotischen Zellen unzugängliche, da dort intrazelluläre, Phosphatidylserin von Annexin-V gebunden werden. Annexin-V ist ein bei Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an negativ geladene Phospholipide bindendes Protein, wobei es jedoch mit besonders hoher Spezifität an Phosphatidylserin bindet. Durch Kopplung von rekombinantem Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff FLUOS kann auf diese Weise durchflußzytometrisch der Anteil der Zellen, welcher Annexin-V gebunden hat, und damit der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurden die durchflußzytometrischen Messungen dieses Apoptose-Assays mit einem FACSCalibur-Durchflußzytometer von BD Biosciences unter Verwendung der zugehörigen Software CellQuest 3.3 durchgeführt. Die erhaltenen FACS-Daten wurden daraufhin mit Hilfe der frei verfügbaren Software WinMDI 2.8 ausgewertet. Die Experimente wurden dreimal unter identischen Bedingungen wiederholt.

In beiden Apoptose-Assays dienten mit Camptothecin behandelte Zellkulturen als Positivkontrollen.

4.2.18 Statistische Analyse

Aus den Messwerten der Replikate wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardfehler (SEM = Standard Error of Mean) berechnet, wobei ggf. die Regeln der Gaußschen Fehlerfortpflanzung angewandt wurden. Die numerische Angabe und die graphische Darstellung der Daten erfolgte jeweils als arithmetischer Mittelwert \pm SEM. Die Signifikanz von Unterschieden wurde mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests (nach Student) ermittelt. Unterschiede wurden als signifikant eingestuft, sofern die berechneten p-Werte folgende Werte unterschritten (geordnet nach steigendem Signifikanzgrad): $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***). Die in Klammern angegebenen Stern-Symbole wurden in Datendiagrammen zur Anzeige der Signifikanz eingesetzt. Die statistische Analysen wurden mit der Software Microsoft Excel 97 durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 *IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen auf der mRNA-Ebene*

5.1.1 **Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression in Hs578T-Zellen mit Hilfe der Affymetrix Human Genome U133A GeneChips[®]**

Mit Hilfe der Affymetrix Human Genome U133A GeneChips[®] wurde die Auswirkung von IGFBP-2 auf die Genexpression von Hs578T-Zellen in Kultur untersucht. Hierbei wurden die Hs578T-Zellen im Vergleich zu den Negativkontrollen mit 800 ng/ml IGFBP-2 behandelt (Abschnitt 4.2.1). Die von der Microarray-Facility des Instituts für Medizinische Genetik in Tübingen erhaltenen Microarray-Rohdaten wurden mit Hilfe der Softwarepakete Affymetrix Microarray Analysis Suite 5.0, Affymetrix MicroDB und Affymetrix Data Mining Tool 3.0 ausgewertet und entsprechend der im Methodenteil (Abschnitt 4.2.8) angegebenen Kriterien gefiltert. Die hierdurch erhaltenen potentiell regulierten Gene wurden in ontologische Gruppen sowie in hoch- bzw. herunterregulierte Gene unterteilt, um einen besseren Überblick über die Genexpressionsänderungen zu bekommen. Die folgenden Tabellen (Tabelle 4 – Teil A und Teil B) enthalten neben der Genbezeichnung (incl. Gensymbol, sofern vorhanden) den aus dem arithmetischen Mittelwert der „Signal Log Ratios“ (Abschnitt 2.2.3) berechneten Regulationsfaktor sowie eine kurze Funktionsbeschreibung und/oder Charakterisierung des jeweiligen Gens (soweit verfügbar). Die Geninformationen wurden mit Hilfe von allgemeinen WWW-Suchmaschinen, NCBI-Datenbanken und Lehrbüchern ermittelt. Weitere quantitative Daten sowie die „GenBank Accession Numbers“ der Gene/Sequenzen finden sich in den Tabellen im Anhang (Tabelle 9 – Teil A und Teil B). Da es sich um bei den Affymetrix GeneChips[®] um Oligonucleotid-Microarrays handelt, werden manche Sequenzen mehrfach in Form unterschiedlicher Sequenzabschnitte oder auf der Grundlage unterschiedlicher Consensus-Sequenzen abgedeckt. Daher ist für manche Gene/Sequenzen mehr als ein Regulationsfaktor angegeben (vgl. Anhang).

Tabelle 4: Affymetrix Microarray-Ergebnisse – durch IGFBP-2 potentiell hoch- bzw. herunter-regulierte Gene in der Brustkrebszelllinie Hs578T

Die folgenden Tabellen enthalten die potentiell durch IGFBP-2 hochregulierten Gene in Hs578T-Zellen, wie sie mit Hilfe der Affymetrix Microarray-Experimente (Affymetrix Human Genome U133A GeneChips[®]) ermittelt wurden. Die hierbei untersuchten Hs578T-Zellen wurden im Vergleich zur Negativkontrolle mit 800 ng/ml IGFBP-2 behandelt (Abschnitt 4.2.8). Die Gene wurden nach ontologischen Gesichtspunkten untergliedert. Der angegebene Regulationsfaktor stellt den arithmetischen Mittelwert der „Signal Log Ratios“ (Abschnitt 2.2.3) dar. Die in der Spalte „Funktionen und charakteristische Eigenschaften“ aufgeführten Geninformationen wurden mit Hilfe von allgemeinen WWW-Suchmaschinen, NCBI-Datenbanken und Lehrbüchern ermittelt.

Teil A: Hochregulierte Gene

A Vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Ras-Associated Binding Protein 2 (RAB2)	3,0	Members of the Rab protein family are nontransforming monomeric GTP-binding proteins of the Ras superfamily that contain 4 highly conserved regions involved in GTP binding and hydrolysis. Rab proteins are prenylated, membrane-bound proteins involved in vesicular fusion and trafficking. The mammalian Rab proteins show striking similarities to the <i>S. cerevisiae</i> YPT1 and SEC4 proteins, Ras-related GTP-binding proteins involved in the regulation of secretion. The RAB2 protein is a resident of pre-Golgi intermediates and is required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. RAB2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates.
Lectin, Mannose- Binding, 1 (LMAN1 / MR60 / ERGIC53)	2,6	MR60 is a membrane mannose-specific lectin identified in intracellular compartments of HL60 cells. MR60 appeared to be different from other known mammalian lectins but is identical to ERGIC53, a protein marker of the intermediate compartment shuttling between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi apparatus. This protein is putatively involved in the transport of early processed glycoproteins containing high mannose glycans from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi. Several findings suggested that ERGIC53 may function as a molecular chaperone for the transport from ER to Golgi of a specific subset of secreted proteins.
Translocating Chain- Associating Membrane Protein (TRAM)	2,6	TRAM belongs to a group of signal sequence receptors that are involved in the recognition and translocation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. TRAM is an abundantly expressed, approximately 36-kD microsomal glycoprotein. Functional analysis indicated that TRAM influences glycosylation and is stimulatory or required for the translocation of secretory proteins.
RAB6A (Ras-Associated Binding Protein 6A)	2,3	RAB6A is a member of the Rab protein family as is RAB2 and probably has similar functions (cf. RAB2).

ADP-Ribosylation Factor-Like 1 (ARL1)	2,3	ADP-ribosylation factors (ARFs), initially described as activators of cholera toxin (CT) ADP-ribosyltransferase activity, regulate intracellular vesicular membrane trafficking and stimulate a phospholipase D (PLD) isoform. ARL1 is a deduced 181-amino acid ARF-like protein with 57% identity to ARF1.
Sorting Nexin 2 (SNX2)	1,9	The sorting nexins constitute a large conserved family of hydrophilic molecules that interact with a variety of receptor types. Based on the functions of their yeast homologs, mammalian sorting nexins probably function in intracellular trafficking of proteins to various organelles.

B Ionenkanäle

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4)	2,1 / 2,0 (abhängig von den Sondenpaaren)	Intracellular chloride channels, such as CLIC4, are found in several types of vacuolar organelles where they contribute to electrolyte composition and acidification of intravesicular spaces.

C Zell-Zell-Wechselwirkungen, Migration und Adhäsion, Bildung des Zellgerüsts

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Human DLG (Drosophila Disc Large) Homolog 1	2,2	Human DLG homolog 1 is required for the maintenance of epithelial cyto-architecture and negatively controls cell proliferation. It is prominently located at sites of intercellular contact of cells that have left the proliferating basal layers and begun maturation. In invasive squamous cell carcinomas, total cellular hDLG levels are greatly reduced.
Protein Tyrosine Kinase 9 (PTK 9)	2,3	PTK 9 possesses tyrosine kinase activity. It forms a complex with actin and prevents actin filament assembly. It localizes to the G-actin-rich cortical actin structures, but is also found at membrane ruffles and cell-cell-contacts. Expression levels are high in the colon, testis, ovary, prostate and lung.
Migration Stimulation Factor FN70	2,8	Migration stimulation factor FN70 is a novel transcription variant (isoform) of the fibronectin gene produced by alternative splicing.
IQ Motif-Containing GTPase-	2,4	IQGAP1 is a widely expressed protein that interacts with components of the cytoskeleton, with cell adhesion molecules, and with several signaling molecules to regulate cell morphology.

Activating Protein 1 (IQGAP1 / p195)		IQGAP1 has also been shown to be a negative regulator of cell-cell adhesion.
EGF-Like Repeats and Discoidin I-Like Domains 3 (EDIL3) / Developmentally Regulated Endothelial Cell Locus 1 (DEL1)	2,1	Angiogenesis and vasculogenesis are regulated by signaling through receptor tyrosine kinase pathways. Signals received by endothelial cells from soluble ligands must be supported by signals from integrin receptors. Peptides containing the common integrin recognition sequence Arg-Gly-Asp (RGD), such as EDIL3, influence endothelial cell behavior. EDIL3 binds to the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor. Functional analysis showed that both DEL1 and vitronectin stimulate endothelial cell migration. Adhesion of endothelial cells to EDIL3 (DEL1) induces tyrosine phosphorylation of PTK2.
CD164 Antigen (Sialomucin)	2,0	The CD164 antigen is an adhesion receptor and belongs the group of sialomucins, which are either secreted or – as in this case – membrane-associated proteins. It appears to play a role in hematopoiesis by facilitating the adhesion of CD34+ cells to bone marrow stroma and by negatively regulating CD34+ hematopoietic progenitor cell growth.
Laminin, Beta 1 (LAMB1)	1,9	The major components of basal laminae are the glycoproteins laminin and collagen IV, both of which are heterotrimers. Laminin is a cruciform protein trimer of chains that when originally isolated from the extracellular matrix of tumor cells, were named A, B1, and B2, but were renamed alpha-1, beta-1, and gamma-1, respectively. Laminin functions in relation to epithelial cells and type IV collagen in the manner that fibronectin does for type I collagen and tissue cells of many types and that chondronectin does for type II collagen and chondrocytes. It binds heparin and heparin sulfate too.
Lysyl Oxidase	1,9	Lysyl oxidase (protein-lysine 6-oxidase; EC 1.4.3.13) is an extracellular copper enzyme that initiates the crosslinking of collagens and elastin by catalyzing oxidative deamination of the epsilon-amino group in certain lysine and hydroxylysine residues of collagens and lysine residues of elastin.

D Regulation der Transkription und Translation, Zellproliferations- und Zellzykluskontrolle

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Histone Deacetylase 1 (HDAC1 / HD1)	2,5	Histon deacetylase 1 is an enzyme required for histone deacetylation, which itself is involved in transcriptional regulation and cell cycle progression. As such, it is also a key element in the control of cell proliferation and differentiation.
Thyroid Hormone Receptor Interactor 8	2,4	The thyroid hormone receptors (TRs) are hormone-dependent transcription factors that regulate expression of a variety of specific target genes. They must specifically interact with a number of proteins as they progress from their initial translation and nuclear

(TRIP8)		translocation to heterodimerization with retinoid X receptors (RXRs), functional interactions with other transcription factors and the basic transcriptional apparatus, and eventually, degradation. In order to elucidate the mechanisms that underlie the transcriptional effects and other potential functions of TRs, the yeast two-hybrid system was used to find molecules directly interacting with these receptors. By this means, several interacting molecules were found and named "Thyroid Hormone Interactors".
Thyroid Hormone Receptor Interactor 3 (TRIP3)	2,3	cf. TRIP8
Tyrosine-3-monooxygenase - tryptophan 5-monooxygenase activation protein, Epsilon Form (YWHAE)	2,2	YWHAE activates tyrosine 5-monooxygenase as well as tryptophan 5-monooxygenase in the presence of ATP, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , calmodulin, and Ca ²⁺ -calmodulin-dependent protein kinase. It interacts with RAF1 but not RAS in yeast 2-hybrid screens and may facilitate the association of CDC25 with RAF1.
Inhibin-β C (INHBC)	2,1	Activins are homo- or heterodimers of related beta subunits while inhibins are dimers composed of an alpha subunit and an activin beta subunit. These proteins belong to the TGF-beta group, the members of which have important roles in cell determination, differentiation, and growth. Members of the inhibin/activin subgroup were originally identified by their opposing roles in the control of follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells.
Cell Division Cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2) / Cyclin-Dependant Kinase 1 (CDK1)	2,3 / 2,0 (abhängig von den Sondenpaaren)	CDC2 is a catalytic subunit of a protein kinase complex, called the M-phase promoting factor, that induces entry into mitosis and is universal among eukaryotes. While the yeast cdc2 expression does not appear to be transcriptionally regulated, serum stimulation of human and mouse fibroblasts results in a marked increase in CDC2 transcription.
CDC2 delta T	2,0	CDC2 delta T is a truncated variant of CDC2.
Nuclear Transcription Factor Y, Beta (NFYB)	2,1	NFYB stimulates the transcription of various genes by recognizing and binding to a CCAAT motif in promoters, for example in type 1 collagen, albumin and beta-actin-genes. It is a subunit of a heterotrimeric transcription factor composed of three components, A, B and C. NF-YB and NF-YC must interact and dimerize for NF-YA association and DNA binding.
Zinc Finger Protein 22 (ZNF22/KOX 15)	2,1	ZNF22 belongs to the Krueppel family of C2H2-type zinc-finger proteins. It may be involved in transcriptional regulation.
Homolog of S. Pombe RAD21 (SSC1)	1,7	SSC1 is part of cohesion complexes. Eukaryotic sister chromatids remain connected from the time of synthesis until they are separated in anaphase. This cohesion depends on a complex of proteins known as cohesins. In vertebrates, unlike in yeast, the cohesins dissociate from chromosome arms earlier in M phase, during prophase. Small amounts of cohesin remain near the centromere until metaphase, with complete removal at the beginning of anaphase. Cohesin

		complexes contain SMC1, SMC3, SCC1 (RAD21), and either SA1 or SA2.
Cullin 4B (CUL4B)	1,9	CUL4B is a part of a ubiquitin ligase complex. CUL4 can temporarily restrict DNA replication licensing in <i>Caenorhabditis elegans</i> . Inactivation of CUL4 causes massive DNA rereplication, producing cells with up to 100C DNA content.

E Signaltransduktion

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Interferon-related developmental regulator (IFRD1)	2,1	Although its function remains unknown, it has been shown that PC4 (protein encoded by IFRD1) is necessary for muscle differentiation and that it might have a role in signal transduction. At midgestation during mouse development, IFRD1 is expressed primarily in specific differentiating structures and body organs.
EHK-1 receptor tyrosine kinase (EPHA5)	2,8	EHK-1 is a neuronal ELK-related receptor protein tyrosine kinase (ephrin receptor subfamily) which interacts with multiple, membrane-anchored ligands including receptors for members of the ephrin-a family (binds to ephrin-a1, -a2, -a3, -a4 and -a5). EHK-1 is almost exclusively expressed in the nervous system.
Interleukin 6 Signal Transducer (IL-6 ST / gp130 / Oncostatin M Receptor)	2,7	Initially described as the interleukin-6 signal transducer, gp130 is a transducer chain shared by many cytokines, including IL6, IL11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), and ciliary neurotrophic factor (CNTF). gp130 contains at least 2 cell-signaling modules. One encompasses 4 phosphotyrosine-binding sites for the SH2 domains of STAT1 and STAT3, while the other includes a phosphotyrosine that activates SHP2 upstream of the RAS-ERK pathway.
Non-Oncogenic Rho GTPase-specific GTP Exchange Factor (Proto-LBC)	2,2	The human lbc oncogene product is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates the Rho small GTP binding protein, thus resulting in biologically active, GTP-bound Rho, which in turn mediates actin cytoskeletal reorganization, gene transcription, and entry into the mitotic S phase. In order to elucidate the mechanism of onco-Lbc transformation, here we report that while proto- and onco-lbc cDNAs encode identical N-terminal dbl oncogene homology (DH) and pleckstrin homology (PH) domains, proto-Lbc encodes a novel C terminus absent in the oncoprotein that includes a predicted alpha-helical region homologous to cyto-matrix proteins, followed by a proline-rich region.
TRAF and TNF Receptor-Associated Protein (TTRAP)	2,2	TTRAP is a member of a superfamily of Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -dependent phosphodiesterases, which includes sphingomyelinases, inositol-phosphatases, and nucleases. TTRAP has significant sequence and structural similarities specifically with APE1 endonuclease, which is involved in both DNA repair and the activation of transcription factors.
Four-And-A-Half	2,0	SLIM1 is a skeletal muscle LIM protein. Recombinant green

LIM Domains 1 (FHL1/SLIM1)		fluorescent protein-SLIM1 localized to the cytoplasm and associated with focal adhesions and actin filaments in COS-7 cells, suggesting a role in FAK-related signal transduction.
SH3-Binding Domain and Glutamic Acid-Rich Protein-Like Protein (SH3BGRL)	1,9	Proline-rich peptide sequences have been shown to play important roles in protein-protein interactions that occur in signal transduction pathways. Specific proline-rich consensus sequences that bind SH3 domains have been identified.

F Regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit Apoptose

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
NCK-Associated Protein 1 (NCKAP1 / NAP1 / NAP125)	3,0	NCKAP1 is a predicted type II transmembrane protein, with a C-terminal transmembrane domain. In situ hybridization of human brain indicated that NCKAP1 is expressed predominantly in neuronal cells. Suppression of NCKAP1 expression using an antisense NCKAP1 oligonucleotide induces apoptosis of neuronal cells.

G Metabolismus

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
N-Acetyl-Glucosamine-Phosphate Mutase	2,3	N-Acetyl-glucosamine-phosphate mutase is an enzyme catalyzing the transfer of phospho groups within N-acetyl-glucosamin-phosphate.
Electron Transfer Flavoprotein-Ubiquinone Oxidoreductase (ETFQO)	2,2	Electron transfer flavoprotein (ETF) exists in the mitochondrial matrix as a heterodimer of 30-kD alpha subunits and 28-kD beta subunits and contains 1 flavin adenine dinucleotide (FAD) and 1 adenosine-5'-monophosphate (AMP) per heterodimer. ETFQH, a 64-kD monomer integrated in the inner mitochondrial membrane, contains 1 molecule of FAD and a 4Fe4S cluster. Both enzymes are required for electron transfer from at least 9 mitochondrial flavin-containing dehydrogenases to the main respiratory chain.

H Regulative Prozesse in Verbindung mit immunologischen Mediatoren

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Transcription Factor 8 / Zinc Finger Homeodomain Protein (TCF8 / Nil-2-a)	2,6	TCF8 encodes a human zinc finger transcription factor (Nil-2-a, negative regulator of IL2) that represses T-lymphocyte-specific interleukin-2 gene expression by interacting with a negative regulatory domain within the IL2 gene promoter. Nil-2-a inhibits IL2 gene expression by binding to a negative regulatory domain 100 nucleotides 5' of the IL2 transcription start site.
Interferon- Stimulated Transcription Factor 3, Gamma (ISGF3G)	1,7	ISGF3 is an interferon-dependent, positive-acting transcription factor that is cytoplasmically activated, possibly through direct interaction with the interferon receptor.

I Hormonhaushalt

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Aspartate Beta- Hydroxylase (ASPH)	2,3	This enzyme recognizes a consensus peptide sequence and specifically hydroxylates the beta carbon of aspartic acid or asparagine residues in certain epidermal growth factor (EGF)-like domains of a number of proteins. Among these are protein C, coagulation factors VII, IX, and X, and the complement factors C1R and C1S.
Membrane Metallo- endopeptidase (Enkephalinase / Neutral Endopeptidase / NEP CALLA / CD10)	2,1	NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin.

J Moleküle mit antioxidativen Wirkungen und „Anti-Stress“-Moleküle

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Paraoxonase 2 (PON2)	1,9	Paraoxonase is transported in plasma as a component of HDL, and it has also been shown in vitro in many studies that paraoxonase inhibits the oxidative modification of LDL. The working hypothesis of a number of groups is that the presence of paraoxonase in HDL may account for at least a proportion of the antioxidant properties of these lipoproteins, and thus contributes to HDL's anti-inflammatory effect.
Biliverdin Reductase A	2,3	Biliverdin reductase A catalyzes the conversion of biliverdin to bilirubin in the presence of NADPH or NADH. Bilirubin is a potent antioxidant that can protect cells from a 10,000-fold excess of H ₂ O ₂ .
Tumor Rejection Antigen 1 (Tra1) / Heat Shock Protein gp96	3,2	GP96 is a cell surface glycoprotein of 96 kDa. The gene sequence shows homology to heat shock protein HSP90, endoplasmic reticular protein ERP99, and glucose-regulated protein GRP94. GP96 appears to have multiple functions, including chaperoning peptides to MHC class I molecules of dendritic cells and other antigen-presenting cells, as well as inducing dendritic cells to express costimulatory molecules such as B7 and to produce cytokines IL12 and TNFA.

K Transkription – allgemein

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Poly(A) Polymerase, Alpha (PAPOLA)	2,4 / 2,3 / 2,2 (abhängig von den Sondenpaaren)	Polyadenylation of the 3'-ends of eukaryotic mRNAs is a key event that takes place in the nucleus during maturation of mRNA. The reaction occurs in 2 distinct steps: endoribonucleolytic cleavage of the pre-RNA at the poly(A) site, followed by synthesis of the poly(A) tail at the 3'-end of the upstream cleavage product. The poly(A) polymerase is required for the adenosine addition reaction.

L DNA-Reparatur

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
RecQ Protein-Like (DNA Helicase Q1-	2,3	DNA helicases are enzymes involved in various types of DNA repair, including mismatch repair, nucleotide excision repair, and direct repair. This helicase was named DNA helicase Q1-like due to its

Like)		amino acid sequence similarity with the <i>Escherichia coli</i> DNA helicase RecQ.
-------	--	--

M Sonstige

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Ubiquitin-Like 5 (UBL5)	2,3	Ubiquitin-like proteins (UBLs) are thought to be reversible modulators of protein function rather than protein degraders like ubiquitin. UBL5 is such ubiquitin-like protein that binds to lysine residues on the target proteins, probably modulating their function.
Capillary Morphogenesis Gene 1 (CMG1)	2,3	CMG1 is one of several transcripts upregulated by umbilical vein endothelial cells during capillary morphogenesis in three-dimensional collagen matrices.
Topoisomerase (DNA) II Alpha (TOP2A)	2,2	DNA topoisomerases are enzymes that control and alter the topologic states of DNA in both prokaryotes and eukaryotes. Topoisomerase II from eukaryotic cells catalyzes the relaxation of supercoiled DNA molecules, catenation, decatenation, knotting, and unknotting of circular DNA.

Teil B: Herunterregulierte Gene

A Vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
EH domain- binding mitotic phosphoprotein (EPSIN)	-4,0	EPN1 is an endocytic accessory protein that interacts with EPS15, the alpha subunit of the clathrin adaptor AP2, and clathrin, as well as with other accessory proteins for the endocytosis of clathrin-coated vesicles.

B Zell-Zell-Wechselwirkungen, Migration und Adhäsion, Bildung des Zellgerüst

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Vinexin-beta	-2,3	Vinexin-beta (one of two isoforms) was identified as a novel focal adhesion and cell-cell adhesion protein that binds via SH3 domains to the hinge region of vinculin, which can enhance actin cytoskeletal organization and cell spreading. When expressed, vinexin alpha and beta localized to focal adhesions in NIH 3T3 fibroblasts, and to cell-cell junctions in epithelial LLC-PK1 cells. Furthermore, expression of vinexin increased focal adhesion size.
Rho GDP Dissociation Inhibitor (GDI) Alpha (RHOGDI)	-2,2	Overexpression of the protein RHOGDI in mammalian cells causes them to 'round up' and disrupts the actin cytoskeleton, mimicking the phenotypic changes associated with inactivation of Rho proteins.

C Regulation der Transkription und Translation, Zellproliferations- und Zellzykluskontrolle

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
JunD	-2,0	JunD is the most broadly expressed member of the JUN family and the AP1 transcription factor complex. Primary fibroblasts lacking murine JunD display p53-dependent growth arrest, upregulated p19 (ARF) expression, and premature senescence. In contrast, immortalized cell lines lacking JunD show increased proliferation and higher cyclin D1 levels. Furthermore, JunD <i>-/-</i> fibroblasts exhibited increased p53-dependent apoptosis upon ultraviolet irradiation and were sensitive to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF). The antiapoptotic role of JUND was confirmed using an in vivo model of TNF-mediated hepatitis. It was proposed that JUND protects cells from senescence, or apoptotic responses to stress stimuli, by acting as a modulator of the signaling pathways that link RAS to p53.

D Regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit Apoptose

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
FK506-Binding	-1,5	FKBPs are intracellular receptors for the immunosuppressive drug

Protein 8 (FKBP8 / FKBP38)		FK506. The FKBP/FK506 complex exerts its immunosuppressive effects by inhibiting calcineurin, a calcium- and calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase that functions as a critical signaling molecule during T-cell activation. Overexpression of FKBP8 blocked apoptosis, whereas functional inhibition of FKBP8 by a dominant-negative mutant or by RNA interference promoted apoptosis. FKBP8 may inhibit apoptosis by anchoring BCL2 and BCLXL to mitochondrial membranes.
FK506-Binding Protein 8 Homolog (FKBP8 / FKBP38 Homolog)	-2,6	cf. FK506-Binding Protein 8
p53 Cellular Tumor Antigen	-1,9	The p53 tumor antigen is found in increased amounts in a wide variety of transformed cells. The protein is also detectable in many actively proliferating, nontransformed cells, but it is undetectable or present at low levels in resting cells. Wild-type p53 may play a role in DNA repair. The tumor suppressor p53 inhibits cell growth through activation of cell cycle arrest and apoptosis. Most cancers lack active p53.

E Translation – allgemein

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Eukaryotic Translation Initiation Factor 2, Subunit 3 (EIF2S3)	-1,6	Translation initiation factor eIF-2 is a heterotrimeric GTP-binding protein involved in the recruitment of methionyl-tRNA to the 40 S ribosomal subunit. Gasper et al. (1994) cloned a human cDNA encoding the largest subunit of eIF-2, EIF2S3. The EIF2S3 cDNA encodes a 472-amino acid protein with a molecular mass of 51.8 kD and contains 3 consensus GTP-binding elements.

F Sonstige

Genbezeichnung (Gensymbol)	Regulations- faktor (Mittelwert)	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Biglycan (Proteoglycan-I / PG-I)	-1,7	Biglycan, or proteoglycan-I, and decorin, or proteoglycan-II are related but distinct small proteoglycans found in many connective tissues.

5.1.2 Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression in Hs578T-Zellen mit Hilfe von Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays

Die Affymetrix Microarrays lieferten sowohl in bezug auf Anzahl als auch Art der regulierten Gene keine wirklich zufriedenstellenden Ergebnisse in dem Sinne, als dass diese deutliche Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen der zellulären Effekte des IGFBP-2 geliefert hätten. Möglicherweise war die eingesetzte hochphysiologische IGFBP-2-Konzentration noch zu niedrig, um stärkere Effekte auf der Ebene der Genexpression hervorzurufen. Daher sollten erneut Microarray-Experimente mit den Hs578T-Zellen durchgeführt werden, wobei die IGFBP-2-Konzentration bei diesen Experimenten auf 2000 ng/ml angehoben wurde (Abschnitt 4.2.1). Nachteile der Affymetrix Microarray-Experimente waren die sehr hohen Kosten und die Tatsache, dass diese aufgrund der gerätetechnischen Anforderungen nicht selbst durchgeführt werden konnten und man somit keinen direkten Einblick in die Durchführung dieser Experimente hatte. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde im folgenden mit den Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays gearbeitet, welche kostengünstiger waren und mit denen die Experimente im eigenen Labor durchgeführt werden konnten. Die mit der CCD-Kamera erfaßten chemilumineszierenden Microarrays (Abschnitt 4.2.9) sind unten abgebildet.

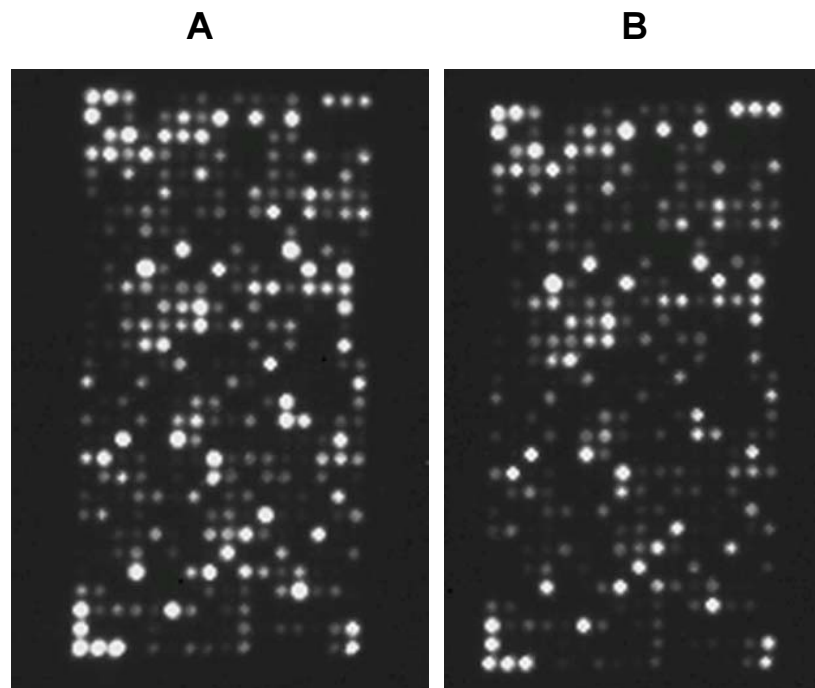


Abb. 12: Chemilumineszenz-Detektion auf den Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays mit markierter Hs578T-cRNA

Abb. 12 zeigt die mehr oder weniger stark chemilumineszierenden Spots der Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays, welche mit markierter Hs578T-cRNA (Abschnitt 4.2.9) hybridisiert wurden. Array A repräsentiert hierbei die Hs578T-Zellen, welche mit 2000 ng/ml IGFBP-2 behandelt wurden (Hs578T+), Array B repräsentiert die zugehörige Negativkontrolle (Hs578T-). Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe einer geeigneten CCD-Kamera erfaßt und in elektronischer Form gespeichert.

Die Ergebnisse der ausgewerteten Rohdaten sind in tabellarischer Form dargestellt (Tabelle 5). Die potentiell regulierten Gene wurden nach ontologischen Gruppen gegliedert. Die Tabellen enthalten neben der Genbezeichnung (inkl. Gensymbol) den Regulationsfaktor, LocusLink-Klassifizierungen sowie eine kurze Funktionsbeschreibung und/oder Charakterisierung des Gens (soweit verfügbar). Auf diese Weise lassen sich eventuelle Tendenzen und Bezüge zu zellulären Effekten besser erkennen. Die LocusLink-Klassifizierung stellt eine schlagwortartige Zuordnung des Gens zu bestimmten Charakteristika und Funktionen dar (z.B. zelluläre Lokalisierung oder physiologische / zelluläre / molekulare Funktionen) und stammt aus der LocusLink-Datenbank des NCBI (mittlerweile ersetzt durch EntrezGene). Die Schlagwörter, welche u.a. für die Zuordnung zu einer ontologischen Gruppe ausschlaggebend waren, sind grau hinterlegt. Einige Gene sind mitunter in mehreren ontologischen Gruppen aufgelistet, da die Zuordnung zu einer einzigen Gruppe unzureichend gewesen wäre. Jedoch sind nicht alle Gene in jeder ontologischen Gruppe aufgelistet, da dies die Ergebnistabellen unnötig stark vergrößert hätte. Stattdessen erfolgte eine Zuordnung zu den jeweils relevantesten ontologischen Gruppen. Im Anhang (Tabelle 10) befindet sich eine weitere Tabelle mit zusätzlichen Daten: Zu jedem der dort alphabetisch sortierten Gene sind die GenBank Accession Number sowie die Chemilumineszenz-Intensitäten der zugehörigen Spots und die wichtigsten daraus berechneten Werte (incl. Regulationsfaktor) angegeben.

Tabelle 5: Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarray-Ergebnisse – Potentiell durch IGFBP-2 regulierte Gene in der Brustkrebszelllinie Hs578T

Die folgenden Tabellen enthalten die potentiell durch IGFBP-2 regulierten Gene in Hs578T-Zellen, welche unter Verwendung der Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays ermittelt wurden. Die hierbei untersuchten Hs578T-Zellen wurden im Vergleich zur Negativkontrolle mit 2000 ng/ml IGFBP-2 behandelt (Abschnitt 4.2.9). Die Gene wurden nach ontologischen Gesichtspunkten untergliedert. Die Spalte „RF“ gibt den Regulationsfaktor an, also das Verhältnis der Genexpressionslevel, welche aus den Hintergrund-korrigierten und normalisierten Spotintensitäten hervorgegangen sind (Abschnitt 4.2.9). LocusLink-Klassifizierungen, die zur Zuordnung eines Gens zu einer ontologischen Gruppe beitragen, sind grau hervorgehoben. Die in der Spalte „Funktionen und charakteristische Eigenschaften“ aufgeführten Geninformationen wurden mit Hilfe von allgemeinen WWW-Suchmaschinen, NCBI-Datenbanken und Lehrbüchern ermittelt.

A Zellwachstum und Bestandserhaltung, Regulation der Zellproliferation

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Transforming Growth Factor, Alpha (TGFA)	1,81	cell proliferation; cell-cell signaling; epidermal growth factor receptor activating ligand activity; extracellular space; growth factor activity; integral to plasma membrane; protein binding; protein-tyrosine kinase activity; regulation of cell cycle; signal transducer activity; soluble fraction	Transforming growth factors (TGFs) are biologically active polypeptides that reversibly confer the transformed phenotype on cultured cells. TGF- α shows about 40% sequence homology with epidermal growth factor (EGF) and competes with EGF for binding to the EGF receptor, stimulating its phosphorylation and producing a mitogenic response. TGF- α can act synergistically with TGF- β to promote anchorage-independent cell proliferation in soft agar.
Non-Metastatic Cells 1, Protein Expressed In (NME1)	1,65	ATP binding; CTP biosynthesis; GTP biosynthesis; UTP biosynthesis; kinase activity; negative regulation of cell cycle; negative regulation of cell proliferation; nucleoside triphosphate biosynthesis; nucleoside-diphosphate kinase activity; nucleus; transferase activity	NME1 was identified because of its reduced mRNA transcript levels in highly metastatic cells. NME1 encodes the 'A' isoform of nucleoside diphosphate kinase (NDK) and plays a major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP. NDK exists as a hexamer composed of the 'A' (NME1) and 'B' (encoded by NME2) isoforms. Mutations in NME1 have been identified in aggressive neuroblastomas.
Stratifin / 14-3-3-Sigma (SFN)	1,90	cell proliferation; cytoplasm; extracellular space; negative regulation of protein kinase activity; protein domain specific binding; protein kinase C inhibitor activity; regulation of cell cycle; signal transduction	The 14-3-3 family of proteins mediates signal transduction by binding to phosphoserine-containing proteins. In colorectal cancer cell lines, 14-3-3-sigma, or stratifin, showed to be strongly induced by gamma irradiation and other DNA-damaging agents. The induction of 14-3-3-sigma is mediated by a p53-responsive element located 1.8 kb upstream of its transcription start site. Exogenous introduction of 14-3-3-sigma into cycling cells results in a G2 arrest . 14-3-3 sigma also appears to have a positive feedback effect on p53 activity.
Tumor Protein p73 (TP73)	2,52	DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis; apoptosis; mismatch repair; negative regulation of cell cycle; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription factor activity	p73, a protein with significant amino acid sequence similarity to p53 can, at least when overproduced, activate the transcription of p53-responsive genes and inhibit cell growth in a p53-like manner by inducing apoptosis. It may be a tumor suppressor protein.
v-yes-1 Yamaguchi Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1 (YES1)	2,02	ATP binding; cell growth and/or maintenance; intracellular signaling cascade; protein amino acid phosphorylation; protein-tyrosine kinase activity; transferase activity	This gene is the cellular homolog of the Yamaguchi sarcoma virus oncogene, Yes1. The encoded protein has tyrosine kinase activity and belongs to the src family of proteins.
v-myc	2,25	cell cycle arrest; cell	On the one hand, induction of the

Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Avian) (MYC)		proliferation; iron ion homeostasis; nucleus; regulation of transcription from Pol II promoter; transcription factor activity	transcription factor MYC promotes cell proliferation and transformation by activating growth-promoting genes. On the other hand, by inhibiting p21(CIP1) expression MYC favors the initiation of apoptosis, thereby influencing the outcome of a p53 response in favor of cell death.
v-raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (RAF1)	1,74	ATP binding; apoptosis; cell proliferation; diacylglycerol binding; intracellular signaling cascade; mitochondrial outer membrane; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; receptor signaling protein activity; transferase activity	Raf-1 is a MAP kinase kinase kinase (MAP3K) which functions downstream of the Ras family of membrane associated GTPases to which it binds directly. Once activated Raf-1 can phosphorylate to activate the dual specificity protein kinases MEK1 and MEK2 which in turn phosphorylate to activate the serine/threonine specific protein kinases ERK1 and ERK2. Activated ERKs are pleiotropic effectors of cell physiology and play an important role in the control of gene expression involved in the cell division cycle, apoptosis, cell differentiation and cell migration.
DNA-Damage-Inducible Transcript 3 (DDIT3 / CHOP)	2,49	cell cycle arrest; cell growth and/or maintenance; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; response to DNA damage stimulus; transcription corepressor activity; transcription factor activity	CHOP is activated by endoplasmic reticulum (ER) stress imposed by unfolded and malformed proteins. It is assumed that CHOP deletion protects cells from ER stress by decreasing ER protein load and changing redox conditions. CHOP seems to affect proliferation of certain cancer cells.
Polo-Like Kinase 2 (Drosophila) (PLK2)	2,32	ATP binding; cell cycle; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; transferase activity	This serum-inducible kinase is a member of the 'polo' family of serine/threonine protein kinases that play a role in normal cell division.
Retinoblastoma 1 (including Osteosarcoma) (RB)	2,06	cell cycle checkpoint; chromatin; negative regulation of cell cycle; negative regulation of transcription from Pol II promoter; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription factor activity	Retinoblastoma 1 (RB) occurs in embryonic neoplasms of retinal origin. It almost always presents in early childhood and is often bilateral. Probably acts as a regulator of other genes. It forms a complex with adenovirus E1A and with SV40 large T antigen. It acts as a tumor suppressor. It is a potent inhibitor of E2F-mediated trans-activation. It recruits and targets histone methyltransferase SUV39H1 leading to epigenetic transcriptional repression. It also inhibits the intrinsic kinase activity of TAF1.
Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101)	1,72	DNA binding; intracellular protein transport; protein transporter activity; regulation of cell growth; transcription corepressor activity; ubiquitin conjugating enzyme activity; ubiquitin cycle	The protein encoded by this gene belongs to a group of apparently inactive homologs of ubiquitin-conjugating enzymes. The gene product contains a coiled-coil domain that interacts with stathmin, a cytosolic phosphoprotein implicated in tumorigenesis. The protein may play a role in cell growth and differentiation and act as a negative growth regulator. In vitro steady-state expression of this tumor susceptibility gene appears to be important for maintenance of genomic stability and cell cycle regulation. Mutations and alternative splicing in this

			gene occur at high frequency in breast cancer and suggest that defects occur during breast cancer tumorigenesis and/or progression.
Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3)	1,58	cell growth and/or maintenance; extracellular space; insulin-like growth factor binding; regulation of cell growth; signal transduction	The insulin-like growth factors, their receptors, and their binding proteins play key roles in regulating cell proliferation and apoptosis. Among the several roles of IGFBP3 are its function as the major carrying protein for IGF1 and IGF2 in the circulation, and its action as a modulator of IGF bioactivity and as a direct growth inhibitor in the extravascular tissue compartment, where it is expressed in a highly regulated manner. IGFBP-3 also appears to have IGF-independent actions that are currently under further investigation. IGFBP-3 has been shown to have a growth-inhibitory effect on human breast cancer cells.
Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1)	2,15	JAK-STAT cascade; cytoplasm; insulin-like growth factor receptor binding; intracellular signaling cascade; negative regulation of JAK-STAT cascade; protein kinase binding; protein kinase inhibitor activity; regulation of cell growth	This gene encodes a member of the STAT-induced STAT inhibitor (SSI), also known as suppressor of cytokine signaling (SOCS), family. SSI family members are cytokine-inducible negative regulators of cytokine signaling. The expression of this gene can be induced by a subset of cytokines, including IL2, IL3 erythropoietin (EPO), CSF2/GM-CSF, and interferon (IFN)-gamma. The protein encoded by this gene functions downstream of cytokine receptors, and takes part in a negative feedback loop to attenuate cytokine signaling. It appears to be a major regulator of signaling by interleukin 6 (IL6) and leukemia inhibitory factor (LIF). Knockout studies in mice suggested the role of this gene as a modulator of IFN-gamma action, which is required for normal postnatal growth and survival.
Integrin-Linked Kinase-2 (ILK)	2,03	ATP binding; cell proliferation; cell-matrix adhesion; cytoplasm; integrin-mediated signaling pathway; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; transferase activity	Transduction of extracellular matrix signals through integrins influences intracellular and extracellular functions, and appears to require interaction of integrin cytoplasmic domains with cellular proteins. ILK encodes a predicted 451-amino acid protein, with an apparent molecular weight of 59 kD. The ILK protein is a serine/threonine protein kinase (with 4 ankyrin-like repeats), which phosphorylates the beta-1 and beta-3 integrin subunits on serine and threonine residues. It is found within the focal adhesion protein part of the complex ILK-PINCH. This complex is considered to be one of the convergence points of integrin- and growth factor-signaling pathway. ILK might be implicated in mediating cell architecture, adhesion to integrin substrates and anchorage-dependent growth in epithelial cells. ILK is thought to be a regulator of integrin-mediated signal transduction. ILK is induced by TGF- β 1.

Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2B (CDKN2B)	1,97	biological process unknown; cell cycle ; cell cycle arrest ; cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity; cytoplasm; negative regulation of cell cycle ; negative regulation of cell proliferation ; nucleus; regulation of CDK activity	This gene lies adjacent to the tumor suppressor gene CDKN2A in a region that is frequently mutated and deleted in a wide variety of tumors. The product encoded by this gene is a cyclin-dependent kinase inhibitor, which forms a complex with CDK4 or CDK6, and prevents the activation of the CDK kinases, thus functions as a cell growth regulator that controls cell cycle G1 progression. The expression of this gene was found to be dramatically induced by TGF- β , which suggested its role in the TGF- β induced growth inhibition. Two alternatively spliced transcript variants of this gene, which encode distinct proteins, have been reported.
Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	1,72	DNA binding; DNA polymerase processivity factor activity; DNA repair; DNA replication; cell proliferation ; delta-DNA polymerase cofactor complex; nucleus; regulation of DNA replication ; regulation of cell cycle	The protein encoded by this gene is found in the nucleus and is a cofactor of DNA polymerase delta. The encoded protein acts as a homotrimer and helps increase the processivity of leading strand synthesis during DNA replication. In response to DNA damage, this protein is ubiquitinated and is involved in the RAD6-dependent DNA repair pathway. Two transcript variants encoding the same protein have been found for this gene. Pseudogenes of this gene have been described on chromosome 4 and on the X chromosome.
Notch Homolog 2 (Drosophila) (NOTCH2)	2,73	Notch signaling pathway; calcium ion binding; cell cycle arrest ; cell differentiation; cell fate determination; cell growth ; cell surface; determination of left/right symmetry; hemopoiesis; induction of apoptosis; integral to plasma membrane; ligand-regulated transcription factor activity; morphogenesis of an epithelial sheet; negative regulation of cell proliferation ; neurogenesis; nucleus; positive regulation of RAS protein signal transduction; protein binding; protein heterodimerization activity; receptor activity; regulation of development; regulation of transcription, DNA-dependent; stem cell maintenance; transcription regulator activity	This gene encodes a member of the Notch family. Members of this Type 1 transmembrane protein family share structural characteristics including an extracellular domain consisting of multiple epidermal growth factor-like (EGF) repeats, and an intracellular domain consisting of multiple, different domain types. Notch family members play a role in a variety of developmental processes by controlling cell fate decisions. The Notch signaling network is an evolutionarily conserved intercellular signaling pathway which regulates interactions between physically adjacent cells. In Drosophila, notch interaction with its cell-bound ligands (delta, serrate) establishes an intercellular signaling pathway that plays a key role in development. Homologues of the notch-ligands have also been identified in human, but precise interactions between these ligands and the human notch homologues remain to be determined. This protein is cleaved in the trans-Golgi network, and presented on the cell surface as a heterodimer. This protein functions as a receptor for membrane bound ligands, and may play a role in vascular, renal and hepatic development.
Neurofibromin 2 (NF2)	1,90	cytoskeleton; negative regulation of cell cycle ; negative regulation of cell proliferation ; perception of sound; plasma membrane; structural molecule activity	This gene encodes a protein that is similar to some members of the ERM (ezrin, radixin, moesin) family of proteins that are thought to link cytoskeletal components with proteins in the cell membrane. This gene product has

			<p>been shown to interact with cell-surface proteins, proteins involved in cytoskeletal dynamics and proteins involved in regulating ion transport. This gene is expressed at high levels during embryonic development; in adults, significant expression is found in Schwann cells, meningeal cells, lens and nerve. Mutations in this gene are associated with neurofibromatosis type II which is characterized by nervous system and skin tumors and ocular abnormalities. Two predominant isoforms and a number of minor isoforms are produced by alternatively spliced transcripts.</p>
<p>Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 7 (TNFSF7)</p>	1,69	<p>apoptosis; cell proliferation; cell-cell signaling; immune response; integral to plasma membrane; signal transduction; tumor necrosis factor receptor binding</p>	<p>The protein encoded by this gene is a cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This cytokine is a ligand for TNFRSF27 (CD27). It is a surface antigen on activated, but not on resting, T and B lymphocytes. It induces proliferation of costimulated T cells, enhances the generation of cytolytic T cells, and contributes to T cell activation. However, its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis. This cytokine is also reported to play a role in regulating B-cell activation, cytotoxic function of natural killer cells, and immunoglobulin synthesis. This receptor transduces signals that lead to the activation of NF-kappaB and MAPK8/JNK. Adaptor proteins TRAF2 and TRAF5 have been shown to mediate the signaling process of this receptor. CD27-binding protein (SIVA), a proapoptotic protein, can bind to this receptor and is thought to play an important role in the apoptosis induced by this receptor.</p>

B Apoptose / Nekrose (Zelltod)

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
CD27-Binding Protein (SIVA)	1,80	<p>apoptosis; defense response; induction of apoptosis by extracellular signals; receptor signaling protein activity</p>	<p>This protein seems to have an important role in the apoptotic (programmed cell death) pathway induced by the CD27 antigen, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily, and it also binds to the CD27 antigen cytoplasmic tail. Two splice variants have been found for this gene that differ by a 193 nucleotide length internal insertion sequence in the coding region. The resulting proteins are 110 and 175 amino acids long. Isoform 1 inhibits BCL2L1 isoform Bcl-x(L) anti-apoptotic activity.</p>
Tumor	2,52	DNA damage response, signal	p73, a protein with significant amino acid

Protein p73 (TP73)		transduction resulting in induction of apoptosis; apoptosis; mismatch repair; negative regulation of cell cycle; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription factor activity	sequence similarity to p53 can, at least when overproduced, activate the transcription of p53-responsive genes and inhibit cell growth in a p53-like manner by inducing apoptosis. It may be a tumor suppressor protein.
Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells 1 (p105) (NFKB1)	2,23	transcriptional regulation; nucleus; apoptosis	This gene encodes a 105 kD protein which can undergo cotranslational processing by the 26S proteasome to produce a 50 kD protein. The 105 kD protein is a Rel protein-specific transcription inhibitor and the 50 kD protein is a DNA binding subunit of the NF-kappa-B (NFKB) protein complex. NFKB is a transcription regulator that is activated by various intra- and extra-cellular stimuli such as cytokines, oxidant-free radicals, ultraviolet irradiation, and bacterial or viral products. Activated NFKB translocates into the nucleus and stimulates the expression of genes involved in a wide variety of biological functions. Although NFKB mainly has anti-apoptotic effects, it can also have pro-apoptotic effects (in connection with p53).
Tumor Necrosis Factor (TNF Superfamily, Member 2) (TNF)	2,34	apoptosis; cell-cell signaling; immune response; inflammatory response; integral to membrane; leukocyte cell adhesion; necrosis; regulation of transcription, DNA-dependent; response to virus; signal transduction; soluble fraction; tumor necrosis factor receptor binding	This gene encodes a multifunctional proinflammatory cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily. This cytokine is mainly secreted by macrophages. It can bind to, and thus functions through its receptors TNFRSF1A/TNFR1 and TNFRSF1B/TNFR. This cytokine is involved in the regulation of a wide spectrum of biological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and coagulation. This cytokine has been implicated in a variety of diseases, including autoimmune diseases, insulin resistance, and cancer. Knockout studies in mice also suggested the neuroprotective function of this cytokine.
Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 6 (TNFRSF6)	1,65	cellular component unknown; cytosol; immune response; induction of apoptosis; integral to plasma membrane; protein complex assembly; regulation of apoptosis; signal transduction; soluble fraction; transmembrane receptor activity	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor contains a death domain. It has been shown to play a central role in the physiological regulation of programmed cell death, and has been implicated in the pathogenesis of various malignancies and diseases of the immune system. The interaction of this receptor with its ligand allows the formation of a death-inducing signaling complex that includes Fas-associated death domain protein (FADD), caspase 8, and caspase 10. The autoproteolytic processing of the caspases in the complex triggers a downstream caspase cascade, and leads to apoptosis. This receptor has been also shown to activate NF-kappaB, MAPK3/ERK1, and MAPK8/JNK, and is found to be involved in transducing the proliferating signals in normal diploid fibroblast and T cells. At least eight

			alternatively spliced transcript variants encoding seven distinct isoforms have been described. The isoforms lacking the transmembrane domain may negatively regulate the apoptosis mediated by the full length isoform.
Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 7 (TNFSF7)	1,69	apoptosis; cell proliferation; cell-cell signaling; immune response; integral to plasma membrane; signal transduction; tumor necrosis factor receptor binding	The protein encoded by this gene is a cytokine that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) ligand family. This cytokine is a ligand for TNFRSF27/CD27. It is a surface antigen on activated, but not on resting, T and B lymphocytes. It induces proliferation of costimulated T cells, enhances the generation of cytolytic T cells, and contributes to T cell activation. However, its overexpression inhibits tumor cell growth and induces apoptosis. This cytokine is also reported to play a role in regulating B-cell activation, cytotoxic function of natural killer cells, and immunoglobulin synthesis. This receptor transduces signals that lead to the activation of NF-kappaB and MAPK8/JNK. Adaptor proteins TRAF2 and TRAF5 have been shown to mediate the signaling process of this receptor. CD27-binding protein (SIVA), a proapoptotic protein, can bind to this receptor and is thought to play an important role in the apoptosis induced by this receptor.
Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 10a (TNFRSF10A)	1,71	TRAIL binding; activation of NFκB-inducing kinase; apoptosis; caspase activation; caspase activator activity; death receptor activity; induction of apoptosis; induction of apoptosis via death domain receptors; integral to membrane; receptor activity; signal transduction	The protein encoded by this gene is a member of the TNF-receptor superfamily. This receptor is activated by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TNFSF10/TRAIL), and thus transduces cell death signal and induces cell apoptosis. Studies with FADD-deficient mice suggested that FADD, a death domain containing adaptor protein, is required for the apoptosis mediated by this protein.
v-raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (RAF1)	1,74	ATP binding; apoptosis; cell proliferation; diacylglycerol binding; intracellular signaling cascade; mitochondrial outer membrane; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; receptor signaling protein activity; transferase activity	Raf-1 is a MAP kinase kinase kinase (MAP3K) which functions downstream of the Ras family of membrane associated GTPases to which it binds directly. Once activated Raf-1 can phosphorylate to activate the dual specificity protein kinases MEK1 and MEK2 which in turn phosphorylate to activate the serine/threonine specific protein kinases ERK1 and ERK2. Activated ERKs are pleiotropic effectors of cell physiology and play an important role in the control of gene expression involved in the cell division cycle, apoptosis, cell differentiation and cell migration.
Notch homolog 2 (Drosophila) (NOTCH2)	2,73	Notch signaling pathway; calcium ion binding; cell cycle arrest; cell differentiation; cell fate determination; cell growth; cell surface; determination of left/right symmetry; hemopoiesis; induction of apoptosis; integral to	This gene encodes a member of the Notch family. Members of this Type 1 transmembrane protein family share structural characteristics including an extracellular domain consisting of multiple epidermal growth factor-like (EGF) repeats, and an intracellular domain consisting of

		plasma membrane; ligand-regulated transcription factor activity; morphogenesis of an epithelial sheet; negative regulation of cell proliferation; neurogenesis; nucleus; positive regulation of RAS protein signal transduction; protein binding; protein heterodimerization activity; receptor activity; regulation of development; regulation of transcription, DNA-dependent; stem cell maintenance; transcription regulator activity	multiple, different domain types. Notch family members play a role in a variety of developmental processes by controlling cell fate decisions. The Notch signaling network is an evolutionarily conserved intercellular signaling pathway which regulates interactions between physically adjacent cells. In Drosophila, notch interaction with its cell-bound ligands (delta, serrate) establishes an intercellular signaling pathway that plays a key role in development. Homologues of the notch-ligands have also been identified in human, but precise interactions between these ligands and the human notch homologues remain to be determined. This protein is cleaved in the trans-Golgi network, and presented on the cell surface as a heterodimer. This protein functions as a receptor for membrane bound ligands, and may play a role in vascular, renal and hepatic development.
v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Avian) (MYC)	2,25	cell cycle arrest; cell proliferation; apoptosis; iron ion homeostasis; nucleus; regulation of transcription from Pol II promoter; transcription factor activity	On the one hand, induction of the transcription factor MYC promotes cell proliferation and transformation by activating growth-promoting genes. On the other hand, by inhibiting p21(CIP1) expression MYC favors the initiation of apoptosis, thereby influencing the outcome of a p53 response in favor of cell death.
Non-Metastatic Cells 3, Protein Expressed In (NME3)	1,67	ATP binding; CTP biosynthesis; GTP biosynthesis; UTP biosynthesis; induction of apoptosis; kinase activity; nucleoside-diphosphate kinase activity; transferase activity	NME3 plays a major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP. It was found that NME3 mRNA was preferentially expressed at early stages of myeloid differentiation of highly purified CD34(+) cells. Its constitutive expression in a myeloid precursor line, which is growth-factor dependent for both proliferation and differentiation, resulted in inhibition of granulocytic differentiation induced by granulocyte colony-stimulating factor and caused apoptotic cell death.

C Zelladhäsion

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Laminin, Beta 1 (LAMB1)	2,21	basement membrane; cell adhesion; protein binding; structural molecule activity	Laminins, a family of extracellular matrix glycoproteins, are the major noncollagenous constituent of basement membranes. They have been implicated in a wide variety of biological processes including cell adhesion, differentiation, migration, signaling, neurite outgrowth and metastasis. Laminins are composed of 3 non identical chains: laminin

			<p>alpha, beta and gamma (formerly A, B1, and B2, respectively) and they form a cruciform structure consisting of 3 short arms, each formed by a different chain, and a long arm composed of all 3 chains. Each laminin chain is a multidomain protein encoded by a distinct gene. Several isoforms of each chain have been described. Different alpha, beta and gamma chain isomers combine to give rise to different heterotrimeric laminin isoforms which are designated by Arabic numerals in the order of their discovery, i.e. alpha1beta1gamma1 heterotrimer is laminin 1. The biological functions of the different chains and trimer molecules are largely unknown, but some of the chains have been shown to differ with respect to their tissue distribution, presumably reflecting diverse functions in vivo. This gene encodes the beta chain isoform laminin, beta 1. The beta 1 chain has 7 structurally distinct domains which it shares with other beta chain isomers. The C-terminal helical region containing domains I and II are separated by domain alpha, domains III and V contain several EGF-like repeats, and domains IV and VI have a globular conformation. Laminin, beta 1 is expressed in most tissues that produce basement membranes, and is one of the 3 chains constituting laminin 1, the first laminin isolated from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tumor. A sequence in the beta 1 chain that is involved in cell attachment, chemotaxis, and binding to the laminin receptor was identified and shown to have the capacity to inhibit metastasis.</p>
<p>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (Erythroid Potentiating Activity, Collagenase Inhibitor) (TIMP1)</p>	2,92	<p>development; extracellular matrix; metalloendopeptidase inhibitor activity; metalloproteinase activity; proteolysis and peptidolysis</p>	<p>This gene belongs to the TIMP gene family. The proteins encoded by this gene family are natural inhibitors of the matrix metalloproteinases, a group of peptidases involved in degradation of the extracellular matrix. TIMP1 is highly inducible at the transcriptional level in response to many cytokines and hormones. It complexes with matrix metalloproteinases (such as collagenases) and irreversibly inactivates them. Also mediates erythropoiesis in vitro; but, unlike IL-3, it is species-specific, stimulating the growth and differentiation of only human and murine erythroid progenitors. TIMP1 is known to act on MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13 and MMP-16. It does not act on MMP-14.</p>
<p>Integrin-Linked Kinase-2 (ILK)</p>	2,03	<p>ATP binding; cell proliferation; cell-matrix adhesion; cytoplasm; integrin-mediated signaling pathway; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; transferase activity</p>	<p>Transduction of extracellular matrix signals through integrins influences intracellular and extracellular functions, and appears to require interaction of integrin cytoplasmic domains with cellular proteins. ILK encodes a predicted 451-amino acid protein, with an apparent molecular weight of 59 kD. The ILK protein is a serine/threonine protein kinase (with 4 ankyrin-like repeats), which</p>

			phosphorylates the beta-1 and beta-3 integrin subunits on serine and threonine residues. It is found within the focal adhesion protein part of the complex ILK-PINCH. This complex is considered to be one of the convergence points of integrin- and growth factor-signaling pathway. ILK might be implicated in mediating cell architecture, adhesion to integrin substrates and anchorage-dependent growth in epithelial cells. Overexpression of constitutively active ILK results in loss of cell-cell adhesion, anchorage-independent growth, and tumorigenicity in nude mice. ILK is thought to be a regulator of integrin-mediated signal transduction. ILK is induced by TGF- β 1.
Integrin, Alpha 3 (Antigen CD49C, Alpha 3 Subunit of VLA-3 Receptor) (ITGA3)	1,84	cell-matrix adhesion; integral to membrane; integrin complex; integrin-mediated signaling pathway; protein binding; receptor activity	ITGA3 encodes the integrin alpha 3 chain. Integrins are heterodimeric integral membrane proteins composed of an alpha chain and a beta chain. Alpha chain 3 undergoes post-translational cleavage in the extracellular domain to yield disulfide-linked light and heavy chains that join with beta 1 to form an integrin that interacts with many extracellular-matrix proteins. The alpha 3 beta 1 integrin is known variously as: very late (activation) antigen 3 ('VLA-3'), very common antigen 2 ('VCA-2'), extracellular matrix receptor 1 ('ECMR1'), and galactoprotein b3 ('GAPB3'). ITGA3 is – for example – found in integrin alpha-3/beta-1, which is a receptor for fibronectin, laminin, collagen, epiligrin and thrombospondin.
Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (Rho Family, Small GTP Binding Protein Rac1) (RAC1)	1,90	GTP binding; cell adhesion; cell motility; inflammatory response; morphogenesis; small GTPase mediated signal transduction; small monomeric GTPase activity	The protein encoded by this gene is a GTPase which belongs to the RAS superfamily of small GTP-binding proteins. Members of this superfamily appear to regulate a diverse array of cellular events, including the control of cell growth, cytoskeletal reorganization, and the activation of protein kinases. Several alternatively spliced transcript variants of this gene have been described, but the full-length nature of some of these variants has not been determined.

D Vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Clathrin, Heavy Polypeptide (Hc) (CLTC)	1,86	clathrin vesicle coat; coated pit; intracellular protein transport; structural molecule activity	Clathrin is a major protein component of the cytoplasmic face of intracellular organelles, called coated vesicles and coated pits. These specialized organelles are involved in the

			intracellular trafficking of receptors and endocytosis of a variety of macromolecules. The basic subunit of the clathrin coat is composed of three heavy chains and three light chains.
RAB5A, member RAS oncogene family (RAB5A)	2,29	GTP binding; RAB small monomeric GTPase activity; early endosome; endocytosis; intracellular protein transport; protein transporter activity; small GTPase mediated signal transduction	Members of the Rab protein family are non-transforming monomeric GTP-binding proteins of the Ras superfamily that contains 4 highly conserved regions involved in GTP binding and hydrolysis. They are prenylated, membrane-bound proteins involved in vesicular fusion and trafficking. It was demonstrated that RAB5A is a rate-limiting component of the machinery regulating the kinetics of membrane traffic in the early endocytic pathway.
Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101)	1,72	DNA binding; intracellular protein transport; protein transporter activity; regulation of cell growth; transcription corepressor activity; ubiquitin conjugating enzyme activity; ubiquitin cycle	The protein encoded by this gene belongs to a group of apparently inactive homologs of ubiquitin-conjugating enzymes. The gene product contains a coiled-coil domain that interacts with stathmin, a cytosolic phosphoprotein implicated in tumorigenesis. The protein may play a role in cell growth and differentiation and act as a negative growth regulator. In vitro steady-state expression of this tumor susceptibility gene appears to be important for maintenance of genomic stability and cell cycle regulation. Mutations and alternative splicing in this gene occur in high frequency in breast cancer and suggest that defects occur during breast cancer tumorigenesis and/or progression.
Translocation Associated Membrane Protein 1 (TRAM1)	2,48	glycosylation; protein transporter activity; exocytosis	Immunoblot analysis showed that TRAM1 is an abundantly expressed, approximately 36 kDa microsomal glycoprotein. Functional analysis indicated that TRAM1 influences glycosylation and is stimulatory or required for the translocation of secretory proteins.
Insulin-Like Growth Factor 2 Receptor (Mannose-6-Phosphate Receptor) (IGF2R)	1,59	intracellular trafficking; activation of TGFbeta; internalization of IGF-II	The mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor (250 kDa transmembrane protein) functions in the intracellular trafficking of lysosomal enzymes, the activation of the potent growth inhibitor, transforming growth factor beta, and the degradation of IGF-II, a mitogen often overproduced in tumors.

E Kerntransport

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Karyopherin Alpha 2 (RAG Cohort 1, Importin Alpha 1) (KPNA2)	2,01	DNA metabolism; G2 phase of mitotic cell cycle; M-phase specific microtubule process; NLS-bearing substrate-nucleus import; cytoplasm; intracellular protein transport; nuclear localization sequence binding; nucleoplasm; protein binding; protein transporter activity; regulation of DNA recombination	The import of proteins into the nucleus is a process that involves at least 2 steps. The first is an energy-independent docking of the protein to the nuclear envelope and the second is an energy-dependent translocation through the nuclear pore complex. Imported proteins require a nuclear localization sequence (NLS) which generally consists of a short region of basic amino acids or 2 such regions spaced about 10 amino acids apart. Proteins involved in the first step of nuclear import have been identified in different systems. These include the <i>Xenopus</i> protein importin and its yeast homolog, SRP1 (a suppressor of certain temperature-sensitive mutations of RNA polymerase I in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>), which bind to the NLS. KPNA2 protein binds specifically and directly to substrates containing either a simple or bipartite NLS motif. It interacts with the NLSs of DNA helicase Q1 and SV40 T antigen and may be involved in the nuclear transport of proteins. KPNA2 also may play a role in V(D)J recombination.

F Ionentransport

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Solute Carrier Family 20 (Phosphate Transporter), Member 1 (SLC20A1)	2,02	inorganic phosphate transporter activity; integral to plasma membrane; membrane; phosphate metabolism; phosphate transport; receptor activity; sodium:phosphate symporter activity; transport	GLVR1 is a sodium-dependent phosphate symporter.
Chloride Channel, Nucleotide- Sensitive, 1A (CLNS1A)	1,61	auxiliary transport protein activity; chloride transport; circulation; nucleus; plasma membrane; regulation of cell volume; transport; visual perception	Immunocytochemistry experiments showed the presence of CLNS1A protein in the cytosol and in the plasma membrane. In human platelets, CLNS1A associates with alpha(IIb)beta(3) integrin to functionally regulate platelet activation. CLNS1A may participate in cellular volume control by activation of a swelling-induced chloride conductance pathway.
Voltage-	2,05	nucleotide transport; outer	The voltage-dependent anion channel

Dependent Anion Channel 1 (VDAC1)		mitochondrial membrane; transport	<p>(VDAC1) of the outer mitochondrial membrane is a small, abundant outer membrane pore-forming protein found in the outer membranes of all eukaryotic mitochondria. The VDAC1 protein is thought to form the major pathway for movement of adenine nucleotides through the outer membrane and to be the mitochondrial binding site for hexokinase and glycerol kinase.</p> <p>VDAC1 may also be <i>indirectly</i> involved in apoptosis: During transduction of an apoptotic signal into the cell, there is an alteration in the permeability of the membranes of the cell's mitochondria, which causes the translocation of the apoptogenic protein cytochrome c into the cytoplasm, which in turn activates death-driving proteolytic proteins known as caspases. The BCL2 family of proteins, whose members may be antiapoptotic or proapoptotic, regulates cell death by controlling this mitochondrial membrane permeability during apoptosis.</p> <p>The observed binding of BCL2 family proteins bind to the VDAC is thought to regulate the mitochondrial membrane potential and the release of cytochrome c during apoptosis.</p>
-----------------------------------	--	-----------------------------------	---

G Energiestoffwechsel

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)	-1,98	cytoplasm; glucose metabolism ; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity; glycolysis ; oxidoreductase activity	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase catalyzes an important energy-yielding step in carbohydrate metabolism, the reversible oxidative phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate in the presence of inorganic phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD).
Cytochrome c Oxidase Subunit VIc (COX6C)	1,78	cytochrome-c oxidase activity; electron transport ; energy pathways ; inner membrane; mitochondrion; oxidoreductase activity	Cytochrome c oxidase (COX), the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, catalyzes the electron transfer from reduced cytochrome c to oxygen. It is a heteromeric complex consisting of 3 catalytic subunits encoded by mitochondrial genes and multiple structural subunits encoded by nuclear genes. The mitochondrially-encoded subunits function in electron transfer, and the nuclear-encoded subunits may be involved in the regulation and assembly of the complex. This nuclear gene encodes subunit VIc, which has 77% amino acid sequence identity with mouse COX subunit VIc. This gene is up-regulated in prostate cancer cells.

H Proteinbiosynthese

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Methionine- tRNA Synthetase (MARS)	2,49	ATP binding; actin binding; cytoplasm; ligase activity; methionine-tRNA ligase activity; methionyl-tRNA aminoacylation; protein biosynthesis; soluble fraction; tRNA binding	Aminoacyl-tRNA synthetases are a class of enzymes that charge tRNAs with their cognate amino acids. The protein encoded by this gene belongs to the class I family of tRNA synthetases.
Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Alpha Type, 1 (PSMA1)	2,17	RNA binding; endopeptidase activity; polysome; proteasome core complex (sensu Eukarya); ubiquitin-dependent protein catabolism	The proteasome is a multicatalytic proteinase complex with a highly ordered ring-shaped 20S core structure. The core structure is composed of 4 rings of 28 non-identical subunits; 2 rings are composed of 7 alpha subunits and 2 rings are composed of 7 beta subunits. Proteasomes are distributed throughout eukaryotic cells at a high concentration and cleave peptides in an ATP/ubiquitin-dependent process in a non-lysosomal pathway. An essential function of a modified proteasome, the immunoproteasome, is the processing of class I MHC peptides. This gene encodes a member of the peptidase T1A family, that is a 20S core alpha subunit.
Prefoldin 5 (PFDN5)	2,22	chaperone activity; nucleus; prefoldin complex; protein folding; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription corepressor activity	Prefoldin is a heterohexameric chaperone protein which assists in the correct folding of other proteins. It binds specifically to cytosolic chaperonin and transfers target proteins. Prefoldin may function by selectively targeting nascent actin and tubulin chains pending their transfer to cytosolic chaperonin for final folding and/or assembly. It promotes folding in an environment in which there are many competing pathways for nonnative proteins. This gene encodes a subunit of prefoldin, prefoldin 5. This subunit is associated with c-myc and is thought to repress the transcriptional activity of c-myc.
Ribophorin II (RPN2)	1,57	dolichyl- diphosphooligosaccharide- protein glycotransferase activity; integral to membrane; oligosaccharyl transferase complex; protein modification; transferase activity	This gene encodes a type I integral membrane protein found only in the rough endoplasmic reticulum. The encoded protein is part of an N-oligosaccharyl transferase complex that links high mannose oligosaccharides to asparagine residues found in the Asn-X-Ser/Thr consensus motif of nascent polypeptide chains.
Heat Shock 70kDa Protein 8 (HSPA8)	1,54	ATP binding; ATPase activity, coupled; intracellular; protein folding	The product encoded by this gene belongs to the heat shock protein 70 family which contains both heat-inducible and constitutively expressed members. The latter

			are called heat-shock cognate proteins. This gene encodes a heat-shock cognate protein. This protein binds to nascent polypeptides to facilitate correct folding. It also functions as an ATPase in the disassembly of clathrin-coated vesicles during transport of membrane components through the cell.
--	--	--	---

I ROS-Metabolismus¹ / Anti-oxidative Prozesse

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Peroxiredoxin 2 (PRDX2)	1,70	cytoplasm; electron transporter activity; oxidoreductase activity; peroxidase activity; response to oxidative stress; thioredoxin peroxidase activity	This gene encodes a member of the peroxiredoxin family of antioxidant enzymes, which reduce hydrogen peroxide and alkyl hydroperoxides. The encoded protein may play an antioxidant protective role in cells, and may contribute to the antiviral activity of CD8(+) T-cells. It enhances natural killer (NK) cells activity. This protein may have a proliferative effect and play a role in cancer development or progression.
Peroxiredoxin 4 (PRDX4)	1,57	I-kappaB phosphorylation; oxidoreductase activity; peroxidase activity; thioredoxin peroxidase activity	The protein encoded by this gene is an antioxidant enzyme and belongs to the peroxiredoxin family. The protein is localized to the cytoplasm. Peroxidases of the peroxiredoxin family reduce hydrogen peroxide and alkyl hydroperoxides to water and alcohol with the use of reducing equivalents derived from thiol-containing donor molecules. This protein has been found to play a regulatory role in the activation of the transcription factor NF-kappaB.
Microsomal Glutathione S-Transferase 1 (MGST1)	2,41	glutathione transferase activity; membrane; microsome; mitochondrion; transferase activity	This gene encodes a protein that catalyzes the conjugation of glutathione to electrophiles and the reduction of lipid hydroperoxides. This protein is localized to the endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membrane where it is thought to protect these membranes from oxidative stress.
Thioredoxin Reductase 1 (TXNRD1)	2,18	oxidoreductase activity; thioredoxin reductase activity	This gene encodes a member of a family of pyridine nucleotide oxidoreductases. This protein reduces thioredoxins as well as other substrates, and plays a role in selenium metabolism and protection against oxidative stress. The functional enzyme is thought to be a homodimer which uses FAD as a cofactor. Each subunit contains a selenocysteine residue which is required for

¹ ROS = **R**eactive **O**xigen **S**pecies (reaktive Sauerstoffspezies)

			the catalytic activity.
NAD(P)H Dehydrogenase, Quinone 1 (NQO1)	1,99	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity; cytochrome-b5 reductase activity; cytoplasm; electron transport; nitric oxide biosynthesis; oxidoreductase activity ; response to toxin; synaptic transmission, cholinergic; xenobiotic metabolism	NQO1 is a 2-electron reductase that detoxifies quinones derived from the oxidation of phenolic metabolites of benzene. It is also involved in biosynthetic processes such as the vitamin K-dependent gamma-carboxylation of glutamate residues in prothrombin synthesis.

J Stress-Antwort

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Hypoxia Up-Regulated 1 (HYOU1)	1,69	ATP binding; chaperone activity; endoplasmic reticulum; response to stress	The protein encoded by this gene belongs to the heat shock protein 70 family. This gene has three mRNAs from the use of alternative transcription sites. A cis-acting segment is found at the 5' end of exon 1A which is involved in the stress-dependent induction. The transcript that begins with exon 1B is preferentially induced by hypoxia, resulting in the accumulation of this protein in the endoplasmic reticulum (ER). The protein encoded by this gene is thought to play an important role in protein folding and secretion in the ER.
Serine (or Cysteine) Proteinase Inhibitor, Clade H (Heat Shock Protein 47), Member 1 (SERPINH1)	1,83	heat shock response ; chaperone activity	This gene encodes a member of the serpin superfamily of serine proteinase inhibitors. Its expression is induced by heat shock. The protein localizes to the endoplasmic reticulum lumen and binds collagen; thus it is thought to be a molecular chaperone involved in the maturation of collagen molecules. Autoantibodies to this protein have been found in patients with rheumatoid arthritis.
DNA-Damage-Inducible Transcript 3 (DDIT3/CHOP)	2,49	cell cycle arrest; cell growth and/or maintenance; nucleus; response to stress ; regulation of transcription, DNA-dependent; response to DNA damage stimulus; transcription corepressor activity; transcription factor activity	CHOP is activated by endoplasmic reticulum (ER) stress imposed by unfolded and malformed proteins. It is assumed that CHOP deletion protects cells from ER stress by decreasing ER protein load and changing redox conditions. CHOP also seems to affect proliferation of certain cancer cells.

K DNA-Reparatur

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
mutS Homolog 6 (E. coli) (MSH6)	1,59	ATP binding; damaged DNA binding ; mismatch repair ; nucleus	All homologs of the MutS proteins contain a highly conserved region of approximately 150 amino acids that encompasses a helix-turn-helix domain associated with an adenine nucleotide and magnesium binding motif, termed Walker-A motif. This part of the molecule has ATPase activity. Gradia et al. (1997) found that this ATPase activity and the associated adenine nucleotide-binding domain function to regulate mismatch binding as a molecular switch. The MSH2-MSH6 complex is 'on' (binds mismatched nucleotides) in the ADP-bound form and 'off' in the ATP-bound form. Hydrolysis of ATP results in the recovery of mismatch binding, while ADP-to-ATP exchange results in mismatch dissociation.

L Immunologie

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
HLA-G Histocompatibility Antigen, Class I, G (HLA-G)	1,64	MHC class I receptor activity; antigen presentation , endogenous antigen; antigen processing , endogenous antigen via MHC class I; cellular defense response; detection of pest/pathogen/parasite; integral to membrane	HLA-G is involved in the presentation of foreign antigens to the immune system. HLA-G belongs to the HLA class I heavy chain paralogues. This class I molecule is a heterodimer consisting of a heavy chain and a light chain (beta-2 microglobulin). The heavy chain is anchored in the membrane.
Myeloid Differentiation Primary Response Gene (88) (MYD88)	2,10	cell surface receptor linked signal transduction; death receptor binding; immune response ; inflammatory response ; membrane; transmembrane receptor activity	Mice with a targeted disruption of the Myd88 gene are unable to respond to IL1, as determined by defective T-cell proliferation and the production of cytokines. Likewise, Myd88-deficient mice are unable to produce gamma-interferon and mediate natural killer cell activity in response to IL18. NFkB activation in response to IL1 or IL18 is also impaired. This suggest that MYD88 is a critical component in the IL1R and IL18R signaling cascades.
Zeta-Chain (TCR) Associated Protein Kinase 70kDa	2,20	ATP binding; immune response ; protein amino acid phosphorylation; protein binding; protein kinase cascade; protein-tyrosine kinase activity;	Protein-tyrosine kinases (PTKs) play an integral role in T-cell activation. Stimulation of the T-cell antigen receptor results in tyrosine phosphorylation of a number of cellular substrates. One of these is the TCR-zeta

(ZAP70)		transferase activity	chain, which can mediate the transduction of extracellular stimuli into cellular effector functions. Humans with mutations in ZAP70 have T-cell immunodeficiency.
Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3)	1,69	RNA polymerase II transcription factor activity; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription cofactor activity; transcription factor activity; transcription from Pol II promoter; induction of interferon expression	IRF3 encodes interferon regulatory factor 3, a member of the interferon regulatory transcription factor (IRF) family. IRF3 is found in an inactive cytoplasmic form that upon serine/threonine phosphorylation forms a complex with CREBBP. This complex translocates to the nucleus and activates the transcription of interferons alpha and beta, as well as other interferon-induced genes.

M Hormone und zugehörige Moleküle

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Peroxisome Proliferative Activated Receptor, Delta (PPARD)	1,68	energy pathways; lipid metabolism; nucleus; regulation of transcription from Pol II promoter; regulation of transcription, DNA-dependent; steroid hormone receptor activity ; transcription; transcription factor activity	The protein encoded by this gene is a member of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. PPARs are nuclear hormone receptors that bind peroxisome proliferators and control the size and number of peroxisomes produced by cells. PPARs mediate a variety of biological processes, and may be involved in the development of several chronic diseases, including diabetes, obesity, atherosclerosis, and cancer.
Nuclear Receptor Subfamily 2, Group F, Member 1 (NR2F1)	1,96	ligand-regulated transcription factor activity; nucleus; regulation of transcription, DNA-dependent; signal transduction; steroid hormone receptor activity ; transcription coactivator activity; transcription factor activity	This nuclear receptor is a member of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. It is also an orphan receptor because no ligand has yet been identified for it.
Non-POU Domain Containing, Octamer-Binding (p54) (NONO)	2,02	co-activator; nucleus	NONO expression is related to hormone-dependence or -independence associated with the androgen receptor. It was suggested that p54 functions as a coactivator of androgen receptors that potentiates transcription and possibly splicing.
Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA)	1,95	transcriptional repression	REA has a role as a mediator of transcriptional repression by nuclear hormone receptors via recruitment of histone deacetylases.

N Transkriptionelle Regulation

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Protein Kinase, cAMP- Dependent, Regulatory, Type I, Alpha (Tissue Specific Extinguisher 1) (PRKAR1A / TSE1)	1,97	3',5'-cAMP binding; cAMP- dependent protein kinase complex; cAMP-dependent protein kinase regulator activity; intracellular signaling cascade; protein amino acid phosphorylation; regulation of transcription from Pol II promoter	Extinction is an operational term that refers to the lack of expression of tissue-specific traits and is generally observed in hybrid cells formed by fusing dissimilar cell types. The tissue-specific extinguisher-1 locus in the mouse is symbolized Tse1. It represses gene expression in trans.
Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell Specific, HMG-Box) (TCF7L2)	1,92	DNA binding; Wnt receptor signaling pathway; nucleus; regulation of transcription , DNA- dependent	Gene activation by the beta-catenin/TCF7L2 complex is a critical event in cancer development. Disruption of beta-catenin/TCF7L2 activity in colorectal cancer cells induces a rapid G1 arrest and blocks a genetic program that was physiologically active in the proliferative compartment of colon crypts.
Snail Homolog 2 (Drosophila) (SNAI2)	2,06	DNA binding; development; ectoderm/mesoderm interaction; negative regulation of transcription from Pol II promoter ; nucleus; regulation of transcription , DNA-dependent	This gene encodes a member of the Snail family of C2H2-type zinc finger transcription factors. The encoded protein acts as a transcriptional repressor that binds to E-box motifs and is also likely to repress E-cadherin transcription in breast carcinoma.
Signal Transducer and Activator of Transcription 2, 113kDa (STAT2)	1,64	JAK-STAT cascade; hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor signal transducer activity; intracellular signaling cascade; nucleus; regulation of transcription from Pol II promoter ; signal transducer activity; transcription factor activity	The protein encoded by this gene is a member of the STAT protein family. In response to cytokines and growth factors, STAT family members are phosphorylated by the receptor associated kinases, and then form homo- or heterodimers that translocate to the cell nucleus where they act as transcription activators. In response to interferon (IFN), this protein forms a complex with STAT1 and IFN regulatory factor family protein p48 (ISGF3G), in which this protein acts as a transactivator, but lacks the ability to bind DNA directly.
v-rel Reticuloendo- theliosis Viral Oncogene Homolog B, Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells 3 (Avian) (RELB)	2,03	nucleus; protein binding; regulation of transcription , DNA- dependent; transcription corepressor activity; transcription factor activity	RELB is part of the the NFkB complex, which consists of NFkB1 or NFkB2 bound to REL, RELA, or RELB. It stimulates promoter activity in the presence of p49- and p50-NF-kappa-B.
Retinoblastoma	2,13	transcriptional repression	This gene encodes a ubiquitously expressed

binding protein 4 (RBBP4)			nuclear protein which belongs to a highly conserved subfamily of WD-repeat proteins. It is present in protein complexes involved in histone acetylation and chromatin assembly. It is part of the Mi-2 complex which has been implicated in chromatin remodeling and transcriptional repression associated with histone deacetylation. This encoded protein is also part of co-repressor complexes, which is an integral component of transcriptional silencing. It is found among several cellular proteins that bind directly to retinoblastoma protein to regulate cell proliferation. This protein also seems to be involved in transcriptional repression of E2F-responsive genes.
---------------------------	--	--	---

O Signaltransduktion

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2 (MAP2K2)	2,43	ATP binding; extracellular; protein amino acid phosphorylation; protein serine/threonine kinase activity; protein-tyrosine kinase activity; transferase activity	The protein encoded by this gene is a dual specificity protein kinase that belongs to the MAP kinase kinase family. This kinase is known to play a critical role in mitogen growth factor signal transduction. It phosphorylates and thus activates MAPK1/ERK2 and MAPK2/ERK3. The activation of this kinase itself is dependent on the Ser/Thr phosphorylation by MAP kinase kinases.

P Sonstige

Genbezeichnung (Gensymbol)	RF	LocusLink-Klassifizierung	Funktionen und charakteristische Eigenschaften (soweit bekannt)
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 10 (DDX10)	1,50	ATP binding; ATP-dependent helicase activity; RNA binding; RNA helicase activity	DEAD box proteins, characterized by the conserved motif Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD), are putative RNA helicases. They are implicated in a number of cellular processes involving alteration of RNA secondary structure such as translation initiation, nuclear and mitochondrial splicing, and ribosome and spliceosome assembly. Based on their distribution patterns, some members of this family are believed to be involved in embryogenesis, spermatogenesis, and cellular growth and division. This gene encodes a DEAD box protein, and it may be

			involved in ribosome assembly.
Prion Protein (p27-30) (PRNP)	2,11	protein aggregation	The protein encoded by this gene is a membrane glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein that tends to aggregate into rod-like structures. Mutations in the repeat region as well as elsewhere in this gene have been associated with Creutzfeldt-Jakob disease, fatal familial insomnia, Gerstmann-Straussler disease, Huntington disease-like 1, and kuru.
Staphylococcal Nuclease Domain Containing 1 (Nuclear Protein p100) (SND1)	2,14	nuclease activity; nucleic acid binding	Tudor-SN (tudor staphylococcal nuclease), a protein containing 5 taphylococcal / micrococcal nuclease domains and a tudor domain, is a component of the RNA-induced silencing complex (RISC) enzyme in <i>C. elegans</i> , <i>Drosophila</i> , and mammals. Nuclear protein p100 may act as a coactivator for STAT6 and function as a bridging factor between STAT6 and the basal transcription machinery.
Nucleophosmin (Nucleolar Phosphoprotein B23, Numatrin) (NPM1)	1,52	nucleolus; RNA-binding nucleolar phosphoprotein	Nucleophosmin is an RNA-binding nucleolar phosphoprotein that is more abundant in tumor cells than in normal resting cells. Stimulation of the growth of normal cells, e.g., mitogen activation of B lymphocytes, is accompanied by an increase in nucleophosmin protein level. It is assumed that nucleophosmin is involved in the assembly of ribosomal proteins into ribosomes. Nucleophosmin was also identified as a substrate of CDK2 /cyclin E in centrosome duplication. NPM1 associated with unduplicated centrosomes, and dissociated from centrosomes by CDK2/cyclin E-mediated phosphorylation.
Bleomycin Hydrolase (BLMH)	1,54	peptidase activity	Bleomycin hydrolase (BMH) is a cytoplasmic cysteine peptidase that is highly conserved through evolution; however, the only known activity of the enzyme is metabolic inactivation of the glycopeptide bleomycin (BLM), an essential component of combination chemotherapy regimens for cancer. The protein contains the signature active site residues of the cysteine protease papain superfamily.
Keratin 18 (KRT18)	1,79	intermediate filaments; epithelial tissues	KRT18 encodes the type I intermediate filament chain keratin 18. Keratin 18, together with its filament partner keratin 8, are perhaps the most commonly found members of the intermediate filament gene family. They are expressed in single layer epithelial tissues of the body.
Pleiotrophin (Heparin Binding Growth Factor 8, Neurite Growth-	1,63	<i>specific</i> growth factor activity	Heparin-binding neurite growth-promoting factor is a member of a highly conserved human gene family of proteins. It exhibits neurite outgrowth-promoting activity and may

Promoting Factor 1) (PTN)			play a role in nervous tissue development and/or maintenance. Expression of this factor is developmentally regulated, increasing in the brain during embryogenesis and reaching its maximum expression at the time of birth.
Transducin-Like Enhancer of Split 1 (E(sp1) Homolog, Drosophila) (TLE1)	2,42	differentiation	In both normal tissues and tissues resulting from incorrect or incomplete maturation events (such as metaplastic and neoplastic transformations), TLE expression appeared to be elevated and coincided with 'Notch' expression, implicating these molecules in the maintenance of the undifferentiated state in epithelial cells.
Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2L 6 (UBE2L6)	1,77	labeling for protein degradation	The modification of proteins with ubiquitin is an important cellular mechanism for targeting abnormal or short-lived proteins for degradation. Ubiquitination involves at least three classes of enzymes: ubiquitin-activating enzymes (E1s), ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s). This gene encodes a member of the E2 ubiquitin-conjugating enzyme family.
Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A (WNT5A)	2,11	development; oncogenesis; signaling	The WNT gene family consists of structurally related genes which encode secreted signaling proteins. These proteins have been implicated in oncogenesis and in several developmental processes, including regulation of cell fate and patterning during embryogenesis. This gene is a member of the WNT gene family. It encodes a protein which shows 98%, 98% and 87% amino acid identity to the mouse, rat and the xenopus Wnt5A protein, respectively.
High-Mobility Group Box 1 (HMGB1)	1,56	DNA unwinding; chromatin; nuclear chromosome; single-stranded DNA binding	High mobility group box 1 protein is an abundant component of all mammalian nuclei, and related proteins exist in all eukaryotes. HMGB1 binds with high affinity to specific DNA structures such as bent or kinked, preferentially single-stranded DNA, and unwinds double stranded DNA. It is considered to be a structural protein of chromatin.

5.1.3 Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR

Zur Verifizierung der Regulation einzelner Gene basierend auf den Microarray-Experimenten wurde die quantitative Real-Time RT-PCR eingesetzt. Ausgewählt wurden unter anderem

- a) Gene, welche in Hinblick auf die Frage nach den Wirkungsmechanismen des IGFBP-2 nützliche Hinweise liefern könnten (TGF β -1, LAM β 1, IGF1R) und
- b) Gene, welche einen Bezug zur Apoptose besaßen (TGF β -1, NF κ B, p53), einer Wirkung, welche im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden sollte.

Bcl-2, welches innerhalb der Microarray-Ergebnisse nicht in Erscheinung trat, wurde unabhängig davon für die Untersuchung ausgewählt, da Zhang *et al.* (1995) eine Hochregulation von Bcl-2 über $\alpha_5\beta_1$ -Integrin beobachten konnten. Da $\alpha_5\beta_1$ -Integrin u.a. ein Rezeptor für IGFBP-2 (Rauschnabel *et al.* 1999, Schuett *et al.* 2004) ist, Zhang *et al.* aber den Einfluß von IGFBP-2 auf die Bcl-2-Genexpression nicht überprüft hatten, bot sich eine solche Untersuchung an. Iip45 wurde in die Real-Time PCR-Messungen mitaufgenommen, weil Song *et al.* (2003) es als Antagonist der IGFBP-2 induzierten Stimulation der Gliomzellinvasion identifizierten hatten. Dieses Gen befand sich zudem auf keinem Array, konnte durch diese also auch nicht detektiert werden.

Genexpressionsanalysen mittels Real-Time RT-PCR wurden für die folgenden Zelllinien durchgeführt:

- Hs578T-Zellen, welche im Vergleich zur Negativkontrolle mit 2000 ng/ml IGFBP-2 behandelt worden waren
- HEK-293-Zellen in Form ihrer stabil transfizierten Varianten 293-10 und 293-4

Bei den stabil transfizierten Varianten der HEK-293-Zellen handelt es sich um mit dem murinen IGFBP-2-Gen stabil transfizierte Klone, wobei 293-10 große Mengen, 293-4 hingegen nur sehr geringe Mengen an IGFBP-2 produziert. 293-4 weist zudem eine höhere proliferative Aktivität als 293-10 auf (Hoeflich *et al.* 1998).

Als Maß für die Expression ist jeweils die mittlere normalisierte mRNA-Expression in % der Kontrolle angegeben. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurden die Messdaten des Referenzgens β_2 -Microglobulin (=Kontrolle) eingesetzt. Um prozentuale Angaben machen zu können, wurden die relativen Expressionslevel (Abschnitt 2.2.4) der Negativkontrolle jeweils gleich 100 % gesetzt.

In Abb. 13 sind die Real-Time RT-PCR-Ergebnisse für die Brustkrebszelllinie Hs578T graphisch dargestellt (incl. Standardfehlerbalken und Signifikanzlevel-Indikator). Bei dieser Zelllinie wurde die mRNA-Expression der Gene TGFB1, LAMB1, NFκB, p53, Bcl-2 und Ilp45 quantifiziert.

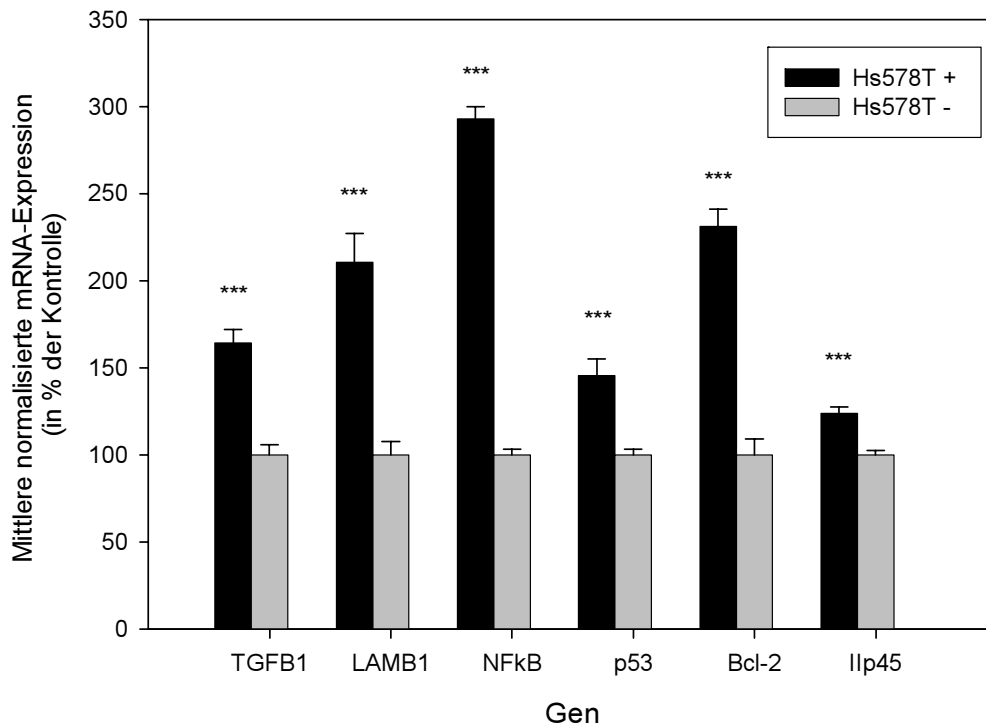


Abb. 13: mRNA-Expressionslevel von TGF β-1 LAMB1, NFκB, p53, Bcl-2 und Ilp45 in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Das Diagramm zeigt die Real-Time RT-PCR-Ergebnisse für die Hs578T-Zellen, welche mit 2000 ng/ml IGFBP-2 behandelt (Hs578T+, schwarze Balken) wurden bzw. unbehandelt blieben (Hs578T-, graue Balken). Dargestellt sind die mRNA-Expressionslevel von TGFB1, LAMB1, NFκB, p53, Bcl-2 und Ilp45 im Verhältnis zur jeweiligen Negativkontrolle, welche gleich 100 % gesetzt wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von β₂-Mikroglobulin als Referenzgen. Die Anzahl der Replikate betrug n = 12, das Signifikanzlevel war immer p < 0,001 (***), d.h. die Unterschiede waren statistisch signifikant. Die Expression des IGF-I-Rezeptors (IGF1R) wurde bei dieser Zelllinie nicht untersucht, da diese Zelllinie keinen funktionellen IGF1R besitzt.

In Abb. 14 sind die Real-Time RT-PCR-Ergebnisse für die HEK-293-Zellklone 293-10 und 293-4 graphisch dargestellt (incl. Standardfehlerbalken und Signifikanzlevel-Indikator). Bei dieser Zelllinie wurde zusätzlich die mRNA-Expression des IGF-I-Rezeptors quantifiziert.

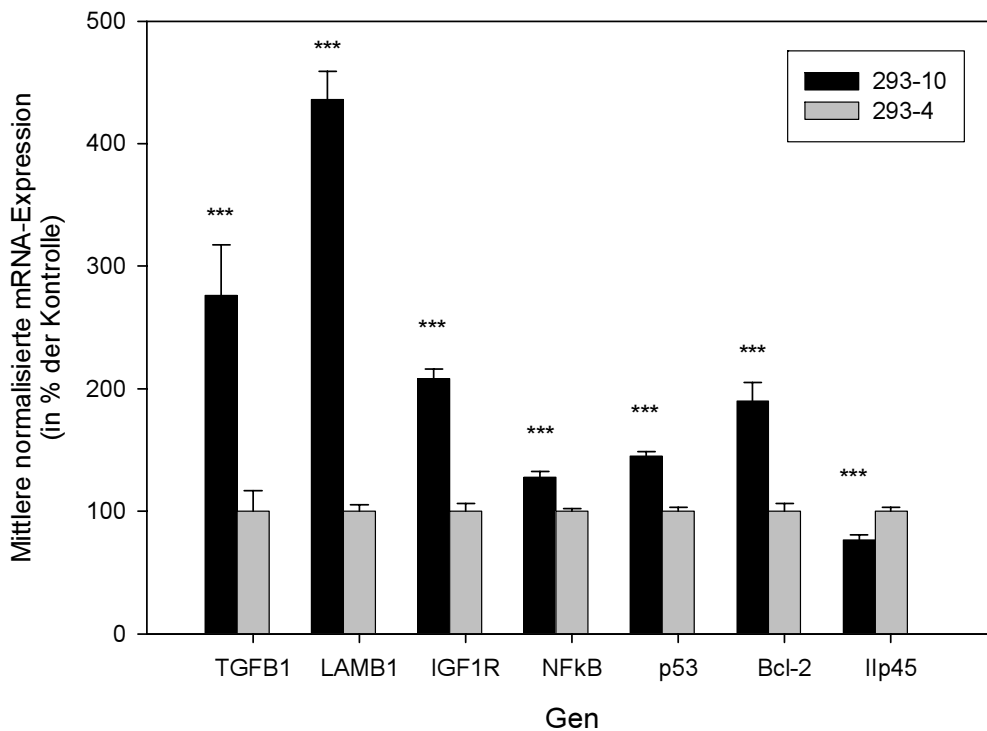


Abb. 14: mRNA-Expressionslevel von TGF β -1 LAMB1, IGF1R, NF κ B, p53, Bcl-2 und Ilp45 ausgewählter Gene in 293-10 und 293-4 Zellen

Dieses Diagramm zeigt die Real-Time RT-PCR-Ergebnisse für die stabil transfizierten HEK-293-Zellklone 293-10 und 293-4, die sehr viel (Klon 10, schwarze Balken) bzw. nur sehr wenig (Klon 4, graue Balken) IGBFP-2 produzieren. Dargestellt sind die mRNA-Expressionslevel von TGFB1, LAMB1, IGF1R, NF κ B, p53, Bcl-2 und Ilp45 im Verhältnis zur jeweiligen Negativkontrolle, welche gleich 100 % gesetzt wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von β_2 -Mikroglobulin als Referenzgen. Die Anzahl der Replikate betrug $n = 12$, das Signifikanzlevel war immer $p < 0,001$ (***), d.h. die Unterschiede waren statistisch signifikant.

In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Regulationsfaktoren, d.h. die Verhältnisse der Genexpressionslevel (Probe vs Negativkontrolle), in numerischer Form (incl. Standardfehler des Regulationsfaktors) angegeben.

Tabelle 6: Real-Time RT-PCR-Ergebnisse – Änderung der Expression ausgewählter Gene in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Der Regulationsfaktor gibt die n-fache Änderung der Expression des Gens im zur Negativkontrolle an. Zusätzlich ist der Standardfehler der Regulationsfaktoren angegeben (n = 12).

Gen	Regulationsfaktor	Standardfehler (SE)
TGF β -1	1,6	0,13
LAMB1	2,1	0,23
NF κ B	2,9	0,12
p53	1,5	0,11
Bcl-2	2,3	0,24
Ilp45	1,2	0,05

Tabelle 7: Real-Time RT-PCR-Ergebnisse – Änderung der Expression ausgewählter Gene in 293-10 und 293-4 Zellen

Der Regulationsfaktor gibt die n-fache Änderung der Expression des Gens im zur Negativkontrolle an. Zusätzlich ist der Standardfehler der Regulationsfaktoren angegeben (n = 12).

Gen	Regulationsfaktor	Standardfehler (SE)
TGF β -1	2,8	0,61
IGF1R	2,1	0,15
LAMB1	4,4	0,33
NF κ B	1,3	0,06
p53	1,5	0,06
Bcl-2	1,9	0,19
Ilp45	-1,3	0,09

5.2 IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen auf der Proteinebene

5.2.1 Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die NF κ B- und p53-Proteinexpression mittels Western Blotting

Um zu überprüfen, ob ein regulatorischer Effekt durch die Zugabe von IGFBP-2 (Endkonzentration 2000 ng/ml) zu Hs578T-Zellen auch auf der Proteinebene nachweisbar ist, wurde die Proteinexpression der Apoptose-relevanten Moleküle NF κ B und p53 in dieser Zelllinie mit Hilfe von Western Immunoblots quantifiziert (Abschnitt 4.2.15).

Die Ergebnisse der Western Blotting-Analysen sind in Abb. 15 und Abb. 16 jeweils zusammen mit einem exemplarischen Western Blot graphisch dargestellt. Die auf den Bandenintensitäten basierenden Werte für die Proteinexpression sind angegeben als arithmetischer Mittelwert aller Replikate relativ zur Negativkontrolle, welche gleich 100 % gesetzt wurde. Diesen Ergebnissen zufolge wurde durch Zugabe von IGFBP-2 die Proteinexpression von NF κ B und p53 um einen Faktor von $1,43 \pm 0,11$ ($n = 12$; $p < 0,001$) bzw. $1,50 \pm 0,17$ ($n = 16$; $p < 0,001$) hochreguliert.

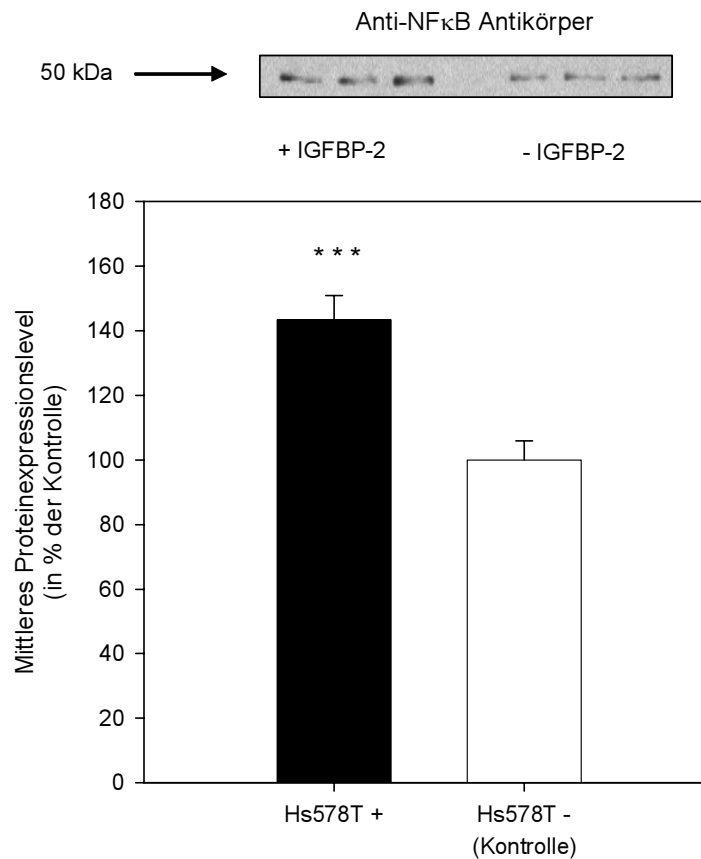


Abb. 15: Proteinexpression von NF κ B in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Um die Hs578T-Zellen auf eine Änderung der Proteinexpression von NF κ B als Reaktion auf die Behandlung mit IGFBP-2 hin zu überprüfen, wurden Zelllysate hergestellt und Western Immunoblots erstellt (Abschnitt 4.2.15). Die Intensität der Banden ($n = 12$) auf den Western Immunoblots wurde densitometrisch bestimmt. Das Ergebnis der Western Blotting-Analyse ist hier graphisch zusammen mit einem exemplarischen Western Blot dargestellt. Die Proteinexpression ist angegeben in % der Kontrolle, welche gleiche 100 % gesetzt wurde. Die Proteinexpression von NF κ B wurde in den mit IGFBP-2 behandelten Hs578T-Zellen (schwarzer Balken) im Vergleich zur Negativkontrolle (weißer Balken) um den Faktor $1,43 \pm 0,11$ ($n = 12$; $p < 0,001$) hochreguliert.

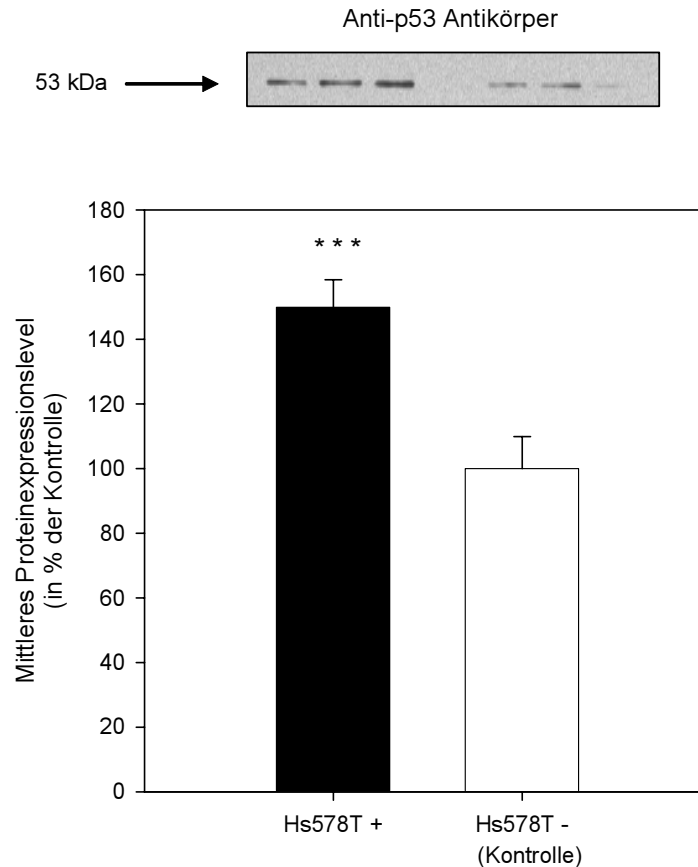


Abb. 16: Proteinexpression von p53 in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Behandlung von Hs578T-Zellen mit IGFBP-2 auch eine Änderung der Expression von NF κ B auf der Proteinebene zur Folge hat, wurde eine quantitative Western Blotting-Analyse (Abschnitt 4.2.15) durchgeführt, deren Ergebnis hier graphisch zusammen mit einem exemplarischen Western Blot dargestellt ist. Die Proteinexpression ist angegeben in % der Kontrolle, welche gleiche 100 % gesetzt wurde. Die Proteinexpression von p53 wurde in den mit IGFBP-2 behandelten Hs578T-Zellen (schwarzer Balken) im Vergleich zur Negativkontrolle (weißer Balken) um den Faktor $1,50 \pm 0,11$ ($n = 16$; $p < 0,001$) hochreguliert.

5.2.2 Untersuchung des Einflusses von IGFBP-2 auf die TGF β -1 Proteinexpression mit Hilfe eines Immunoassays

Die Expression des laut Real-Time RT-PCR auf der mRNA-Ebene durch IGFBP-2 regulierten TGF β -1 Gens sollte zusätzlich auf der Proteinebene untersucht werden. Dazu wurde ein (kommerziell erhältlicher) TGF β -1 Immunoassay eingesetzt (Abschnitt 4.2.16), welcher die Quantifizierung der Menge an TGF β -1 im Zellkulturüberstand ermöglichte. Es wurden die Zellkulturüberstände der mit IGFBP-2 (2000 ng/ml) behandelten Hs578T-Zellen

mit denen der unbehandelten Hs578T-Zellen (d.h. Zugabe von PBS anstelle von IGFBP-2) verglichen. Um auf unterschiedliche Zellzahlen zurückzuführende Variationen in der Menge an sezerniertem TGF β -1 zu kompensieren, wurden die Zellzahlen bestimmt und die gemessenen TGF β -1 Mengen jeweils auf 10^3 Zellen bezogen. Abb. 17 zeigt das Ergebnis des TGF β -1 Immunoassays. Die Menge an sezerniertem TGF β -1 nahm durch Zugabe von IGFBP-2 zu den Hs578T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor $1,52 \pm 0,18$ ($n = 9$; $p < 0,05$) zu.

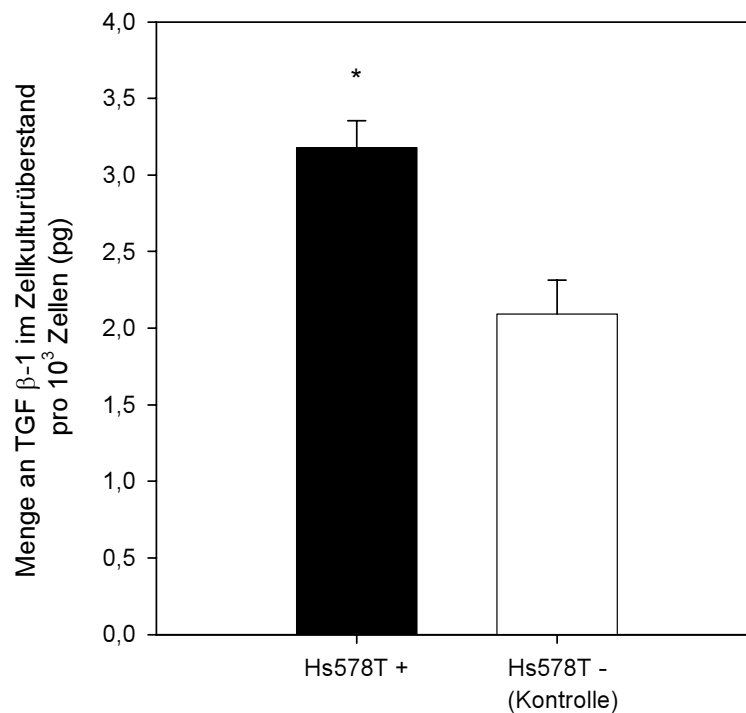


Abb. 17: TGF β -1 Sekretion von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Die im Zellkulturüberstand der Hs578T-Zellen befindlichen Menge an TGF β -1 wurde mit Hilfe eines TGF β -1 Immunoassays bestimmt. Um zellzahlbedingte Unterschiede in der Menge an sezerniertem TGF β -1 zu kompensieren, wurden die Zellzahlen bestimmt und die Mengen an TGF β -1 im Zellkulturüberstand jeweils auf 10^3 Zellen bezogen. Durch Zugabe von IGFBP-2 kam es in den Hs578T-Zellen zu einer Hochregulation der TGF β -1 Sekretion um den Faktor $1,52 \pm 0,18$ ($n = 9$; $p < 0,05$).

5.3 Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose in Zellkulturmodellen

Basierend auf der Beobachtung, dass sich infolge der Zugabe von IGFBP-2 die Expressionslevel mehrerer Apoptose-relevanter Gene signifikant änderten, stellte sich die Frage, ob IGFBP-2 tatsächlich eine messbare Wirkung auf die Apoptose ausübt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Apoptose-Assays durchgeführt:

- der Cell Death Detection ELISA^{PLUS}
- ein auf dem Annexin-V-FLUOS Staining Kit basierender Apoptose-Assay

5.3.1 Untersuchung der apoptotischen Wirkung von IGFBP-2 mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Zur Quantifizierung der Apoptose als Reaktion auf erhöhte IGFBP-2-Konzentrationen wurde der Cell Death Detection ELISA^{PLUS} eingesetzt, welcher als Apoptose-Parameter den partiellen DNA-Abbau (noch vor Auflösung der Zellmembran) misst, der zur Freisetzung von Mono- und Oligonukleosomen ins Cytosol führt (Abschnitt 4.2.17).

Da es sich hierbei um einen ELISA-basierten Apoptose-Assay handelt, der die Zellzahl selbst nicht berücksichtigt, wurden die relativen Apoptose-Werte zusätzlich durch die Zellzahl dividiert, um eventuelle zellzahlbedingte Unterschiede auszugleichen. Unter Anwendung dieses Assays konnte eine Erhöhung des Apoptosegrades durch IGFBP-2 sowohl für Hs578T-Zellen (Abb. 18) als auch HEK-293-Zellen (Abb. 19) gezeigt werden. Im Falle der Hs578T-Zellen kam es zu einem Anstieg des Apoptosegrades um das 1,82-fache ($p < 0,001$), bei den HEK-293-Zellen sogar auf das 2,98-fache ($p < 0,001$).

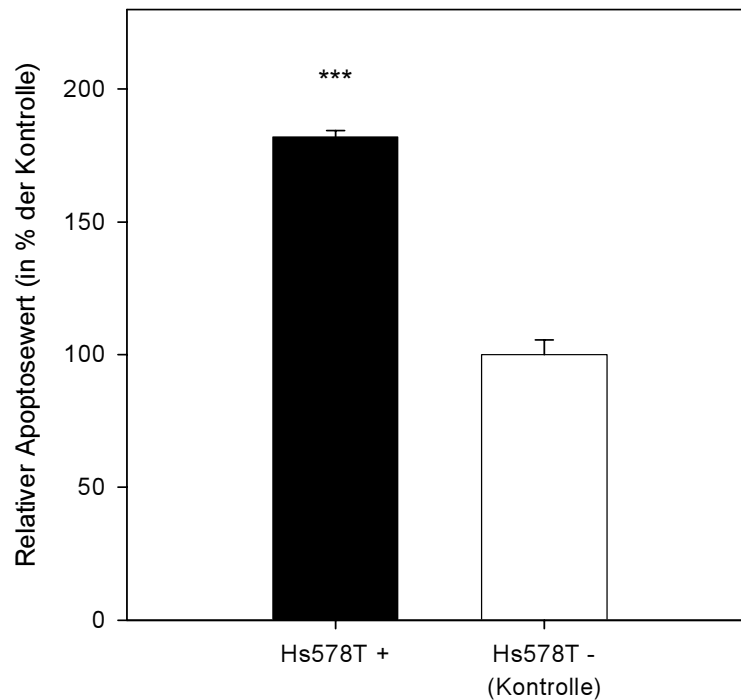


Abb. 18: Apoptose-Quantifizierung in Hs578T-Zellen mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Unter Anwendung des ELISA-basierten Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Abschnitt 4.2.17) wurde der relative Apoptosegrad von mit IGFBP-2 behandelten (schwarzer Balken) und unbehandelten (weißer Balken) Hs578T-Zellen bestimmt. Die Kontrolle (Hs578T-) wurde gleich 100 % gesetzt. Zur Kompensation eventueller zellzahlbedingter Unterschiede wurden die Relativwerte (welche auf photometrischen Messwerten beruhen) zusätzlich durch die Zellzahl dividiert. Die mit IGFBP-2 behandelten Hs578T-Zellen wiesen diesem Assay zufolge einen 1,82-fach ($p < 0,001$) höheren Apoptosegrad auf als die unbehandelten Zellen.

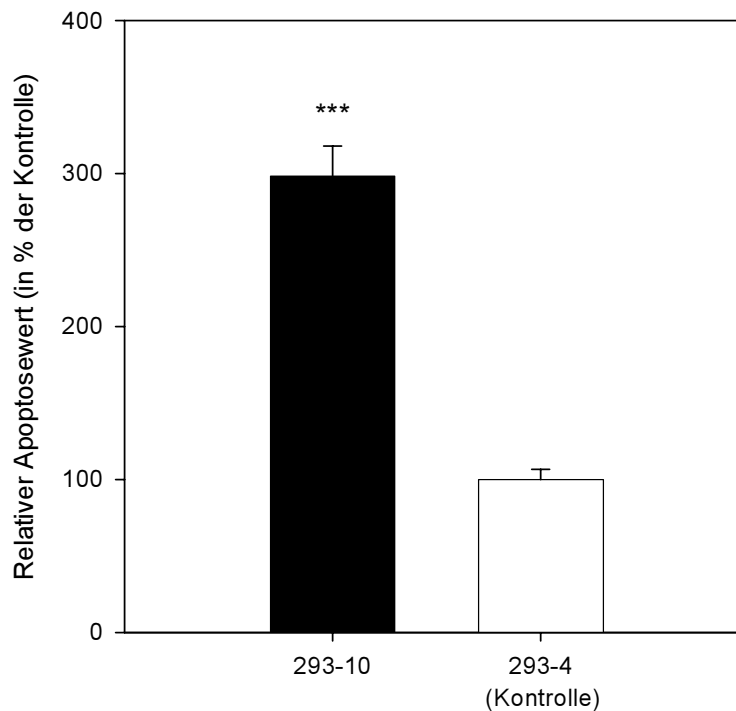


Abb. 19: Apoptose-Quantifizierung in 293-10 und 293-4 Zellen mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS}

Unter Anwendung des ELISA-basierten Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Abschnitt 4.2.17) wurde der relative Apoptosegrad von 293-10 Zellen (schwarzer Balken) und 293-4 Zellen (weißer Balken) bestimmt. Die Kontrolle (293-4) wurde gleich 100 % gesetzt. Zur Kompensation eventueller zellzahlbedingter Unterschiede wurden die Relativwerte zusätzlich durch die Zellzahl dividiert. Die 293-10 Zellen, welche eine hohe IGFBP-2-Produktion aufweisen, besitzen diesem Assay zufolge einen 2,98-fach ($p < 0,001$) höheren Apoptosegrad als die 293-4 Zellen, welche nur sehr wenig IGFBP-2 produzieren.

5.3.2 Untersuchung der apoptotischen Wirkung von IGFBP-2 mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits

Zur Apoptose-Quantifizierung wurde auch der auf Annexin-V-FLUOS Staining Kit basierende Apoptose-Assay (Abschnitt 4.2.17) verwendet. Bei diesem dient als quantitativer Apoptose-Parameter die durchflußzytometrisch bestimmte Menge an Zellen, bei denen sich Phosphatidylserin gehäuft auf der Außenseite der Plasmamembran befindet. Bei vitalen, nicht-apoptotischen Zellen findet sich dieses hingegen fast ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran. In Abb. 20 ist das Ergebnis dieses Apoptose-Assays für Hs578T-Zellen graphisch dargestellt. Diesem zufolge erhöhte sich durch Zugabe des

IGFBP-2 (2000 ng/ml) der Anteil der apoptotischen Zellen im Mittel von 6,2 % auf 15,8 % ($n = 9$; $p < 0,05$), was einem Verhältnis von 2,6 entspricht.

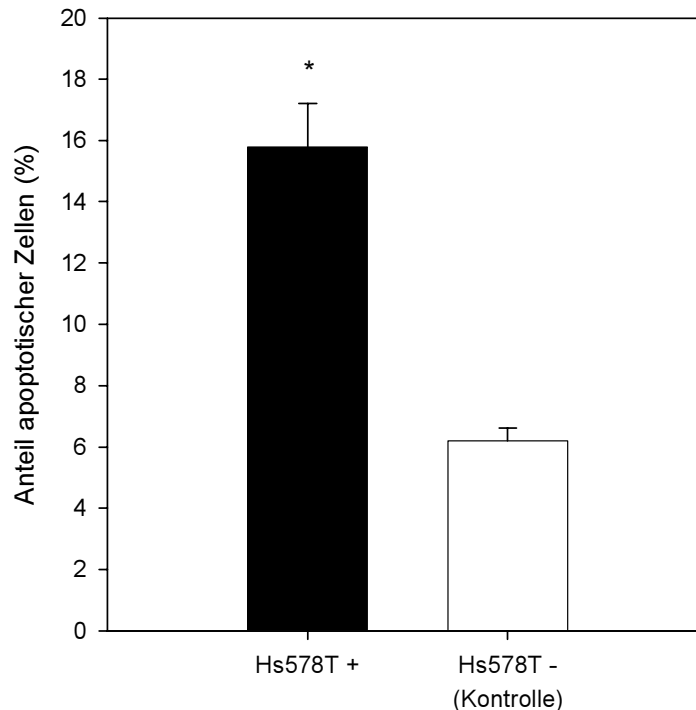


Abb. 20: Apoptose-Quantifizierung in Hs578T-Zellen mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits

Mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits (Abschnitt 4.2.17) wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen in den Hs578T-Zellproben bestimmt. Im Schnitt stieg der Anteil der apoptotischen Zellen durch die Zugabe von IGFBP-2 von 6,2 % (Kontrolle, weißer Balken) auf 15,8 % (schwarzer Balken), was einem Verhältnis von 2,6 entspricht ($n = 9$; $p < 0,05$).

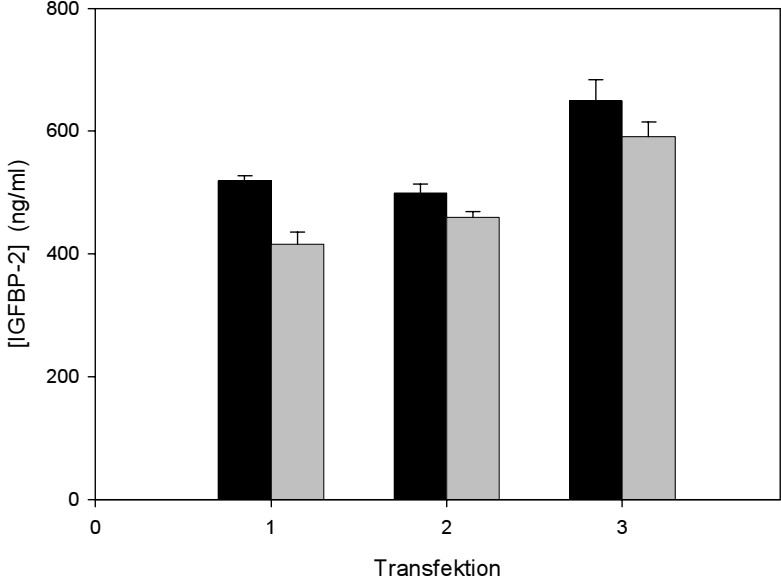
Es wurde mit Hilfe des Annexin-V Apoptose-Assays ebenfalls versucht, den Apoptosegrad für die HEK-293-Zellen zu quantifizieren. Dies war jedoch nicht möglich, da bei diesem Zelltyp die Markierung der Zellen nicht richtig funktionierte, so dass im Durchflußzytometer (auch bei der Positivkontrolle mit Camptothecin) keine apoptotischen Zellen detektiert werden konnten.

5.4 Transfektion von A673-Zellen mit siRNAs zur Herunterregulierung der IGFBP-2-Expression

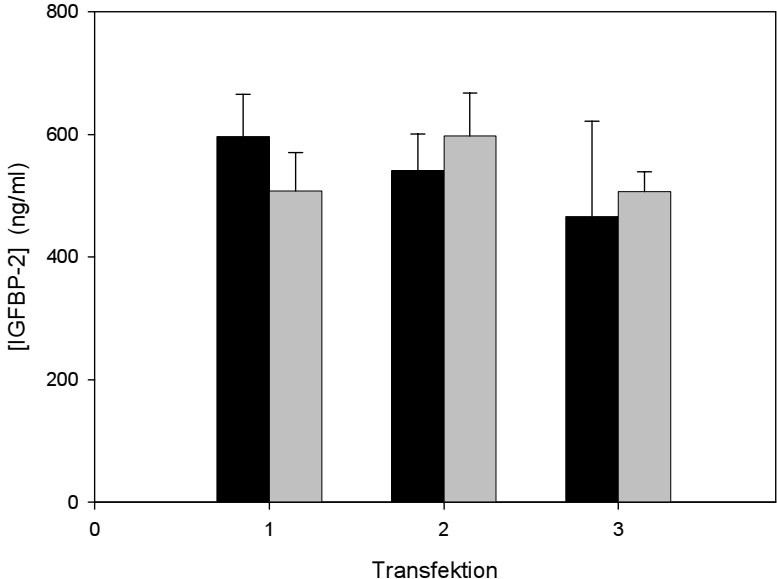
Mit Hilfe von synthetisch hergestellten siRNAs, welche mittels Lipofektion (unter Verwendung des TransMessenger Transfection Reagents von Qiagen) in die Zellen transfiziert wurden, sollte die Expression von IGFBP-2 in den A673-Zellen herunterreguliert werden (Abschnitt 4.2.3). Um die Effektivität der Herunterregulierung zu überprüfen, wurden regelmäßig Zellkulturüberstände entnommen, in denen mittels Radioimmunoassay (Abschnitt 4.2.4) die IGFBP-2-Konzentration bestimmt wurde.

Jedoch brachte die Transfektion mit siRNA in diesem Fall nicht den gewünschten Erfolg. Die IGFBP-2-Konzentration im Zellkulturmedium der mit siRNA transfizierten A673-Zellkulturen war im Vergleich zu den (mock-transfizierten) Negativkontrollen generell nur relativ geringfügig erniedrigt (Abb. 21 A und C) oder teilweise sogar leicht erhöht (Abb. 21 B). Im Verlauf der zahlreichen Testexperimente wurde u.a. die siRNA-Konzentration erhöht, die Zellen wurden unterschiedlich oft transfiziert und die Art und Weise, auf welche die Zellen konsekutiv transfiziert wurden, wurde verändert (vgl. Methodenteil „4.2.3 Transfektion mit siRNA“ Methode 1 und 2). Ein Problem der mehrfach aufeinanderfolgenden Transfektion war zudem, dass die Zellen nach der zweiten oder dritten Transfektion bereits stark geschädigt erschienen, was wahrscheinlich auf die Behandlung mit dem Transfektionsreagenz und das zunehmende Alter der Zellkulturen zurückzuführen ist. In den Abb. 21 A bis C sind beispielhaft die Ergebnisse dreier Transfektionsexperimente gezeigt.

A



B



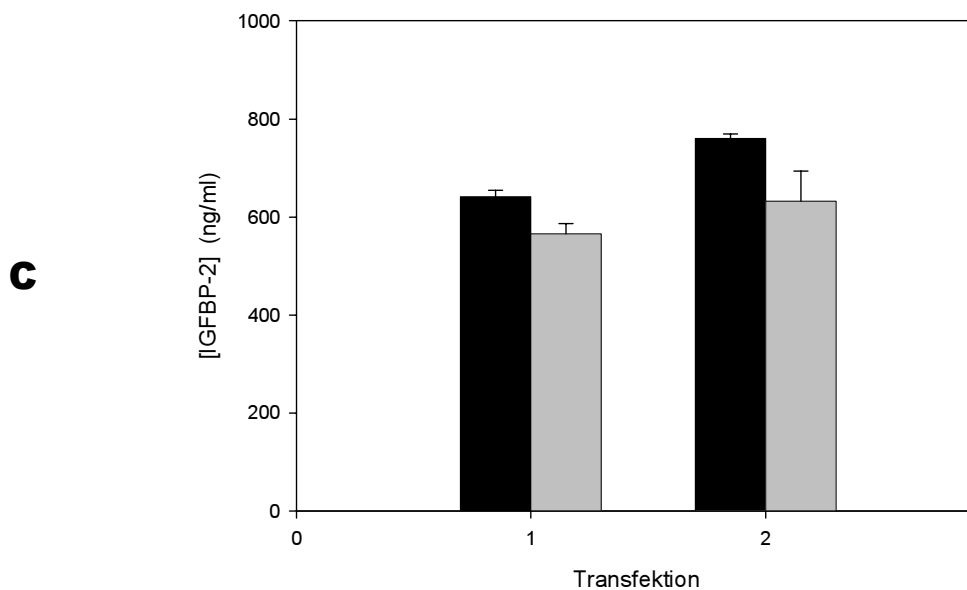


Abb. 21 A-C: IGFBP-2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von siRNA-transfizierten A673-Zellen

Diese Abbildungen zeigen die mittels RIA bestimmten IGFBP-2-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen von A673-Zellen, welche unter Anwendung unterschiedlicher Methoden (Abschnitt 4.2.3) mit gegen das IGFBP-2-Gen gerichteten siRNAs transfiziert wurden. Die schwarzen Balken repräsentieren die mit den siRNAs transfizierten A673-Zellen, die grauen Balken die mock-transfizierten Negativkontrollen. In Abb. 21 A sind die Ergebnisse einer dreimaligen konsekutiven Transfektion dargestellt, wobei hierbei kein Zellsplitting zwischen den Transfektionen erfolgte (vgl. Methode 1 in Abschnitt 4.2.3). Erfolgte zwischen den konsekutiven Transfektionen hingegen ein Zellsplitting (vgl. Methode 2 in Abschnitt 4.2.3), so war die IGFBP-2-Konzentration nach der zweiten und dritten Transfektion mit siRNAs im Vergleich zu den Negativkontrollen sogar leicht erniedrigt (Abb. 21 B). Eine Erhöhung der siRNA-Menge auf das 2,5-fache brachte ebenfalls keine wesentliche Verbesserung (Abb. 21 C).

5.5 Bestimmung der Konzentration von IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturmedium mittels Radioimmunoassays

Mittels Radioimmunoassays (Abschnitt 4.2.4) wurde die Konzentration von IGFBP-2 und IGF-II im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten (800 ng/ml) und unbehandelten Hs578T-Zellen bestimmt. Kurz vor der Zellernte (Abschnitt 4.2.1) wurde ein kleines Aliquot an Zellkulturmedium aus dem Überstand der Zellkulturen entnommen und für die RIA-Messungen eingesetzt.

Bezüglich des Einflusses von IGFBP-2 auf die IGF-II-Konzentration wurde zusätzlich die Dosisabhängigkeit untersucht, indem neben einer IGFBP-2-Konzentration von 800 ng/ml auch eine Konzentration von 400 ng/ml und 200 ng/ml verwendet wurde (Abb. 24). Bei den ersten IGF-II-Konzentrationsbestimmungen wurde keine Zellzählung durchgeführt, daher ist hier die Konzentration angegeben (Abb. 23). In den anderen Fällen ist die IGF-II- (Abb. 24) bzw. IGFBP-3-Menge (Abb. 22) pro 10^6 Zellen angegeben, um zellzahlbedingte Unterschiede auszugleichen.

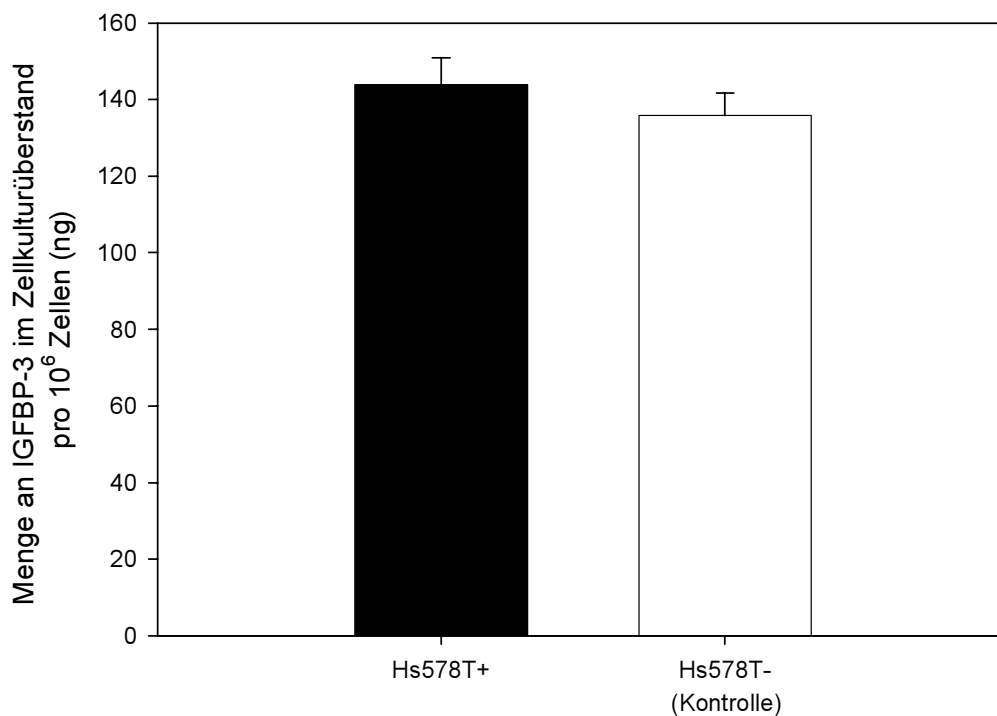


Abb. 22: IGFBP-3-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Die IGFBP-3-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten (800 ng/ml) und unbehandelten Hs578T-Zellen wurde mittels Radioimmunoassay (Abschnitt 4.2.4) für mehrere parallel unter identischen Bedingungen kultivierte Zellkulturen ($n = 3$) bestimmt. Unter Verwendung der Zellzahl und des Kulturüberstandsvolumens wurde daraus die Menge an IGFBP-3 pro 10^6 Zellen berechnet.

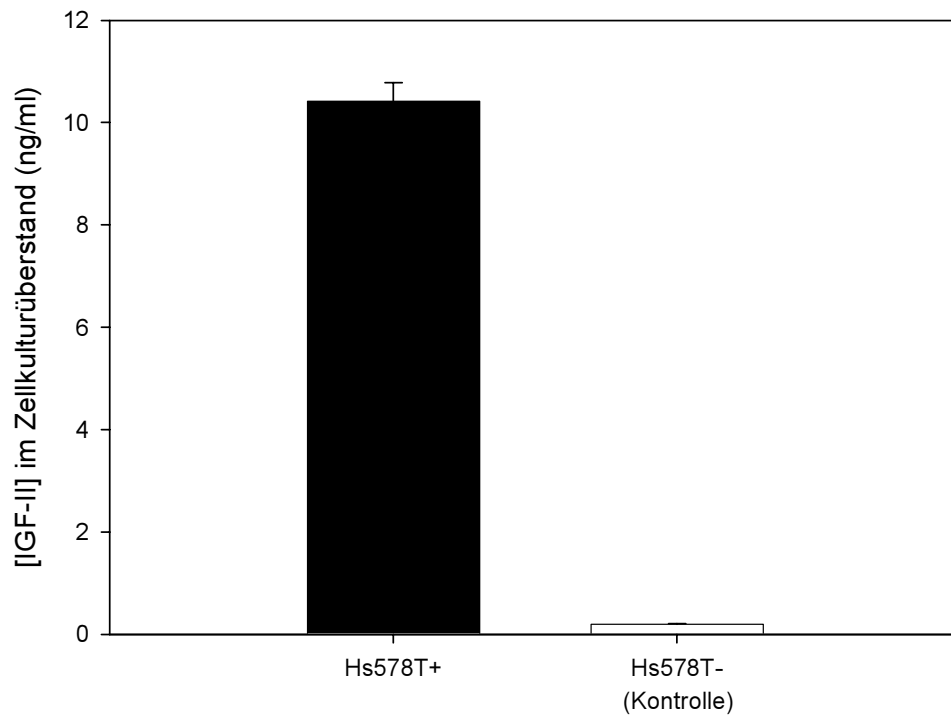


Abb. 23: IGF-II-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen

Die IGF-II-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten (800 ng/ml) und unbehandelten Hs578T-Zellen wurde mittels Radioimmunoassay (Abschnitt 4.2.4) für mehrere parallel unter identischen Bedingungen kultivierte Zellkulturen ($n = 3$) bestimmt. (Anmerkung: Der Fehlerbalken für die IGF-II-Konzentration der Negativkontrolle wurde nicht vergessen, sondern ist zu klein, um sichtbar zu sein.)

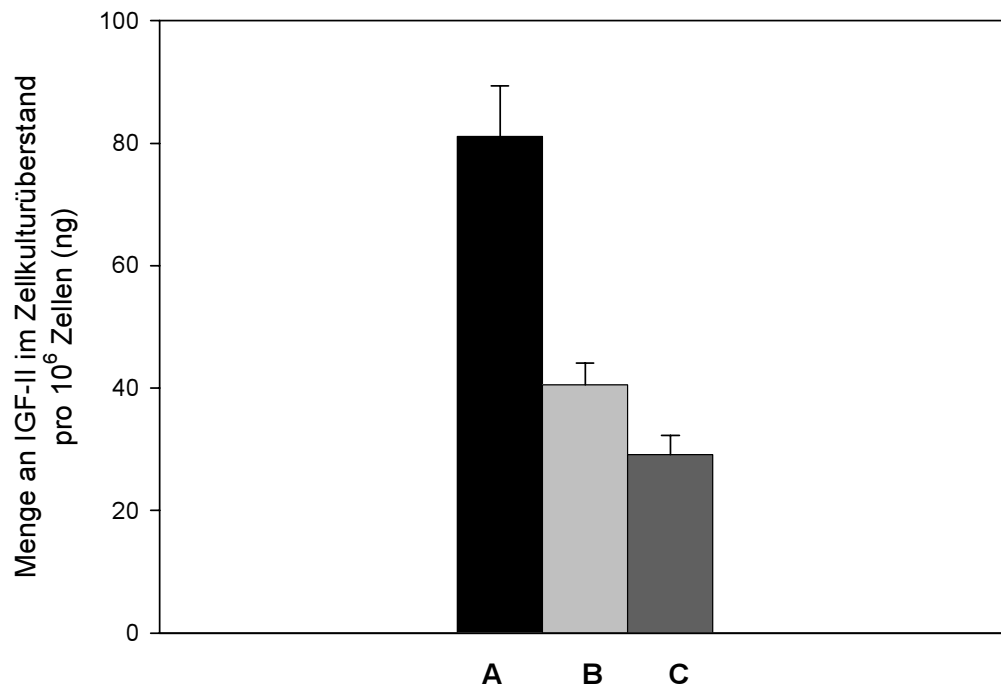


Abb. 24: Dosisabhängigkeit des Einflusses der IGFBP-2-Konzentration auf die IGF-II-Konzentration

Der Einfluß der IGFBP-2-Konzentration auf die IGF-II-Konzentration wurde anhand dreier unterschiedlicher IGFBP-2-Konzentrationen untersucht:

- A 800 ng/ml IGFBP-2 (schwarzer Balken)
- B 400 ng/ml IGFBP-2 (hellgrauer Balken)
- C 200 ng/ml IGFBP-2 (dunkelgrauer Balken)

Die Ergebnisse sind in der obigen Abbildung dargestellt (Anzahl der Zellkultur-Replikate $n = 3$). Es ist die Menge an IGF-II im Zellkulturüberstand bezogen auf je 10^6 Zellen angegeben.

6. Diskussion

Das „Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2“ (IGFBP-2) ist an wichtigen biologischen Zell-Funktionen, wie z.B. der Proliferation, Migration und Adhäsion, beteiligt (Hoeflich *et al.* 2001a). Die *in vitro* beobachteten Effekte von IGFBP-2 variieren jedoch in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie, d.h. es wurden beispielsweise gegensätzliche Effekte auf die Proliferation beobachtet. Hierfür gibt es mehrere mögliche Gründe: Als Bindeprotein der IGFs vermag IGFBP-2 die IGF-Aktivität zu erhöhen, indem es vermutlich als Trägermolekül für die IGFs dient und diese vor raschem proteolytischen Abbau schützt (Ranke & Elmlinger 1997). Andererseits wurde gezeigt, dass IGFBP-2 sowohl in Lösung als auch in Membran-assoziiierter Form in der Lage ist, mit den IGFs um ihre Rezeptoren zu kompetitieren (Reeve *et al.* 1993). Dies wiederum könnte zu einer Verminderung ihrer Wirkung führen. Da IGFBP-2 auch als Modulator der IGF-Wirkungen fungieren kann, spielt sicherlich auch die unterschiedliche Reaktion verschiedener Zelllinien auf IGFs eine Rolle. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hs578T-Zelllinie ist IGF-insensitiv (De Leon *et al.* 1992, Gill *et al.* 1997), d.h. IGFs haben auf diese Zelllinie keine nachweisbare Wirkung, so dass die beobachteten Effekte bei dieser Zelllinie nicht durch die Modulation der IGF-Wirkungen hervorgerufen werden können. Andere Zelllinien, wie die HEK-293-Zelllinie, sind IGF-sensitiv, wobei diese Sensitivität durchaus unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. In diesem Fall wird die modulatorische Wirkung des IGFBP-2 auf die IGFs gewiß auch eine Rolle spielen. Neben den IGF-abhängigen Effekten wurde anhand der Hs578T-Zelllinie gezeigt, dass IGFBP-2 auch IGF-unabhängige Effekte besitzt (Schuett *et al.* 2004). Es wird angenommen, dass diese IGF-unabhängigen Effekte vorwiegend auf der Wechselwirkung von IGFBP-2 mit der extrazellulären Matrix beruhen, was für einige Moleküle der extrazellulären Matrix bereits gezeigt werden konnte (Schuett *et al.* 2004, Russo *et al.* 2005). So bindet IGFBP-2 über sein RGD-Motiv an $\alpha_5\beta_1$ -Integrine (Rauschnabel *et al.* 1999) und über seine Heparin-Bindedomäne (HBD) an Heparin sowie bestimmte Glycosaminoglykane und Proteoglykane (Arai *et al.* 1996, Russo *et al.* 1997, Conover & Khosla 2003, Russo *et al.* 2005). Die intrazelluläre Lokalisation von IGFBP-2 (Hoeflich *et al.* 2004) und die Wechselwirkung mit dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21 CIP/WAF1 (Terrien *et al.* 2005) sprechen jedoch dafür, dass IGFBP-2 seine Funktionen u.a. auch intrazellulär ausübt.

Das Hauptziel dieser Arbeit lag darin, die molekularen Grundlagen insbesondere der IGF-unabhängigen Effekte des IGFBP-2 zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden

Genexpressionsanalysen durchgeführt. Deren Ergebnisse sollten dann – soweit möglich – in Korrelation mit bereits beobachteten *in vitro* Effekten des IGFBP-2 gebracht werden, im speziellen Proliferation, Migration/Adhäsion (s. folgende Abschnitte) und Apoptose (Abschnitt 5.3).

Die genannten zellulären Effekte spielen u.a. eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie. Die Stärke der Proliferation, die Migration und Adhäsion sowie die Apoptose von Tumorzellen sind bestimmende Faktoren bei der Entwicklung, Progression und Dissemination von Tumoren. Tumorzellen weisen gegenüber normalen Zellen üblicherweise eine erhöhte proliferative und eine erniedrigte apoptotische Aktivität auf. Eine Verminderung der Proliferation und Erhöhung der Apoptose könnten daher dabei helfen, die Entwicklung und die Progression eines Tumors einzudämmen, während eine erhöhte Adhäsion und eine verringerte Migration eine verminderte Dissemination des Tumors bewirken können. Da die Wirkungen von IGFBP-2 in Abhängigkeit von der Tumorzelllinie zum Teil unterschiedlich ausfallen, ist eine universelle Aussage über die Auswirkung von IGFBP-2 auf Tumore *in vivo* nicht möglich. So stellten Wang *et al.* (2003) in *in vitro*-Untersuchungen fest, dass IGFBP-2 die Invasivität von Glioblastomen erhöht, indem es die Expression von Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) und einigen anderen für die Invasivität relevanten Genen erhöhte. Andererseits konnte für IGFBP-2 bei der Brustkrebszelllinie Hs578T eine proliferations- und migrationshemmende (Schuett *et al.* 2004) sowie apoptosefördernde Wirkung (s. diese Dissertation) gezeigt werden. Insofern scheint es notwendig zu sein, die Wirkung von IGFBP-2 immer in Hinblick auf eine bestimmte Tumorzelllinie bzw. einen bestimmten Tumortyp zu betrachten.

6.1 Objektive Einschätzung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen wurden mit Hilfe verschiedenener Methoden durchgeführt. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse gibt es in Abhängigkeit von der Methode einige Aspekte zu berücksichtigen, um die Ergebnisse besser einschätzen zu können.

Bei der Microarray-Technologie (Abschnitt 2.2.3) sollte man sich immer der Tatsache bewußt sein, dass es sich hierbei um eine Screening-Methode mit im Vergleich zu anderen Genexpressionsanalysemethoden potentiell relativ hohem Anteil an falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen handelt, d.h. es wird eventuell eine Regulation für ein Gen angezeigt, obwohl in Wirklichkeit keine solche vorliegt, genauso wie die Regulation

bestimmter Gene möglicherweise nicht erfaßt wird. Sowohl bei der Herstellung der Microarrays als auch während der Durchführung der Microarray-Experimente können unvermeidbare Variabilitäten auftreten, die sich auf die Ergebnisse auswirken. Ist das absolute Expressionslevel eines Gens in allen experimentellen Systemen sehr niedrig, so wird es unter Umständen überhaupt nicht erfaßt, wodurch auch eventuelle Unterschiede in der Genexpression nicht detektiert werden können.

Die Real-Time RT-PCR (Abschnitt 2.2.4) besitzt eine höhere Genauigkeit als die Microarray-Technologie und zudem ein sehr niedriges Detektionslimit, d.h. auch Gene mit ausgesprochen niedrigen Genexpressionsleveln können noch verläßlich detektiert werden. Sie wird oft zur Verifizierung ausgewählter Microarray-Ergebnisse verwendet. Ihr Nachteil besteht v.a. darin, dass geringe Unterschiede in der Genexpression nur bis zu einem gewissen Grad erfaßt werden können. Während große Unterschiede in der Genexpression (1 : 1000 und mehr) problemlos gemessen werden können, sind signifikante Unterschiede um den Faktor 2 oder kleiner nur unter Verwendung relativ hoher Replikatzahlen messbar und sollten auch dann immer kritisch betrachtet werden.

Auch die semiquantitative Western Blotting-Analyse basierend auf der densitometrischen Quantifizierung von Bandenintensitäten kann nur Unterschiede bis zu einem gewissen Grad zuverlässig erfassen. Die Immunoassays liefern unter den hier verwendeten Methoden sicherlich die genauesten Ergebnisse.

Neben Genauigkeit und Detektionslimit ist im Rahmen von Genexpressionsanalysen noch folgendes zu berücksichtigen: Letztendlich ist es das Protein, welches eine bestimmte Funktion in der Zelle ausübt. Bei Genexpressionsanalysen, bei denen nicht Proteine, sondern mRNAs quantifiziert werden, wird üblicherweise die Annahme gemacht, dass eine erhöhte mRNA-Expression in vergleichbarem Maß zu einer Erhöhung der Proteinexpression führt. Posttranskriptionale und posttranslationale Regulationsmechanismen können jedoch dazu führen, dass dies nicht der Fall ist.

6.2 IGFBP-2-induzierte Genexpressionsänderungen

Es ist nicht möglich, alle IGFBP-2-induzierten Genexpressionsänderungen im Detail zu diskutieren, und auch nicht alle Genexpressionsänderungen vermögen eine direkte Erklärung für die beobachteten zellulären Effekte zu liefern. Ein möglicher Grund hierfür sind eventuelle falsch positive Ergebnisse (Abschnitt 6.1) oder aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt unzureichende Informationen über ein bestimmtes Gen, so dass eine Interpretation seiner

Regulation nicht möglich ist. Letzteres trifft auf nicht wenige potentiell regulierte Gene zu. Neben der Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse sollten zudem verschiedene mögliche Mechanismen IGFBP-2-induzierter Zellantworten in Betracht gezogen werden, welche letztendlich zu den gemessenen Änderungen der Genexpressionslevel führen. Zum einen kann eine direkte Wechselwirkung von IGFBP-2 mit Integrinrezeptoren für die Regulation von Zielgenen verantwortlich sein, indem Integrin-Signaltransduktionsketten aktiviert werden. Zum anderen beeinflusst IGFBP-2 möglicherweise indirekt die Signaltransduktion, indem es nicht selbst Signaltransduktionsketten auslöst, sondern stattdessen bestimmte Liganden daran hindert, dies zu tun, indem es deren Rezeptoren blockiert. Schließlich wurde bereits gezeigt, dass IGFBP-2 an eine Vielzahl von Komponenten der extrazellulären Matrix binden kann, wie zum Beispiel Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Heparin, Glykosaminoglykane und Proteoglykane (Arai *et al.* 1996, Russo *et al.* 1997, Conover & Khosla 2003, Russo *et al.* 2005). In bezug auf die Zelladhäsion legt diesen einen weiteren möglichen, eher unspezifischen Mechanismus nahe: Durch die Blockierung von Adhäsionsankern initiiert IGFBP-2 unter Umständen zelluläre Gegenmaßnahmen, welche darauf abzielen, bei adhären Zellen einen zu starken Verlust an Adhäsion zu vermeiden, da dieser längerfristig zur Apoptose führen kann (Gilmore 2005). All dies gilt es bei der folgenden Diskussion zu berücksichtigen.

6.2.1 IGFBP-2-induzierte Expressionsänderungen von proliferationsrelevanten Genen

Der in der Literatur bisher am intensivsten untersuchte biologische Parameter, der durch IGFBP-2 beeinflusst wird, ist die Zellproliferation, welche besonders deutlich die entgegengesetzten Effekte aufzeigt, die IGFBP-2 auf unterschiedliche Zelltypen haben kann. In IGFBP-2 überexprimierenden Y-1 adrenokortikalen Tumorzellen (Hoeflich *et al.* 2000), A673 Ewing Sarkom-Zellen (Schuett *et al.* 2004) und SKN-SHEP Neuroblastomzellen (Russo *et al.* 2005) sowie in mit IGFBP-2 behandelten LAPC-4 Prostatakrebszellen (Moore *et al.* 2003) besitzt IGFBP-2 eine ausgeprägte proliferationsfördernde Wirkung. Im Gegensatz dazu hemmt IGFBP-2 die Proliferation in mit IGFBP-2 behandelten fötalen Podozyten (Bridgewater & Matsell 2003) und Hs578T Brustkrebszellen (Schuett *et al.* 2004) sowie in IGFBP-2 überexprimierenden HEK-293 embryonalen Nierenzellen (Hoeflich *et al.* 1998). IGFBP-2 korreliert zudem positiv mit der Tumormalignität, was für die zuvor erwähnten Y-1 adrenokortikalen Tumorzellen *in vitro* (Hoeflich *et al.* 2000) und humane Gliome *in vivo* (Elmlinger *et al.* 2001) gezeigt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit dienten Hs578T- und

HEK-293-Zellen als Modellsysteme. Daher waren hier vor allem Gene von Interesse, welche die bei diesen Zelllinien beobachtete antiproliferative Wirkung des IGFBP-2 erklären könnten. Da die Hs578T-Zellen im Gegensatz zu den HEK-293-Zellen IGF-insensitiv sind, werden in diesem Fall ausschließlich die IGF-unabhängigen Effekte des IGFBP-2 erfaßt. Durch die Genexpressionsanalysen konnte für die Hs578T-Zelllinie eine Vielzahl an potentiell IGFBP-2-regulierten Genen identifiziert werden, welche eine Rolle bei der Proliferation spielen (Abschnitt 5.1 und 5.2). In Übereinstimmung mit dem antiproliferativen Effekt des IGFBP-2 auf Hs578T-Zellen führte selbiges zu einer Hochregulation der Expressionslevel von TGF β -1, NME1, 14-3-3- σ , TP73 (p73), TP53 (p53), RB, TSG101, CDKN2B, NF2 und TNFSF7, von denen bekannt ist, dass die entsprechenden Proteine proliferationshemmend wirken können. Die Real-Time PCR-Ergebnisse ergaben für die HEK-293-Zellen zusätzlich eine Hochregulation des IGF-I-Rezeptors (IGF1R) um ungefähr das Doppelte. Dies ist sehr ungewöhnlich, da IGF-I eine proliferationsfördernde Wirkung besitzt und diese Zelllinie IGF-sensitiv ist. Dennoch reagierte diese Zelllinie auf die IGFBP-2-Überexpression mit einer Wachstumshemmung. Aus diesem Grund müssen die wachstumshemmenden Effekte überwiegen. Dazu könnten die IGF-unabhängigen Effekte des IGFBP-2 und die Sequestrierung des IGF-I durch IGFBP-2 beitragen.

6.2.2 IGFBP-2-induzierte Expressionsänderung von adhäsions- und migrationsrelevanten Genen

IGFBP-2 nimmt auch Einfluß auf die Zelladhäsion und -migration. Bei A673-Zellen wurde als Folge einer IGFBP-2-Stimulation eine erhöhte Zelladhäsion beobachtet, während Hs578T-Zellen infolgedessen eine verminderte Zelladhäsion aufwiesen (Schuett *et al.* 2004). Eine verstärkte Invasivität, hervorgerufen durch IGFBP-2, wurde bei SKN-SHEP-Zellen (Russo *et al.* 2005) und SNB19-Glioblastomzellen (Wang *et al.* 2003b) festgestellt. Unter den regulierten adhäsions- und migrationsrelevanten Genen finden sich sowohl Gene, welche die verminderte Adhäsion der Hs578T-Zellen als Reaktion auf die IGFBP-2-Stimulation zu erklären vermögen, als auch Gene, bei denen dies nicht der Fall ist (für mögliche Gründe vgl. Einleitung Abschnitt 6.2). In Übereinstimmung mit der durch IGFBP-2 herbeigeführten Verminderung der Adhäsion von Hs578T-Zellen zeigte sich u.a. eine Hochregulation der ILK (Integrin-Linked Kinase 2) und RAC1 (Ras Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1). Die ILK ist ein Regulator der Integrin-vermittelten Signaltransduktion und ein Bestandteil der fokalen Adhäsionskomplexe, welche als Reaktion auf die Ligandenbindung an bestimmte Integrine gebildet werden (Sakai *et al.* 2003). Hanning *et al.* (1996) zufolge führte die

Überexpression von ILK in dem von ihnen verwendeten Epithelzellmodell in der Tat zu einer Inhibition der Zelladhäsion an Integrinsubstrate, was die verminderte Adhäsion von Hs578T-Zellen erklären könnte, nachdem diese mit IGFBP-2 behandelt worden waren. RAC1, eine GTPase, welche zur Gruppe der RAS-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine zählt, ist u.a. an der Regulation der Actin-Polymerisation beteiligt. RAC1 ist aber in Verbindung mit CDC42 zudem in der Lage, die Zellmotilität und -invasivität durch einen Integrin-vermittelten Mechanismus zu erhöhen (Nobes & Hall 1995, Keely *et al.* 1997, Berrier *et al.* 2002). Dies korrespondiert mit der verstärkten Invasivität, welche bei SKN-SHEP-Zellen (Russo *et al.* 2005) und SNB19-Glioblastomzellen (Wang *et al.* 2003b) beobachtet wurde. Das durch IGFBP-2 hochregulierte Gen ITGA3 kodiert die α_3 -Untereinheit bestimmter Integrinrezeptoren, wie zum Beispiel dem Integrin-Heterodimer $\alpha_3\beta_1$, einem Rezeptor für Fibronectin, Laminin, Kollagen, Epiligrin, Thrombospondin und CSPG4. Obwohl die meisten Integrine i.d.R. mit einer verstärkten Adhäsion assoziiert sind, führte die Expression der Integrin- α_3 -Untereinheit in einigen ITGA3-Transfektanten zu einer Verminderung der Zell-Zell-Adhäsion (Weitzman *et al.* 1995). Die anti-adhäsive Wirkung der Integrin- α_3 -Untereinheit wird desweiteren durch die Beobachtung unterstützt, welcher zufolge $\alpha_3\beta_1$ -Integrin erforderlich ist für die Auflösung der interzellulären Adhäsion innerhalb von Epithelzellen (Kawano *et al.* 2001). Das Protein IQGAP1 (IQ Motif-Containing GTPase-Activating Protein 1) geht mit einer Vielzahl an Molekülen Wechselwirkungen ein, wie zum Beispiel Molekülen des Zytoskeletts, der Zelladhäsion und Signaltransduktionsmolekülen, die an der Ausprägung der Zellmorphologie beteiligt sind. Im Rahmen von Untersuchungen zur Zelldissoziation, welche u.a. für die Migration und Invasivität von Bedeutung ist, wurde gezeigt, dass IQGAP1 hierbei als negative Regulator der Zell-Zell-Adhäsion fungiert (Kuroda *et al.* 1998, Fukuta *et al.* 2001, Sugimoto *et al.* 2001, Shimao *et al.* 2002). Die erhöhte Expression von IQGAP1 könnte damit ein weiterer Faktor sein, der als Folge einer erhöhten IGFBP-2-Exposition zur Verminderung der Zelladhäsion bei Hs578T-Zellen und zur verstärkten Invasivität bei SKN-SHEP-Zellen und SNB19-Glioblastomzellen beiträgt. Die erhöhte Expression von anderen Genen bzw. Proteinen, beispielweise LAMB1, einer Untereinheit der heterotrimeren Laminin-glykoproteine, oder TIMP, einem Metalloproteinase-Inhibitor, liefert hingegen keine direkte Erklärung für die beobachteten Effekte. Mögliche Gründe hierfür wurden in der Einleitung zu Abschnitt 6.2 diskutiert.

6.2.3 IGFBP-2-induzierte Expressionsänderung von apoptoserelevanten Genen

Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist IGFBP-2 in der Lage, auf bestimmte Zelltypen proapoptotisch zu wirken (Abschnitt 5.3). Die Behandlung von Hs578T-Zellen mit IGFBP-2 führte u.a. zur Hochregulation einer Vielzahl von Genen, deren Proteinprodukte generell oder unter bestimmten Umständen proapoptotisch wirken können und damit mögliche Mechanismen für den proapoptotischen Effekt des IGFBP-2 liefern können. Dazu zählen SIVA, TP73 (p73), TNF, TNFSF7, TNFRSF6, TNFRSF10A, NOTCH2, MYC, NME3, 14-3-3- σ , NF κ B, TGF β -1 und TP53 (p53). Unter den apoptoserelevanten Genen fanden sich nur wenige, welche herunterreguliert wurden. Hiervon wurden für JunD und FKBP38 antiapoptotische Effekte gezeigt (Weitzman *et al.* 2000, Shirane & Nakayama 2003), so dass deren Herunterregulation ebenfalls am proapoptotischen Effekt von IGFBP-2 beteiligt sein könnte. Das proapoptotische Protein SIVA bindet an CD27 (TNFRSF27), welches ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie ist, und leitet wahrscheinlich in Verbindung mit diesem einen Apoptose-induzierenden Signaltransduktionsweg ein, was zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt wird, dass eine Überexpression von SIVA in verschiedenen Zelllinien zur Apoptose führte (Prasad *et al.* 1997). TP73 ist ein p53-Homolog und aktiviert die Transkription von vielen Genen, welche auch von p53 aktiviert werden (Kaghad *et al.* 1997, Zhu *et al.* 1998). Es ist wie p53 in der Lage, Apoptose zu induzieren (Jost *et al.* 1997). TNF und TNFSF7 gehören zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie, während TNFRSF6 und TNFRSF10A zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie gehören. Die Mitglieder dieser Familien spielen jedoch nicht nur – wie der Name vielleicht vermuten ließe – bei der Nekrose eine Rolle, sondern auch bei der Apoptose (Obeid *et al.* 1993, Wiley *et al.* 1995, Pan *et al.* 1997). NOTCH2 ist eines von drei Säugetierhomologen der zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckten NOTCH-Gene. Bei den Notch-Proteinen handelt es sich um Transmembranrezeptorproteine, welche Signaltransduktionsketten auslösen können. Es zeigte sich, dass diese Signaltransduktionsketten („Notch Signaling“) u.a. an der Induktion von Apoptose beteiligt sind (Miele & Osborne 1999, Yang *et al.* 2004, Zweidler-McKay *et al.* 2005). Die proapoptotische Wirkung von NME3 (DR-nm23) wird durch die Beobachtung gestützt, dass seine Überexpression in bestimmten Zelltypen zur Apoptose führte (Venturelli *et al.* 1995). Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor NF κ B ist zwar vorwiegend an antiapoptotischen Reaktionen von Zellen auf verschiedene externe Stimuli beteiligt (Van Antwerp *et al.* 1996, Mayo *et al.* 1997); dennoch kann seine Hochregulation als Reaktion auf die Behandlung mit IGFBP-2 als mit der proapoptotischen Wirkung in den

untersuchten Zellmodellen (Hs578T und HEK-293) in Einklang gebracht werden, indem man berücksichtigt, dass NF κ B nicht nur bei antiapoptotischen Effekten eine Rolle spielt, sondern seine Aktivität auch für die Ausübung der proapoptotischen Wirkung von p53 erforderlich ist (Ryan *et al.* 2000). Auch weitere Proteine wirken u.a. über die Modulation der Aktivität von p53: MYC beeinflusst das Resultat einer p53-vermittelten Zellreaktion zugunsten der Apoptose (Seoane *et al.* 2002), und 14-3-3- σ (Stratifin) übt einen positiven Feedback-Effekt auf die p53-Aktivität aus (Yang *et al.* 2003). Die proapoptotische Wirkung von IGFBP-2 läßt sich durch die Hochregulation von Bcl-2 (Abschnitt 5.1.3), einem generell antiapoptotisch wirkenden Molekül, definitiv nicht erklären. Sofern sich die per Real-Time RT-PCR gemessene Erhöhung des mRNA-Expressionslevels von Bcl-2 in ähnlichem Ausmaß auf der Proteinebene auswirkt, ist anzunehmen, dass die Hochregulation von Bcl-2 durch andere proapoptotische Effekte überkompensiert wird. Was dennoch für die Richtigkeit der Hochregulation von Bcl-2 spricht, ist die Beobachtung, dass die Bindung von Fibronectin an $\alpha_5\beta_1$ -Integrin über sein RGD-Motiv zu einer erhöhten Bcl-2-Expression führte (Zhang *et al.* 1995) und IGFBP-2 ebenfalls über sein RGD-Motiv an dieses Integrinheterodimer bindet (Rauschnabel *et al.* 1999, Schuett *et al.* 2004).

6.2.4 Wechselwirkungen zwischen den IGFBP-2-regulierten Genen: ein mögliches Regulationsnetzwerk

Ein Teil der durch IGFBP-2 regulierten Gene steht miteinander in Verbindung und zwar in Form einer direkten oder indirekten Wechselwirkung, über einen Signaltransduktionsweg oder als Teil bestimmter regulativer Mechanismen. Diese Verbindungen wurden zum Teil schon in den vorangegangenen Abschnitten angesprochen, wie z.B. der positive Feedback-Effekt von 14-3-3- σ auf die p53-Aktivität. Im folgenden sollen diese Verbindungen, welche basierend auf den Ergebnissen einer Literaturrecherche ermittelt wurden, näher beleuchtet werden. Diese werden zuerst in einer Tabelle aufgelistet und anschließend schematisch dargestellt (Abb. 25). Die miteinander in Wechselwirkung stehenden Proteine sind in der weiter unten folgenden tabellarischen Auflistung nicht streng geordnet. Eine gewisse Ordnung besteht jedoch darin, dass die Wechselwirkungen in der Reihenfolge ihres Bezugs zur Proliferation, Adhäsion/Migration und Apoptose aufgelistet sind. Da die Untersuchungsergebnisse aus unterschiedlichen Quellen stammen, welche mit verschiedenen experimentellen Systemen gearbeitet haben, handelt es sich hierbei um ein postuliertes Netzwerk, dessen Komponenten und Verbindungen nicht in jedem Zelltyp in der dargestellten Art und Weise vorhanden sein müssen.

Tabelle 8: Verbindungen zwischen den Proteinprodukten IGFBP-2-regulierter Gene

Protein 1	Protein 2	Verbindung zwischen den Proteinen
TGFB1	CDKN2B	Die CDKN2B (p15INK4B)-Expression wird in humanen Keratinozyten durch TGFB1 induziert (Hannon & Beach 1994). Die Autoren vermuten aufgrund dieser Beobachtung, dass CDKN2B ein potentieller Effektor des TGFB1-induzierten Zellzyklus-Arrests ist.
TNF	NF κ B	TNF (Synonym: TNF- α) ist an der Initiation eines NF κ B-vermittelten Zellwachstumsarrest mit dem cdk-Inhibitor p21CIP/WAF1 als Effektor beteiligt (Basile <i>et al.</i> 2003).
TSG101	p21 CIP/WAF1	TSG101 bindet an den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p21 CIP/WAF1 und dadurch wahrscheinlich seinen Einfluß auf die Zellproliferation ausübt (Oh <i>et al.</i> 2002).
TGFB1	p21 CIP/WAF1	In humanen Keratinozyten wird die p21 CIP/WAF1-Expression durch TGFB1 induziert (Reynisdottir <i>et al.</i> 1995).
TGFB1	ILK	TGFB1 führt zur Induktion der ILK-Expression in Epithelzellen der Nierentubuli (Li <i>et al.</i> 2003b). ILK spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Adhäsion und Migration.
TGFB1	TIMP1	In der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren bewirkte TGFB1 die Induktion von TIMP1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1) (Edwards <i>et al.</i> 1987, Hall <i>et al.</i> 2003).
RAC1	IQGAP1	IQGAP1, ein negativer Regulator der Zell-Zell-Adhäsion, fungiert als Effektor von Rac1 [und Cdc42] (Kuroda <i>et al.</i> 1998, Fukuta <i>et al.</i> 2001).
TNFSF7	SIVA	TNFSF7 ist ein Ligand des Rezeptors TNFRSF27 (CD27), an welchen auf der cytoplasmatischen Seiten das proapoptische Protein SIVA bindet (Prasad <i>et al.</i> 1997).
14-3-3- σ	p53	14-3-3- σ ist ein Zielgen von p53. 14-3-3- σ übt einen positiven Feedback-Effekt auf p53 auf, welcher über folgende Mechanismen erfolgt: 14-3-3- σ stabilisiert p53, indem es die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung von p53 antagonisiert. Zusätzlich erleichtert es die Oligomerisierung von p53 und verstärkt seine transkriptionelle Aktivität (Yang <i>et al.</i> 2003).
MYC	p53	Myc inhibiert selektiv die Aktivierung der p21(Cip1)-Transkription durch Bindung an p53 und führt dadurch zu einer verstärkten Apoptose-Aktivität von p53 anstatt einer eher ctyostatischen Aktivität (Seoane <i>et al.</i> 2002). Zudem bewirkt Myc eine Erhöhung des p53-Proteinlevels

		(Dang <i>et al.</i> 2005).
NF κ B	p53	NF κ B ist in der Lage, p53 zu aktivieren und trägt auf diese Weise möglicherweise zur wachstumsinhibierenden Wirkung von p53 bei (Wu & Lozano 1994).
p53	SIVA	Das proapoptotische Protein SIVA ist ein direktes Zielgen („transcriptional target“) von p53 (Fortin <i>et al.</i> 2004).
p53	CLIC4	Die Überexpression von p53 führt u.a. dazu, dass CLIC4 hochreguliert und Apoptose induziert wird. Die Beteiligung von CLIC4 an der Apoptose wird durch die Beobachtung unterstützt, dass dessen Überexpression mittels transienter Transfektion zu einem reduzierten mitochondrialen Membranpotential, der Freisetzung von Cytochrom C ins Cytoplasma und der Aktivierung von Caspasen führt (Fernandez-Salas <i>et al.</i> 2002, Suh <i>et al.</i> 2005).
TGFB1	CLIC4	In Myofibroblasten wird CLIC4 durch TGFB1 hochreguliert (Ronnov-Jessen <i>et al.</i> 2002).
TNF	CLIC4	TNF (Synonym: TNF- α) ist an der Regulation der CLIC4-Expression beteiligt (Fernandez-Salas <i>et al.</i> 1999).
MYC	CLIC4	Die Expression von CLIC4 wird durch Myc, welches an den CLIC4-Promotor bindet, induziert (Shiio <i>et al.</i> 2005).
MYC	Bcl-2	Myc kann zur Auslösung der Apoptose beitragen, indem es zur Aktivierung von Bim führt, welches wiederum das antiapoptotische Bcl-2 neutralisiert (Hemann <i>et al.</i> 2005).
TGFB1	IGFBP-2	Zwischen diesen beiden Proteinen scheint eine bidirektionale Regulation stattzufinden: Während in alveolären Epithelzellen TGFB1 zu einer Stimulation der IGFBP-2-Expression (Cazals <i>et al.</i> 1994) führte, bewirkte umgekehrt in intestinalen IEC-6 Epithelzellen IGFBP-2 eine Erhöhung der TGFB1-mRNA-Level (Guo <i>et al.</i> 1995).
NF κ B	IGFBP-2	NF κ B ist möglicherweise in der Lage, die Expression von IGFBP-2 zu beeinflussen. Diese Annahme beruht auf der Feststellung, dass die Promotorregion des IGFBP-2 vier potentiell NF κ B-bindende Abschnitte aufweist; und dies legt eine IGFBP-2-Promotoraktivierung durch NF κ B nahe (Cazals <i>et al.</i> 1999).

Dass IGFBP-2, welches ein RGD-Motiv besitzt, tatsächlich für die erhöhte Expression und Sekretion von TGF β -1 verantwortlich ist, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass

RGDS-Peptid über einen Integrin-vermittelten Mechanismus in humanen Mesangiumzellen zu eben diesen Effekten führte (Ortega-Velazquez *et al.* 2003).

Folgende Erkenntnisse sprechen dafür, dass IGFBP-2 neben der Auslösung Integrin-vermittelter Signaltransduktionsketten wahrscheinlich auch intrazellulär seine Effekte ausübt:

- Die Promotorregion des IGFBP-2 weist vier potentiell NF κ B-bindende Abschnitte auf, was eine IGFBP-2-Promotoraktivierung durch NF κ B nahelegt (Cazals *et al.* 1999).
- Terrien *et al.* (2005) stellten fest, dass IGFBP-2 im Rahmen seiner wachstumsinhibierenden Wirkung eine Wechselwirkung mit dem Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor p21 CIP/WAF1 eingeht.

Ogleich seines postulierten Charakters vermag das in Abb. 25 dargestellte Netzwerk mögliche Erklärungen für einige der gemessenen Genexpressionsänderungen als Reaktion auf erhöhte IGFBP-2-Pegel zu liefern, indem es Wechselwirkungen zwischen regulierten Genen bzw. ihren Expressionsprodukten aufzeigt. So führt beispielsweise IGFBP-2 – wahrscheinlich über sein RGD-Motiv – zu einer erhöhten Expression von TGF β -1, welches wiederum seinerseits eine erhöhte Expression von CLIC4 bewirken kann. Dies ist nur ein Beispiel für die Vielzahl der möglichen regulatorischen Verbindungen in dem unten dargestellten Regulationsnetzwerk.

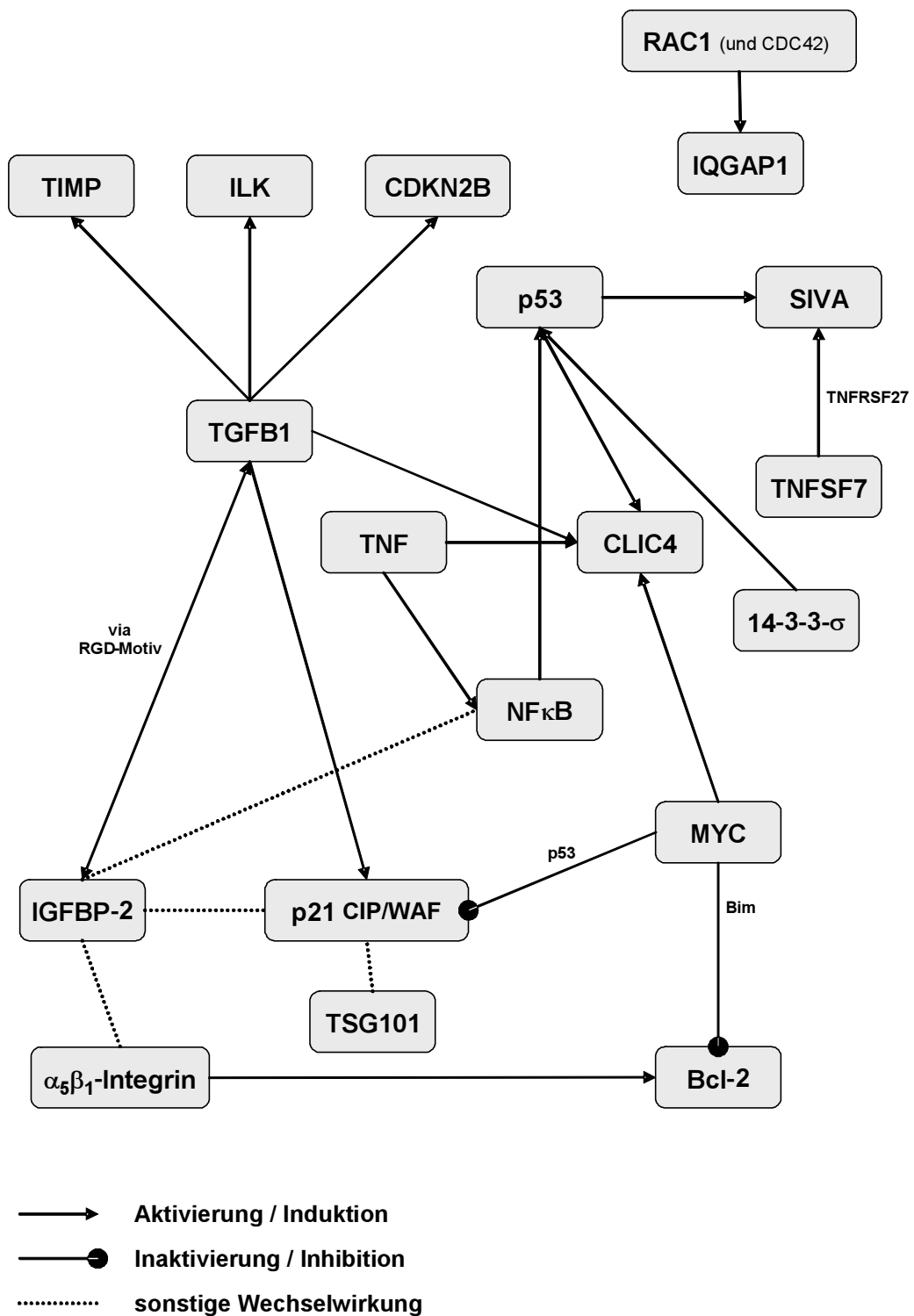


Abb. 25: Ein mögliches Regulationsnetzwerk in Form von Wechselwirkungen IGFBP-2-regulierter Gene

6.3 Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose in Zellkulturmodellen

Die Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose wurde bei zwei humanen Zellkulturmodellen untersucht: bei der IGF-insensitiven Zelllinie Hs578T und der IGF-sensitiven Zelllinie HEK-293 (Abschnitt 5.3). Bei beiden Zelllinien führte IGFBP-2 zu einer Erhöhung des Apoptosegrades, demnach ist der proapoptotische Effekt von IGFBP-2 nicht auf IGF-insensitive Zelllinien beschränkt. Der proapoptotische Effekt war den Ergebnissen des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} zufolge bei den HEK-293-Zellen stärker ausgeprägt als bei den Hs578T-Zellen (Abschnitt 5.3.1). Es sind mehrere Mechanismen in der Diskussion, über welche die IGFBPs (und damit auch IGFBP-2) die Aktivität der IGFs modulieren können (Clemmons 1998, Firth & Baxter 2002): Einerseits sollen die IGFBPs die IGFs vor Proteolyse zu schützen, andererseits können sie aber auch sequestrierend wirken, d.h. die IGFs komplett abschirmen und damit die Bindung an die IGF-Rezeptoren verhindern oder erschweren. Würde hier primär erstere Funktion zum Tragen kommen, dann wäre bei IGF-sensitiven Zellen eine Verminderung des Apoptosegrades zu erwarten, da IGF-I antiapoptotisch wirkt (Baserga *et al.* 1997, Resnicoff & Baserga 1998). Der sequestrierende Effekt des IGFBP-2 könnte hingegen die stärker ausgeprägte proapoptotische Aktivität des IGFBP-2 bei den HEK-293-Zellen erklären.

Während in den meisten Fällen eine positive Korrelation zwischen der IGFBP-2-Expression und apoptotischen Geweben oder Zellen festgestellt wurde (Besnard *et al.* 2001, Guthrie *et al.* 1995, Thomas *et al.* 2000), war eine über das Tumorsuppressorgen PTEN induzierte Apoptose in U251 Gliomzellen mit einer erniedrigten IGFBP-2-Konzentration assoziiert (Levitt *et al.* 2005). Ungeachtet der genannten unterschiedlichen Ergebnisse erlaubten diese noch keine eindeutige Aussage darüber, ob IGFBP-2 pro- oder antiapoptotisch wirkt, da die erhöhte bzw. erniedrigte IGFBP-2-Expression sowohl Teil der Apoptose-Induktion als auch eine Gegenreaktion der Zelle auf die bereits stattfindende Apoptose hätten sein können. Im Gegensatz dazu kann ein erhöhter Apoptosegrad als Folge einer IGFBP-2-Zugabe oder einer dauerhaften Überexpression von IGFBP-2 (durch stabile Transfektion mit dem IGFBP-2-Gen) eindeutig als proapoptotischer Effekt des IGFBP-2 interpretiert werden.

Neben der Apoptose korreliert IGFBP-2 noch mit einem weiteren konzeptionell verwandten Vorgang, welcher die Lebensdauer einer Zelle begrenzt: der Seneszenz. Mehrere *in vitro* Studien haben eine deutliche Hochregulation der IGFBP-2-Expression in Verbindung mit replikativer Seneszenz gezeigt (Hjelmeland *et al.* 1999, Matsunaga *et al.* 1999, Shelton *et al.* 1999). In gewisser Weise läßt sich Seneszenz für die Zellen als Wegweiser in Richtung

Zelltod betrachten, denn mit zunehmender Seneszenz rücken Zellen dem programmierten Zelltod näher.

6.4 Transfektion der Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 mit siRNAs zur Herunterregulierung der IGFBP 2 Expression

Die transiente Transfektion von A673-Zellen mit siRNAs zur Herunterregulierung der IGFBP-2-Expression in dieser Zelllinie war nicht erfolgreich (Abschnitt 5.4). Unterschiedliche Varianten der konsekutiven Transfektion brachten ebensowenig Erfolg wie eine Erhöhung der siRNA-Konzentration und der Lipofektionsreagenz-Menge. Die Transfektionsprozedur wurde entsprechend der Kit-Anleitung durchgeführt. Es hätten noch einige weitere Optimierungsexperimente durchgeführt werden können, wie das Austesten weiterer unterschiedlicher Mengenverhältnisse Transfektionsreagenz : siRNA oder das Design neuer siRNAs. Da die Transfektionseffizienz von sehr vielen Parametern abhängt, die zudem nicht alle variierbar oder kontrollierbar sind, erschienen die eher geringen Erfolgsaussichten den Aufwand nicht zu rechtfertigen. Insbesondere der Zelltyp kann den Erfolg oder Mißerfolg einer Transfektion bestimmen. Da noch andere geeignete Zelllinien für die geplanten Experimente zur Verfügung standen, wurde die A673-Zelllinie daraufhin nicht mehr eingesetzt.

6.5 Bestimmung der Konzentration von IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturmedium mittels Radioimmunoassays

Die Proteinkonzentration von IGFBP-3 blieb durch die IGFBP-2-Behandlung unbeeinflusst, während die IGF-II-Proteinkonzentration in mit IGFBP-2 behandelten Hs578T-Zellen gegenüber den unbehandelten Negativkontrollen um ein Vielfaches erhöht war (Abschnitt 5.5). IGFBP-2 scheint also bei Zugabe von außen keinen Einfluß auf die IGFBP-3-Proteinkonzentration zu nehmen. Die in den Oligo GEArray[®] Human Cancer Microarrays gefundene Hochregulation des IGFBP-3-mRNA-Levels um den Faktor 1,58 (vgl. Tabelle 5) konnte also zumindest auf der Proteinebene nicht bestätigt werden. Da die RIA-Bestimmungen sehr zuverlässig sind, handelt sich hierbei entweder um ein falsch positives Microarray-Ergebnis oder um eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinlevel, die möglicherweise auf posttranslationalen und posttranskriptionalen Regulationsmechanismen beruht. Eine Beeinflussung der IGFBP-3-Konzentration wäre u.a. von

Bedeutung gewesen, weil bereits vor der Entdeckung der IGF-unabhängigen Wirkungen des IGFBP-2 für IGFBP-3 ähnliche Wirkungen gezeigt werden konnten (Oh *et al.* 1993, Gill *et al.* 1997).

Im Gegensatz zur Erhöhung der Proteinkonzentration des IGF-II im Zellkulturüberstand erfolgte den Microarray-Ergebnissen zufolge keine signifikante Änderung des mRNA-Expressionslevels von IGF-II. Dies spricht sehr dafür, dass die erhöhte IGF-II-Proteinkonzentration auf einem Proteolyse-Schutz durch IGFBP-2, welches mit hoher Affinität an IGF-II bindet, beruht und nicht auf einer Beeinflussung der Expression.

7. Zusammenfassung

IGFBP-2 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2) ist Teil des IGF-Systems und spielt als solches eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler zellulärer und physiologischer Vorgänge. Auch in der Tumorbilogie besitzt IGFBP-2 eine bedeutende Rolle. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, auf welche Art und Weise IGFBP-2 an der Vermittlung dieser Effekte beteiligt ist. Es ist bekannt, dass IGFBP-2 als Modulator der Wirkungen der IGFs fungieren und über die Bindung an Integrine Einfluß auf die Signaltransduktion nehmen kann. Eine Vermittlung der oben genannten Effekte kann jedoch auch über die Regulation von Genexpressionen erfolgen. Genau hierauf lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit. Mit Hilfe von Oligonucleotid-Microarrays, Real-Time RT-PCR, Western Blotting und Immunoassays wurden Genexpressionsuntersuchungen an verschiedenen Zellkulturmodellen durchgeführt. Als Zellkulturmodelle dienten die IGF-insensitive Brustkrebszelllinie Hs578T sowie die humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293, welche in zwei verschiedenen stabil transfizierten Varianten vorlag. Durch Zugabe von humanem rekombinantem IGFBP-2 im Falle der Hs578T-Zellen bzw. durch erhöhte endogene Expression von IGFBP-2 im Falle der stabil transfizierten HEK-293-Zellen wurden die Zellen im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle erhöhten Konzentrationen an IGFBP-2 ausgesetzt. Das anschließende Screening nach Änderungen der Genexpression mittels Oligonucleotid-Microarrays ergab eine Vielzahl an potentiell regulierten Genen, welche sich unterschiedlichen ontologischen Gruppen zuordnen lassen. Es fanden sich u.a. Gene der Gruppen Adhäsion und Migration, Zellzyklusregulation, Signaltransduktion, transkriptionelle und translationale Regulation, vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport, Zellhomöostase (Ionenkanäle) und nicht zuletzt Apoptose. Einzelne Gene wurden für weitere Untersuchungen mittels Real-Time RT-PCR, Western Blotting und Immunoassays ausgewählt. Durch quantitative Real-Time RT-PCR-Messungen konnte auf der mRNA-Ebene eine statistisch signifikante Hochregulation der Expression von NF κ B, p53, TGF β -1, LAMB1, Bcl-2 und Iip45 gezeigt werden (Spannweite der Regulationsfaktoren -1,2 bis 4,4; in allen Fällen $p < 0,001$). In Übereinstimmung damit konnte für NF κ B, p53 und TGF β -1 auf der Proteinebene mittels Western Blotting und Immunoassays ebenfalls eine Hochregulation gemessen werden (Spannweite der Regulationsfaktoren 1,4 bis 3,5; $p < 0,01$).

Da die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen eine relativ große Anzahl an Apoptose-relevanten Genen aufwies und die Wirkung von IGFBP-2 auf die Apoptose noch nicht näher

untersucht worden war, wurde daraufhin die Wirkung von IGFBP-2 auf die verwendeten Zellkulturen untersucht. Zur quantitativen Bestimmung der apoptotischen Wirkung von IGFBP-2 wurden zwei voneinander unabhängige Methoden eingesetzt: der auf einem Immunoassay basierende „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ und ein FACS-basierter Assay unter Verwendung des „Annexin-V-FLUOS Staining Kits“. Mit Hilfe dieser beiden Assays wurde für die IGF-insensitive Hs578T-Zelllinie ein signifikanter proapoptotischer Effekt von IGFBP-2 gezeigt. Eine sinnvolle quantitative Auswertung der Apoptose-Assay-Daten war für die HEK-293-Zelllinie nur mit dem Immunoassay-basierten Apoptose-Assay möglich, daher liegen in diesem Fall auch nur für diesen Assay entsprechende Daten vor. Unter Verwendung des „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ betrug das Verhältnis der relativen apoptotischen Parameter von IGFBP-2 behandelten gegenüber unbehandelten Hs578T-Zellen 1,82 ($p < 0,001$), während dieses Verhältnis für die unterschiedlich stabil transfizierten Varianten der HEK-293-Zelllinie 2,98 ($p < 0,001$) betrug. Die Messung mit Hilfe des FACS-basierten Apoptose-Assays ergab für die Hs578T-Zellen eine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen von 6,2 % auf 15,8 % (entsprechend einem Verhältnis von 2,6; $p < 0,05$). Während der proapoptotische Effekt von IGFBP-2 bei der IGF-insensitiven Hs578T-Zelllinie im Wesentlichen dem IGFBP-2 zugeschrieben werden kann, muss bei der HEK-293-Zelllinie berücksichtigt werden, dass möglicherweise Wechselwirkungen mit den IGFs ebenso eine Rolle spielen. Da IGF-I antiapoptotisch wirkt, im gesamten jedoch ein proapoptotischer Effekt beobachtet wurde, ist eine Verstärkung dessen Wirkung durch IGFBP-2 – beispielsweise durch Schutz vor Proteolyse – unwahrscheinlich. Stattdessen könnte vielmehr eine Sequestrierung des IGF-I durch IGFBP-2 zu einer Abschwächung dessen antiapoptotischen Effekts führen.

Im Rahmen der IGFBP-2-Konzentrationsbestimmungen mittels Radioimmunoassay wurde für die Hs578T-Zellen auch die Konzentration von IGF-II und IGFBP-3 im Zellkulturmedium bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass IGFBP-2 keinen signifikanten Einfluß auf die Konzentration von IGFBP-3 hat, jedoch zu einer stark erhöhten IGF-II-Konzentration führt, welche sehr wahrscheinlich auf einem Proteolyse-Schutzeffekt durch IGFBP-2 beruht.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsuntersuchungen identifizierten IGFBP-2 regulierte Gene, über welche dieses u.a. seine IGF-unabhängigen Wirkungen direkt oder indirekt zu vermitteln vermag. Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass IGFBP-2 auf bestimmte Zellkulturen proapoptotisch wirken kann. Diese neuen Erkenntnisse könnten dabei helfen, ein besseres Verständnis der Rolle des IGFBP-2 bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, insbesondere bei der Tumorentwicklung und

-progression, zu erlangen; und dies könnte für den Einsatz von IGFBP-2 als diagnostischen Marker und für die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung der mit veränderten IGFBP-2-Pegeln einhergehenden Krankheiten von Bedeutung sein.

8. Literatur

- [1] Afshari CA, Nuwaysir EF & Barrett JC 1999 Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. *Cancer Res* **59** 4759-4760.
- [2] Al-Khaldi SF, Martin SA, Rasooly A & Evans JD 2002 DNA microarray technology used for studying foodborne pathogens and microbial habitats: minireview. *JAOAC Int* **85** 906-910.
- [3] Arai T, Busby W, Jr. & Clemmons DR 1996 Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* **137** 4571-4575.
- [4] Arnold PM, Ma JY, Citron BA & Festoff BW 1999 Insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid during human development and aging. *Biochem Biophys Res Commun* **264** 652-656.
- [5] Ashton IK, Dornan TL, Pocock AE, Turner RC & Bron AJ 1983 Plasma somatomedin activity and diabetic retinopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **19** 105-110.
- [6] Baron-Hay S, Boyle F, Ferrier A & Scott C 2004 Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as a prognostic marker in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **10** 1796-1806.
- [7] Baserga R 1999 The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* **253** 1-6.
- [8] Baserga R, Peruzzi F & Reiss K 2003 The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer* **107** 873-877.
- [9] Baserga R, Resnicoff M, D'Ambrosio C & Valentinis B 1997 The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* **53** 65-98.
- [10] Basile JR, Eichten A, Zacny V & Munger K 2003 NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes. *Mol Cancer Res* **1** 262-270.
- [11] Bennett A, Wilson DM, Liu F, Nagashima R, Rosenfeld RG & Hintz RL 1983 Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* **57** 609-612.
- [12] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM & Hannon GJ 2001 Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409** 363-366.
- [13] Berrier AL, Martinez R, Bokoch GM & LaFlamme SE 2002 The integrin beta tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *J Cell Sci.* **115** 4285-4291.
- [14] Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A & Malvy C 2002 Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **296** 1000-1004.

- [15] Besnard V, Corroyer S, Trugnan G, Chadelat K, Nabeyrat E, Cazals V & Clement A 2001 Distinct patterns of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 expression in oxidant exposed lung epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1538** 47-58.
- [16] Binoux M, Roghani M, Hossenlopp P & Whitechurch O 1991 Cerebrospinal IGF binding proteins: isolation and characterization. *Adv Exp Med Biol* **293** 161-170.
- [17] Blum WF, Horn N, Kratzsch J, Jorgensen JO, Juul A, Teale D, Mohnike K & Ranke MB 1993 Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay. *Growth Regul* **3** 100-104.
- [18] Blum WF 1993 Insulinähnliche Wachstumsfaktoren und ihre Bindungsproteine. In: *Endokrinologische Funktionsdiagnostik im Kindes- und Jugendalter*, Ranke MB (Hrsg.). Mannheim: J&J Verlag.
- [19] Blundell TL, Bedarkar S, Rinderknecht E & Humbel RE 1978 Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** 180-184.
- [20] Boes M, Booth BA, Dake BL, Moser DR & Bar RS 1996 Insulin-like growth factor binding protein production by bovine and human vascular smooth muscle cells: production of insulin-like growth factor binding protein-6 by human smooth muscle. *Endocrinology* **137** 5357-5363.
- [21] Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L & Le Bouc Y 1998 Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83** 1713-1720.
- [22] Boulle N, Baudin E, Gicquel C, Logie A, Bertherat J, Penfornis A, Bertagna X, Luton JP, Schlumberger M & Le Bouc Y 2001 Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* **144** 29-36.
- [23] Brantl S 2002 Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* **1575** 15-25.
- [24] Bridgewater DJ & Matsell DG 2003 Insulin-like growth factor binding protein-2 modulates podocyte mitogenesis. *Pediatr Nephrol* **18** 1109-1115.
- [25] Canalis E 1983 The hormonal and local regulation of bone formation. *Endocr Rev* **4** 62-77.
- [26] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A & Morgan RA 2001 Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 9742-9747.
- [27] Carr JM, Owens JA, Grant PA, Walton PE, Owens PC & Wallace JC 1995 Circulating insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) and tissue mRNA levels of IGFBP-2 and IGFBP-4 in the ovine fetus. *J Endocrinol* **145** 545-557.

-
- [28] Cazals V, Mouhieddine B, Maitre B, Le Bouc Y, Chadelat K, Brody JS & Clement A 1994 Insulin-like growth factors, their binding proteins, and transforming growth factor-beta 1 in oxidant-arrested lung alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **269** 14111-14117.
- [29] Chadelat K, Boule M, Corroyer S, Fauroux B, Delaisi B, Tournier G & Clement A 1998 Expression of insulin-like growth factors and their binding proteins by bronchoalveolar cells from children with and without interstitial lung disease. *Eur Respir J* **11** 1329-1336.
- [30] Clemmons DR 1998 Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* **140** 19-24.
- [31] Clemmons DR & Van Wyk JJ 1984 Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* **13** 113-143.
- [32] Clemmons DR, Underwood LE, Dickerson RN, Brown RO, Hak LJ, MacPhee RD & Heizer WD 1985 Use of plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I measurements to monitor the response to nutritional repletion in malnourished patients. *Am J Clin Nutr* **41** 191-198.
- [33] Cogoni C & Macino G 2000 Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* **10** 638-643.
- [34] Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR & Rosenfeld RG 1993 Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* **76** 1031-1035.
- [35] Conover CA & Khosla S 2003 Role of extracellular matrix in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 regulation of IGF-II action in normal human osteoblasts. *Growth Horm IGF Res* **13** 328-335.
- [36] Dang CV, O'Donnell K A, Juopperi T, Mhawech P, Yang HY, Wen YY, Chen CH, Lozano G & Lee MH 2005 The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* **8** 177-178.
- [37] Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R & Berkhout B 2004 Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* **78** 2601-2605.
- [38] Daughaday WH & Reeder C 1966 Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone. *J Lab Clin Med* **68** 357-368.
- [39] Daughaday WH & Rotwein P 1989 Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* **10** 68-91.
- [40] Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL & van Wyk JJ 1972 Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* **235** 107.
- [41] Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL, Wilfinger WW, Mackey K & Chomczynski P 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and

- immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum
- [42] Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *J Clin Endocrinol Metab* **51** 781-788.
- [43] De Leon DD, Wilson DM, Powers M & Rosenfeld RG 1992 Effects of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF receptor antibodies on the proliferation of human breast cancer cells. *Growth Factors* **6** 327-336.
- [44] D'Ercole AJ 1996 Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25** 573-590.
- [45] Draznin B, Burstein PJ, Heinrich UE, Johnson CB, Emler CA & Schalch DS 1980 Insulin-like growth factor and its carrier protein in hypopituitary and hypothyroid children and adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* **12** 137-142.
- [46] Eckstein F, Pavicic T, Nedbal S, Schmidt C, Wehr U, Rambeck W, Wolf E & Hoeflich A 2002 Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice. *Anat Embryol (Berl)* **206** 139-148.
- [47] Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P & Heath JK 1987 Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *Embo J.* **6** 1899-1904.
- [48] el Atiq F, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Sastre B & Pommier G 1994 Alterations in serum levels of insulin-like growth factors and insulin-like growth-factor-binding proteins in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* **57** 491-497.
- [49] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K & Tuschl T 2001 Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411** 494-498.
- [50] Elmlinger MW, Rauschnabel U, Koscielniak E, Weber K & Ranke MB 1999 Secretion of noncomplexed 'Big' (10-18 kD) forms of insulin-like growth factor-II by 12 soft tissue sarcoma cell lines. *Horm Res* **52** 178-185.
- [51] Elmlinger MW, Deininger MH, Schuett BS, Meyermann R, Duffner F, Grote EH & Ranke MB 2001 In vivo expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* **142** 1652-1658.
- [52] Elmlinger MW, Grund R, Buck M, Wollmann HA, Feist N, Weber MM, Speer CP & Ranke MB 1999 Limited proteolysis of the IGF binding protein-2 (IGFBP-2) by a specific serine protease activity in early breast milk. *Pediatr Res* **46** 76-81.
- [53] Fernandez-Salas E, Sagar M, Cheng C, Yuspa SH & Weinberg WC 1999 p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem* **274** 36488-36497.

-
- [54] Fernandez-Salas E, Suh KS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KR, Edwards LE, Hayes DD, Cheng C *et al.* 2002 mtCLIC/CLIC4, an organellar chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol.* **22** 3610-3620.
- [55] Firth SM & Baxter RC 2002 Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* **23** 824-854.
- [56] Fjose A, Ellingsen S, Wargelius A & Seo HC 2001 RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol Annu Rev* **7** 31-57.
- [57] Flyvbjerg A, Mogensen O, Mogensen B & Nielsen OS 1997 Elevated serum insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) and decreased IGFBP-3 in epithelial ovarian cancer: correlation with cancer antigen 125 and tumor-associated trypsin inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* **82** 2308-2313.
- [58] Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G & Wallace JC 1998 Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *J Biol Chem* **273** 4647-4652.
- [59] Fortin A, MacLaurin JG, Arbour N, Cregan SP, Kushwaha N, Callaghan SM, Park DS, Albert PR & Slack RS 2004 The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem.* **279** 28706-28714. Epub 22004 Apr 28722.
- [60] Fukata M, Nakagawa M, Itoh N, Kawajiri A, Yamaga M, Kuroda S & Kaibuchi K 2001 Involvement of IQGAP1, an effector of Rac1 and Cdc42 GTPases, in cell-cell dissociation during cell scattering. *Mol Cell Biol.* **21** 2165-2183.
- [61] Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J & Nanes MS 2000 Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* **141** 3956-3964.
- [62] Gill ZP, Perks CM, Newcomb PV & Holly JM 1997 Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3) predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF-dependent manner. *J Biol Chem* **272** 25602-25607.
- [63] Gilmore AP 2005 Anoikis. *Cell Death Differ.* **12** 1473-1477.
- [64] Gluckman PD, Johnson-Barrett JJ, Butler JH, Edgar BW & Gunn TR 1983 Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)* **19** 405-413.
- [65] Goldberg AC, Trivedi B, Delmez JA, Harter HR & Daughaday WH 1982 Uremia reduces serum insulin-like growth factor I, increases insulin-like growth factor II, and modifies their serum protein binding. *J Clin Endocrinol Metab* **55** 1040-1045.
- [66] Gourmelen M, Perin L & Le Bouc Y 1994 IGFs and their binding proteins. *Nucl Med Biol* **21** 297-302.

- [67] Gourmelen M, Le Bouc Y, Girard F & Binoux M 1984 Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in constitutionally tall children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* **59** 1197-1203.
- [68] Guo YS, Townsend CM, Jr., Jin GF, Beauchamp RD & Thompson JC 1995 Differential regulation by TGF-beta 1 and insulin of insulin-like growth factor binding protein-2 in IEC-6 cells. *Am J Physiol* **268** E1199-1204.
- [69] Guthrie HD, Grimes RW & Hammond JM 1995 Changes in insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 in follicular fluid during atresia of follicles grown after ovulation in pigs. *J Reprod Fertil* **104** 225-230.
- [70] Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR & Clark IM 2003 The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*. **278** 10304-10313. Epub 12003 Jan 10313.
- [71] Han VK, Lund PK, Lee DC & D'Ercole AJ 1988 Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* **66** 422-429.
- [72] Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC & Dedhar S 1996 Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* **379** 91-96.
- [73] Hannon GJ & Beach D 1994 p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371** 257-261.
- [74] Hemann MT, Bric A, Teruya-Feldstein J, Herbst A, Nilsson JA, Cordon-Cardo C, Cleveland JL, Tansey WP, Lowe SW, Dang CV *et al.* 2005 Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* **436** 807-811.
- [75] Hill DJ, Strain AJ & Milner RD 1987 Growth factors in embryogenesis. *Oxf Rev Reprod Biol* **9** 398-455.
- [76] Hjelmeland LM, Cristofolo VJ, Funk W, Rakoczy E & Katz ML 1999 Senescence of the retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **5** 33.
- [77] Hoeflich A, Lahm H, Blum W, Kolb H & Wolf E 1998 Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett* **434** 329-334.
- [78] Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H, Blum WF, Kolb HJ, Engelhardt D, Wolf E & Weber MM 2000 Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* **60** 834-838.
- [79] Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM & Wolf E 2001a Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res* **61** 8601-8610.

-
- [80] Hoeflich A, Nedbal S, Blum WF, Erhard M, Lahm H, Brem G, Kolb HJ, Wanke R & Wolf E 2001b Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* **142** 1889-1898.
- [81] Hoeflich A, Reisinger R, Schuett BS, Elmlinger MW, Russo VC, Vargas GA, Jehle PM, Lahm H, Renner-Muller I & Wolf E 2004 Peri/nuclear localization of intact insulin-like growth factor binding protein-2 and a distinct carboxyl-terminal IGFBP-2 fragment in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **324** 705-710.
- [82] Holt RI, Jones JS, Stone NM, Baker AJ & Miell JP 1996 Sequential changes in insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding proteins in children with end-stage liver disease before and after successful orthotopic liver transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* **81** 160-168.
- [83] Holt RI, Crossey PA, Jones JS, Baker AJ, Portmann B & Miell JP 1997 Hepatic growth hormone receptor, insulin-like growth factor I, and insulin-like growth factor-binding protein messenger RNA expression in pediatric liver disease. *Hepatology* **26** 1600-1606.
- [84] Humbel RE 1990 Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* **190** 445-462.
- [85] Hwa V, Oh Y & Rosenfeld RG 1999 The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* **20** 761-787.
- [86] Jost CA, Marin MC & Kaelin WG, Jr. 1997 p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* **389** 191-194.
- [87] Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X *et al.* 1997 Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90** 809-819.
- [88] Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B & Karasik A 1993 Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* **77** 229-233.
- [89] Kawano K, Katak SS, Murai M, Yao CC & Kramer RH 2001 Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res*. **262** 180-196.
- [90] Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ & Parise LV 1997 Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390** 632-636.
- [91] Khosla S, Hassoun AA, Baker BK, Liu F, Zein NN, Whyte MP, Reasner CA, Nippoldt TB, Tiegs RD, Hintz RL *et al.* 1998 Insulin-like growth factor system abnormalities in hepatitis C-associated osteosclerosis. Potential insights into increasing bone mass in adults. *J Clin Invest* **101** 2165-2173.

- [92] Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP & Sahagian GG 1988 Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **263** 9339-9344.
- [93] Kiyama S, Morrison K, Zellweger T, Akbari M, Cox M, Yu D, Miyake H & Gleave ME 2003 Castration-induced increases in insulin-like growth factor-binding protein 2 promotes proliferation of androgen-independent human prostate LNCaP tumors. *Cancer Res* **63** 3575-3584.
- [94] Klemke RL, Yebra M, Bayna EM & Cheresch DA 1994 Receptor tyrosine kinase signaling required for integrin alpha v beta 5-directed cell motility but not adhesion on vitronectin. *J Cell Biol* **127** 859-866.
- [95] Kornfeld S 1992 Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* **61** 307-330.
- [96] Kratzsch J, Blum WF, Schenker E & Keller E 1995 Regulation of growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF)I, IGF binding proteins -1, -2, -3 and GH binding protein during progression of liver cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **103** 285-291.
- [97] Kurihara S, Hakuno F & Takahashi S 2000 Insulin-like growth factor-I-dependent signal transduction pathways leading to the induction of cell growth and differentiation of human neuroblastoma cell line SH-SY5Y: the roles of MAP kinase pathway and PI 3-kinase pathway. *Endocr J* **47** 739-751.
- [98] Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M, Fujii K, Nakamura T, Ookubo T, Izawa I, Nagase T, Nomura N, Tani H *et al.* 1998 Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. *Science*. **281** 832-835.
- [99] Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.
- [100] Lee DY, Kim SJ & Lee YC 1999 Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J Korean Med Sci* **14** 401-404.
- [101] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, Salvaterra P & Rossi J 2002 Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* **20** 500-505.
- [102] Levitt RJ, Georgescu MM & Pollak M 2005 PTEN-induction in U251 glioma cells decreases the expression of insulin-like growth factor binding protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* **336** 1056-1061.
- [103] Li C & Wong WH 2001 Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** 31-36.
- [104] Li K, Lin SY, Brunicardi FC & Seu P 2003a Use of RNA interference to target cyclin E-overexpressing hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **63** 3593-3597.

-
- [105] Li Y, Yang J, Dai C, Wu C & Liu Y 2003b Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* **112** 503-516.
- [106] Lindenbergh-Kortleve DJ, Rosato RR, van Neck JW, Nauta J, van Kleffens M, Groffen C, Zwarthoff EC & Drop SL 1997 Gene expression of the insulin-like growth factor system during mouse kidney development. *Mol Cell Endocrinol* **132** 81-91.
- [107] Long L, Rubin R & Brodt P 1998 Enhanced invasion and liver colonization by lung carcinoma cells overexpressing the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Exp Cell Res* **238** 116-121.
- [108] Luna AM, Wilson DM, Wibbelsman CJ, Brown RC, Nagashima RJ, Hintz RL & Rosenfeld RG 1983 Somatomedins in adolescence: a cross-sectional study of the effect of puberty on plasma insulin-like growth factor I and II levels. *J Clin Endocrinol Metab* **57** 268-271.
- [109] Lupia E, Elliot SJ, Lenz O, Zheng F, Hattori M, Striker GE & Striker LJ 1999 IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes* **48** 1638-1644.
- [110] MacDonald RG, Pfeffer SR, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czech MP & Ullrich A 1988 A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* **239** 1134-1137.
- [111] Marek J, Schullerova M, Schreiberova O & Limanova Z 1981 Effect of thyroid function on serum somatomedin activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* **96** 491-497.
- [112] Martin JL & Baxter RC 1999 IGF Binding Proteins as Modulators of IGF Action. In *The IGF System*, edn. Ed. Eds RG Rosenfeld & CT Roberts. New Jersey, USA: Humana Press Totowa.
- [113] Martinez MA, Gutierrez A, Armand-Ugon M, Blanco J, Parera M, Gomez J, Clotet B & Este JA 2002 Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *Aids* **16** 2385-2390.
- [114] Matsell DG, Bennett T, Armstrong RA, Goodyer P, Goodyer C & Han VK 1997 Insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein gene expression in multicystic renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* **8** 85-94.
- [115] Matsudaira P 1987 Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* **262** 10035-10038.
- [116] Matsunaga H, Handa JT, Gelfman CM & Hjelmeland LM 1999 The mRNA phenotype of a human RPE cell line at replicative senescence. *Mol Vis* **5** 39.
- [117] Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ & Baldwin AS, Jr. 1997 Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. *Science* **278** 1812-1815.
- [118] McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ & Kay MA 2002 RNA interference in adult mice. *Nature* **418** 38-39.

- [119] McGuire SE, Hilsenbeck SG, Figueroa JA, Jackson JG & Yee D 1994 Detection of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by ligand blotting in breast cancer tissues. *Cancer Lett* **77** 25-32.
- [120] Merimee TJ, Zapf J & Froesch ER 1983 Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med* **309** 527-530.
- [121] Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, Freyberger H, Klein M, Losche C, Rollmann R & Schatz H 1993 Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* **92** 2620-2625.
- [122] Miele L & Osborne B 1999 Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* **181** 393-409.
- [123] Moore MG, Wetterau LA, Francis MJ, Peehl DM & Cohen P 2003 Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* **105** 14-19.
- [124] Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA & Rutter WJ 1987 Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* **329** 301-307.
- [125] Moss EG 2001 RNA interference: it's a small RNA world. *Curr Biol* **11** R772-775.
- [126] 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.
- [127] Neumann GM, Marinaro JA & Bach LA 1998 Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* **37** 6572-6585.
- [128] Nissley P & Lopaczynski W 1991 Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* **5** 29-43.
- [129] Nobes CD & Hall A 1995 Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans.* **23** 456-459.
- [130] Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P & Sharp PA 2002 siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* **8** 681-686.
- [131] Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA & Hannun YA 1993 Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259** 1769-1771.
- [132] Oh Y & Rosenfeld RG 1999 IGF-Independent Actions of the IGF-Binding Proteins. In *The IGF-System*, edn. Ed. Eds RG Rosenfeld & CT Roberts. New Jersey: Humana Press Totowa.

- [133] Oh Y, Muller HL, Lamson G & Rosenfeld RG 1993 Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* **268** 14964-14971.
- [134] Oh H, Mammucari C, Nenci A, Cabodi S, Cohen SN & Dotto GP 2002 Negative regulation of cell growth and differentiation by TSG101 through association with p21(Cip1/WAF1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 5430-5435.
- [135] Ortega-Velazquez R, Diez-Marques ML, Ruiz-Torres MP, Gonzalez-Rubio M, Rodriguez-Puyol M & Rodriguez Puyol D 2003 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide stimulates transforming growth factor beta1 transcription and secretion through integrin activation. *Faseb J.* **17** 1529-1531. Epub 2003 Jun 1523.
- [136] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J & Dixit VM 1997 The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276** 111-113.
- [137] Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, Rossjohn J & Price JT 2004 Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res* **64** 977-984.
- [138] Pilch PF, O'Hare T, Rubin J & Boni-Schnetzler M 1986 The ligand binding subunit of the insulin-like growth factor 1 receptor has properties of a peripheral membrane protein. *Biochem Biophys Res Commun* **136** 45-50.
- [139] Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S & Schlossman SF 1997 CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94** 6346-6351.
- [140] Puztai L, Ayers M, Stec J & Hortobagyi GN 2003 Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *Oncologist* **8** 252-258.
- [141] Rajaram S, Baylink DJ & Mohan S 1997 Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* **18** 801-831.
- [142] Randle PJ 1954 Plasma-insulin activity in hypopituitarism assayed by the rat-diaphragm method. *Lancet* **266** 809-810.
- [143] Ranke MB & Elmlinger M 1997 Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Res* **48** 9-15.
- [144] Ranke MB, Blum WF & Bierich JR 1988 Clinical relevance of serum measurements of insulin-like growth factors and somatomedin binding proteins. *Acta Paediatr Scand Suppl* **347** 114-126.
- [145] Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW & Flehmig B 2003 Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* **60** 174-180.
- [146] Rauschnabel U, Koscielniak E, Ranke MB, Schuett B & Elmlinger MW 1999 RGD-specific binding of IGFBP-2 to alpha5-beta1 integrin of Ewing sarcoma cells. *Growth Horm. IGF Res.* **9** 369-370.

- [147] Rechler MM & Nissley SP 1990 Insulin-like growth factors. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors - Handbook of Pharmacology*, edn. Ed. Eds MB Sporn & AB Roberts. Heidelberg: Springer.
- [148] Rechler MM & Brown AL 1992 Insulin-like growth factor binding proteins: gene structure and expression. *Growth Regul* **2** 55-68.
- [149] Renehan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM & O'Dwyer ST 2000 Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* **83** 1344-1350.
- [150] Resnicoff M & Baserga R 1998 The role of the insulin-like growth factor I receptor in transformation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **842** 76-81.
- [151] Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A & Massague J 1995 Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* **9** 1831-1845.
- [152] Rinderknecht E & Humbel RE 1978a The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* **253** 2769-2776.
- [153] Rinderknecht E & Humbel RE 1978b Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* **89** 283-286.
- [154] Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Edwards JC & Petersen OW 2002 Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol* **161** 471-480.
- [155] Rosenfeld RG, Pham H, Oh Y, Lamson G & Giudice LC 1990 Identification of insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGF-BP-2) and a low molecular weight IGF-BP in human seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **70** 551-553.
- [156] Ross RJ, Chew SL, D'Souza Li L, Yateman M, Rodriguez-Arno J, Gimson A, Holly J & Camacho-Hubner C 1996 Expression of IGF-I and IGF-binding protein genes in cirrhotic liver. *J Endocrinol* **149** 209-216.
- [157] Rotwein P 1991 Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* **5** 3-18.
- [158] Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL & Werther GA 1997 Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* **138** 4858-4867.
- [159] Russo VC, Schutt BS, Andaloro E, Ymer SI, Hoeflich A, Ranke MB, Bach LA & Werther GA 2005 Igfbp-2 Binding to Extracellular Matrix Plays a Critical Role in Neuroblastoma Cell Proliferation, Migration and Invasion. *Endocrinology*.
- [160] Ryan KM, Ernst MK, Rice NR & Vousden KH 2000 Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* **404** 892-897.

-
- [161] Sakai T, Li S, Docheva D, Grashoff C, Sakai K, Kostka G, Braun A, Pfeifer A, Yurchenco PD & Fassler R 2003 Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* **17** 926-940.
- [162] Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, Helin HJ, Helen PT, Schraml P, Kallioniemi OP & Kononen J 2000 Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* **60** 6617-6622.
- [163] Salmon WD, Jr. & Daughaday WH 1957 A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* **49** 825-836.
- [164] Sara VR & Hall K 1990 Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* **70** 591-614.
- [165] Scharf J, Ramadori G, Braulke T & Hartmann H 1996 Synthesis of insulinlike growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit in primary cultures of rat hepatocytes, of Kupffer cells, and in cocultures: regulation by insulin, insulinlike growth factor, and growth hormone. *Hepatology* **23** 818-827.
- [166] Scherr M, Morgan MA & Eder M 2003 Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem* **10** 245-256.
- [167] Schuett BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB & Elmlinger MW 2004 Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* **32** 859-868.
- [168] Seoane J, Le HV & Massague J 2002 Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419** 729-734.
- [169] Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D & Funk WD 1999 Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9** 939-945.
- [170] Shier P & Watt VM 1989 Primary structure of a putative receptor for a ligand of the insulin family. *J Biol Chem* **264** 14605-14608.
- [171] Shiio Y, Suh KS, Lee H, Yuspa SH, Eisenman RN & Aebersold R 2005 Quantitative proteomic analysis of Myc-induced apoptosis: A direct role for Myc induction of the mitochondrial chloride ion channel, mtCLIC/CLIC4. *J Biol Chem*.
- [172] Shimao Y, Nabeshima K, Inoue T & Koono M 2002 Complex formation of IQGAP1 with E-cadherin/catenin during cohort migration of carcinoma cells. Its possible association with localized release from cell-cell adhesion. *Virchows Arch.* **441** 124-132. Epub 2002 Feb 2019.
- [173] Shirane M & Nakayama KI 2003 Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol.* **5** 28-37.
- [174] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH & Fire A 2001 On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107** 465-476.

- [175] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150** 76-85.
- [176] Stears RL, Martinsky T & Schena M 2003 Trends in microarray analysis. *Nat Med* **9** 140-145.
- [177] Stewart CE & Rotwein P 1996 Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* **76** 1005-1026.
- [178] Stracke ML, Engel JD, Wilson LW, Rechler MM, Liotta LA & Schiffmann E 1989 The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J Biol Chem* **264** 21544-21549.
- [179] Sugimoto N, Imoto I, Fukuda Y, Kurihara N, Kuroda S, Tanigami A, Kaibuchi K, Kamiyama R & Inazawa J 2001 IQGAP1, a negative regulator of cell-cell adhesion, is upregulated by gene amplification at 15q26 in gastric cancer cell lines HSC39 and 40A. *J Hum Genet.* **46** 21-25.
- [180] Suh KS, Mutoh M, Gerdes M & Yuspa SH 2005 CLIC4, an intracellular chloride channel protein, is a novel molecular target for cancer therapy. *J Invest Dermatol Symp Proc* **10** 105-109.
- [181] Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, Marucci L, Gaggiotti G, Orlandoni P, Macarri G, Perego L, Benedetti A *et al.* 1999 Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate proliferation and type I collagen accumulation by human hepatic stellate cells: differential effects on signal transduction pathways. *Hepatology* **29** 1743-1751.
- [182] Terrien X, Bonvin E, Corroyer S, Tabary O, Clement A & Henrion Caude A 2005 Intracellular colocalization and interaction of insulin-like growth factor binding protein-2 with the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 CIP/WAF1 during growth inhibition. *Biochem J.* **392** 457-465.
- [183] Thomas LN, Wright AS, Lazier CB, Cohen P & Rittmaster RS 2000 Prostatic involution in men taking finasteride is associated with elevated levels of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs)-2, -4, and -5. *Prostate* **42** 203-210.
- [184] Tonshoff B, Blum WF & Mehls O 1995 Insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins in children with chronic renal failure. *Prog Growth Factor Res* **6** 481-491.
- [185] Tonshoff B, Blum WF & Mehls O 1997 Derangements of the somatotrophic hormone axis in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* **58** S106-113.
- [186] Toogood AA, Jones J, O'Neill PA, Thorner MO & Shalet SM 1998 The diagnosis of severe growth hormone deficiency in elderly patients with hypothalamic-pituitary disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **48** 569-576.
- [187] Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E *et al.* 1986 Insulin-like growth factor I receptor primary

- structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* **5** 2503-2512.
- [188] Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR & Verma IM 1996 Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274** 787-789.
- [189] van der Laan BF, Freeman JL & Asa SL 1995 Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues. *Thyroid* **5** 67-73.
- [190] Venturelli D, Martinez R, Melotti P, Casella I, Peschle C, Cucco C, Spampinato G, Darzynkiewicz Z & Calabretta B 1995 Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 7435-7439.
- [191] Vincent TS, Garvin AJ, Gramling TS, Hazen-Martin DJ, Re GG & Sens DA 1994 Expression of insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) in Wilms' tumors. *Pediatr Pathol* **14** 723-730.
- [192] Voinnet O 2002 RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **5** 444-451.
- [193] Wang H, Shen SS, Diwan AH, Zhang W, Fuller GN & Prieto VG 2003a Expression of insulin-like growth factor-binding protein 2 in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* **30** 599-605.
- [194] Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN & Zhang W 2003b Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* **63** 4315-4321.
- [195] Weber MM, Fottner C & Wolf E 2000 The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest* **30 Suppl 3** 69-75.
- [196] Weitzman JB, Chen A & Hemler ME 1995 Investigation of the role of beta 1 integrins in cell-cell adhesion. *J Cell Sci.* **108** 3635-3644.
- [197] Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K & Yaniv M 2000 JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell.* **6** 1109-1119.
- [198] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA *et al.* 1995 Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3** 673-682.
- [199] Wilfinger WW, Mackey K & Chomczynski P 1997 Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22** 474-476, 478-481.
- [200] Wu H & Lozano G 1994 NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* **269** 20067-20074.
- [201] Yang HY, Wen YY, Chen CH, Lozano G & Lee MH 2003 14-3-3 sigma positively regulates p53 and suppresses tumor growth. *Mol Cell Biol* **23** 7096-7107.

- [202] Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R & Shen J 2004 Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway. *Dev Biol* **269** 81-94.
- [203] Yu H, Nicar MR, Shi R, Berkel HJ, Nam R, Trachtenberg J & Diamandis EP 2001 Levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 2 and 3 in serial postoperative serum samples and risk of prostate cancer recurrence. *Urology* **57** 471-475.
- [204] Zapf J 1995 Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins. *Eur J Endocrinol* **132** 645-654.
- [205] Zapf J & Froesch ER 1986 [Acromegaly and insulin-like growth factors]. *Schweiz Med Wochenschr* **116** 71-77.
- [206] Zapf J, Rinderknecht E, Humbel RE & Froesch ER 1978 Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications. *Metabolism* **27** 1803-1828.
- [207] Zhang Z, Vuori K, Reed JC & Ruoslahti E 1995 The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 6161-6165.
- [208] Zhu J, Jiang J, Zhou W & Chen X 1998 The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res* **58** 5061-5065.
- [209] Zumkeller W, Schwander J, Mitchell CD, Morrell DJ, Schofield PN & Preece MA 1993 Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II and IGF binding protein-2 (IGFBP-2) in the plasma of children with Wilms' tumour. *Eur J Cancer* **29A** 1973-1977.
- [210] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC, Aster JC, Allman D & Pear WS 2005 Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood* **106** 3898-3906.

9. Anhang

Tabelle 9: Zusätzliche quantitative Ergebnisdaten der Affymetrix Microarray-Experimente

% KVÜ = Prozentuale Übereinstimmung aller Kreuzvergleiche (vgl. Abschnitt 4.2.8)

SLR-Mittelwert = arithmetischer Mittelwert der „Signal Log Ratios“ der Replikate

SLR-Median = Median der „Signal Log Ratios“ der Replikate

SLR-SD = Standardabweichung des „Signal Log Ratios“ der Replikate

SLR-IQ = Interquartil des „Signal Log Ratios“ der Replikate

Teil A: Hochregulierte Gene

A Vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Ras-Associated Binding Protein 2 (RAB2)	AI189609	77 %	1,58	1,76	0,37	0,6	3,0	3,4
Lectin, Mannose-Binding, 1 (LMAN1 / MR60 / ERGIC53)	NM_005570.2	77 %	1,36	1,44	0,23	0,35	2,6	2,7
Translocating Chain-Associating Membrane Protein (TRAM)	AF130055.1	100 %	1,4	1,31	0,25	0,42	2,6	2,5
RAB6A (Ras-Associated Binding Protein 6A)	NM_002869.1	66 %	1,23	1,21	0,27	0,28	2,3	2,3
ADP-Ribosylation Factor-Like 1 (ARL1)	BE890745	66 %	1,21	1,19	0,4	0,55	2,3	2,3
Sorting Nexin 2 (SNX2)	AF043453.1	77 %	0,96	0,68	0,39	0,66	1,9	1,6

B Ionenkanäle

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4)	AI638420	77 %	1,09	1,12	0,26	0,38	2,1	2,2

Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4)	AF109196.1	66 %	0,98	0,99	0,23	0,37	2,0	2,0
--	------------	------	------	------	------	------	-----	-----

C Zell-Zell-Wechselwirkungen, Migration und Adhäsion, Bildung des Zellgerüsts

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Human DLG (Drosophila Disc Large) Homolog 1	NM_004087.1	88 %	1,13	1,09	0,16	0,21	2,2	2,1
Protein Tyrosine Kinase 9 (PTK 9)	AW665024	77 %	1,22	1,3	0,22	0,37	2,3	2,5
Migration Stimulation Factor FN70	AJ276395.1	66 %	1,51	1,49	0,48	0,49	2,8	2,8
IQ Motif-Containing GTPase-Activating Protein 1 (IQGAP1 / p195)	A1679073	66 %	1,25	1,29	0,3	0,4	2,4	2,4
EGF-Like Repeats and Discoidin I-Like Domains 3 (EDIL3) / Developmentally Regulated Endothelial Cell Locus 1 (DEL1)	NM_005711.1	66 %	1,09	1,04	0,31	0,5	2,1	2,1
CD164 Antigen (Sialomucin)	AF263279.1	66 %	0,99	1	0,15	0,08	2,0	2,0
Laminin, Beta 1 (LAMB1)	NM_002291.1	66 %	0,96	0,98	0,36	0,6	1,9	2,0
Lysyl Oxidase	BE503425	66 %	0,92	0,87	0,29	0,45	1,9	1,8

D Regulation der Transkription und Translation, Zellproliferations- und Zellzykluskontrolle

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Histone Deacetylase 1 (HDAC1 / HD1)	NM_004964.2	66 %	1,32	1,31	0,46	0,65	2,5	2,5
Thyroid Hormone Receptor Interactor 8 (TRIP8)	A1694023	66 %	1,29	1,23	0,51	0,56	2,4	2,3
Thyroid Hormone Receptor Interactor	A1131008	66 %	1,17	1,17	0,37	0,68	2,3	2,3

3 (TRIP3)								
Tyrosine-3-monooxygenase-tryptophan 5-monooxygenase activation protein, Epsilon Form (YWHAE)	AA502643	100 %	1,11	1,1	0,35	0,59	2,2	2,1
Inhibin-β C (INHBC)	NM_005538.1	66 %	1,06	1,07	0,26	0,27	2,1	2,1
Cell Division Cycle 2, G1 to S and G2 to M (CDC2) / Cyclin-Dependant Kinase 1 (CDK1)	AL524035	66 %	1,17	1,02	0,46	0,69	2,3	2,0
CDC2	NM_001786.1	66 %	0,99	0,94	0,26	0,36	2,0	1,9
CDC2 delta T	D88357.1	77 %	0,98	0,94	0,22	0,31	2,0	1,9
Nuclear Transcription Factor Y, Beta (NFYB)	NM_006166.2	66 %	1,04	1	0,36	0,51	2,1	2,0
Zinc Finger Protein 22 (ZNF22/KOX 15)	NM_006963.1	88 %	1,04	0,97	0,33	0,4	2,1	2,0
Homolog of S. Pombe RAD21 (SSC1)	BG289967	66 %	0,8	0,82	0,09	0,1	1,7	1,8
Cullin 4B (CUL4B)	AI650819	77 %	0,91	0,73	0,33	0,42	1,9	1,7

E Signaltransduktion

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Interferon-related developmental regulator (IFRD1)	NM_001550.1	88 %	1,05	0,86	0,38	0,64	2,1	1,8
EHK-1 receptor tyrosine kinase (EPHA5)	X95425.1	88 %	1,5	1,5	0,46	0,67	2,8	2,8
Interleukin 6 Signal Transducer (IL-6 ST / gp130 / Oncostatin M Receptor)	NM_002184.1	66 %	1,44	1,45	0,38	0,35	2,7	2,7
Non-Oncogenic Rho GTPase-specific GTP Exchange Factor (Proto-LBC)	AF127481.1	66 %	1,16	1,15	0,25	0,33	2,2	2,2
TRAF and TNF Receptor-Associated Protein	NM_016614.1	66 %	1,11	1,13	0,41	0,72	2,2	2,2

(TTRAP)								
Four-And-A-Half LIM Domains 1 (FHL1/SLIM1)	U29538.1	77 %	1,02	1	0,15	0,22	2,0	2,0
SH3-Binding Domain and Glutamic Acid-Rich Protein-Like Protein (SH3BGRL)	AL515318	66 %	0,96	0,89	0,3	0,38	1,9	1,9

F Regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit Apoptose

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
NCK-Associated Protein 1 (NCKAP1 / NAP1 / NAP125)	AK001291.1	77 %	1,57	1,56	0,38	0,56	3,0	2,9

G Metabolismus

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
N-Acetylglucosaminphosphate Mutase	BC001258.1	66 %	1,18	1,22	0,23	0,25	2,3	2,3
Electron Transfer Flavoprotein-Ubiquinone Oxidoreductase (ETFQO)	S69232	66 %	1,11	1,14	0,34	0,55	2,2	2,2

H Regulation von oder über immunologische Mediatoren

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Transcription Factor 8 / Zinc Finger Homeodomain Protein (TCF8 / Nil-2-a)	U12170.1	88 %	1,37	1,35	0,31	0,55	2,6	2,5
Interferon-Stimulated Transcription Factor 3, Gamma (ISGF3G)	N/A	66 %	0,76	0,72	0,1	0,16	1,7	1,6

I Hormonhaushalt

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR- Mittel- wert	SLR- Median	SLR- SD	SLR- IQ	Regulations- faktor (Mittelwert)	Regulations- faktor (Median)
Aspartate Beta- Hydroxylase (ASPH)	NM_004318.1	77 %	1,2	1,18	0,25	0,28	2,3	2,3
Membrane Metallo- endopeptidase (Enkephalinase / Neutral Endopeptidase / NEP CALLA / CD10)	A1433463	77 %	1,05	0,96	0,28	0,44	2,1	1,9

J Moleküle mit antioxidativen Wirkungen und „Anti-Stress“-Moleküle

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR- Mittel- wert	SLR- Median	SLR- SD	SLR- IQ	Regulations- faktor (Mittelwert)	Regulations- faktor (Median)
Paraoxonase 2 (PON2)	AF001602.1	100 %	0,96	0,79	0,29	0,52	1,9	1,7
Biliverdin Reductase A	AA740186	88 %	1,2	1,16	0,29	0,28	2,3	2,2
Tumor Rejection Antigen 1 (Tra1) / Heat Shock Protein gp96	AK025862.1	66 %	1,7	1,67	0,52	0,8	3,2	3,2

K Transkription – allgemein

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR- Mittel- wert	SLR- Median	SLR- SD	SLR- IQ	Regulations- faktor (Mittelwert)	Regulations- faktor (Median)
Poly(A) Polymerase, Alpha (PAPOLA)	BC000927.1	66 %	1,25	1,31	0,44	0,64	2,4	2,5
Poly(A) Polymerase, Alpha (PAPOLA)	BC000927.1	77 %	1,22	1,24	0,34	0,48	2,3	2,4
Poly(A) Polymerase, Alpha (PAPOLA)	A1984479	77 %	1,16	1,09	0,39	0,64	2,2	2,1

L DNA-Reparatur

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
RecQ Protein-Like (DNA Helicase Q1-Like)	NM_002907.1	66 %	1,21	1,27	0,24	0,3	2,3	2,4

M Sonstige

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Ubiquitin-Like 5 (UBL5)	NM_024292.1	66 %	1,18	1,18	0,48	0,85	2,3	2,3
Capillary Morphogenesis Gene 1 (CMG1)	AI610355.1	66 %	1,19	1,18	0,23	0,16	2,3	2,3
Topoisomerase (DNA) II Alpha (TOP2A)	AU159942	66 %	1,16	1,09	0,41	0,53	2,2	2,1

Teil B: Herunterregulierte Gene**A Vesikuläre Fusion und vesikulärer Transport**

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
EH domain-binding mitotic phosphoprotein (EPSIN)	NM_013333.1	77 %	-1,99	-1,89	0,67	0,65	-4,0	-3,7

B Zell-Zell-Wechselwirkungen, Migration und Adhäsion, Bildung des Zellgerüsts

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Vinexin-beta	NM_005775.1	66 %	-1,22	-1,22	0,32	0,39	-2,3	-2,3
Rho GDP Dissociation Inhibitor (GDI) Alpha (RHOGDI)	AI571798	66 %	-1,15	-0,95	0,44	0,45	-2,2	-1,9

C Regulation der Transkription und Translation, Zellproliferations- und Zellzykluskontrolle

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
JunD	AI762296	66 %	-1,03	-1,13	0,52	0,61	-2,0	-2,2

D Regulatorische Funktionen im Zusammenhang mit Apoptose

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
FK506-Binding Protein 8 Homolog (FKBP8 / FKBP38 Homolog)	L37033	66 %	-1,4	-1,45	0,79	1,27	-2,6	-2,7
FK506-Binding Protein 8 (FKBP8 / FKBP38)	NM_012181.1	55 %	-0,54	-0,44	0,26	0,3	-1,5	-1,4
p53 Cellular Tumor Antigen	K03199.1	66 %	-0,89	-0,88	0,13	0,15	-1,9	-1,8

E Translation – allgemein

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Eukaryotic Translation Initiation Factor 2, Subunit 3 (EIF2S3)	NM_001415.1	77 %	-0,66	-0,56	0,34	0,54	-1,6	-1,5

F Sonstige

Genbezeichnung (Gensymbol)	GenBank Accession Number	% KVÜ	SLR-Mittelwert	SLR-Median	SLR-SD	SLR-IQ	Regulationsfaktor (Mittelwert)	Regulationsfaktor (Median)
Biglycan (Proteoglycan-I / PG-I)	NM_001711.1	66 %	-0,77	-0,67	0,3	0,42	-1,7	-1,6

Tabelle 10: Zusätzliche quantitative Ergebnisdaten der Oligo GEArray Microarray-Experimente mit der Hs578T-Brustkrebszelllinie

Array.1 = Werte für unbehandelte Hs578T-Zellen

Array.2 = Werte für mit IGFBP-2 behandelte Hs578T-Zellen (2000 ng/ml IGFBP-2)

HK = Hintergrund-korrigiert

Norm = Normalisiert

Gen (Symbol)	GenBank Accession Number	Array.1	Array.2	Array.1 _{HK/Norm}	Array.2 _{HK/Norm}	Array.2 _{HK/Norm} - Array.1 _{HK/Norm}	Array.2 _{BC/Norm} / Array.1 _{BC/Norm}
BLMH	NM_000386	14141	18269	6425	9884	3459	1,54
CDKN2B	NM_004936	17503	28296	10118	19911	9793	1,97
CLNS1A	NM_001293	20745	30403	13678	22018	8340	1,61
CLTC	NM_004859	12508	17015	4632	8630	3998	1,86
COX6C	NM_004374	17352	26096	9952	17711	7759	1,78
DDX10	NM_004398	12183	14805	4275	6420	2145	1,50
GAPD	NM_002046	50522	31839	46378	23454	-22924	-1,98
HLA-G	NM_002127	12723	16352	4868	7967	3099	1,64
HMGB1	NM_002128	26571	39611	20076	31226	11150	1,56
HSPA8	NM_006597	26743	39598	20265	31213	10948	1,54
HYOU1	NM_006389	16141	22934	8622	14549	5927	1,69
IGF2R	NM_000876	17076	23706	9649	15321	5672	1,59
IGFBP3	NM_000598	23813	35248	17047	26863	9816	1,58
ILK	NM_004517	19673	33787	12501	25402	12901	2,03
IRF3	NM_001571	14143	19247	6428	10862	4434	1,69
ITGA3	NM_002204	16731	25402	9270	17017	7747	1,84
KPNA2	NM_002266	12268	17180	4369	8795	4426	2,01
KRT18	NM_000224	13510	18657	5733	10272	4539	1,79
LAMB1	NM_002291	24638	48000	17953	39615	21662	2,21
MAP2K2	NM_030662	23572	49127	16782	40742	23960	2,43
MARS	NM_004990	16621	31188	9149	22803	13654	2,49
MGST1	NM_020300	13654	22584	5891	14199	8308	2,41
MSH6	NM_000179	11755	14436	3805	6051	2246	1,59
MYC	NM_002467	13070	20200	5249	11815	6566	2,25
MYD88	NM_002468	10849	14289	2810	5904	3094	2,10
NF2	NM_000268	14750	21873	7094	13488	6394	1,90
NFKB1	NM_003998	11522	16307	3549	7922	4373	2,23
NME1	NM_000269	20586	30719	13503	22334	8831	1,65
NME3	NM_002513	11850	14927	3910	6542	2632	1,67
NOTCH2	NM_024408	12714	21651	4858	13266	8408	2,73
NPM1	NM_199185	37629	57333	32220	48948	16728	1,52
NQO1	NM_000903	26384	48010	19871	39625	19754	1,99
NR2F1	NM_005654	12139	16690	4227	8305	4078	1,96
PCNA	NM_182649	17082	25025	9655	16640	6985	1,72
PFDN5	NM_002624	18821	34087	11565	25702	14137	2,22
PLK2	NM_006622	12576	19286	4707	10901	6194	2,32
PPARD	NM_006238	13206	17455	5399	9070	3671	1,68

PRDX2	NM_005809	22081	34109	15145	25724	10579	1,70
PRDX4	NM_006406	26389	39541	19876	31156	11280	1,57
PRKAR1A	NM_002734	16360	25882	8862	17497	8635	1,97
PRNP	NM_183079	13642	20785	5877	12400	6523	2,11
PSMA1	NM_002786	11559	16167	3590	7782	4192	2,17
PTN	NM_002825	13480	17669	5700	9284	3584	1,63
RAB5A	NM_004162	11850	17331	3910	8946	5036	2,29
RAC1	NM_006908	12479	17138	4600	8753	4153	1,90
RAF1	NM_002880	12723	16877	4868	8492	3624	1,74
RB1	NM_000321	13014	19072	5188	10687	5499	2,06
RBBP4	NM_005610	13216	19928	5410	11543	6133	2,13
REA	NM_007273	18036	29208	10703	20823	10120	1,95
RELB	NM_006509	12092	16869	4175	8484	4309	2,03
RPN2	NM_002951	27486	41544	21081	33159	12078	1,57
SERPINH1	NM_001235	12122	16068	4208	7683	3475	1,83
SFN	NM_006142	14342	21039	6646	12654	6008	1,90
SIVA	NM_006427	16642	24930	9172	16545	7373	1,80
SLC20A1	NM_005415	16607	26839	9134	18454	9320	2,02
SNAI2	NM_003068	19002	32606	11764	24221	12457	2,06
SND1	NM_014390	19377	34406	12176	26021	13845	2,14
SOCS1	NM_003745	12107	17385	4192	9000	4808	2,15
STAT2	NM_005419	16985	24047	9549	15662	6113	1,64
TCF7L2	NM_030756	18122	29064	10797	20679	9882	1,92
TGFA	NM_003236	11861	15491	3922	7106	3184	1,81
TIMP1	NM_003254	15328	30932	7729	22547	14818	2,92
TLE1	NM_005077	14933	26066	7295	17681	10386	2,42
TNF	NM_000594	10551	14192	2483	5807	3324	2,34
TNFRSF10A	NM_003844	19521	29485	12334	21100	8766	1,71
TNFRSF6	NM_152877	16969	24096	9531	15711	6180	1,65
TNFSF7	NM_001252	12101	15478	4185	7093	2908	1,69
TP73	NM_005427	10559	14660	2492	6275	3783	2,52
TRAM1	NM_014294	14400	25057	6710	16672	9962	2,48
TSG101	NM_006292	11651	14723	3691	6338	2647	1,72
TXNRD1	NM_003330	12424	18288	4540	9903	5363	2,18
UBE2L6	NM_004223	14660	20768	6995	12383	5388	1,77
VDAC1	NM_003374	12906	18768	5069	10383	5314	2,05
WNT5A	NM_003392	13024	19362	5199	10977	5778	2,11
NONO	NM_007363	12739	18232	4886	9847	4961	2,02
YES1	NM_005433	11580	15682	3613	7297	3684	2,02
ZAP70	NM_001079	13075	19967	5255	11582	6327	2,20

Tabelle 11: Real-Time PCR-Primer

Die Real-Time PCR-Primer wurden nach den in Abschnitt 4.2.10 beschriebenen Kriterien entworfen. Die zugrundeliegenden Gensequenzen stammen aus der Sequenzdatenbank (GenBank) des NCBI und können mit Hilfe der hier angegebenen „Accession Number“ abgerufen werden. Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer wurde dem Datenblatt des Primer-Herstellers MWG Biotech entnommen.

Primer-Bezeichnung	Primer-Länge [Basen]	Sequenz	T_m [°C]	Basis-Sequenz für Amplikon (Accession Number)	Länge des erwarteten PCR-Produkts [bp]
B2M_for	25	5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3'	59,7	Homo sapiens Beta-2-Microglobulin (NM_004048.1)	86
B2M_rev	22	5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'	62,1		
BCL2_up	22	5'-TCATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3'	60,3	Homo sapiens B-Cell CLL / Lymphoma 2 (NM_000633.1)	168
BCL2_dn	24	5'-TACAGTTCCACAAAGGCATCCCAG-3'	62,7		
IGF1R_for	23	5'-AGGATATTGGGCTTTACAACCTG-3'	58,9	Homo sapiens Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (NM_000875.2)	145
IGF1R_rev	23	5'-GGCTTATTCCCCACAATGTAGTT-3'	58,9		
Ilp45_for	24	5'-ATACCTGGGCTATGACTGGATTGC-3'	62,7	Invasion Inhibitory Protein 45 (AK024020.1)	124
Ilp45_rev	24	5'-GCAGATACACTCCTCCTTGTGGT-3'	62,7		
LAMB1_up	24	5'-TTGCTGGCCAGTGTCCGGTGTAAT-3'	62,7	Homo sapiens Laminin, Beta 1 (LAMB1) (NM_002291.1)	131
LAMB1_dn	24	5'-TGTTCCCAGAGGATTGCAAGCACA-3'	62,7		
NFkB_for	21	5'-GCCTGACTTTGAGGGACTGTA-3'	59,8	Homo sapiens NFkB Subunit (X61499.1)	137
NFkB_rev	21	5'-CTAGATGCAAGGCTGTTCGTC-3'	59,8		
p53_for	24	5'-ACCGGCGCACAGAGGAAGAGAATC-3'	66,1	Human p53 Cellular Tumor Antigen (K03199.1)	109
p53_rev	24	5'-TGGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTG-3'	66,1		
TGFB1_up	24	5'-AGTGGACATCAACGGGTTCACTAC-3'	62,7	Homo sapiens Transforming Growth Factor, Beta 1 (NM_000660.1)	145
TGFB1_dn	24	5'-GTGGAGCTGAAGCAATAGTTGGTG-3'	62,7		

Tabelle 12: Gegen humane IGFBP-2-mRNA gerichtete siRNA-Moleküle

Diese Tabelle listet die Sequenzen der siRNA-Moleküle auf, welche zur Herunterregulierung der IGFBP-2-Expression in A673-Zellen eingesetzt werden sollten (Abschnitt 4.2.3). Neben der hier aufgeführten Sequenz, welche komplementär zur Zielsequenz ist, besitzen die siRNAs zusätzlich einen dTdT-Überhang, der für ihre RNAi-Wirkung ebenfalls erforderlich ist.

siRNA-Bezeichnung	Länge [Basen]	Sequenz	Zielsequenz (Accession Number)
Bp-2TPAE	21	5'-AACACCGGCAGAAAACGGAGA-3'	Homo sapiens Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 (X16302.1)
Bp-2NCDK	21	5'-AACTGTGACAAGCATGGCCTG-3'	

10. Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
A	Ampere
BCA	Bicinchoninsäure („Bicinchoninic Acid“)
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CCD-Kamera	„Charged Couple Device“-Kamera
cDNA	copy-DNA
cf.	„confer“ (= vgl.)
cpm	Zählereignisse pro Minute („Counts per Minute“)
cRNA	copy-RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („Deoxyribonucleic Acid“)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor („Epidermal Growth Factor“)
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
evt.	eventuell
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fötale Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
ggf.	gegebenenfalls
GH	Wachstumshormon („Growth Hormone“)
h	Stunde(n)
HBD	Heparin Binding Domain
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV-1	„Human Immunodeficiency Virus 1“
HRP	Meerrettich-Peroxidase („Horseradish Peroxidase“)

IGF	„Insulin-like Growth Factor“
IGF1R	IGF-I-Rezeptor
IGF2R	IGF-II-Rezeptor
IGFBP	„Insulin-like Growth Factor Binding Protein“
IGFBP-rP	„IGFBP-related Proteins“
i.d.R.	in der Regel
incl.	inklusive
IQ	Interquartil
l	Liter
m	Milli
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Adhäsionskinase
min	Minute(n)
mRNA	„Messenger“-Ribonukleinsäure
N/A	nicht anwendbar / nicht verfügbar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
o.ä.	oder ähnliches
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
PTEN	„Phosphatase and Tensin Homolog“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RF	Regulationsfaktor
RFU	„Relative Fluorescence Units“
rh	rekombinant-human
RIA	Radioimmunoassay
RISC	„RNA-Induced Silencing Complex“
RNA	Ribonukleinsäure („Ribonucleic Acid“)
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“)
rpm	Umdrehungen (Rotationen) pro Minute
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung („Standard Deviation“)

SDS	Natriumlaurylsulfat („Sodium Dodecyl Sulfate“)
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler („Standard Error of Mean“)
siRNA	„Small Interfering RNA“
SLR	„Signal Log Ratio“
SNP	„Single Nucleotide Polymorphism“
sog.	sogenannte(n)
TBE	Tris-Borat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur („Melting Temperature“)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs	versus (gegen)
WWW	World Wide Web
z.B.	zum Beispiel

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mechanismus der siRNA-Wirkung	15
Abb. 2: Ablauf eines cDNA-Microarray-Experiments	17
Abb. 3: Ablauf eines Oligonucleotid-Microarray-Experiments	18
Abb. 4: Photolithographische in situ Synthese von Oligonukleotiden zur Herstellung von Affymetrix GeneChips®	19
Abb. 5: Pseudofarbenplot eines cDNA-Microarrays.....	20
Abb. 6: Visualisierung eines Affymetrix-Microarrays.....	21
Abb. 7: Visualisierung eines Oligo GEArray® Microarrays	21
Abb. 8: Beispiel eines „Perfect Match“-/ „Mismatch“-Oligonukleotid-Paars.....	22
Abb. 9: Schmelzkurvenanalyse – Auftragung der Temperatur gegen die Fluoreszenz.....	27
Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse – 1. negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur gegen die Temperatur	28
Abb. 11: Ermittlung des Ct-Wertes aus einem Amplifikationsdiagramm.....	29
Abb. 12: Chemilumineszenz-Detektion auf den Oligo GEArray® Human Cancer Microarrays mit markierter Hs578T-cRNA.....	73
Abb. 13: mRNA-Expressionslevel von TGF β -1 LAMB1, NF κ B, p53, Bcl-2 und Ilp45 in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen	98
Abb. 14: mRNA-Expressionslevel von TGF β -1 LAMB1, IGF1R, NF κ B, p53, Bcl-2 und Ilp45 ausgewählter Gene in 293-10 und 293-4 Zellen.....	99
Abb. 15: Proteinexpression von NF κ B in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	102
Abb. 16: Proteinexpression von p53 in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	103
Abb. 17: TGF β -1 Sekretion von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	104
Abb. 18: Apoptose-Quantifizierung in Hs578T-Zellen mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	106
Abb. 19: Apoptose-Quantifizierung in 293-10 und 293-4 Zellen mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	107
Abb. 20: Apoptose-Quantifizierung in Hs578T-Zellen mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Staining Kits	108
Abb. 21: IGFBP-2-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von siRNA-transfizierten A673-Zellen.....	111
Abb. 22: IGFBP-3-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	112
Abb. 23: IGF-II-Konzentration im Zellkulturüberstand von mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	113

Abb. 24: Dosisabhängigkeit des Einflusses der IGFBP-2-Konzentration auf die IGF-II-Konzentration	114
Abb. 25: Ein mögliches Regulationsnetzwerk in Form von Wechselwirkungen IGFBP-2-regulierter Gene.....	126

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkrankungen des Menschen, welche mit einem veränderten IGFBP-2-Serumlevel einhergehen.....	10
Tabelle 2: Tumorarten mit erhöhten IGFBP-2-Leveln.....	11
Tabelle 3: Pipettierschema für die Radioimmunoassays zur Bestimmung von IGFBP-2, IGFBP-3 und IGF-II im Zellkulturüberstand.....	47
Tabelle 4: Affymetrix Microarray-Ergebnisse – Potentiell durch IGFBP-2 hoch- bzw. herunter-regulierte Gene in der Brustkrebszelllinie Hs578T.....	62
Tabelle 5: Oligo GEArray® Human Cancer Microarray-Ergebnisse – Potentiell durch IGFBP-2 regulierte Gene in der Brustkrebszelllinie Hs578T.....	74
Tabelle 6: Real-Time RT-PCR-Ergebnisse – Änderung der Expression ausgewählter Gene in mit IGFBP-2 behandelten und unbehandelten Hs578T-Zellen.....	100
Tabelle 7: Real-Time RT-PCR-Ergebnisse – Änderung der Expression ausgewählter Gene in 293-10 und 293-4 Zellen.....	100
Tabelle 8: Verbindungen zwischen den Proteinprodukten IGFBP-2-regulierter Gene.....	123
Tabelle 9: Zusätzliche quantitative Ergebnisdaten der Affymetrix Microarray-Experimente.....	151
Tabelle 10: Zusätzliche quantitative Ergebnisdaten der Oligo GEArray Microarray-Experimente mit der Hs578T-Brustkrebszelllinie.....	158
Tabelle 11: Real-Time PCR-Primer.....	160
Tabelle 12: Gegen humane IGFBP-2-mRNA gerichtete siRNA-Moleküle.....	161

13. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Martin W. Elmlinger an der Kinderklinik Tübingen in der Abteilung für Pädiatrische Endokrinologie durchgeführt.

Das Projekt wurde finanziell unterstützt durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG EL 167 / 3-2 und RE 1562/1-2, SPP 1117) und durch das „Growth Research Center“ (Pfizer).

Zuallererst möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Martin W. Elmlinger für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Betreuung dieser Arbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen recht herzlich bedanken.

Prof. Dr. Michael B. Ranke danke ich für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenso danke ich Frau Prof. Gabriele Dodt für ihre Bereitschaft, die Mitbetreuung meiner außerfakultären Doktorarbeit zu übernehmen, und die interessanten Doktorandenseminare.

Dr. Burkhardt S. Schütt bin ich für seine Hilfsbereitschaft dankbar.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des endokrinologischen Labors für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke Karin Weber für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Durchführung von Radioimmunoassays.

Prof. Dr. Andreas Höflich danke ich für die Bereitstellung der stabil transfizierten HEK-293 Zellklone.

Bei Frau Dr. Katharina Reichenmiller bedanke ich mich für die Möglichkeit, den BioRad iCycler für Real-Time PCR-Messungen benutzen zu können.

Für seine Hilfe bei der Einarbeitung in die Bedienung des BioRad iCyclers danke ich Christian Klein.

Ich danke auch Nadine Kemmler für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Bedienung des FACSCalibur Durchflußzytometers.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die stetige Unterstützung in allen Lebenslagen.

14. Liste der akademischen Lehrer

Albert K.	Hiller W.	Probst H.
Bauer H.	Iftner T.	Reutter K.
Bayer E.	Jäger W.	Riedinger H.-J.
Bisswanger H.	Jung G.	Sarrazin W.
Dringen R.	Kapurniotu A.	Schwarz M.
Bock K.	Keller K.-D.	Selzer P.
Bohley P.	Kiebler M.	Spang A.
Breyer-Pfaff U.	Kohlbau J.	Steinbeisser H.
Buchmann A.	Lindner E.	Stock W.
Dotd G.	Machulla H.-J.	Stoeva S.
Eisele K.	Maier J.	Verleysdonk S.
Elmlinger M.	Mayer W.-E.	Voelter W.
Gauglitz G.	Mecke D.	Voigt J.
Götz F.	Müller J.	Weber U.
Grabmayr P.	Münzel P.	Wegmann K.
Günzl H.	Nakel W.	Werringloer J.
Häfelinger G.	Overath P.	Weser U.
Hagenmaier H.	Pfeiffer W.	Wiesinger H.
Hamprecht B.	Pfeiffer-Guglielmi B.	Wohlleben W.
Hanack M.	Kissling G.	
Hartmann H.-J.	Pommer H.	