

**Molekulare Charakterisierung Tumor-assoziiertes  
Kandidatengene in gynäkologischen Tumoren**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Malgorzata Czystowska  
aus Grójec/Polen**

**Düsseldorf 2005**

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik  
der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Dall  
Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2006

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Allgemeine Charakterisierung gynäkologischer Tumore.....	1
1.1.1	Das Mammakarzinom.....	2
1.1.2	Das Ovarialkarzinom .....	2
1.2	Molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese: Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reparaturgene.....	3
1.3	Bedeutung von epigenetischen Veränderungen für die Karzinogenese .....	5
1.4	Zellproliferation, Zellzyklus-Kontrolle und Apoptose als entscheidende Prozesse für die Karzinogenese .....	7
1.5	Identifizierung von differenziel exprimierten Kandidatengene durch „in silico“-Methoden .....	10
1.6	Das IGF-System.....	11
1.7	Zielsetzung.....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND GERÄTE</b> .....	<b>16</b>
2.1	Patientenmaterial .....	16
2.2	Bakterienstämme .....	16
2.3	Zelllinien.....	16
2.4	Plasmide .....	18
2.5	Oligonukleotide und shRNAs.....	18
2.6	Antikörper und rekombinante Proteine.....	21
2.7	Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.8	Reagenzien-Kits.....	22
2.9	Puffer und Lösungen .....	23
2.10	Sonstige Materialien.....	23
2.11	Geräte.....	24
2.12	Software und Datenbanken .....	24
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1.1	DNA/RNA-Isolierung .....	25
3.1.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebe.....	25
3.1.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen.....	25
3.1.1.3	Isolierung genomischer DNA aus Vollblut bzw. Blutlymphozyten.....	25
3.1.1.4	RNA-Isolierung aus Gewebe .....	26
3.1.1.5	RNA-Isolierung aus Zellkulturen .....	26

3.1.1.6	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA .....	26
3.1.1.7	Kontrolle der cDNA-Synthese mittels $\beta$ -Actin-PCR.....	27
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	27
3.1.3.1	PCR-Amplifikation zur LOH-Analyse.....	27
3.1.3.2	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression .....	28
3.1.4	Sequenzierung .....	30
3.1.5	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	30
3.1.6	Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten.....	31
3.1.6.1	Agarosegel-Elektrophorese .....	31
3.1.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	31
3.1.7	Mutationsanalyse mittels DHPLC.....	32
3.1.8	Methylierungsanalyse mittels DHPLC.....	32
3.1.9	Klonierung.....	34
3.1.9.1	Restriktionsanalyse von DNA .....	34
3.1.9.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.1.9.3	Ligation .....	35
3.1.9.4	Herstellung kompetenter E.coli-Zellen .....	35
3.1.9.5	Transformation von E.coli mittels Elektroporation.....	35
3.1.9.6	Plasmidpräparation .....	35
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.2.1	Kultivierung und Passagierung von Zelllinien.....	36
3.2.2	Kryokonservierung .....	37
3.2.3	Mycoplasmen-Test.....	37
3.2.4	Funktionelle Assays mit Zelllinien .....	37
3.2.4.1	Promotor-Demethylierung nach Behandlung mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin .....	37
3.2.4.2	Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I).....	38
3.2.4.3	Proliferationsassay .....	38
3.2.4.4	Invasionsassay.....	39
3.2.4.5	Poly-HEMA-Assay.....	40
3.2.4.6	Soft-Agar-Colony-Formation-Assay .....	41
3.2.5	Apoptose-Assays .....	41
3.2.5.1	Quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen mittels ELISA nach Kristalviolett-Färbung .....	41
3.2.5.2	FACS-Analyse nach Propidium-Iodid-Färbung (Nicoletti) .....	42
3.2.6	Transfektion von Zelllinien.....	43
3.2.6.1	Liposomale Transfektion mit FUGENE .....	43
3.2.6.2	Stabile Transfektion adenoviraler Expressionsplasmide.....	43

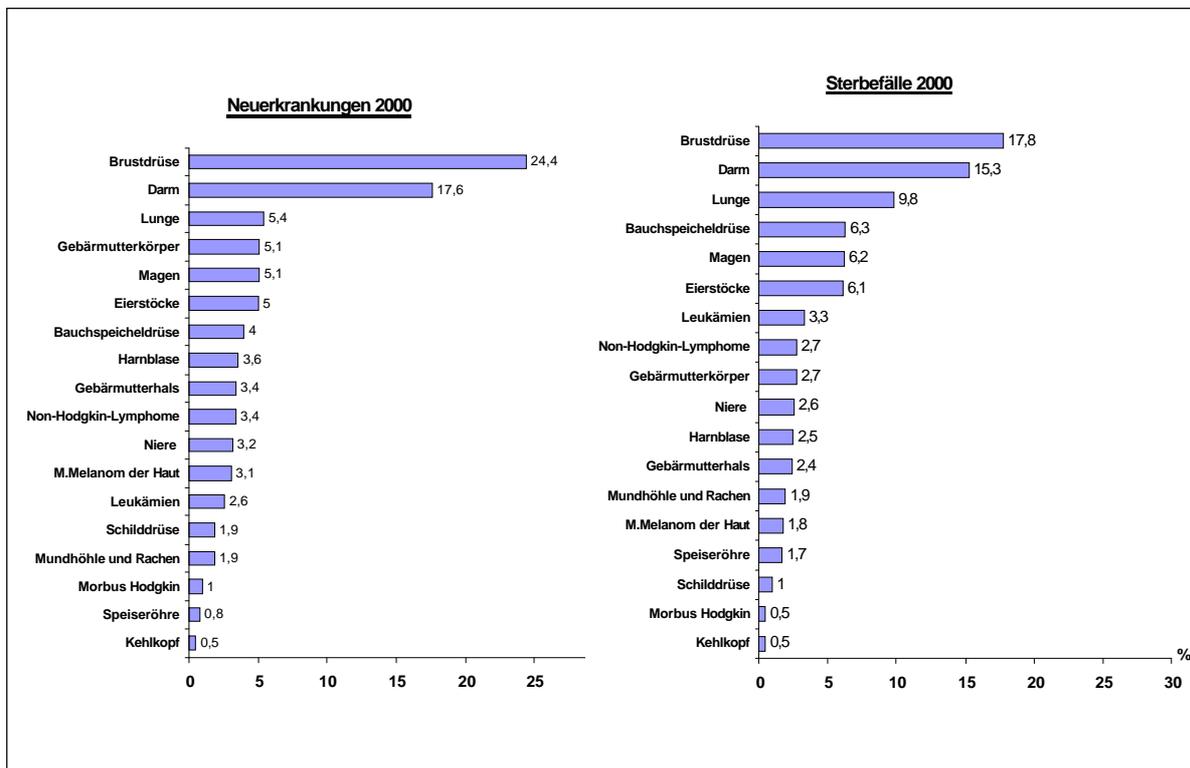
3.2.7	Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz .....	43
3.2.7.1	Konstruktion geeigneter shRNAs .....	44
3.2.7.2	Klonierung der shRNAs in pLV-TH .....	45
3.2.7.3	Virale Transfektion der siRNA-Expressionsvektoren in Tumorzellen .....	45
<b>3.3</b>	<b>Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Aufkonzentrierung von Zellkulturüberstand .....	45
3.3.2	Proteinisolierung aus Zelllinien .....	46
3.3.3	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure .....	46
3.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	46
3.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.3.6	Westernblot.....	48
3.3.7	Immunopräzipitation von Proteinen aus Zellüberstand .....	49
<b>3.4</b>	<b>Immunohistochemische Methoden.....</b>	<b>49</b>
3.4.1.1	Anzucht von Zellen auf Objektträgern .....	49
3.4.1.2	Immunohistochemische Färbung.....	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Strategie zur experimentellen Verifizierung von Kandidatengen</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Verifizierung der differentiell exprimierten Kandidatengene über Northern Blot und quantitative RT-PCR .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>IGFBP-4 als ein neues Tumorsuppressor-Kandidatengen für das OvCa .....</b>	<b>56</b>
4.3.1	Identifizierung von OvCa-Tumoren mit einem IGFBP-4-Allelverlust mittels LOH-Feinkartierung.....	57
4.3.2	Mutationsanalyse von IGFBP-4 mittels DHPLC.....	58
<b>4.4</b>	<b>Promotor-Hypermethylierung des IGFBP-4-Gens .....</b>	<b>61</b>
4.4.1	Methylierungs-Analyse des IGFBP-4-Promotors mittels DHPLC .....	61
4.4.2	Reexpression von IGFBP-4 nach Behandlung mit einem Methyltransferase-Inhibitor .....	63
<b>4.5</b>	<b>Estrogen-Rezeptor-Abhängigkeit von IGFBP-4 in OvCa .....</b>	<b>65</b>
4.5.1	IGFBP-4-Reexpression in ER $\alpha$ -SKBR3-Transfektanten nach 5`-Aza-dC-Behandlung.....	66
4.5.2	ER-Expressionsanalyse in OvCa und Zelllinien.....	67
<b>4.6</b>	<b>IGFBP-4-Genregulation über GC-reiche Sequenzen als Bindestellen für ER/Sp1-Komplexe...69</b>	
4.6.1	Sp1-Protein als ein weiterer Regulationsfaktor für IGFBP-4:Sp1-Expressionsanalyse .....	69
4.6.2	Mutationsanalyse der GC-reichen ER/Sp1-Bindesequenzen innerhalb des IGFBP-4 -Promotors .....	70
<b>4.7</b>	<b>Zusammenhang der IGFBP-4-Expression mit der Expression anderer IGFBPs.....</b>	<b>72</b>
<b>4.8</b>	<b>Funktionelle Bedeutung von IGFBP-4.....</b>	<b>76</b>

4.8.1	Stabile Expression von IGFBP-4 in OvCa-Zelllinien über einen retroviralen Vektor .....	76
4.8.2	IGFBP-4-Silencing in MDAH-Zellen über lentiviral transfizierte shRNAs .....	78
4.8.3	Proliferation von OvCa-Zelllinien in Abhängigkeit von der IGFBP-4-Expression .....	81
4.8.4	Einfluss von IGFBP-4 auf den MAPK-Signalweg.....	82
4.8.5	Einfluss von IGFBP-4 auf die Zelladhäsion („Anchorage independent growth“) .....	84
4.8.6	Einfluss von IGFBP-4 auf die Invasivität von OvCa-Zellen .....	85
4.8.7	Rolle des IGFBP-4 für die Etoposid-vermittelte Apoptose in HEY-Zellen .....	86
4.8.8	Einfluss von IGFBP-4 auf pro- und anti-apoptotische Signalwege in HEY-Zellen.....	94
4.8.9	IGF-Abhängigkeit des pro-apoptotischen IGFBP-4-Effektes.....	98
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>102</b>
5.1	„Electronic Northern von EST-Bibliotheken als neue Methode zur Identifizierung tumorassoziierter Gene .....	102
5.2	Das IGFBP-4 -Kandidatengen als ein neues Tumorsuppressorgen für das Ovarial-Karzinom .....	102
5.3	Funktionelle Bedeutung des IGFBP-4 für das Ovarial-Karzinom .....	108
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>139</b>
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>141</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>143</b>
<b>13</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>149</b>

## 1 EINLETUNG

### 1.1 Allgemeine Charakterisierung gynäkologischer Tumore

Die gynäkologischen Malignome, d.h. Tumore der Brust, des Ovars und des Genitaltraktes gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau, wobei des Mammakarzinom den am häufigsten diagnostizierten Tumor und die häufigste Todesursache darstellt. Jährlich erkranken über 47.500 Frauen an Brustkrebs, davon fast die Hälfte im Alter unter 60 Jahren. Dank verbesserter Früh-Diagnose und intensiver Vorsorge-Untersuchungen (Mammographie) ist jedoch in den letzten Jahrzehnten die Überlebensrate erheblich gestiegen (5-Jahres-Überlebensrate: 76%). Der Ovarialkrebs stellt etwa 5% aller bösartigen Neubildungen bei Frauen dar. Die Inzidenz liegt damit zwischen Gebärmutterkörper- und Gebärmutterhalskrebs (siehe Abb.1.1). Dennoch ist die Sterblichkeit daran höher als an den beiden anderen Krebsarten zusammen. Die 5-Jahres-Überlebensrate im ersten Jahr liegt hier zwischen 20% und 40%, da wegen des zunächst relativ symptomfreien Verlaufs etwa 70 der Fälle erst in fortgeschrittenen Stadien (FIGO III und IV) diagnostiziert werden. 10% aller Ovarialkrebserkrankungen, zumeist vom Typ des Keimzelltumors, treten bereits unter 45 Jahren auf (mittleres Erkrankungsalter: 66 Jahre.)



**Abb.1.1:** Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen und an der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland 2000 (Dachdokumentation Krebs, Robert-Koch-Institut)

Das Endometriumkarzinom ist die vierthäufigste Krebslokalisation bei Frauen und die häufigste der weiblichen Genitalorgane. Sein Anteil an allen Todesfällen durch Krebs ist aufgrund der guten Prognose recht niedrig (2,7%), das mittlere Erkrankungsalter beträgt über 67 Jahre. Als Risikofaktoren gelten vor allem hormonelle Einflüsse (Östrogendauerstimulus).

Das Zervixkarzinom gilt heute in den westlichen Industrieländern als eine vermeidbare Erkrankung, da es lange präinvasiv bleibt und in diesem Stadium durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen diagnostiziert

und erfolgreich behandelt werden kann. Immerhin erkranken derzeit in Deutschland jährlich etwa 6.500 Frauen an dieser Krebsart, die deutlich häufiger bei jüngeren Frauen (25-35 Jahre) diagnostiziert wird. Die ursächliche Rolle der humanen Papillomaviren (HPV) für die Entstehung des Zervixkarzinoms gilt heute als gesichert.

Das häufigste Ursprungsgewebe der gynäkologischen Tumore ist das Epithel. Dessen Proliferation und Differenzierung werden über die Steroidhormone Östrogen und Progesteron reguliert. Zum Beispiel führt Östrogen im normalen Brustgewebe zur Zellteilung und Proliferation von glandulärem Epithel, wohingegen Progesteron zyklusabhängig eine Differenzierung und sekretorische Umwandlung des Lobulusepithels bewirkt. Somit unterliegt das Epithel während des Monats-Zyklus, der Schwangerschaft und der Menopause einem stetigen Wandel. Eine Fehlregulation dieser komplexen Vorgänge kann zur Transformation von gesunden Zellen zu Tumorzellen führen. Diese zeigen im Vergleich zu Normal-Zellen viele neue Eigenschaften, wie verstärkte Proliferation und Unsterblichkeit, schwache Differenzierung, Verlust der Kontaktinhibition, verstärkte Invasivität und Induktion von Neo-Angiogenese.

### 1.1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom (MaCa) geht in den meisten Fällen aus dem Epithel hervor, das die Milchgänge der weiblichen Brustdrüse auskleidet. Dabei unterscheidet man die duktales Anteile (*Ductus lactifer* = Milchgang), die die kleinen und größeren milchabführenden Gänge (Ductuli) bilden und die lobulären Anteile, die die milchproduzierenden Endstrukturen (Lobuli) darstellen. Ausgehend von diesen beiden Anteilen unterteilt man die Mammakarzinome in 2 Hauptgruppen: das häufiger vorkommende invasiv-ductale Karzinom (IDC, 70-80% aller Fälle) und das seltenere invasiv-lobuläre Karzinom (ILC, 10-20%). Beide Karzinomtypen sind bezüglich ihrer klinischen und histologischen Merkmale sehr heterogen. Etablierte prognostische Faktoren sind Erkrankungsalter und menopausaler Status der Patientin, histologischer Typ und TNM-Status des Tumors (UICC-Klassifikation) sowie der Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status. Sie erlauben die Auswahl einer geeigneten Therapie (z.B. Anti-Östrogen-Behandlung) sowie eine Abschätzung der langfristigen Prognose.

### 1.1.2 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom (OvCa) weist ein sehr umfangreiches histologisches Spektrum auf. Es kann aus dem Epithel (ca. 90%), dem Stroma oder den Keimzellen (ca. 5%) entstehen. Die epithelialen Tumore werden ihrerseits in seröse, muzinöse, endometroide und klarzellige Karzinome sowie maligne Brennertumore bzw. gemischte, undifferenzierte und unklassifizierbare Tumore unterteilt. Das Risiko für eine Erkrankung steigt ab dem 40. Lebensjahr signifikant an, wobei Infertilität, Nulliparität, dauerhafte ovulatorische Zyklen und Einnahme von ovulationsfördernden Medikamenten weitere Risikofaktoren darstellen. Die im Vergleich zum Mammakarzinom hohe Sterberate ist v. a. auf die späte Diagnose des Tumors zurückzuführen. Diese ist bedingt durch die fehlende Symptomatik im Frühstadium und den Mangel an spezifischen und sensitiven Screeningverfahren. Die Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht zum einen aus einer radikalen Operation des Tumors und zum anderen aus einer aggressiven postoperativen Platin/Paclitaxel-Kombinationstherapie. Der Erfolg einer solchen Chemotherapie hängt vom Grading und der histologischen Klassifikation sowie von der postoperativen Tumorrestgröße ab. Prognostische Faktoren sind wie beim MaCa das Alter, der histologische Typ und der TNM-Status.

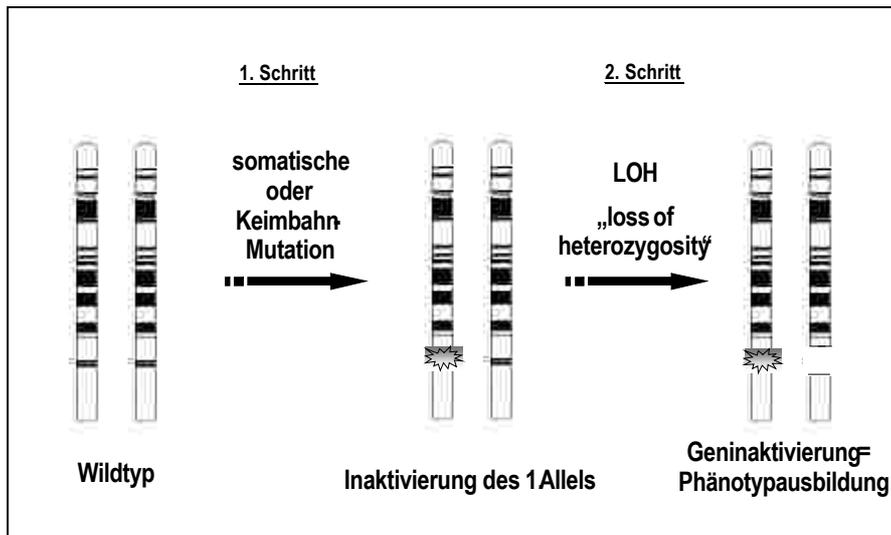
Die meisten gynäkologischen Tumore der Brust und des Ovars treten sporadisch auf als ein Effekt eines Mehrschrittprozesses, der mehrere Stadien umfasst: Hyperplasie, *in situ* Karzinom, invasives Karzinom. Dabei spielen neben den genetischen Faktoren auch physiologische Einflüsse (Hormone, Wachstumsfaktoren, Mutagene aus der Umwelt, etc) eine wichtige Rolle. Erst das Zusammenspiel der einzelnen genetischen und nicht-genetischen Faktoren führt letztendlich zur Tumorentstehung. Inwieweit die zeitliche Abfolge und das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren diesen Prozess beeinflussen, ist zur Zeit Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Die einzelnen Stadien mehrerer Krebsarten wurden bereits auf molekulargenetischer Ebene genauer charakterisiert und mit spezifischen genetischen Alternationen in Verbindung gebracht. Für manche Tumorarten konnten anhand genauer pathologischer und molekulargenetischer Untersuchungen bereits detaillierte Progressionsmodelle mit den für jedes Stadium betroffenen Genen aufgestellt werden, wie z.B. für das Kolorektalkarzinom (Cho und Vogelstein 1992). Aufgrund der hohen pathologischen Differenzierung und der komplexen Gen/Hormon-Wechselwirkungen bei gynäkologischen Tumoren ist es bislang noch nicht gelungen, ein ähnlich komplettes Tumorgenese-Modell für diese Tumore zu entwickeln.

## **1.2 Molekulargenetische Grundlagen der Karzinogenese: Onkogene, Tumorsuppressor-gene und DNA-Reparaturgene**

Die Entstehung und Progression maligner Tumore wird heute als Folge einer Anhäufung genetischer Defekte in einem mehrstufigen Prozess erklärt (Hanahan und Weinberg, 2000; Sledge und Miller, 2003). Sie können sowohl chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Inversionen, Deletionen und Polyploidien wie auch Veränderungen einzelner Gene durch Punktmutationen, Deletionen, Amplifikationen oder Hypermethylierung umfassen (Lengauer *et al* 1998) Diese genetischen Veränderungen beeinflussen die Expression bestimmter Gene und führen zum Erwerb neuer zellulärer Eigenschaften, die den transformierten Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber Normalzellen verschaffen. Es kommt zur klonalen Expansion dieser transformierten Zellen, begleitet von einer Anhäufung weiterer somatischer Mutationen, die den expandierenden Zellen zusätzliche Selektionsvorteile bieten und so schließlich zur Entstehung eines malignen Tumors führen. Aufgrund ihrer primären Wirkung auf das Zellwachstum werden die tumorassoziierten Gene in Onkogene (proliferationsfördernd) und in Tumorsuppressorgene (proliferationshemmend) eingeteilt.

Die proliferationsfördernden Onkogene entstehen aus Proto-Onkogenen, die durch die genetische Veränderung einen Funktionsgewinn („*gain of function*“) erlangen. Entweder sind sie dann konstitutiv aktiv oder sie werden unter Bedingungen aktiviert, unter denen das Wildtyp-Gen normalerweise nicht aktiv sein würde. Onkogene wirken dominant, denn bereits die Mutation nur eines der beiden homologen Allele führt zum Funktionsgewinn und Ausbildung des karzinogenen Phänotyps (Bishop *et al* 1983; Bishop *et al*, 1991; Prescott und Flexer, 1990). Diese genetische Veränderungen können über verschiedene Mechanismen entstehen: über Genamplifikation, die zur verstärkten Expression führt; über chromosomale Translokation, die das Proto-Onkogen in die Nähe eines häufig exprimierten Gens bringt oder durch eine einzige Punktmutation des Gens. Onkogene fungieren üblicherweise als Wachstumsfaktoren oder dessen Rezeptoren (c-ERBB2), Signalproteine (RAS), Transkriptionsfaktoren

(MYC, FOS, JUN), Kernproteine (MYB) Apoptoseinduktoren (BCL-2) etc. (Übersicht in Futreal *et al*, 2004; Vogelstein und Kinzler, 2004).



**Abb.1.2:** „Zwei-Schritt“-Modell nach Knudson (1971): Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verläuft in zwei Schritten. Nach Inaktivierung des ersten Allels durch eine Mutation kommt es durch Verlust der Heterozygotie zur Geninaktivierung und Phänotyp-Ausbildung

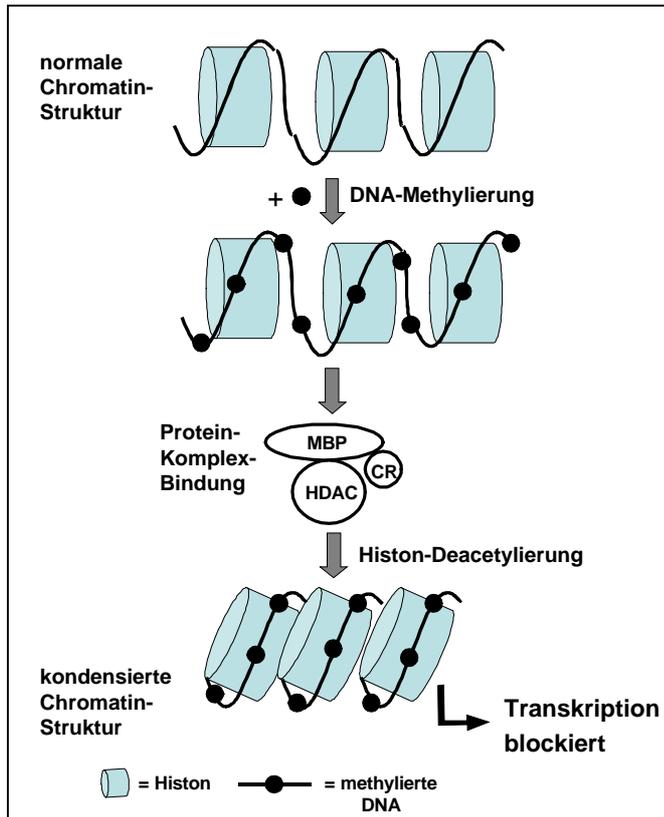
Tumorsuppressorgene (TSG) haben einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation und werden durch genetische Alterationen stets inaktiviert. Zu diesem Funktionsverlust („loss of function“) kommt es erst dann, wenn beide Allele, sowohl das maternale wie auch das paternale, betroffen sind. Die Mutation nur eines Allels – diese kann bereits in der Keimbahn erfolgen – führt nicht zur Ausbildung des Phänotyps. Dies geschieht erst nach dem Funktionsverlust des zweiten Allels („Two-hit“-Hypothese von Knudson, 1971). Meistens erfolgt diese „Zwei-Schritt“-Inaktivierung so, dass eine intragenische Mutation des einen Allels von einer Deletion des zweiten Allels durch den Verlust eines ganzen Chromosoms bzw. Chromosomenarms gefolgt wird (Abb.1.2). Eine solche chromosomale Instabilität wurde in Form von Aneuploidie in fast allen soliden Tumoren beobachtet (Duesberg und Li, 2003). Auf der molekularen Ebene werden Chromosomenverluste als Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“ = LOH) sichtbar. Durchschnittlich 25-30% der Allele einer normalen Zelle gehen in Tumoren verloren und sogar Verluste von 75% der Allele wurden beobachtet (Lengauer *et al*, 1998). Klassische wie auch moderne zytogenetische Studien von zahlreichen Tumoren bestätigen diese Beobachtungen (Mitelman, 2000, Albertson und Pinkel, 2003). In dem sie die Inaktivierung vieler Tumorsuppressorgene hervorrufen, scheinen diese gravierenden chromosomalen Veränderungen den Tumorzellen viele Vorteile zu bringen.

Die Tumorsuppressorgene können nach ihrer Funktion in sogenannte „Gatekeepers“ und „Caretakers“ eingeteilt werden (Kinzler und Vogelstein, 1997). „Gatekeeper“-Gene sind direkt in die Kontrolle der Zellproliferation eingebunden, indem sie an der Regulation der Zellzyklus-Kontrollpunkte („checkpoints“) teilnehmen. Klassische „Gatekeeper“-Proteine sind das Rb-Kernphosphoprotein und die Proteine der INK-Familie der cdk-Inhibitoren. Mutationen in den „Gatekeeper“-Genen resultieren in starker Zellproliferation. Die „Caretaker“-Gene haben hingegen einen indirekten Einfluss auf das Zellwachstum. Sie sichern die Integrität des Genoms und halten die Mutationsrate im Genom auf ein Minimum. Sie

umfassen die DNA-Reparatur-Gene („mismatch-repair“-, „nucleotide-excision-repair“- und „base-excision-repair“-Gene), die für die Reparatur der während der normalen DNA-Replikation bzw. durch Mutagen-Einfluss entstandenen Fehler sorgen, und Stabilitäts-Gene wie z.B. BRCA1, BLM und ATM, die die mitotische Rekombination und chromosomale Segregation kontrollieren. Die bekanntesten vererbaren Krebserkrankungen, das familiäre Brust-/Eierstockkarzinom oder Dickdarmkrebs (HNPCC) werden überwiegend durch Keimbahnmutationen einiger Stabilitätsgene (BRCA1, BRCA1, MUTYH, MLH1, MSH2) hervorgerufen. Die Mechanismen, die die Aneuploidie und chromosomale Instabilität in sporadischen Tumoren bedingen, sind noch weitestgehend unbekannt, obwohl einige Kandidatengene und Signalwege, die z.B. die Zellzyklus-Kontrollpunkte, Telomeren-Verlängerung und Centromere betreffen, bereits vorgeschlagen wurden (Rajagopalan *et al*, 2003; Shiloh und Kastan, 2001; Scully und Livingston, 2000; Maser und Depinho, 2002; Pihan und Doxsey, 2003).

### 1.3 Bedeutung von epigenetischen Veränderungen für die Karzinogenese

Neben Genen, die durch genetische Veränderungen wie Mutationen und Deletionen in Tumoren inaktiviert wurden, identifizierte man zahlreiche mit der Karzinogenese assoziierte Gene, die nicht mutiert waren. Man fand heraus, dass ihre veränderte Expression durch epigenetische Veränderungen, darunter v. a. durch veränderte Methylierungsmuster, bedingt war. Heute weiß man, dass solche epigenetischen Veränderungen einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung von Tumoren leisten (Baylin *et al*, 2001; Jones und Laird, 1999). Bei der epigenetischen Regulation ist vor allem der Grad der DNA-Hypermethylierung des Gens und die damit verbundene Veränderung der Packungsdichte des Chromatins entscheidend. Bei Säugern ist die DNA-Methylierung essentiell für eine normale Embryogenese und das Gen-Imprinting. Sie stellt die einzige natürlich vorkommende Modifikation der DNA dar und betrifft nur die von einer Guanin-Base gefolgte Cytosin-Basen. Genomweit liegt die Häufigkeit solcher CpG-Dinukleotide unter dem theoretischen statistischen Wert, was als CG-Suppression bezeichnet wird. In der Promotorregion und den ersten Exons von Genen liegt die CpG-Frequenz jedoch deutlich höher. Diese sogenannten CpG-Inseln repräsentieren ca. 1% des Genoms und sind in ca. der Hälfte aller Promotoren, besonders von Genen, die an der Tumor-Suppression beteiligt sind nachgewiesen worden (Bird, 1986). In normalen Zellen sind ungefähr 70% aller CpG-Nucleotide im Genom methyliert, die meisten CpG-Inseln in Promotoren sind dagegen zunächst unmethyliert. Eine generelle Verminderung der DNA-Methylierung (Hypo-Methylierung) wird als Ursache der genetischen Instabilität bei Neoplasien beschrieben und mit der Aktivierung einiger Onkogene (BCL-2, KRAS) assoziiert. Eine Methylierung der CpG-Inseln im Promotorbereich (Hypermethylierung) bewirkt hingegen eine Gen-Inaktivierung. Eine solche Hypermethylierung wurde in verschiedenen Tumortypen im Promotorbereich von vielen Tumorsuppressorgenen nachgewiesen (Jones und Baylin, 2002; Wajed *et al*, 2001). So wird das BRCA1-Gen in 10-15% der nichtfamiliären Mamma-Karzinome, das VHL-Gen, das für das von-Hippel-Lindau-Syndrom verantwortlich ist, in mehr als 70% der Nierenzellkarzinome und das bei familiären Formen des Mamma-, Kolon- und Nierenkarzinoms bedeutsame STK11-GEN (Serin/Threonin-Proteinkinase) durch DNA-Hypermethylierung inaktiviert. Das am häufigsten methylierte TSG ist das p16, das in einer Vielzahl von Tumortypen epigenetisch verändert ist (Herman *et al*, 1995).

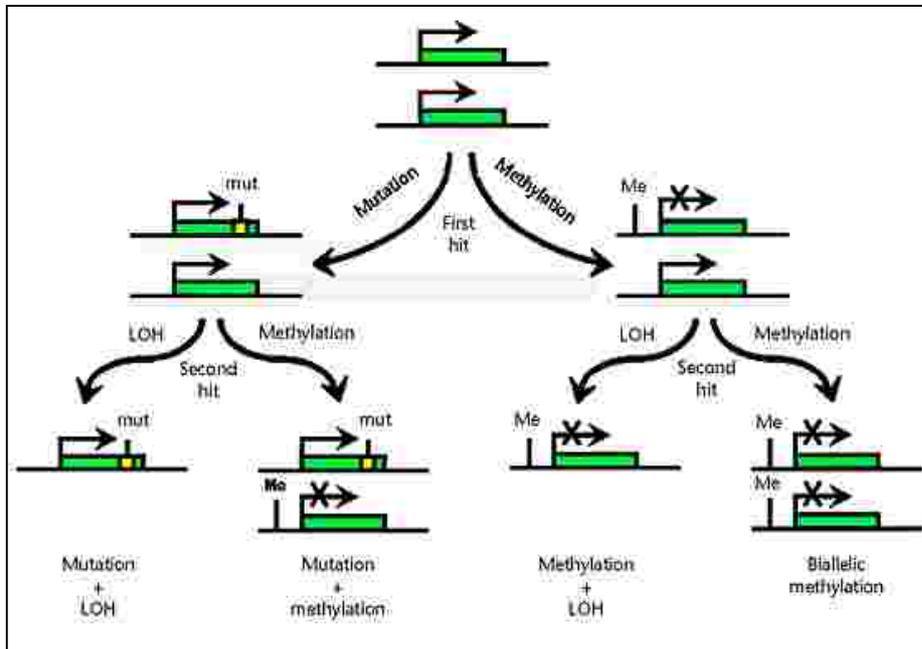


**Abb.1.3 :** Transkriptionelle Repression nach DNA-Methylierung durch Veränderung der Chromatinstruktur. Ein Protein-Komplex, bestehend aus dem Transkriptions-repressiven methyl-bindenden Protein (MBP), einem Co-Repressor –Molekül (CR) und einer Histone-Deacetylase (HDAC) bindet an methylierte DNA. Die Histone werden deacetyliert, was zu einer kompakteren Chromatin-Struktur führt. Damit ist die DNA für die Transkription nicht mehr zugänglich.

Die DNA-Methylierung wird durch mindestens vier unterschiedliche DNA-Methyltransferasen (DNMT1, 2, 3a und 3b) gesteuert (Attwood, *et al* 2002). Die DNMT 1 ist v.a. für die Beibehaltung schon vorhandener Methylierungsmuster nach der Replikation verantwortlich, der DNMT 3a und 3b wird hingegen eine *de-novo* Methylierung zugeschrieben. Die DNA-Hypermethylierung wird durch eine Deacetylierung der Histone durch Histone-deacetylasen (HDAC) und Methylgruppen-bindenden Domänen wie MDB-1-4 und MeCP2 begleitet, die zu einer verschlossenen Chromatinstruktur und Blockade der Transkription führt (Abb. 1.3). Die Mechanismen der DNA-Methylierung, die zu einem abweichenden Methylierungsmuster in Tumoren führen, sind noch nicht genau geklärt. Es ist unklar, ob die Methylierung ein primärer Effekt ist, der für die Gen-Stilllegung verantwortlich ist oder eher ein sekundärer Effekt. Theoretisch könnten aberrante Methylierungsmuster durch eine Überexpression eines Methylierungs-Faktors bzw. durch den Funktionsverlust eines „demethylierenden“-Faktors verursacht werden. In Tumoren beobachtete erhöhte Levels von Methyltransferasen würden dieses Konzept belegen (el-Deiry *et al*, 1991), doch aktuelle Studien haben gezeigt, dass diese Erhöhung eher ein sekundärer Effekt der erhöhten Zellproliferation ist (Eads *et al*, 1999). Normalerweise ist das Genom strikt in aktives Eu- und inaktives Heterochromatin aufgeteilt und spezielle Elemente verhindern die Ausbreitung des repressiven Heterochromatins in angrenzende aktive Chromosomenregionen (Sun und Elgin, 1999). Eine Ursache für die *de novo* Methylierung von CpG-Inseln in Tumoren könnte ein Zusammenbruch dieser strikten Abgrenzung während der Karzinogenese sein (Turker und Bestor 1997).

Die Hypermethylierung tritt bereits früh in dem Prozess der Karzinogenese auf und konnte sogar im normalen Epithel von älteren Patienten identifiziert werden, was auf einen Zusammenhang mit dem Altern hinweist. Sicher ist, dass die Tumorzelle durch die Methylierung spezifischer Tumorsuppressorgene einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Zellen erwirbt. Die Kombination

von genetischen und epigenetischen Ereignissen liefert der Tumorzelle einen Mechanismus, der übereinstimmend mit der Knudson-Modell zur kompletten Inhibition der beiden Allele eines Tumorsuppressorgens und damit zur Hemmung seiner Expression führt (Abb. 1.4). Die Existenz solcher gewebe- und tumorspezifischen Cytosin-Methylierungsmustern, die schnell und einfach über sensitive PCR-Methoden detektiert werden können, bietet zudem eine vielversprechende Strategie zur besseren Detektion, Diagnose und Risikoabschätzung für zahlreiche Tumor-Arten.



**Abb.1.4:** Knudsons „two hit“-Hypothese unter Berücksichtigung der DNA-Methylierung als einen zur Mutation alternativen Inaktivierungsmechanismus (aus: Jones und Laird 1999).

#### 1.4 Zellproliferation, Zellzyklus-Kontrolle und Apoptose als entscheidende Prozesse für die Karzinogenese

Letztendlich führt die tumorassoziierte Aktivierung von Onkogenen und die Suppression von Tumorsuppressorgenen auf der physiologischen Ebene zum gleichen Ergebnis: Störung des Gleichgewichtes zwischen der Zellproliferation und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Durch diese Störung wird die Gewebe-Homeostase aufgehoben und es kommt zu einem unkontrollierten, neoplastischen Wachstum. Alle Onkogene und Tumorsuppressorgene wirken demnach innerhalb nur weniger entscheidender Signalwege und Prozesse, die dieses Gleichgewicht modulieren. Dazu gehören die Phosphotyrosin-Kinase-Signalwege, die die Stimulation der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren vermitteln (PI3K-, MAPK-Signalweg), die Zellzyklus-Regulation und die pro- und anti-apoptischen Signalwege. Viele der tumorassoziierten Gene wirken innerhalb mehrerer Signalwege und stellen damit einen wichtigen Mediator dar, der den engen „cross-talk“ zwischen den Signalwegen vermittelt. Als Beispiel dient hier der p53-Transkriptionsfaktor, der sowohl für einen Zellzyklus-Arrest und DNA-Reparatur sorgt, wie auch die Apoptose auslösen kann (Oren, 2003; Prives und Hall, 1999). Zahlreiche Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I), ihre Rezeptoren (Her2neu, EGF-R, IGF-IR) und die „downstream“ Protein-Kinasen (PI3K, Akt) werden in Tumoren verstärkt exprimiert (bedingt z.B. durch eine Gen-Amplifikation) oder liegen konstitutiv aktiviert vor (Gschwind, 2004; Downward, 2003; Cantley, 2002). Auch viele Transkriptionsfaktoren (z.B. Wnt, Smad), die die Zielproteine dieser Signalkaskaden

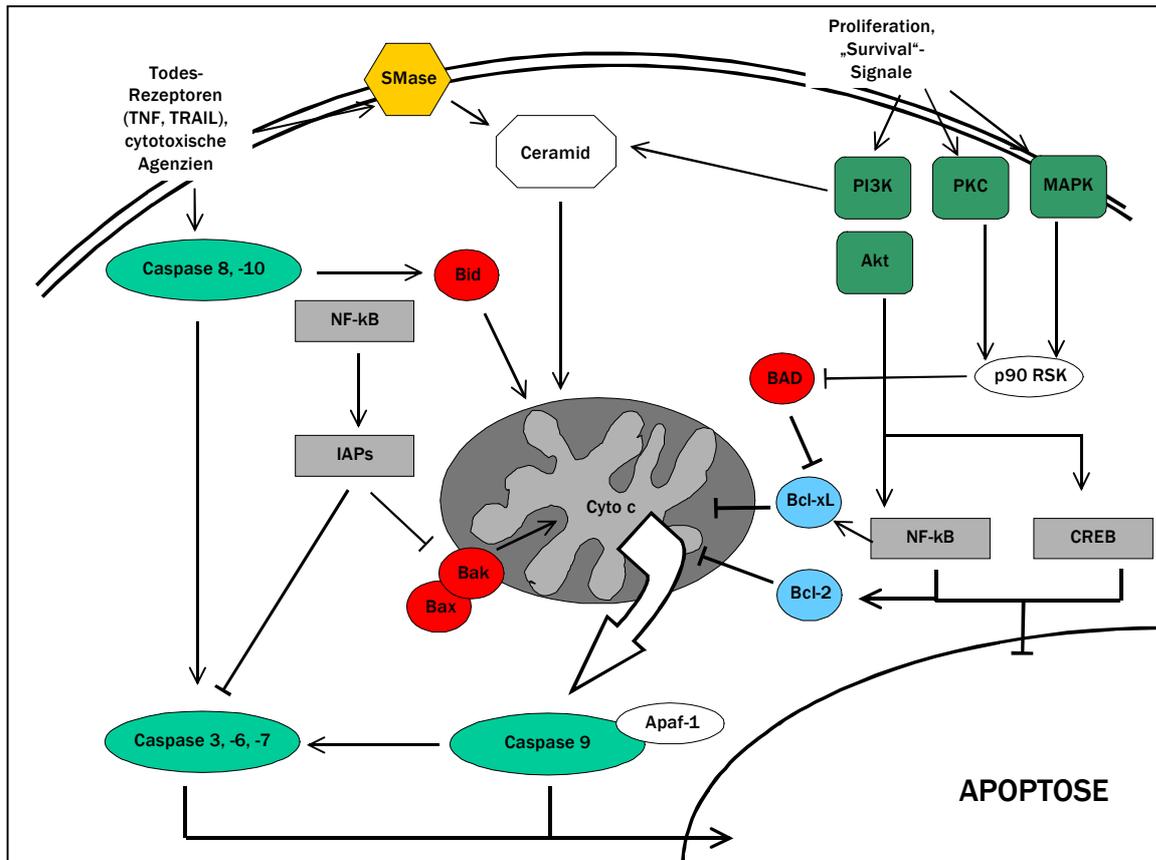
sind und die Expression von wachstumsfördernden Genen regulieren, sind in Tumoren oft mutiert. Die bislang erfolgreichsten Krebs-Therapien zielen alle auf die Hemmung dieser Zellproliferations-Kaskaden ab, z.B. durch Blockierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie Her2neu (Pegram *et al*, 2000) oder von Signal-Kinasen (Langer, 2004; Mechtersheimer 2004).

Eine Fehlregulation des Zellzyklus kann ebenfalls eine erhöhte Proliferationsrate hervorrufen. Im Verlauf des Zellzyklus gibt es zwei wichtige Kontrollpunkte („checkpoints“), an denen die Integrität des Genoms durch die „Caretaker“-Proteine überwacht wird. Am G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt in der späten G<sub>1</sub>-Phase wird die Integrität der DNA vor deren Replikation kontrolliert. Wurde die DNA z.B. durch physikalische oder chemische Mutagene geschädigt, so wird entweder der Eintritt in die S-Phase durch das p53-Protein verzögert, um eine Reparatur der Defekte zu ermöglichen, oder die Zelle wird durch Apoptose eliminiert. Am G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt werden Zellen mit geschädigter DNA bzw. fehlerhaft verlaufenen Mitose aussortiert (Sherr 2000; Blagosklonny und Pardee 2002). Zu den Proteinen, die den wichtigen Übergang vom Ruhezustand (G<sub>0</sub> oder G<sub>1</sub>) in die Replikations-Phase (S) des Zellzyklus kontrollieren, gehören sowohl Tumorsuppressorgene wie das Rb-Protein und das p16-Protein (Classon und Harlow, 2002), wie auch Onkogene wie die cdk4-Kinase und das Cyclin D (Ortega *et al* 2002; Classon und Harlow, 2002). Nahezu alle Tumore zeigen eine fehlerhafte Kontrolle der G<sub>1</sub>-Progression und eine verminderte Detektion von DNA-Schäden an den Zellzyklus-Kontrollpunkten, was zu einer ungehemmten Proliferation von Zellen führt, die vermehrt genetische Alterationen akkumulieren (Malumbres und Carnero, 2003).

Eine zentrale Rolle in der tumorspezifischen Fehlregulation der Gewebe-Homeostase nimmt neben der Zellproliferation ihr Gegenspieler ein – die Apoptose. Apoptose ist eine streng regulierte Form des Zelltodes, die sich durch bestimmte morphologische und biochemische Eigenschaften auszeichnet. Als Antwort auf ein apoptotisches Signal kommt es zu einer Blasenbildung der Zellplasmamembran und zur Zell-Schrumpfung, dann zur Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung in membrangebundenen Vesikeln, die durch angrenzende Zellen phagozytiert werden. Während dieses Prozesses bleiben die Zellmembranen im Gegenteil zur Nekrose intakt, so dass der Zellinhalt nicht freigegeben wird und zur Beeinflussung der Nachbarzellen führt. Die Apoptose trägt zum Zelltod von Tumoren bei, die mit verschiedenen anti-Krebs Agenzien behandelt wurden und ist die Basis für die Chemo-, Strahlen- und Immunotherapie verschiedenster Tumoren. Eine gestörte Regulation von pro- und anti-apoptotischen Signalwegen wird als Ursache für die Entstehung von Chemosensibilitäten betrachtet, die die erfolgreiche Behandlung vieler Tumorarten erschweren.

Auf molekularer Ebene basiert die Apoptose auf der Aktivierung von Caspasen über ein kompliziertes Netzwerk von Signaltransduktionskaskaden. Diese Caspasen führen als Proteasen zur Degradation zahlreicher zellulärer Komponenten und somit zum Zelltod (Story und Kodym, 1998). Dabei sind viele von extrazellulären Faktoren regulierte Zelltod- und „survival“-Gene involviert und das Gleichgewicht zwischen diesen pro- und anti-apoptotischen Regulatoren bestimmt den zellspezifischen Schwellenwert, der bei Überschreitung zur Apoptose führt. Am Anfang der Apoptose-Signalkaskade wird oft durch die Aktivierung der Sphingomyelinase (Smase) an der inneren Zellmembran Ceramid gebildet (Liu *et al*, 1999). Folgende Signalkaskaden involvieren die Proteine der Bcl-2 Familie, die sowohl pro-apoptotische (Bax, Bad, Bak, Bcl-xs) wie auch anti-apoptotische Faktoren (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) umfasst (Gross *et al*,

1999), die inhibitorischen Proteine der IAP-Familie (Deveraux und Reed, 1999), den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Baldwin, 2001) und die Mitglieder der MAPK-Familie, wie die p42/p44 MAP-Kinasen, die Erk-Kinasen, SAPK/JNK und p38 MAPK (Ballif und Blenis, 2001)



**Abb. 1.5:** pro- und anti-apoptotische Signalwege. Todesrezeptor-Liganden wie TNF und TRAIL induzieren die pro-apoptotischen Signalkaskaden wie die Aktivierung der Sphingomyelinase (SMase), die über Ceramid zur Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien führt (intrinsischer Apoptose-Weg). Alternativ können die Initiator-Caspasen 8 und 10 aktiviert werden, die sowohl über die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 oder 7 pro-apoptotische (extrinsischer Apoptose-Weg) wie auch über NF- $\kappa$ B anti-apoptotische Prozesse einleiten können. Die Effizienz des pro-apoptotischen Signals wird durch die Aktivierung der anti-apoptotischen „survival“-Signalwege über PI3K, PKC und MAPK beeinflusst (nach Simstein *et al*, 2003).

Es werden grundsätzlich zwei verschiedene Wege unterschieden, auf denen die Caspasen durch apoptotische Stimuli aktiviert werden können: den sogenannten extrinsischen Weg über Aktivierung der membrangebundenen Zelltod-Rezeptoren und den intrinsischen Weg, der über die Mitochondrien abläuft und unabhängig von der Aktivierung der Initiator-Caspasen ist (Abb. 1.5). Der extrinsische Signalweg wird über die Ligandenbindung an die Zelltod-Rezeptoren, wie Fas (CD95), die TNF- $\alpha$ -Rezeptoren und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-Rezeptoren initiiert. Über die Bindung weiterer apoptose-induzierender Proteine an den Rezeptor und Bildung des sogenannten DISC (Death Inducing Signaling Complex) kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspasen (Caspase -8, -10, -12), die anschließend die Effektor-Caspasen (Caspase -3, -6, -7) proteolytisch aktivieren (Earnshaw *et al*, 1999). Der intrinsische Apoptose-Signalweg läuft über die Mitochondrien, die durch Ausschüttung von Cytochrom c ins Cytoplasma zur Unterbrechung der Elektronentransportkette, Senkung des zellulären Redoxpotentials und Aktivierung von Caspasen die Apoptose einleiten können. Die Freilassung des Cytochroms c aus den Mitochondrien wird dabei durch die pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine ausgelöst. Das Cytochrom c

aktiviert das Adaptor-Protein Apaf-1, welches wiederum die Initiator-Caspase-9 aktiviert, die dann weitere Effektor-Caspasen stimuliert (Herr und Debatin 2001). Beide Signalwege können auf dem Level der Effektor-Caspasen miteinander interagieren. Es gibt Hinweise, dass die durch Krebs-bekämpfende cytotoxische Medikamente ausgelöste Apoptose vorwiegend über den mitochondrialen Signalweg vermittelt wird (Herr und Debatin, 2001; Kaufmann und Earnshaw, 2000). Gängige Chemotherapeutika wie Paclitaxel, Doxorubicin und Etoposid erhöhen die Expression von pro-apoptotischen und erniedrigen die Expression von anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen (Tudor *et al*, 2000; Leung und Wang, 1999; Gibson *et al*, 1999). Die Effizienz von Chemotherapeutika kann durch den PI3K/Akt-„Survival“-Signalweg gemindert werden, dessen Hochregulierung mit der Chemoresistenz assoziiert ist.

### 1.5 Identifizierung von differentiell exprimierten Kandidatengen durch „in silico“ Methoden

Die meisten der hier beschriebenen genetischen und epigenetischen Veränderungen von Onko- und Tumorsuppressor-Genen wirken letztendlich über eine veränderte Genexpression. Bei der Progression der meisten Tumorarten zeigt jedes Tumor-Stadium, vom benignen Karzinom über einen borderline-Tumor bis hin zum hochgradigen Karzinom, ein charakteristisches Genexpressionsmuster mit spezifisch hoch- und runterregulierten Genen. Die Identifizierung solcher differentiell exprimierter Gene ist deshalb essentiell für ein besseres Verständnis der molekularen Tumorgenese, -Progression und Metastasierung. Zusätzlich könnten neu entdeckte differentiell exprimierte Gene auch als prognostische Marker in der frühen Tumordiagnostik bzw. als Zielmoleküle für die Therapie eingesetzt werden. Um so wichtiger ist es deshalb, schnelle und effiziente Screening-Methoden für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene zu etablieren.

Es sind bereits zahlreiche experimentelle Methoden für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene bekannt, wie das „Differential Display“, die suppressive subtraktive Hybridisierung, die SEREX-Methode bzw. die quantitative Real-Time-PCR. Die in letzter Zeit rasante Entwicklung der Microarray-Technologien erlaubt nun eine Hochdurchsatz-Expressionsanalyse von Tausenden Genen gleichzeitig und ermöglicht somit die Untersuchung von ganzen Gen-Netzwerken (Russo *et al*, 2003, Polyak *et al*, 2001, Collins *et al*, 2003). Alle diese Methoden sind meistens sehr aufwendig und benötigen oft größere Mengen an Gewebematerial, z.B. für die Gewinnung von qualitativ hochwertiger RNA. Kürzlich entwickelte bioinformatische Ansätze und ein immer größeres Netzwerk von Sequenz-Datenbanken ermöglichen es, tumorassoziierte Gene auch ohne aufwendige experimentelle Methoden aufgrund ihrer differentiellen Expression im Normal- und Tumorgewebe zu identifizieren. Neben genomischen Sequenz-Datenbanken des weltweiten Humangenom-Projektes stehen sog. EST-Bibliotheken zur Verfügung. ESTs sind kurze DNA-Abschnitte (ca. 400 bp), die durch Sequenzierung von cDNA-Klonen entstanden sind. Eine EST-Bibliothek aus einem bestimmten Gewebe enthält zwischen 1000 bis 10.000 ESTs und umfasst daher nur einen Bruchteil der Gesamt-RNA einer Zelle (durchschnittlich 300.000 RNA-Moleküle von 10.000-30.000 verschiedenen Genen). Trotzdem ermöglicht die Analyse einer genügend großen Anzahl verschiedener ESTs die Identifizierung differentiell exprimierter Kandidatengene (Scheurle *et al*, 2000).

Die vorliegende Arbeit basierte auf den Ergebnissen eines von der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH (Berlin) entwickelten bioinformatischen Ansatzes zur Identifizierung potentieller tumorassoziiierter

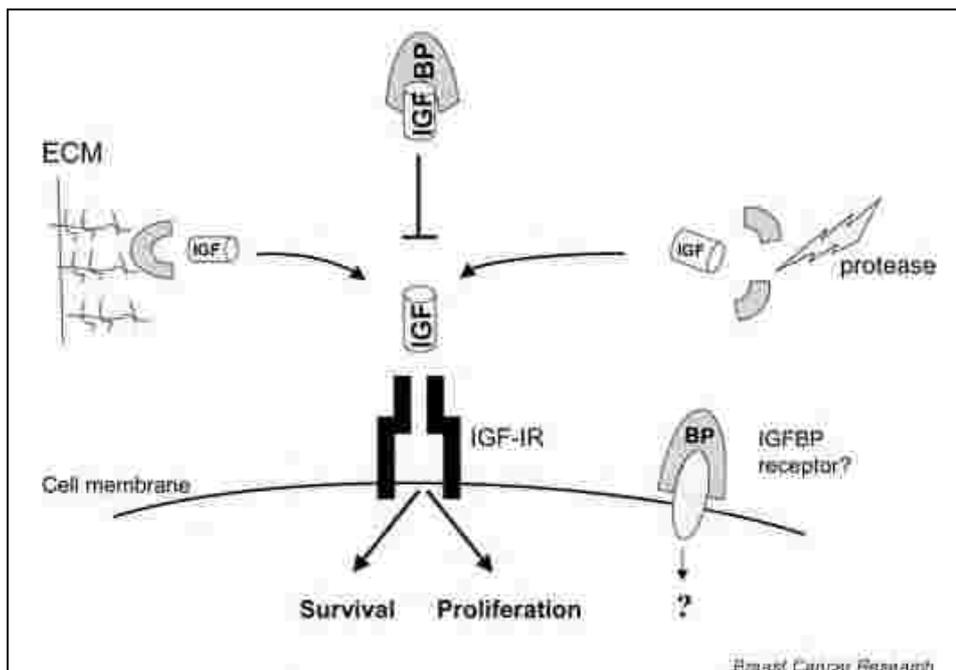
Kandidatengene (Schmitt *et al*, 1999). Dabei wurden öffentliche (CGAP: Cancer Genome Anatomy Project) und kommerzielle (Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, USA) Datenbanken mit über 4 Millionen ESTs aus unterschiedlichsten Normal- und Tumorgeweben „*in silico*“ nach differentiell exprimierten Genen durchsucht. Über ein spezielles Such- und Assemblierungsprogramm (AUTEX) wurden aus nicht-normalisierten EST-Sequenzen mehr als 100.000 cDNA-contigs von maximaler Länge generiert. Für jedes einzelne cDNA-contig wurde dann die Verteilung aller verfügbaren ESTs in Normal- und Tumorgewebe bestimmt. Die Signifikanz der Expressions-Unterschiede wurde mit dem Fischer-Test berechnet. Eine cDNA-Sequenz wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn  $p < 0,05$  war. Die identifizierten Kandidatengene wurden dann mit bekannten Sequenzen über das BLAST-Programm verglichen. Bei fehlender Homologie mit bereits publizierten Genen wurde in der Sequenz nach bekannten Proteinmotiven und Domänen gesucht, um dann über einen Abgleich mit der Protein-Datenbank „Pfam“ das Kandidatengen zu bekannten Proteinfamilien zuordnen zu können.

Auf diese Weise wurden über 600 differentiell exprimierte Kandidatengene identifiziert, die je nach Stärke der differentiellen Expression in drei Klassen eingeteilt wurden. Klasse I umfasste Gene, mit einer sehr starken (Ratio  $> 10$ ), Klasse II Gene mit einer starken (Ratio  $> 5$ ) und Klasse III Gene mit einer mittleren (Ratio  $> 2$ ) differentiellen Expression. Interessanterweise erwiesen sich viele Gene der Klasse I in den Zell-Metabolismus und Tumor-Infiltrierung involviert zu sein, wohingegen viele gut bekannte tumor-assoziierte Gene in die Klassen II und III klassifiziert wurden. Das bedeutet, dass der Grad der Überexpression bzw. Runterregulierung eines Gens in den Tumoren nicht automatisch seine Bedeutung für die Tumorgenese widerspiegelt und dass die Expression vieler tumor-relevanter Gene in den Karzinomen nur leicht verändert ist. Für die weitere Validierung und molekulare Charakterisierung wurde nur ein beschränktes Set an Kandidatengenen ausgewählt. Die wichtigsten Auswahlkriterien waren die Involvierung in tumor-assoziierten Signalwege und/oder eine Lokalisierung in chromosomalen Regionen, für die ein LOH oder eine Genamplifikation in Tumoren gezeigt werden konnte. Da das für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten funktionellen Analysen ausgewählte Kandidatengen IGFBP-4 innerhalb des IGF-Systems wirkt, wird im Folgenden die Bedeutung dieses Systems für die Karzinogenese kurz dargestellt.

## 1.6 Das IGF-System

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors, IGFs) IGF-I und IGF-II sind wichtige Mediatoren von Wachstum, Entwicklung und Überleben von Zellen und sie werden in nahezu allen Gewebetypen exprimiert. Sie sind unter den anderen Peptid-Wachstumsfaktoren insofern einzigartig, da sie sowohl lokal als autokrine/parakrine Wachstumsfaktoren als auch systemisch als Insulin-ähnliches Hormon wirken können (Jones und Clemmons, 1995; Stewart und Rotwein, 1996). Die meisten zellulären Effekte von IGFs werden über die Bindung der Peptide an den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) vermittelt, der eine starke Homologie zu dem Insulin-Rezeptor zeigt (Le Roith *et al*, 1995). Die Bioverfügbarkeit von freien IGFs, die mit dem IGF-IR interagieren können wird über die sechs IGF-Bindeproteine 1 bis 6 (IGFBP-1, -6) moduliert (Hwa und Rosenfeld, 1999). Diese Modulierung erfolgt nicht nur direkt über eine Sequestrierung, sondern kann auch indirekt über verschiedene Mechanismen ausgeübt werden: spezifische Bindung an Plasma-, ECM (extrazelluläre Matrix)- und Zellmembran-

Proteine, rasche Aufnahme in Zielzellen und Translokation in den Zellkern (Firth und Baxter, 2002; Clemmons, 2001; Bach und Rechler, 1995). Im Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten, ist die Mehrheit der IGFs (>97%) an IGFBPs gebunden, v.a. an das IGFBP-3, (Clemmons *et al*, 1990) und wird erst nach einer gezielten IGFBP-Proteolyse meist zell- und gewebespezifisch für die IGF-IR-Interaktion freigegeben (Bunn und Fowlkes, 2003). Damit erhöhen die IGFBPs zum einem die Halbwertszeit der IGFs im Serum und regulieren ihren Transport zwischen intra- und extravaskulären Kompartimenten und zum anderen regulieren sie die IGF-vermittelten Effekte sowohl endokrin wie auch lokal autokrin/parkarin. Darüberhinaus können die IGFBPs durch Interaktion mit Zell- oder Matrix-Komponenten die IGFs in der Nähe ihres Rezeptors konzentrieren und somit die IGF-Aktivität erhöhen (Clemmons 1999; Clemmons, 2001). Abbildung 1.6 stellt die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten des IGF-System vereinfacht dar.



**Abb. 1.6** Zusammenspiel zwischen den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (Insulin-like growth factors =IGFs) und den IGF-Bindeproteinen (IGFBPs). Wechselwirkungen zwischen IGF und IGFBPs vermindern den Level an freien IGF-Molekülen und reduzieren damit die mitogenen Effekte des IGF-Rezeptors. IGFBP-Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und Proteasen-Aktivität erhöhen die Anzahl freier IGF-Moleküle, die den IGF-I-Rezeptor aktivieren können. IGFBPs können auch direkte Effekte über hypothetische IGFBP-Rezeptoren z.B. auf die Apoptose ausüben (aus: Marshman und Streuli, 2002).

Die Familie der IGF-Bindeproteine besteht aus sechs IGFBPs mit einer hohen Affinität für IGFs und aus bislang neun beschriebenen verwandten Proteinen mit einer niedrigen IGF-Affinität (IGFBP-rPs). Alle IGFBPs sind untereinander hoch homolog ( Identitäten zwischen 30%-40%) und besitzen eine ähnliche Domänen-Organisation. Am höchsten konserviert sind die N- und die C-terminalen Cystein-reichen Regionen. Beide Domänen nehmen an der IGF-Bindung Teil und beinhalten mehrere konservierte Cysteine (10 in der N- und 6 in der C-terminalen Domäne). Die am schwächsten konservierte zentrale L-Domäne enthält viele Spaltstellen für spezifische Proteasen (Siwanowicz *et al*, 2005). Die Regulation von IGFBPs ist Mediator- und Zell-spezifisch und wird von Hormonen (Sexual- und adrenale Steroide, Vitamin D, RA, GH, FSH, Insulin), Wachstumsfaktoren (IGFs, PDGF, EGF, TGF- $\beta$ ), Cytokine (IL-1), TNF- $\alpha$  und Tumorsuppressorgenen (p53) sowie spezifischen IGFBP-Proteasen vermittelt (Yu und Rohan, 2000;

Maile und Holly, 1999). Jedes IGFBP zeigt eine gewebespezifische Expression: das IGFBP-1 wird vorwiegend in der Leber und im Endometrium, IGFBP-2 im Nerven-Gewebe und in der Prostata, IGFBP-4 und -5 in Knochen und Nieren exprimiert. Das IGFBP-3 ist das Haupt-IGF-Bindeprotein im Serum und wird, ähnlich wie das IGFBP-6 auch in anderen Geweben exprimiert (Ferry *et al*, 1999).

Der IGF-I-Rezeptor gehört zu der Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und seine Anzahl an der Zelloberfläche bestimmt die IGF-I-Antwort (Butler *et al*, 1998). Die Produkte mehrerer Tumorsuppressorgene, wie Wilms tumor-1 (WT-1), p53 und BRCA-1 wie auch IGF-I vermindern dessen Expression, wohingegen die meisten Wachstumsfaktoren, Steroide und Hormone die Expression erhöhen (Yu und Rohan, 2000). Der IGF-IR wird fast in jedem Zelltyp exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, da transgene Mäuse mit einer IGF-IR-Nullmutation bei der Geburt aufgrund von allgemeiner Hypoplasie von Organen um 45% kleiner sind als Wildtyp-Mäuse (Liu *et al*, 1993). Die IGF-Bindung an den Rezeptor induziert seine Autophosphorylierung und die Aktivierung signalabwärts gelegener Effektor-Moleküle vieler Signalkaskaden, wie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalwegs, der mit Wachstum und Zellproliferation assoziiert ist, des Phosphatidylinositol-3 (PI-3) Signalwegs, der zur Hemmung der Differenzierung und Apoptose beiträgt, und des JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducer and activator of transcription) Signalwegs (Petley *et al*, 1999). Die Nutzung dieser Signalkaskaden ist jedoch zell- und entwicklungspezifisch und eine als „cross-talk“ bezeichnete Interaktion zwischen den Signalwegen verbindet die IGF-I-Signalkaskaden zu einem äußerst komplexen Signal-Netzwerk.

Viele verschiedene *in vitro* Studien und Experimente mit Tumormodellen und transgenen Tieren belegten eindeutig, dass das IGF-System eine zentrale Rolle im Entwicklungsprozess von Tumoren einnimmt und eine wachsende Zahl von epidemiologischen Studien bestätigt eine Korrelation zwischen den Serum-Konzentrationen von Komponenten des IGF-Systems und dem Krebsrisiko und Prognose (Sandhu *et al*, 2002; Giovannucci, 2001; Sachdev und Yee, 2001). Der IGF-IR ist an fast allen Schritten der Tumorigenese beteiligt: angefangen von einer Stimulation der Proliferation und einem Schutz vor Apoptose über die Regulation von Transformationsprozessen und Erhalt des transformierten Phänotyps bis hin zu einer Förderung des Metastasierungspotentials von Zellen beteiligt ist (Moschos und Mantzoros, 2002; Yu und Rohan, 2000; Khwandala *et al*, 2000; Pollak *et al*, 2004, Fürstenberger *et al*, 2003; LeRoith und Roberts 2003). IGF-I und IGF-II sind starke Mitogene für eine ganze Reihe von Tumor-Zelllinien, eine IGF-I Überexpression in Tiermodellen erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentwicklung und Krebs-Zellen mit einer hohen IGF-II- und IGF-IR-Expression zeigen verstärktes invasives Potential. IGF-IR liegt in vielen Tumorarten überexprimiert vor und seine Überexpression korreliert mit aggressiven Tumoren (Xie *et al*, 1999). Eliminierung des IGF-I von der Zellmembran, Hemmung der IGF/IGF-IR-Interaktion oder Unterbrechung der Signaltransduktion des IGF-IR kann die mitogenen Effekte der IGFs auf die Krebszellen verhindern (LeRoith und Helman, 2004). IGFs schützen Krebszellen vor einer ganzen Reihe apoptotischer Stimuli, zum einem über die Aktivierung von „Survival“-Signalwegen (PI3K/Akt) und Hemmung der Caspasen-Aktivierung und zum anderen über die direkte Modulation von positiven (Bax, Bcl-Xs) und negativen (Bcl-xl, Bcl-2) Apoptose-Regulatoren der Bcl-2-Familie (Butt *et al*, 1999; Baserga *et al*, 2003).

Einige IGFBPs üben zusätzlich IGF/IGF-IR-unabhängige Effekte aus (Murphy, 1998; Wetterau *et al*, 1999; Mohan und Baylink, 2002), die wesentlich zur Regulation der Zelladhäsion und –Migration, des Zellzyklus und der Apoptose beitragen. IGFBP-1 beeinflusst durch Interaktion mit dem  $\alpha 5/\beta 1$  Integrin die Zelladhäsion und Migration und IGFBP-2, -3, -5 und –6 haben Heparin-bindende Domänen und binden Glycosaminglykane. IGFBP-3 und –5 können mit Komponenten der Zelloberfläche und der Zellmatrix, dem nukleären Transporter Importin- $\beta$  und anderen Proteinen wechselwirken. Das IGFBP-3 ist ein wichtiges pro-apoptotisches Protein, welches die Apoptose IGF-unabhängig über einen putativen membranständigen Rezeptor und/oder durch Translokation in den Zellkern und Bindung an den Retinoid X Rezeptor- $\alpha$  sowie möglicherweise über den Einfluss auf das TGF $\beta$ -signalling über die Smad-Proteine fördert (Butt und Williams, 2001; Lee und Cohen, 2002).

Das im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisierte IGFBP-4 ist das kleinste unter den IGF-Bindeproteinen und ist unter den anderen IGFBPs insofern einzigartig, weil bislang ausschließlich IGF-inhibitorische Effekte für diese Protein nachgewiesen werden konnten (Zhou *et al*, 2003; Mazerbourg *et al*, 2004). Erste Beschreibungen des Proteins erschienen im Zusammenhang mit seiner starken Inhibition des Knochenwachstums (Mohan *et al*, 1989) und der Hemmung der Hormon-stimulierten Steroid-Produktion in ovariellen Granulosa-Zellen (Ui *et al*, 1989). Die meisten bislang beschriebenen IGFBP-4-Effekte basieren auf Bindung der IGFs, es wurden aber auch bereits IGF-unabhängige IGFBP-4-Mechanismen beobachtet. Das humane IGFBP-4-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert (17q12-21.1) [Bajalica *et al*, 1992; Tonin *et al*, 1993; Shimasaki *et al*, 1990], umfasst ca. 1,3 kb und besteht aus 4 Exons (Zazzi *et al*, 1998). Sein Promotor besitzt eine typische TATA-Box und eine CAAT-Box sowie zahlreiche putative Regulationselemente, wie AP-1 und Sp-1-Bindestellen und cAMP- und Steroid-responsive Elemente (Dai *et al*, 1997). Sequenzaufwärts vom IGFBP-4 befinden sich zahlreiche Alu-Repeatsequenzen, was auf eine genomische Instabilität und erhöhte Frequenz von Sequenz-Polymorphismen hinweist. Das IGFBP-4-Protein besteht aus 237 Aminosäuren und kommt normalerweise in 2 Formen vor: als eine 24 kDa nicht-glycosylierte Form und eine 28 kDa glykosylierte Form (Wetterau *et al*, 1999), die biologische Funktion der Glykosylierung ist jedoch nicht bekannt. Als einziges der IGFBPs besitzt es zwei zusätzliche Cysteine innerhalb der variablen L-Domäne, welche miteinander verbunden sind und möglicherweise für die einzigartigen Eigenschaften des IGFBP-4 verantwortlich sind. Im Gegensatz zu anderen IGFBPs wurde bislang kein Hinweis auf eine Wechselwirkung des IGFBP-4 mit der Zelloberfläche gefunden und es scheint, dass das IGFBP-4 ausschließlich in einer löslichen, extrazellulären Form vorkommt. Das Protein wurde in allen biologischen Flüssigkeiten (Rajaram *et al*, 1997) und in zahlreichen Geweben verschiedener Spezies (Übersicht in Zhou *et al* 2003) detektiert. Wie andere IGFBPs wird es durch zahlreiche Hormone, Cytokine, Wachstumsfaktoren und Steroide gewebespezifisch reguliert. Die wichtigste Regulation erfolgt jedoch über die Proteolyse, vor allem über die spezifische IGF-abhängige PAPP-A-Protease, welche eine wichtige Rolle in der Regulation der IGFBP-4-Wirkung besonders innerhalb der reproduktiven Physiologie einnimmt. Das IGFBP-4 spielt eine große Rolle während der Schwangerschaft als Wachstums-Regulator der Plazenta und des Fötus und trägt entscheidend zur korrekten Ei-Reifung im Ovar bei. Es ist der wichtigste IGF-Modulator in Knochenzellen und ist eingebunden in die Entwicklung und Physiologie der Niere. Auch für das IGFBP-4 gibt es zahlreiche Hinweise auf seine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation von zahlreichen Tumoren und einige Studien belegen sogar weitere IGFBP-4-

spezifische, zum Teil auch IGF-unabhängige Effekte, die dem transformierten Phänotyp von Tumorzellen entgegenwirken, wie z.B. die Inhibition der Invasion.

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des DHGP-Teilprojektes „Genetische *Basis sporadischer gynäkologischer Tumore – molekulare Analyse und Validierung von Kandidatengenen, die mit sporadischen Tumoren von Brust, Ovar und Endometrium assoziiert sind* durchgeführt. Ihr Ziel war die Validierung potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene für gynäkologische Tumoren, die durch bioinformatische Analysen als differentiell exprimiert identifiziert worden waren und in tumor-assoziierten chromosomalen Regionen lagen bzw. tumor-relevante Funktion besaßen. Die „in silico“-Expressionsdaten sollten experimentell an Normal/Tumorgewebe-Probenpaaren auf mRNA- und wenn möglich auch auf Protein-Ebene verifiziert werden. Anhand verfügbarer molekularbiologischer Methoden (Mutations-, Methylierungs-Analyse) sollte der jeweilige Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsmechanismus für ausgesuchte Kandidatengene identifiziert sowie ihre Bedeutung für die Karzinogenese in Zellkulturmodellen anhand funktioneller Assays näher charakterisiert werden.

## 2. MATERIAL UND GERÄTE

### 2.1 Patientenmaterial

54 sporadische Mammakarzinome und 80 sporadische Ovarial-Karzinome wurden nach chirurgischer Entnahme im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Proben stammen von Patientinnen, die in den Jahren 1993-2000 in der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf operiert wurden. Bei einigen Patientinnen wurde neben dem Tumor auch Normalgewebe entnommen. Zusätzlich konnte Normal-DNA bzw. Normal-RNA aus Blutlymphozyten der Patientinnen isoliert werden. Die histopathologische Beurteilung der entnommenen Gewebeproben umfasste die TNM-Klassifikation nach Richtlinien der UICC (T= Tumorgroße, N= Befall der regionalen Lymphknoten, M= Fernmetastasen), das histologische Grading (Klassifikation nach Graden nach Scarff-Bloom-Richardson) und den Hormonrezeptor-Status (Östrogen-, Progesteronrezeptor). Die klinischen Daten der untersuchten Tumore sind im Anhang aufgelistet.

### 2.2 Bakterienstämme

Bei der Transformation und Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde mit folgenden kompetenten *Escherichia coli*-Stämmen gearbeitet:

DH5 $\alpha$  F $^{-}$ :  $\Delta lacU169(\phi 80 lacZ \Delta M15) hsdR17(r_K^{-} m_K^{+}) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 phoA$   
 $relA1 supE44 \lambda^{-}$

XL1-Blue  $recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K^{-} m_K^{+}) supE44 relA1 lac F[proAB^{+} lacI^q]$   
 $lacZ \Delta M15 Tn10(tet^r)$

### 2.3 Zelllinien

Für die Expressions- und Methylierungs-Analysen sowie für die funktionellen Assays wurden humane Karzinom-Zelllinien gynäkologischen Ursprungs eingesetzt. Für die Apoptose-Analysen wurde zusätzlich eine primäre immortalisierte Maus-Fibroblasten-Zelllinie eingesetzt. Die Produktion von Adenoviren wurde in der Zelllinie 293 durchgeführt, die Teile des adenoviralen Genoms als stabile Integration enthält.

Die verwendeten Kulturmedien (DMEM, MEM, McCoy's5A, DMEM/NutMix-F12 von der Firma GIBCO, RPMI von der Firma PAA) enthalten 10% v/v fötales Kälberserum (FCS), L-Glutamin (2mM), Glukose (1,0 bzw. 4,5 g/l) und ein Antibiotikum (Gentamicin bzw. Penicillin/Streptomycin). Das Kulturmedium für die Normalgewebeszelllinie MCF-12A enthält anstelle von FCS Pferdeserum (HS). Transfizierte Zelllinien wurden unter Selektionsdruck mit dem entsprechenden Selektions-Reagenz kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien und die entsprechenden Kulturmedien und Zusätzen sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

**Tabelle 2.1:** Auflistung der verwendeten Zelllinien, Kultivierungsmedien und Bezugsquellen

Zelllinie	Ursprung	Kulturmedium	Zusätze	Quelle
293	Nierenkarzinom	DMEM (4,5 g/l Glukose)	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	Qbiogene, Heidelberg
R-	embr. Maus-fibroblasten	DMEM	10% FCS, Vitamine (1% v/v) G418 (10ng/ml)	Baserga Philadelphia USA
R(600)	embr. Maus-fibroblasten	DMEM	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Hygromycin B (40ng/ml)	Baserga Philadelphia USA
An3Ca	Endometrium-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HBT-111)
BT-20	Mamma-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-19)
Hey	Ovarial-Karzinom	RPMI1640	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	Prof. Pfeleiderer, Universität Freiburg
C33A	Endometrium-Karzinom	DMEM/Ham`sF12	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	ATCC (HTB-31)
Caski	Endometrium-Karzinom	RPMI1640	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	ATCC (CRL-1550)
Hec-1A	Endometrium-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HBT-112)
Hela	Cervix-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (CCL-2)
Ishikawa	Endometrium-Karzinom	DMEM/Ham`sF12	10% FCS, Vitamine (1% v/v), 1%HEPES Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	Prof. Pfeleiderer, Universität Freiburg
MCF-7	Mamma-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml) Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-22)
MCF-12A	Mamma-Gewebe	DMEM:DMEM/NutMix-F12 (1:1)	5% Pferdeserum, Cholera-Toxin(100 ng/ml), EGF (20 ng/ml), Insulin (0,01 mg/ml) Hydrocortison (500 ng/ml)	ATCC (CRL-10782)
MDAH 2774	Ovarial-Karzinom	DMEM (4,5 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (CRL-10303)
MDA-MB-231	Mamma-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-26)
MDA-MB-468	Mamma-Karzinom	DMEM (1 g/l Glukose)	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-132)
RL-95-2	Endometrium-Karzinom	DMEM/Ham`sF12	10% FCS, Vitamine (1% v/v), 1%HEPES Pen/Strept/L-Glut-Lsg (1x), Insulin 0,5%	ATCC (CRL-1671)
Siha	Endometrium-Karzinom	DMEM/Ham`sF12	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	ATCC (HTB-35)
SK-BR-3	Mamma-Karzinom	McCoy`s 5A	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-30)
SK-OV-3	Ovarial-Karzinom	RPMI1640	10% FCS, Gentamycin (50µg/ml)	ATCC (HTB-77)
T-47-D	Mamma-Karzinom	Minimum Essential Medium	10% FCS, Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-133)
U2Os	Osteosarkom	DMEM (1 g/l Glukose)	Vitamine (1% v/v) Penicillin/Streptomycin/L-Glut-Lsg (1x)	ATCC (HTB-96)
ZR-75-1	Mamma-Karzinom	Minimum Essential Medium	Vitamine (1% v/v)	ATCC (CRL-1500)

## 2.4 Plasmide

Der retrovirale Expressionsvektor S11IEG3 (5709 bp) und der lenti-virale Expressionsvektor pLV-TH (11 085 bp) wurden freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hahnenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Beide Vektorsysteme besitzen flankierende retrovirale Long Terminal Repeat (LTR)-Sequenzen, die die Integration der innerhalb der Sequenzen liegenden DNA in das humane Genom vermitteln. Die Vektoren enthalten einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in *E. coli*, sowie als prokaryotischen Selektionsmarker das  $\beta$ -Lactamase-Gen, welches die Ampicillinresistenz vermittelt. Die *Multiple Cloning Site* (MCS) ermöglicht es, die gewünschten Genabschnitte unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzymen in das Plasmid zu integrieren. Das S11IEG3-Plasmid hat einen BR332-„Backbone“. Die IRES-Kassette (internal ribosome entry site) verbindet als Linker das klonierte Gen mit dem GFP-Gen (*Green Fluorescent Protein*), das als Indikator zur Expressions-Kontrolle nach der Transfektion in eukaryotische Zellen dient. Durch die IRES-Kopplung ist die Expression des GFPs proportional zur Expression des innerhalb der MCS klonierten Zielgens. Die Expression wird über den viralen CMV (Zytomegalie-Virus)-Promotor reguliert, welcher eine hohe Expression des klonierten Gens gewährleistet. Für die Klonierung des Expressionsvektors IGFBP-4-S11IEG3 wurde der retrovirale Vektor S11IEG3 als Rückgrat verwendet und die codierende IGFBP-4-Sequenz von 2062 bp (IGFBP-4-RZPD-clone ID: IMAGp958N141460 full length clone) mit Hilfe der Restriktionsenzyme Eco RI und Bam HI vor die IRES-site eingefügt.

## 2.5 Oligonukleotide und shRNAs

Alle Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma metabion GmbH bezogen. Random-Primer für die cDNA-Synthese wurden von Amersham Biosciences bezogen. Alle verwendeten Primer sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet. Die Primerpaare wurden zuvor mit Hilfe des Programmpaketes Oligo 4.1-Primer Analysis Software (National Biosciences Inc., Plymouth USA) und oligo Toolkit (Qiagen, Hilden) ausgewählt. Die Primer sollten eine Länge zwischen 15-25 Basen aufweisen, einen GC-Gehalt zwischen 40-60% besitzen und weder komplementär zueinander noch zu sich selbst sein. Die Primer sollten idealerweise am 3'-Ende einen GC-„Clamp“ aufweisen und möglichst keine „Repeats“ bzw. Purin- oder Pyrimidin-Abschnitte aufweisen. Bei PCR-Produkten, die für die Analyse auf dem A.L.F.-Sequenzierer bestimmt waren, war der entsprechende 5'-Primer Cy5 markiert (in den Tabellen mit \* gekennzeichnet).

**Tabelle 2.2:** Zusammenstellung der verwendeten Primer für IGFBP-4-Analysen:

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz	Lokalisation	Produktgröße
D17S 1814-F*	LOH-Analyse	5'-TCC CCA ATG ACG GTG ATG-3'	17q21.1 – flankiert centromerisch das IGFBP-4-Gen	ca. 150 bp
D17S 1814-R	"	5'-CTG GAG GTT GGC TTG TGG AT-3'	17q21.1 – flankiert centromerisch das IGFBP-4-Gen	
D17S 800-F*	"	5'-GGT-CTC ATC CAT CAG GTT TT-3'	17q21.2 – flankiert telomerisch das IGFBP-4-Gen	ca. 170 bp
D17S 800-R	"	5'-ATA GAC TGT GTA CTG GGC ATT GA-3'	17q21.2 – flankiert telomerisch das IGFBP-4-Gen	
LOH-on78-F*	"	5'-CAG GAG CCT CAT GTG TGT-3'	flankiert ein Dinucleotid-Repeat im Intron des IGFBP-4-Gens	ca. 225 bp
LOH-on78-R	"	5'-GTA AGA ATG AGG TTA GGG CAA-3'	flankiert ein Dinucleotid-Repeat im 2. Intron des IGFBP-4-Gens	
on78-Expr-F*	Expressions-Analyse	5'-AAC AGC TTC AGC CCC TGT A-3'	Exon 2 (27.-45. bp)	228 bp
on78-Expr-R	"	5'-GAT GGG GAT GAT GTA GAG GTC-3'	Exon 4 (76.-96. bp)	
on78-Ex1full-F	Mutations-Analyse	5'-GGG TCG GGT CCT CCA G-3'	Exon 1 (167.-182. bp)	467 bp
on78-Ex1full-R	"	5'-AGG AAA GCC TGC AGC CCT-3'	Exon1 (606.-625. bp)	
on78-Ex1prom-F	"	5'-GAA AAG GAC TTT CAG ATG CG-3'	Promotor (-196. – -163. bp)	475 bp
on78-Ex1prom-R	"	5'-GTC ATG CTG CCC CTC TG-3'	Exon 1 (284.-301. bp)	
on78-Ex2-F	"	5'-GTG TGA CGC TCT GAC CTC TT-3'	flankierender Intronbereich von Exon 2 (-57. - -38. bp)	240 bp
on78-Ex2-R	"	5'-ACA TTT GTG CAT CGG AGG T-3'	flankierender Intronbereich von Exon 2 (+7. - +25.. bp)	
on78-Ex3-F	"	5'-TGC CTC TCT TCC TTC TGC TGA G-3'	flankierender Intronbereich von Exon 3 (-46. - -25. bp)	220 bp
on78-Ex3-R	"	5'-CTG AGT CCA GGG CCA AG-3'	flankierender Intronbereich von Exon 2 (+22. - +38. bp)	
on78-Ex4.1-F	"	5'-ACT GAC CCC TCA TGT CCT T-3'	flankierender Intronbereich von Exon 4 (-29. - -11. bp)	412 bp
on78-Ex4.1-R	"	5'-TCA GTC CTC TTG GGC TGT-3'	Exon 4 (363.-383. bp)	
on78-Ex4.2-F	"	5'-AGA GCC TGG GGT GTT CTC-3'	Exon 4 (336.-353. bp)	406 bp
on78-Ex4.2-R	"	5'-GTC TGG ACC TCG TGA CCA-3'	Exon 4 (724.-741. bp)	
on78-Ex4.3-F	"	5'-CAG AGG GTG GGA GCC TAA-3'	Exon 4 (679.-696. bp)	355 bp
on78-Ex4.3-R	"	5'-TGG GGT AGG GAA CAG GAC-3'	Exon 4 (1016.-1033. bp)	
on78-Ex4.4-F	"	5'-GGA GAA GAC CCA CGT GCT-3'	Exon 4 (977.-994. bp)	325 bp
on78-Ex4.4-R	"	5'-CTG GTG CAT CCC TGT GTC-3'	flankierender Intronbereich von Exon 4 (+29. - +46.. bp)	
on78-meth-F	Methylierung-Analyse	5'-GGC TCT GTC CAG GAA GAC-3'	Promotor-Bereich (- 422. – -405.)	258 bp
on78-meth-R	"	5'-CGC ATC TGA AAG TCC TTT -3'	Promotor-Bereich (- 183. – -166.)	
on78-PromGC-F	Promotor-Analyse	5'- CTC CAC GAG TGG GTC TGA AT-3'	Promotor-Bereich (- 732. – -711.)	266 bp
on78-PromGC-R	"	5'- GTA AAG CGT ACA GGC ACA GCT A-3'	Promotor-Bereich (- 506. – -485.)	

**Tabelle 2.3:** Zusammenstellung der Primer für Expressionsanalysen anderer Gene

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße
IGFBP-2-F*	5'-TGG CGATGACCA CTCAGAAG-3'	245 bp
IGFBP-2-R	5'-GTT CCT GTT GGC AGG GAG T-3'	
IGFBP-3-F*	5'-AGT GAG TCG GAG GAA GAC C-3'	228 bp
IGFBP-3-R	5'-GCA GGG ACC ATA TTC TGT CT-3'	
IGFBP-6-F*	5'-GCA GAG ACC AAC AGA GGA ATC-3'	167 bp
IGFBP-6-R	5'-ATT GGG CAC GTA GAG TGT TTG-3'	
ER $\alpha$ -expr-F*	5'-GGA GAC ATG AGA GTC GCC ACC-3'	438 bp
ER $\alpha$ -expr-R	5'-CCA GCA TGT CGA AGA TC-3'	
Sp1-expr-F*	5'-GAC CCC CTT GAG CTT GTC-3'	184 bp
Sp1-expr-R	5'-CCT CCA GTG CTG CTG CTA-3'	
CRYAB-expr-F*	5'- C TCC CCA GAG GAA CTC AAA G-3'	102 bp
CRYAB-expr-R	5'-CTC CCT GGA GAT GAA ACC ATG TT-3'	
Rab-5C-F*	5'-GCT GGG AAC AAG ATC TGT CA-3'	174 bp
Rab-5C-R	5'-GTG TCA TCC AGG CAG ACA GT-3'	
GAPDH-CG-F*	5'-ATG CTG GCG CTG AGT ACG T-3'	187 bp
GAPDH-CG-R	5'-GAG GCA TTG CTG ATG ATC TTG A-3'	
GAPDH-195-F*	5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'	mit GAPDH-CG-R: 142 bp
$\beta$ -Actin-F*	5'-AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT-3'	446 bp
$\beta$ -Actin-R	5'-ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'	

**shRNA-Oligonukleotide für IGFBP-4:**• **IGFBP4-1sh:**

BgIII LOOP

5'- GATCCCCAGCCTGCAGCCCTCTGACATTCAAGAGATGTCAGAGGGCTGCAGGCTTTTTTA-3'  
 3'-GGGTCGGACGTCCGGAGACTGTAGTTCTCTACAGTCTCCCGACGTCCGAAAAATTCGA HindIII

IGFBP4-1sh-F:

5'- GATCCCCAGCCTGCAGCCCTCTGACATTCAAGAGATGTCAGAGGGCTGCAGGCTTTTTTA-3'

IGFBP4-1sh-R:

5'- AGCTTAAAAAGCCTGCAGCCCTCTGACATCTCTTGAAATGTCAGAGGGCTGCAGGCTGGG-3'

• **IGFBP4-3sh:**

BgIII LOOP

5'- GATCCCCAACAGCTTCAGCCCTGTTCAGAGAGAACAGGGGCTGAAGCTGTTGTTTTTA-3'  
 3'-GGGTTGTGCAAGTCCGGGACAAAGTTCTCTTGTCGCCGACTTCGACAACAAAAATTCGA-5' HindIII

IGFBP4-3sh-F:

5'- GATCCCCAACAGCTTCAGCCCTGTTCAGAGAGAACAGGGGCTGAAGCTGTTGTTTTTA-3'

IGFBP4-3sh-R:

5'- AGCTTAAAAAACAGCTTCAGCCCTGTCTCTTGAAACAGGGGCTGAAGCTGTTGGG-3'

• **IGFBP4-7sh:**

BgIII LOOP

5'- GATCCCC TTCGAGACCGGAGCACCAGTTCAGAGACTGGTGCTCCGGTCTCGAATTTTTTA-3'  
 3'-GGGAAGCTCTGGCCTCGTGGTCAAGTTCTCTGACCACGAGGCCAGAGCTTAAAAATTCGA-5' HindIII

IGFBP4-7sh-F:

5'- GATCCCC TTCGAGACCGGAGCACCAGTTCAGAGACTGGTGCTCCGGTCTCGAATTTTTTA-3'

IGFBP4-7sh-R:

5'-AGCTTAAAAATTCGAGACCGGAGCACCAGTCTCTTGAACTGGTGCTCCGGTCTCGAAGGG-3'

## 2.6 Antikörper und rekombinante Proteine

**Tabelle 2.4:** Zusammenfassung der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Detektiertes Fragment	Quelle	Verdünnung für WB/IHC
IGFB-4 (C20)-sc6005	Carboxyterminus von IGFBP-4	24/28 kDa	polyklonal, Ziege Santa Cruz	1 : 2000
β-Actin Clone AC-74	N-terminales Epitop	β-Actin 42 kDa	polyklonal, Maus Sigma	1 : 2000
Caspase-3	Region um Asp 175 (Spaltstelle für proteolytische Aktivierung)	full-length-Caspase 35 kDa aktive Spaltprodukte 19 kDa, 17 kDa	polyklonal, Ziege Cell Signaling	1 : 1000
Caspase-9	Region um Asp 315 (Spaltstelle für proteolytische Aktivierung)	full-length-Caspase 47 kDa aktive Spaltprodukte 35 kDa, 37 kDa	polyklonal, Kanninchen Cell Signaling	1 : 1000
phospho-Akt (Ser 473)	Region um Ser 473	Aktives Akt phosphoryliert an Serin 473	polyklonal, Kanninchen Cell Signaling	1 : 1000
total-Akt	Carboxyterminus von Akt	Akt1, Akt2, Akt3	polyklonal, Kanninchen Cell Signaling	1 : 1000
phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204)	phosphorylierte MAPK p44 und p42	phosphorylierte Erk1/Erk2 (42 und 44kDa)	monoklonal, Maus Cell Signaling	1 : 2000
total-MAPK	MAPK p44 und p42	Erk1/Erk2 (42 und 44kDa)	polyklonal, Kanninchen Cell Signaling	1 : 1000
CD95	humaner Fas-Rezeptor (CD95/APO-1)	-	monoklonal, Maus Biocheck	Apoptose-Induktion (5-20 ng/ml)

**Tabelle 2.5:** Auflistung der verwendeten rekombinanten Proteine

Bezeichnung	Quelle	biol. Aktivität
rIGFBP-4 BBP-360-2	Insektenzellen, Austral Biologicals (Australien)	ED <sub>50</sub> = 30-90 ng/ml
IGF-I Media Grade	<i>E. coli</i> , GroPep (Australien)	ED <sub>50</sub> = < 30 ng/ml
EGF	<i>E. coli</i> , Invitrogen	ED <sub>50</sub> = < 5 ng/ml
TRAIL	<i>E. coli</i> , Alexis (Schweiz)	ED <sub>50</sub> = 20 ng/ml

## 2.7 Chemikalien und Reagenzien

5'-Aza-2'-deoxycytidin, Sigma, St. Louis, USA

Acetamid; Sigma, St. Louis, USA

Acetonitril, *HPLC-Gradient Grade* Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

Agarose Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA

Albumin Fraktion V (BSA) Merck, Darmstadt, D

Ammoniumpersulfat, Merck, Darmstadt, D

Betaine 5M, Sigma, St. Louis, USA

Bis-Tris-PAA-Gele Invitrogen, Groningen, NL

Blasticidin Invitrogen, Groningen, NL

Bromphenolblau, Sigma, St. Louis, USA

Complete mini, Roche, Mannheim, D

Coomassie R250 Sigma, St. Louis, USA

DMSO Sigma, St. Louis, USA

Ethidiumbromid (500 µg/ml) Sigma, St. Louis, USA  
Etoposid, Sigma, St. Louis, USA  
*Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent* Roche, Mannheim, D  
Gentamycin Invitrogen, San Diego, USA  
Geneticin (G 418), Roche, Mannheim, D  
Expand High Fidelity Taq Polymersae, Roche, Mannheim, D  
*HotStarTaq<sup>®</sup>* DNA Polymerase Qiagen, Hilden, D  
Isopropanol Merck, Darmstadt, D  
Kristallviolet, Merck, Darmstadt, D  
Matrigel Basement Membrane Matrix ,BD Bioscience, Bedford, USA  
Mineralöl, Sigma, St. Louis, USA  
MTT, Sigma, St. Louis, USA  
Natriumdodecylsulfat (SDS) Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA  
Poly-HEMA Sigma, St. Louis, USA  
Propidiumiodid Sigma, St. Louis, USA  
Protein G on Sepharose 4B fast flow, Sigma, St. Louis, USA  
*Rotisol<sup>®</sup>HPLC-Gradient-Grade-H<sub>2</sub>O* Roth, PE Applied Biosystems, Foster City, USA  
SeaPlaque GTG Agarose, Biozym  
Staurosporin Sigma, St. Louis, USA  
T4-Ligase und 10x Puffer Promega, Mannheim, D  
Trypan-Blau Sigma, St. Louis, USA  
Trypsin ICN, Biomedicals  
Tween 20 Sigma, St. Louis, USA  
X-Gal Gibco BRL, Eggenstein, D

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Gibco BRL (Eggestein) oder Sigma (München) in höchstem Reinheitsgrad (pro analysis, p.A.) bezogen.

## 2.8 Reagenzien-Kits

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Roche  
Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche  
CpGenome<sup>™</sup> DNA Modification Kit, Q-Biogen  
ECL<sup>™</sup> Western Blotting detection Reagents, Amersham Biosciences  
GFX<sup>™</sup> Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Bioscience  
QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit, Qiagen  
QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit, Qiagen  
OmniScript RT Kit, Qiagen  
Micro BCA<sup>™</sup> Protein Array Kit, Pierce  
Mycoplasma Plus<sup>™</sup> PCR Primer Set, Stratagene  
Vectastain<sup>®</sup>-ABC-Peroxidase-Kit, Vector Laboratories

**2.9 Puffer und Lösungen****A.L.F.-Auftragspuffer**

100 ml Formamid  
5 g Amberlite  
600 mg Dextran  
3 ml 20 mM EDTA, pH 8,3

**Aufbewahrungsmedium**

50% PBS  
50% Glycerin  
Sucrose  
MgCl x 6 H<sub>2</sub>O

**Bindesilan**

4 ml Ethanol absolut  
15 µl Bindsilan (Pharmacia)  
1 ml 10% Essigsäure

**5 x Elektrophorese/Transferpuffer**

125 mM Tris, pH 8,3-8,4  
960 mM Glycin

**1 x Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris, pH 8,3-8,4  
192 mM Glycin  
SDS

**Färbelösung**

100 mmol/l Natriumphosphat  
1,3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>  
3 mmol/l K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
3 mmol/l K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  
0,4 mg/ml X-Gal

**Fixierlösung**

0.5% Glutaraldehyd in PBS

**Fixierlösung für IHC**

30% Formalin in PBS

**Nicoletti-Puffer**

Iodid 50 µg/ml Propidium- Iodid  
0,1% [w/v] Na-Citrat,  
0,1% [w/v] Triton X-100)

**SB-Probenpuffer**

7 M Harnstoff  
40% (v/v) Glycerin  
50 mmol/l EDTA  
10 mmol/l Tris  
0,1% (w/v) Bromphenolblau

**1 x TBE**

0,2 M Tris  
0,17 M Borsäure  
2 mM EDTA, pH 8,0

**1 x TE**

10 mM Tris, pH 8,0  
1 mM EDTA

**10 x TBS**

80 g NaCl  
13.1 g Tris  
pH 7,3

**0,1% TBST**

1 x TBS  
0,1% Tween20

**1 x Transferpufferpuffer**

25 mM Tris, pH 8,3-8,4  
192 mM Glycin  
20% Methanol

**LB-Medium (Luria Broth)**

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
Aqua dest. Ad 1000 ml  
pH-Wert 7,3  
Für die Herstellung von LB-Agar-  
Platten wurde dem LB-Medium 2%  
Agar-Agar zugesetzt.

**SOC-Medium**

0,5% Hefe-Extrakt  
2% Trypton  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O  
10 mM MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>Og  
20 mM Glucose

**RIPA-Puffer/100 ml**

50 mM Tris pH 7,4  
150 mM NaCl  
1% TritonX-100

**6x SDS-Probenpuffer (nach Laemmli)**

2% SDS  
10% Glycerin  
5% β-Mercaptoethanol  
0,002% Bromphenolblau  
62,5 mM Tris

**Stripping-Puffer**

100 mM β-Mercaptoethanol  
2% SDS  
62,5 mM Tris/HCl pH 6,8

**2.10 Sonstige Materialien**

Sterile Einweg-Plastikwaren, u.a. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Zellkulturschalen wurden von den Firmen Becton Dickinson, Gibco, Greiner, Sarstedt, Sartorius, ABgene und Nerbe plus bezogen.

## 2.11 Geräte

A.L.F.express (Automated Laser Fluorescence)-DNA-Sequenzierer, Pharmacia

Autoklav FNR3200 F Tecnomera

Blotting-kammer: Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer, Nalge Company

CO<sub>2</sub>-Inkubator BB-16, Heraeus Sepatec

Elektrophorese-Kammer: Horizon™, Life technologies Inc.

ELISA-Reader

FACS, BD Biosciences

Filterhalter mit Filtratflasche 250 ml Vol, Nalge Company

Gene-Pulser™, BioRad

Heizblock: Test tube Heater SHT2D, Stuart scientific

Magnetrührer, Ika Labortechnik

Mikrodismembrator, Braun Biotech. Inc.

Mikroskop

Mikrowellengerät, Bosch

Mini Protean II Cell System; BioRad

pH-Meter, Modell pH96-A, WTW

Photometer

Spannungsquellen: Power Pac 300, BioRad

Sterilbank

Thermocycler: OmniGene, Hybaid;

UV-Tisch N90 MW 312 nm, Faust

Wavesystem Transgenomic, Omaha, NE

Schüttler Vortex Genie 2 Heidolph,

Waage LG10-D Satorius, Göttingen

Wasserbad B3 Haake

Zentrifugen: Biofuge 15 Heraeus Sepatec; Megafuge 1.0R Heraeus

## 2.11 Software und Datenbanken

CellQuest Pro (FACS), BD Biosciences

Clone Manager 4.01 Scientific & Educational Software

Fragment Manager Pharmacia

ImageJ

Primer3, Whitehead Institute for Biomedical Research [http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Wavemaker 4.1.42 Transgenomic

Genomatix <http://www.genomatix.de>

Transfac 4.0 <http://cbil.upenn.edu/tess>

Entrez (PubMed/GenBank) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>

OMIM <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

### 3. METHODEN

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 DNA/RNA-Isolierung

###### 3.1.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene Tumor- bzw. Normal-Gewebe wurde auf einem block Trockeneis gelegt und mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde im flüssigen Stickstoff erneut schockgefroren und in einer im flüssigen Stickstoff tiefgekühlter Teflonkapsel mit Wolframkugel mechanisch im Mikrodismembrator für 1 Minute bei 2000 rpm pulverisiert. Das pulverisierte Gewebe wurde in 3-4 ml DNA-Verdaupuffer aufgenommen und nach Zugabe von Proteinase K (0,1 mg/ml Verdaupuffer) über Nacht bei  $50^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Extraktion der DNA erfolgte nach der PCI-Methode. Die Proben wurden hierbei im gleichen Verhältnis mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Gemisch versetzt und nach kräftigem Schütteln zur Phasentrennung für 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige wässrige Überstand wurde abgenommen und zur vollständiger Entfernung des Phenols mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt, geschüttelt und nochmals zentrifugiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskalten absoluten Ethanol und 0,5 Volumen Ammoniumacetat (3M) und Inkubation für mindestens 60 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 2 000 rpm) sedimentiert, mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Pellet-Größe in einer entsprechenden Menge steriler Aqua dest. gelöst. Die Konzentrations-Bestimmung erfolgte photometrisch wie unter 3.1.5 beschrieben.

###### 3.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Frisch trypsinierte und in PBS gewaschene Zellen bzw. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte Zellpellets werden in DNA-Verdaupuffer resuspendiert (0,1 ml Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen). Die Extraktion der DNA erfolgte wie unter 3.1.1.1 beschrieben

###### 3.1.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut bzw. Blutlymphozyten

Die DNA-Isolierung aus Vollblut bzw. Lymphozyten erfolgte unter Verwendung des QIAmp DNA Blood Midi Kits von QIAGEN laut Angaben des Herstellers. Dazu wurden entweder 200  $\mu\text{l}$  Patienten-Vollblut bzw. zuvor isolierte Lymphozyten eingesetzt. Den Patientinnen wurden zuvor 2 x 4 ml Blut in Standardröhrchen mit 0,1 mM EDTA entnommen und bis zur DNA-Isolierung bei  $4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Gewinnung der Lymphozyten wurden 3 ml Patientenblut mit Erythrozyten-Lysispuffer versetzt, gemischt und mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Die Lymphozyten wurden dann bei  $4^{\circ}\text{C}$ , 1000 rpm abzentrifugiert, mit 5 ml PBS gewaschen und entweder sofort zur DNA-Isolierung eingesetzt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.1.1.4 RNA-Isolierung aus Gewebe

Alle hierbei verwendeten Lösungen wurden vor dem Einsatz mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden. Hierzu wurde DEPC im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt und im Verhältnis 1:100 den Lösungen zugesetzt. Diese wurden dann ÜN bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe) verwendet. Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) und basiert auf einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse die Integrität der RNA schützt.

Das Gewebe wurde zur Isolierung wie unter 3.1.1.1 beschrieben pulverisiert und in 1ml TRIzol™ aufgenommen. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Proben wurden ca. 15 Sekunden lang geschüttelt und nach weiteren 2-3 min Inkubation bei RT für 15 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Ober-Phase wurde dann vorsichtig mit 500 µl Isopropanol gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die präzipitierte RNA durch Zentrifugation (10 min bei 12000 rpm, 4°C) pelletiert. Das RNA-Pellet wurde dann 2 mal mit eisgekühltem 75% (v/v) Ethanol vorsichtig gewaschen (Entfernung des Ethanols durch Zentrifugation von 5 min bei 4°C und 9500 rpm), für 5–10 min im Heizblock bei 55°C getrocknet und je nach Pellet-Größe in 20 – 100 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgt photometrisch.

#### 3.1.1.5 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Frisch trypsinierte und in PBS gewaschene Zellen bzw. bei –20°C gelagerte Zellpellets werden in 1 ml TRIzol™ resuspendiert. Die Extraktion der RNA erfolgte wie unter 2.1.1.4 beschrieben.

#### 3.1.1.6 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Für die Expressions-Analysen der Kandidatengene wurde die Gesamt-RNA aus Normal- und Tumorgeweben bzw. Zelllinien durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. (Omniscript RT Kit (QIAGEN)) Der Einsatz unspezifischer Hexanukleotide, hier als Random Primer bezeichnet, ermöglichte es, statistisch gesehen, die gesamte RNA-Population zu erfassen. Ausgehend von einer einzigen cDNA-Synthese konnten so anschließend mehrere Transkripte gleichzeitig untersucht werden, was für eine spätere Quantifizierung entscheidend war. Hierfür wurden mindestens 500 ng RNA entsprechend auf ein Endvolumen von 12,5 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Von der RNA wurden 500 ng für 5 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 12,5 µl des nach Herstellerangaben vorbereiteten Reaktionsansatzes zu den RNA-Proben dazugegeben, so dass folgende Konzentrationen im Reaktionsvolumen (25 µl) vorlagen: 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml BSA, 15 mM DTT, je 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000 pmol Random-Primer und 9.5 U (0,5 µl) Reverse Transkriptase. Für die cDNA Synthese wurde der Reaktionsansatz 60 Minuten bei 37°C und inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch Inkubation für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Nach Abkühlung auf Eis wurden die cDNA Proben bei –20°C gelagert.

### 3.1.1.7 Kontrolle der cDNA-Synthese mittels $\beta$ -Actin-PCR

Die  $\beta$ -Actin-PCR (Tabelle 3.1.) dient als Qualitätskontrolle für die synthetisierte cDNA. Die  $\beta$ -Actin-Primer (siehe Tabelle 2.3) wurden so gewählt, dass genomische DNA aufgrund der zusätzlichen Intronsequenzen ein größeres Fragment (652 bp) ergab als das cDNA-Fragment (446 bp), so dass eventuelle DNA-Kontaminationen nach Auftrennung der Produkte im Agarosegel detektiert werden konnten.

**Tabelle 3.1.**  $\beta$ -Actin-PCR-Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen ( $\mu$ l)	Reaktionsbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,5	94°C 10 min
10x Puffer	5	94°C 1 min 60°C 1 min 72°C 1 min 72°C 8 min } X 35
5'Primer	2,0 (25 pmol)	
3'Primer	2,0 (25 pmol)	
dNTPs	3,0 (7,5 nmol)	
Taq-Polymerase	0,5 (2,5 U)	

### 3.1.3 Polymerasen-Kettenreaktion

Die Polymerasen-Kettenreaktion diente zur gezielter Amplifikation spezifischer Gensequenzen für weitere Analysen. Die jeweiligen Reaktionsbedingungen, wie anealing-Temperatur, Primer- und Nukleotidkonzentration, Zyklenzahl, Template-Menge (cDNA, DNA), wurden für jedes Kandidatengen entsprechend optimiert. Grundsätzlich betrug das Reaktionsvolumen 50  $\mu$ l. Jeder Reaktionsansatz enthielt DNA bzw. cDNA als Template, PCR-Reaktionspuffer, dNTPs, spezifische Primer und dH<sub>2</sub>O. Die Sequenzen der einzelnen Primer sind tabellarisch unter Punkt 2.5 aufgeführt. Sollten die PCR-Produkte anschließend auf dem A.L.F.-Sequenziergerät analysiert werden, waren die entsprechenden 5'-Primer Cy5 Fluorescein-markiert. Für die PCR-Reaktion wurden je nach Zielsetzung unterschiedliche Taq-Polymerasen eingesetzt. Jede PCR-Reaktion wurde mit einem „final extension“-Schritt (8 min bei 72°C) beendet, um einen vollständigen Abschluss aller Reaktionen zu gewährleisten.

#### 3.1.3.2 PCR-Amplifikation zur LOH-Analyse

Für die LOH-Analyse der Kandidatengene wurde parallel DNA aus Tumor- und Normalgewebe einer Patientin untersucht. Als Normalgewebe wurde in den meisten Fällen Normalblut herangezogen. Für jedes Kandidatengen wurde mindestens ein polymorpher Mikrosatelliten-Marker (repetitive DNA-Sequenzen mit hoher Heterozygotie) ausgewählt, der idealerweise intragenisch, bzw. in nächster Nähe des untersuchten Gens lokalisiert war. Die Primersequenzen und die jeweilige Produktlänge sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Die gewählten Mikrosatelliten-Marker mussten eine genügend hohe Heterozygotie-Rate aufweisen, d.h. eine genügend große Anzahl der untersuchten Patientinnen musste bezüglich des Markers informativ sein. Dies ließ sich anhand der Analyse des Normalgewebes bzw. der Blutprobe feststellen. Die Amplifikation nicht-informativer Normalproben ergab nur ein einziges PCR-Produkt, da die Patientin die gleiche Anzahl von Wiederholungseinheiten in beiden Allelen aufwies, d.h. homozygot war. In diesem Fall konnte ein eventuell vorliegender Allelverlust nicht detektiert werden. Bei informativen Fällen hingegen erhielt man zwei unterschiedlich große PCR-Produkte, da die Patientin 2 verschieden lange Repeat-Einheiten des untersuchten Markers in beiden Allelen trug und somit heterozygot war. Hier konnte der Verlust eines Allels als eine Signalreduktion einer der Produkte im Tumor gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden.

**Tabelle 3.2:** Zusammenstellung der PCR-Bedingungen für die LOH-Analyse von IGFBP-4

PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen (µl)	Reaktionsbedingungen
H <sub>2</sub> O	32,1	94°C 10 min
10x Puffer	5	94°C 30 sec
5'Primer	5,0 (50 pmol)	57°C 30 sec
3'Primer	5,0 (50 pmol)	72°C 30 sec
dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	} X 35
Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
		72°C 8 min

Die Auftrennung und quantitative Bestimmung der Produktmengen erfolgte mit Hilfe des A.L.F.-Sequenzierers und der Fragment Manager Software (Pharmacia). Zunächst wurde das Mengen-Verhältnis der beiden Produkte, d.h. der beiden Allele, jeweils für Normal- und Tumorgewebe bestimmt:

$$\text{Ratio}(\text{normal}) = \frac{(\text{Fläche Allel 1})}{(\text{Fläche Allel 2})} \qquad \text{Ratio}(\text{tumor}) = \frac{(\text{Fläche Allel 1})}{(\text{Fläche Allel 2})}$$

Die LOH-Rate ergibt sich aus dem Verhältnis von Ratio (Tumor) zu Ratio (Normal) und wird wie folgt berechnet:

$$\text{ALLELVERHÄLTNISQ} = \frac{(\text{RATIO TUMOR})}{(\text{RATIO NORMAL})}$$

### 3.1.3.3 quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression

Die quantitative RT-PCR wurde zur Expressionsanalyse der Kandidatengene in Tumorgeweben und Zelllinien herangezogen. Das Prinzip beruht auf einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens und eines stabil exprimierten „single copy“ Gens, d.h. eines nur in einer Kopienzahl vorliegenden Referenzgens im gleichen PCR-Reaktionsansatz (multiplex PCR). Dieses Referenzgen, meistens ein „housekeeping“-Gen, diente somit als interner Standard und erlaubte somit den direkten Vergleich der Gen-Expression verschiedener Gewebeproben eines Kollektivs bzw. verschiedener Zelllinien. Die Fluoreszenz-markierten Primer ermöglichten die Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe eines A.L.F.express (Automated Laser Fluorescence)-DNA-Sequenzierers. Die Auswertung erfolgte mit der Fragment Manager Software. Dabei galt die Fläche (A), die von den Signal-Peaks begrenzt wurde, als Maß der Expressionsstärke. Die relative Expression des Zielgens ergab sich aus dem Verhältnis der Signalstärke des Zielgens zu der des Referenzgens. Die Bedingungen der PCR für jedes einzelne Kandidatengen mussten so optimiert werden, dass die Reaktionskinetik allein von der Menge der Template-cDNA abhängig war und nicht von der Enzym-, Primer- und Nukleotidmenge limitiert wurde. Die jeweiligen PCR-Bedingungen für die Expressionanalyse einzelner Gene sind in der Tabellen 3.3 und 3.4 aufgeführt.

Für alle PCR-Reaktionen mit Ausnahme der IGFBP-4-Amplifikation wurde die Taq DNA Polymerase (amersham pharmacia biotech) und der Hybond Omnigene PCR-Cycler eingesetzt. Da das Gerät keinen beheizbaren Deckel besaß, mussten die Reaktionen zum Schutz vor Verdunstung mit je 2 Tropfen Mineralöl überschichtet werden.. Für die Amplifikation des IGFBP-4-Gens wurde die Expand High Fidelity Taq Polymerase (Roche) eingesetzt, da mit der Taq DNA Polymerase kein Produkt amplifiziert werden konnte.

**Tabelle 3.3:** Zusammenstellung der PCR-Bedingungen für die Expressionsanalysen

Gen	PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen (µl)	Reaktionsbedingungen
IGFBP-4	H <sub>2</sub> O	27,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	5'Primer	5,0 (50 pmol)	57°C 45 sec
	3'Primer	5,0 (50 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 38/28
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
IGFBP-2	H <sub>2</sub> O	27,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	5'Primer	5,0 (50 pmol)	59°C 45 sec
	3'Primer	5,0 (50 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 29
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
IGFBP-3	H <sub>2</sub> O	33,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	5'Primer	2,0 (20 pmol)	58°C 45 sec
	3'Primer	2,0 (20 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 33/29
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
IGFBP-6	H <sub>2</sub> O	29,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	5'Primer	4,0 (40 pmol)	58°C 45 sec
	3'Primer	4,0 (40 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 33/29
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Rab5C	H <sub>2</sub> O	27,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	5'Primer	4,0 (40 pmol)	58°C 45 sec
	3'Primer	4,0 (40 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	6,0 (60 pmol)	} x 30
	GAPDH-3'-Primer	6,0 (60 pmol)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
CRYAB	H <sub>2</sub> O	15,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 30 sec
	MgCl <sub>2</sub>	3,0 (Endkonz. 3 mM)	57°C 45 sec
	5'Primer	6,0 (60 pmol)	72°C 1 min
	3'Primer	6,0 (60 pmol)	72°C 8 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	} x 28
	GAPDH-5'-Primer	6,0 (60 pmol)	
	GAPDH-3'-Primer	6,0 (60 pmol)	
High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)		

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurde der sog. „Hot start“ angewandt, d.h. die Polymerase wurde erst während eines Vorheischrittes von 10 min bei 94°C dazugegeben. Für diejenigen Kandidatengene, bei denen die Zyklenzahl für die optimale Amplifikation von Ziel- und Referenzgenen zu unterschiedlich waren, wurde die sog. „primer dropping“-Methode angewandt. Hierbei wurde die Reaktion zunächst nur mit dem Primerpaar für die Sequenz mit der höheren Zyklenzahl gestartet – meistens waren es die Primer für das Zielgen. Erst zu einem entsprechenden Zeitpunkt wurde das zweite Primerpaar für das Gen mit der niedrigeren Zyklenzahl – hier meistens das Referenzgen – dazugegeben.

**Tabelle 3.4:** Zusammenstellung der PCR-Bedingungen für die Expressionsanalysen-Fortsetzung

Gen	PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen (µl)	Reaktionsbedingungen
ERalpha	H2O	29,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 45 sec
	5'Primer	4,0 (40 pmol)	58°C 1 min
	3'Primer	4,0 (40 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 34/27
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)		
ERbeta	H2O	29,1	94°C 10 min
	10x Puffer	5,0	94°C 1 min
	5'Primer	4,0 (40 pmol)	58°C 1 min
	3'Primer	4,0 (40 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 40/31
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)		
Sp1	H2O	29,1	94°C 15 min
	10x Puffer	5,0	94°C 15 sec
	5'Primer	4,0 (40 pmol)	58°C 30 sec
	3'Primer	4,0 (40 pmol)	72°C 1 min
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	72°C 8 min
	GAPDH-5'-Primer	5,0 (50 pmol)	} x 32/28
	GAPDH-3'-Primer	5,0 (50 pmol)	
High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)		

### 3.1.4 Sequenzierung

Die Amplifikation von Gen-Abschnitten für die Sequenzierung erforderte eine möglichst geringe Polymerase-Fehlerrate. Dies wurde durch den Einsatz der Expand High Fidelity Taq Polymerase (Roche), die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, gewährleistet. Die Sequenzierung selbst wurde freundlicherweise durch Mitarbeiter des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

### 3.1.5 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zusätzlich wurde zur Reinheitskontrolle der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260 nm /280 nm bestimmt, der im Bereich zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die Konzentration der Nukleinsäuren aus folgender Formel:

$$c = E \times \frac{1}{e} \times \frac{1}{d}$$

c: Konzentration in mg/ml

E: Extinktion bei 260 nm

d: Schichtdicke der Küvette = 1 cm

Der molare Extinktionskoeffizient e beträgt bei 260 nm für RNA und einzelsträngige DNA 25 cm<sup>2</sup>/mg, für doppelsträngige DNA 20 cm<sup>2</sup>/mg und für Oligonukleotide 30 cm<sup>2</sup>/mg.

### 3.1.6 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten

#### 3.1.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7%-2%-igen (w/v in TBE-Puffer) Agarosegelen. Je 5-10 µl der Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit SD-Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Fragmentgrößenbestimmung wurde wahlweise die 1-kb DNA-Leiter (Gibco BRL) oder der SmartLadder Größenstandards (Eurogentec) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente bei 70 bis 100 V für 30 bis 180 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden dann nach Färbung der Gele für mindestens 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Dabei wurde das zwischen den DNA-Basen interkalierte Ethidiumbromid unter UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt.

#### 3.1.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Polyacrylamid-Gel mit dem A.L.F.-Sequenzierer wurde zur Quantifizierung von PCR-Produktmengen für die LOH- und Expressionsanalyse der Kandidatengene verwendet. Die PAA-Gelelektrophorese im A.L.F.-Sequenzierer ermöglicht eine hohe Auflösung von kleinen DNA-Fragmenten bis 1000 bp und die Quantifizierung geringer Probenmengen. Die verwendeten 9% Acrylamidgele besitzen einen optimalen Trennbereich zwischen 60 – 400 bp. Während der Elektrophorese durchlaufen die Cy5-markierten PCR-Produkte im unteren Drittel des vertikalen Polyacrylamidgels einen Laserstrahl (Helium-Neon-Laser, 632,8 nm) und werden zur Fluoreszenz angeregt. Die Strahlung wird direkt von senkrecht zum Laserstrahl befindlichen Photodioden detektiert, durch die Software erfasst und gespeichert. Die vorgelagerten optischen Filter verringern die Hintergrundstrahlung und das Streulicht. Nach Beendigung des Laufs können die Rohdaten dann mit Hilfe der Software (Fragment-Manager) ausgewertet werden.

**Tabelle 3.5:** Bedingungen für A.L.F.-Polyacrylamidgel-Elektrophoresen

Parameter	Fragmentanalyse
Spannung	1500 Volt
Strom	34 mA
Leistung	38 Watt
Temperatur	40°C
Laufpuffer	0,6 x TBE

Zur Vorbereitung des Polyacrylamid-Gels wurden die Glasplatten der Gelvorrichtung sorgfältig gesäubert, im Bereich des Proben-Kamms mit Binde-Silan-Lösung behandelt und zusammengesetzt (0,5 mm „Spacer“). Für die Gellösung wurden 25,2 g Urea und 9 ml Monomerenlösung (1:29 Bisacrylamid/Acrylamid) in 25,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 5 g Amberlite für 10 Minuten gerührt. 6 ml 6 x TBE und die Lösung wurden filtriert, vermischt und entgast. Dann wurden 40 µl TEMED und 200 µl 10%iges APS zugegeben und die Lösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen. Die Gellösung polymerisierte für mindestens 2 h. Für die Fragmentanalysen wurden die Proben je nach PCR-Produkt mit Aqua dest. verschieden stark verdünnt (1.2 bis 1:50), wobei die entsprechende Verdünnung durch vorherige Auftragung der Produkte auf ein Agarosegel und grobe Abschätzung der Produktmenge ausgewählt wurde. 6,5 µl der Verdünnung wurden dann mit 6,5 µl A.L.F.-Probenauftragspuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert, 3 Minuten auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Je nach Fragmentgröße erfolgte die Elektrophorese für 180 bis 360 min in 1x TBE-Puffer.

### 3.1.7 Mutationsanalyse mittels DHPLC

Für die Mutationsanalyse des IGFBP-4- wurde das Gen in 9 Fragmente aufgeteilt, die nicht größer als 600-800 bp waren, um später eine direkte Sequenzierung dieser Fragmente zu ermöglichen. Idealerweise entsprachen die ausgewählten Fragmente den einzelnen Exons, bei größeren Exons wurden diese in überlappende Fragmente unterteilt. Die Fragmente wurden jeweils getrennt mit Primern amplifiziert, die mit Bereichen in den flankierenden Introns hybridisierten. Die optimalen PCR-Bedingungen für jedes DNA-Fragment wurden experimentell ermittelt (Tabelle 3.6).

Für die DHPLC-Analyse wurde mit Hilfe des Wavemaker 4.1.42 Programms für jedes amplifizierte Fragment die optimalen Bedingungen (Acetonitril-Gradient, Temperatur) ermittelt. Es wurde meistens eine Temperatur ausgewählt, bei der 20-80% des DNA-Fragmentes als Einzelstrang vorlag. Der Acetonitril-Gradient wurde so angepasst, dass das DNA-Fragment nach einer Retentionszeit von 3-5 min von der Säule eluiert wurde. Die Primersequenzen für die Amplifikation der einzelnen Analyse-Fragmente sind in Tabelle 2.2 und die DHPLC-Bedingungen in der Tabelle 3.7 aufgeführt.

### 3.1.8 Methylierungsanalyse mittels DHPLC

Die DHPLC ermöglicht neben der Detektierung von Punktmutationen auch die Identifizierung methylierter CpG-Insel nach vorheriger Bisulfit-Modifikation der zu untersuchenden DNA. Nach der Umwandlung unterscheidet sich die methylierte und unmethylierte DNA in ihrem GC-Gehalt und zeigen somit ein unterschiedliches Schmelzverhalten. Ähnlich wie bei der Mutationsanalyse entstehen nach Denaturierung und Renaturierung neben Homoduplices auch Heteroduplices, die voneinander getrennt werden können.

Die Deaminierung von unmethylierten Cytosin-Basen in Uracil mittels Bisulfit beruht auf der Methode von Clark et al [1994]. Die Umwandlung erfolgte mit dem CpGGenome DNA Modifikation Kit nach Angaben des Herstellers (Q-Biogen). Es wurden jeweils 1 µg DNA für die Umwandlung eingesetzt. Mit Hilfe geeigneter Primer (siehe Tabelle 2.2) wurde das entsprechende Promotorfragment mit den zu analysierenden CpGs amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe .Tabelle 3.6.). Die Primer wurden so gewählt, dass sie keine CpG-sites innerhalb ihrer Sequenz enthielten, so dass sowohl methylierte wie auch unmethylierte Fragmente amplifiziert werden konnten. Diese wurden dann unter optimalen Bedingungen auf der DHPLC analysiert.

**Tabelle 3.6:** Zusammenstellung der PCR-Bedingungen für die Mutationsanalyse von IGFBP-4

Fragment	PCR-Reaktionsansatz	eingesetztes Volumen ( $\mu$ l)	Reaktionsbedingungen
PromGC	H <sub>2</sub> O	37,1	94°C 10 min 94°C 30 sec 59°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min x 35
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	Betain	5,0 (1M)	
	High-FidelityTaq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Ex1full	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 61°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 34
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	Betain	5,0 (1M)	
	Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Ex1prom	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 58°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 35  Gelelution → Reamplifizierung bei 56°C, 35 Zyklen
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	Betain	5,0 (1M)	
	Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Exon 2	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 56°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 35
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	DMSO	5,0 (10%)	
	Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Exon 3	H <sub>2</sub> O		95°C 10 min 92°C 1 min 64°C 3 min 72°C 1 min } x 12 (je Zykl. – 0,5°C)  92°C 1 min 64°C 3 min 72°C 1 min 72°C 8 min } x 26
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	DMSO	5,0 (10%)	
	Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Exon 4.1	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 61°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 35
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	High-Fidelity-Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	
Exon 4.2 und Exon 4.3	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 63°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 35
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
High-Fidelity-Taq-Polymerase	0,4 (2 U)		
Exon 4.4	H <sub>2</sub> O		94°C 10 min 94°C 30 sec 62°C 45 sec 72°C 1 min 72°C 8 min } x 35
	10x Puffer	5,0	
	5' Primer	5,0 (50 pmol)	
	3' Primer	5,0 (50 pmol)	
	dNTPs	2,5 (7,5 nmol)	
	High-Fidelity-Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	

**Tabelle 3.6:** DHPLC-Bedingungen für die Mutationsanalyse von IGFBP-4:

IGFBP-4-Fragment	Analyse-Temp.	Puffer	A%	B%
PromGC	63°C	Loading:	55	45
		Start Gradient:	50	50
		Stop Gradient:	41	59
Ex1prom	70°C	Loading:	49	51
		Start Gradient:	44	56
		Stop Gradient:	35	65
Ex1full	69°C, 72°C	Loading:	49	51
		Start Gradient:	44	56
		Stop Gradient:	35	65
Exon 2	65°C	Loading:	54	46
		Start Gradient:	49	51
		Stop Gradient:	40	60
Exon 3	65°C, 67°C	Loading:	56	44
		Start Gradient:	51	49
		Stop Gradient:	42	58
Exon 4.1	65°C	Loading:	50	50
		Start Gradient:	45	55
		Stop Gradient:	36	64
Exon 4.2	61°C	Loading:	50	50
		Start Gradient:	45	55
		Stop Gradient:	36	64
Exon 4.3	63°C	Loading:	51	49
		Start Gradient:	46	54
		Stop Gradient:	37	63
Exon 4.4	60°C	Loading:	51	49
		Start Gradient:	46	54
		Stop Gradient:	37	63

### 3.1.9 Klonierung

#### 3.1.9.1 Restriktionsanalyse von DNA

Alle Restriktionen wurden unter den vom Hersteller der Restriktionsenzyme (Roche, New England Biolabs) angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer im 20 µl-Reaktionsansatz durchgeführt. Es wurden zwischen 0,4 µg und 5 µg DNA und 1-5 Units Enzym eingesetzt. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden diese gleichzeitig unter Verwendung des optimalen Puffers für alle Enzyme eingesetzt. Die Ansätze wurden jeweils über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.1.9.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Nach der Auftrennung und Gelfärbung in Ethidiumbromid wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Eppendorf Cup überführt. Nach Gewichtsbestimmung des Agarosestückchens wurde dieses mit dem dreifachen Gewichts-Volumen des Puffers QG versetzt und bei 50°C im Heizblock geschmolzen. Nach Zugabe eines Volumens Isopropanol wurde das Gemisch auf die Aufreinigungs-Säule aufgetragen und 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Die an die Siliconmembran der Säule gebundene DNA wurde diese nach Herstellerangaben mit Waschlösung (Puffer PE) gewaschen und erneut 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer durch erneute Zentrifugation von der Säule eluiert.

### 3.1.9.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase (Roche) in dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Es wurden je nach Reaktionsvolumen (15 bis 20  $\mu$ l) und eingesetzter DNA-Menge (20 bis 100 ng) 1-2 Units der Ligase verwendet. Für die Ligationsreaktion wurden unterschiedliche Vektor-Insert-Verhältnisse gewählt, wobei ein Vektor/Insert-Verhältnis von 1:3 sich am effektivsten erwies. Die einzusetzende Menge an Insert-DNA errechnete sich mit folgender Gleichung:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{Insert - Vektor - Verhältnis} \times \left[ \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \right]$$

Die Reaktionsansätze wurden ÜN (über Nacht) bei 8°C inkubiert und die Ligase anschließend für 10 min bei 60°C inaktiviert.

### 3.1.9.4 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter DH5 $\alpha$ - bzw. XL1-Blue-Zellen wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezchtet. Mit dieser Vorkultur wurden dann 500 ml LB-Medium angeimpft. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei  $\lambda = 600$  nm verfolgt. Bei einer optischen Dichte von ca.  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$  wurden die Zellen geerntet, in Zentrifugenröhrchen 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 g für 15 Minuten pelletiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml 10%igem Glycerin und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, á 40  $\mu$ l in Eppendorf Cups auf Eis aliquotiert und sofort bei -80°C gelagert.

### 3.1.9.5 Transformation von *E.coli* mittels Elektroporation

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der kompetente *E.coli*-Stämme DH5 $\alpha$  bzw. XL1-Blue durch Elektroporation transformiert. Dafür wurden die Kompetenten *E.coli*-Zellen Eis aufgetaut, mit 1-2  $\mu$ l des Ligationsansatzes gemischt und in eine eisgekühlte 2 mm- Elektroporationsküvette (BioRad) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser (BioRad, München) durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25  $\mu$ F, 200 W und  $t = 4,0$ . Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Eppendorf Cup für 1 h bei 37°C, 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Einzelkolonien wurden in je 4 ml LBamp-Medium angeimpft, ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubiert und anschließend für Plasmid-DNA-Isolierung geerntet.

### 3.1.9.6 Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus 2–3 ml Bakterienkultur wurde das GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Bei größerer Klonanzahl wurde alternativ die Plasmid-DNA nach der Methode der Alkalischen Lyse isoliert. Bakterien aus 3 ml der

ÜN-Kultur wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 10 000 rpm pelletiert und in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 µl der Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) und 5 min Inkubation lysiert, die Lösung gemischt bis sie klar wurde und für 5 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 (29,5 g KAc in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 5,5 mit Eisessig einstellen und die Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen; Lagerung bei 4 – 10 °C) wurde der Ansatz bis zur sichtbaren Verklumpung der Proteine gemischt, für 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min., 10000 rpm, RT). Der Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit absolutem Ethanol aufgefüllt, gemischt und für 10 min. bei -20°C inkubiert. Nach der Zentrifugation bei RT für 10 min. und 10000 rpm wurde die gefällte Plasmid-DNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 30 – 40 µl TE-Puffer (100xTE: 1 M Tris pH 8,0; 0,1 M EDTA) aufgenommen. Die Plasmid-Isolation aus größeren Bakterienkulturen (150 – 250 ml) wurde mit Hilfe des Endo Free® Plasmid Maxi Kits (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Passagierung von Zelllinien

Zur Kultivierung der Zelllinien wurden Aliquots je  $5 \times 10^6$  Zellen einer Stammcharge im 37°C Wasserbad möglichst schnell aufgetaut, sofort mit 5 ml auf 37°C erwärmten Medium versetzt, abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm), in 1 ml warmen Medium resuspendiert und in einer Gewebekulturflasche (250 ml, 75 cm<sup>2</sup>; Greiner) mit 10 ml des entsprechenden Mediums ausgesät. Alle Zellkulturen wurden unter aseptischen Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Mindestens zweimal wöchentlich wurde ein Medienwechsel vorgenommen, da Bestandteile des Mediums durch die Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C zerfallen. Dabei wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Einmalpipette abgenommen und frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium vorsichtig in die Kulturflasche pipettiert, ohne den Zellrasen zu beschädigen. Zur Passagierung konfluenter Kulturen wurden die adhären wachsenden Zellen mit PBS gewaschen und nach Zusatz von 3-5ml (je nach Flaschengröße) 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung und 5-10 min Inkubation vom Flaschenboden abgelöst und abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm). Die Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert, durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle vereinzelt. und dann ihrem Wachstum entsprechend anteilig neu in frische Kulturflaschen ausgesät.

Für funktionelle Assays war die Aussaat einer genau definierten Menge an Zellen erforderlich, so dass hier eine Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer vor der Subkultivierung durchgeführt werden musste. Hierfür wurde die vereinzelt Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und 10 µl von der Mischung wurden unter das Deckgläschen der Zählkammer pipettiert. Die Neubauer-Zählkammer weist 16 Gruppenquadrate auf, die das Großquadrat mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> bilden. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm. Bei geringer Zellzahl wurden diagonal 4 Gruppenquadrate (à 0,04 mm<sup>2</sup>), bei großer Zellzahl 4 Großquadrate ausgezählt, wobei nur die ungefärbten Zellen berücksichtigt wurden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen / } \mu\text{l}$$

Die Zellzahlbestimmung wird anhand einer Doppelbestimmung verifiziert.

### 3.2.2 Kryokonservierung

Die sedimentierten Zellen (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden in 1,6-1,8 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Danach wurden die Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 3.2.2 Mycoplasmen-Test

Mycoplasmen sind die kleinsten ( $0,2-2,0 \mu\text{m}$ ) sich vermehrenden Prokaryonten und stehen in der mikrobiologischen Klassifikation zwischen Bakterien und Viren. Sie verursachen bei Menschen und Tieren hauptsächlich Erkrankungen des Bronchial- und Urogenitaltraktes. Sie haben keine Zellwand, wachsen intrazellulär und ernähren sich parasitär von den Nährstoffen und Stoffwechselprodukten ihrer Wirtszellen. Sichtbare Merkmale einer Mycoplasmen-Infektion in der Zellkultur sind z.B. abgerundete Zellen mit verminderter Adhärenz, starke Vakuolisierung, körniges Aussehen. Mycoplasmen greifen vielfältig in den Stoffwechsel befallener Zellen ein. Sie führen zur Verarmung von basischen Aminosäuren im Zellkulturmedium, was in Folge zu einer Anfälligkeit der Zellen für Mutationen und Transformationen, zu Mikrokernabspaltungen und vorzeitiger Apoptose führt. Mycoplasmen können auch Antigenpräsentation verhindern, Signaltransduktion auslösen bzw. die Rezeptorfunktionen der Zellmembran stören. Somit ist es unbedingt erforderlich, vor Durchführung von Zellkultur-Experimenten zu kontrollieren, ob die entsprechenden Zellen frei von einer Mycoplasmen-Infektion sind. Für den Nachweis eventueller Mycoplasmen-Kontaminationen wurde der Mycoplasma-Plus™ PCR-Primer Set (Stratagene) nach Angaben des Herstellers genutzt. Die Detektion beruht auf der Amplifikation einer hoch konservierten Region der Mycoplasmen-16sRNA. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, nach einer Restriktion des 874 bp-großen Produkts mit Sau3A anhand des spezifischen Bandenmusters die Mycoplasmen-Art zu identifizieren. Als Template diente jeweils der Zellkultur-Überstand ( $5 \mu\text{l}$ ) von nahezu konfluenten Zellen. Wurde eine Mycoplasmen-Infektion festgestellt, wurden die betroffenen Zellen für mindestens 3 Wochen mit dem Antibiotikum Ciprobay® ( $5 \mu\text{l/ml}$ ) behandelt, wobei bei jedem Mediumswechsel frisches Antibiotikum zugesetzt wurde.

### 3.2.4 Funktionelle Assays mit Zelllinien

#### 3.2.4.1 Promotor-Demethylierung nach Behandlung mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin

Um nachzuweisen, dass der beobachtete Expressionsrückgang von Tumorsuppressorgenen in Tumoren auf die detektierte Hypermethylierung des Promotors zurückzuführen ist, wurden niedrig-exprimierende Zelllinien mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt und anschließend hinsichtlich einer Gen-Reexpression untersucht. 5'-Aza-2'-deoxycytidin ist ein Cytosin-Analog, welches bereits erfolgreich bei Behandlung von Hämoglobinopathien und Leukämien in der Klinik eingesetzt wird. Für die 5'-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung wurden die entsprechenden Tumor-Zellen in 6-well-Platten ausgesät (je nach Zellart  $1 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^5$  Zellen/well). Nach 24h erfolgte ein

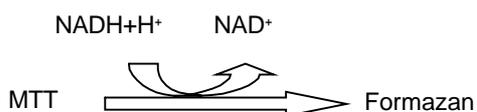
Mediumwechsel mit gleichzeitiger Zugabe von 5`-Aza-2`-deoxycytidin (in Ethanol) in verschiedenen Konzentrationen (0,1-7,5  $\mu\text{M}$ ). Da bereits aus der Literatur bekannt war, dass ER-negative Zellen ca. 4 bis 70 mal sensitiver auf 5`-Aza-2`-deoxycytidin reagieren als ER-positive Zellen, wurden ER-negative Zelllinien, wie z.B. SKBR3 mit geringeren Konzentrationen behandelt (maximal 2,5  $\mu\text{M}$ ). Nach 48 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel ohne weitere 5`-aza-dC-Zugabe. Nach weiteren 48 h Erholung wurden die Zellen für RNA- bzw. DNA-Isolierung geerntet.

### 3.2.4.2 Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I)

Für die Stimulation wurden je nach Zelllinie  $1,5 \times 10^6$  bis  $4 \times 10^6$  Zellen pro 9cm-Kulturschale im phenolrotfreiem Medium + 10% CSFCS ausgesät. Nach 24h erfolgte ein Wechsel auf phenolrotfreiem Medium + 1% CSFCS. Nach 3 weiteren Tagen wurden die entsprechenden Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-I) in geeigneten Konzentrationen (z. B. 10 ng/ml) dazugegeben und 15 min im Brutschrank inkubiert. Für die Untersuchung der IGF-I-Bindung durch IGFBP-4 im Transfektantenüberstand erfolgte vor der eigentlichen Zellstimulation zuerst eine Inkubation des Zellüberstandes mit dem zugesetzten IGF-I, um eine Bindung des IGF-I an die IGFBP-4-Proteine im Überstand zu ermöglichen. Dafür wurde der Überstand von den Zellen abgenommen, zur Entfernung schwimmender Zellen abzentrifugiert und in ein 12 ml-Röhrchen überführt. Eine entsprechende Menge an IGF-I wurde dann dazugegeben und für 15-20 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, bevor der Überstand dann zur Stimulation für 15 min auf die Zellen draufgegeben wurde. Zur Überprüfung der Spezifität der beobachteten Stimulationseffekte wurden auch Negativkontrollen durch Zugabe spezifischer Inhibitoren (z.B. Wortmanin A als Inhibitor von Akt) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen vor der eigentlichen Stimulation für 5-10 min mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert. Nach der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren wurden die Kulturschalen sofort auf Eis gestellt, das Medium wurde abgenommen und die Schalen 3x mit je 5ml PBS/1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  gewaschen. Dann wurden die Zellen in je 150  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (+ 25 mM NaF, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  Protease-Inhibitor) lysiert. Die weitere Bearbeitung des Zelllysats erfolgte wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben.

### 3.2.4.3 Proliferationsassay

Mit Hilfe dieses Zellproliferations-Assays wurde der Einfluss der Kandidatengene, insbesondere des IGFBP-4-Gens auf das Wachstum von Karzinomzelllinien untersucht. Der nicht-radioaktive Test (CellTiter 96™ AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay von Promega) basiert auf der Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu rotem Formazan durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System von metabolisch aktive Zellen:



**Abbildung 3.1:** Farbreaktion des MTT-Zellproliferations-Assays

Die Umsetzung von MTT zu Formazan kann dann entsprechend spektrometrisch quantifiziert werden. Für den Assay wurden die entsprechenden Zellen je nach Proliferationsgeschwindigkeit und Größe  $1 \times 10^3$

bis  $5 \times 10^3$  Zellen/Well in 100  $\mu$ l Medium in eine 96-Well-Platte ausgesät und 24h später mit den entsprechenden Zusätzen (Wachstumsfaktoren, Methylenblau, Cytostatika, etc.) behandelt. Die Zellen wurden dann bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte, je nach Versuchsansatz und Zelldichte nach 24h, 48h, 72h, 96h bzw. 120h. Dazu wurden 20  $\mu$ l der MTS/PMS-Lösung (Endkonz. 333 $\mu$ g/ml MTS; 25 $\mu$ M PMS) pro Well dazugegeben und nach 2 bis 4h (je nach Intensität des Farbumschlags) wurde die Menge des gebildeten Formazan spektrometrisch im ELISA-Platten-Reader (anthos htII) bei 492nm mit einem Referenzfilter bei 690nm gemessen.

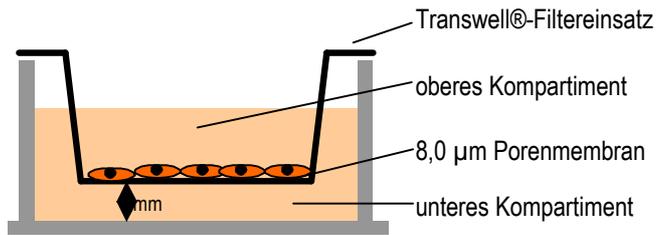
#### 3.2.4.4 Invasionsassay

Der Grad der Invasivität von Tumorzellen ist oft entscheidend für die Bildung von Fernmetastasen. In vitro kann die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen gemessen werden, indem man die Migration von Zellen durch einen mit Matrigel, beschichteten Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 8-12- $\mu$ m bestimmt. Das Matrigel simuliert die Basalmembran (extrazelluläre Matrix) in vivo, und ist eine lösliche Basalmembran-Präparation aus dem Engelberth-Holm-Swarm (EHS)-Maus-Sarcoma. Sein Hauptbestandteil ist Laminin, Collagen IV, Heparan-Sulfat-Proteoglykane, Entactin und Nidogen. Es enthält ebenfalls TGF- $\beta$ , FGF, Plasminogen-Aktivatoren sowie weitere Wachstumsfaktoren. Die Porengröße des Filters richtet sich nach der Größe der verwendeten Zellen und muss für den jeweiligen Zelltyp ausgetestet werden.

##### Materialien:

- Matrigel - Basement Membrane Matrix
- Platten
  - 6-Well-Flachboden
  - Transwell®-Platte, 6-Well-Platte mit Filterdurchmesser 24mm, Porengröße der Polycarbonat Membran 8,0  $\mu$ m
  - 96-Well-Flachboden
- Zellheber (Costar)
- PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1 $\times$ )
- Zellkulturmedium, z.B. DMEM ohne Zusätze
- MTT – C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>SBr
- DMSO

Das Matrigel wurde vor Versuchsbeginn mit DMEM auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml auf Eis verdünnt. Anschließend wurden Transwellfilter mit je 675  $\mu$ l Matrigel beschichtet und für 1 h bei 37°C inkubiert. Hierbei war es sehr wichtig, dass alle Arbeitsschritte auf Eis und mit bei -20°C vorgekühlten Pipettenspitzen, Eppendorfgefäßen, etc. zügig durchgeführt wurden, um ein Vorzeitiges Festwerden des Matrigels zu vermeiden. Nach 1h Inkubation wurde das Restmedium von den Transwellfiltern vorsichtig, ohne die dünne Matrigelschicht zu beschädigen, abgenommen. In die so vorbereiteten Transwellfilter wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in einem Volumen von 1,5 ml ausgesät und das untere Kompartiment mit je 2,5 ml Nährmedium aufgefüllt. Zur spektrometrischen Bestimmung der ausgesäten Zellzahl wurde nach 1h Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit 1/10 (v/v) MTT-Lösung (10 mg MTT/ml PBS) in beide Kompartimente dazugegeben. Das MTT wird, wie bei dem Proliferations-Assay, in den metabolisch aktiven Zellen zu Formazan-Kristallen umgewandelt.



**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung des Zwei-Kompartiment-Systems zur Durchführung des Invasionsassays.

Nach 4h Inkubation wurden die gebildeten Formazan-Kristalle mit je 180 µl DMSO in beiden Kompartimenten gelöst. Die Menge des gebildeten Formazans wurde dann spektrometrisch im ELISA-Platten-Reader bei 492nm mit einem Referenzfilter bei 690 nm gemessen. Die Quantifizierung der invasiven Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip nach 24 bis 48h Inkubation. Hierbei wurden nach Zugabe von MTT und 4h Inkubation die Zellen auf der Oberseite des Filters, auf der Unterseite des Filters sowie die im Medium, im Filtereinsatz und im unteren Kompartiment schwimmende Zellen jeweils getrennt behandelt. Die schwimmenden Zellen wurden durch Zentrifugation des Mediums geerntet und das Pellet in je 180 µl DMSO resuspendiert. Die Zellen auf der Oberseite des Filters wurden direkt in 180 µl DMSO gelöst, die Zellen auf der Unterseite erst mit einem Zellschaber vorsichtig abgekratzt und ebenfalls in 180 µl DMSO aufgenommen. Befanden sich Zellen auch auf den Plattenboden des unteren Kompartiments, so wurden diese ebenfalls in 180 µl DMSO gelöst. Die Absorption aller Zelllösungen wurde dann bei einer Wellenlänge von 562 nm gegen den Referenzwert von 690 nm im ELISA-Reader gemessen (ggf. wurden die Proben 1:10 mit DMSO verdünnt). Die ermittelte Absorption entspricht der Menge an gebildetem Formazan und somit der relativen Anzahl an metabolisch aktiven Zellen. Die Menge der Zellen, die sich auf der Unterseite des Filters, im unteren Kompartiment und auf dem Plattenboden befand entsprach hierbei der Menge der invasiven Zellen. Diese wurde entweder im Vergleich zur Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt der Messung (nicht-invasive Zellen: Zellen auf der Filteroberseite und im oberen Kompartiment + invasive Zellen) bzw. zur Menge der ausgesäten Zellzahl (Messung zum Versuchsbeginn) gesetzt. Je nach Berechnung ergab sich somit ein unterschiedlicher Anteil der invasiven Zellen.

### 3.2.4.5 Poly-HEMA-Assay

Der Poly-HEMA-Assay erlaubt die Untersuchung des Verankerungs-unabhängigen Wachstums (*anchorage independent growth*) von transformierten Zellen [Fukazawa et al 1995]

#### Materialien:

- Poly-HEMA (Poly-2-Hydroxyethylmetacrylat)
- 96-Well-Flachboden (TPP)Platten
- XTT-Kit I

Mindestens 1 Woche vor Versuchsbeginn mussten die Platten mit Poly-HEMA beschichtet werden. Dazu wurde das Poly-HEMA-Granulat in 96% Ethanol unter leichtem Erwärmen (30-40°C) ÜN gelöst (Endkonzentration 5mg/ml). Die Wells der 96-Well-Platten wurden dann mit je 150 µl gelöstem Poly-HEMA beschichtet und für 5-10 Tage in einem Trockeninkubator bei 37°C im getrocknet. Die

beschichteten Platten waren dann im Dunkeln und bei RT für ca. 6 Monate haltbar. Für den eigentlichen Versuch wurden 1 bis  $2 \times 10^3$  Zellen/well in je 150  $\mu$ l Medium in die beschichteten Platten ausgesät. Als Kontrolle dienten Zellen in unbeschichteten Platten, die in gleicher Zelldichte ausgesät wurden. Nach 3 bis 7 Tagen Inkubation erfolgte die Bestimmung der lebenden Zellen mit Hilfe des XTT-Kits. Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 50:1 gemischt und je 75  $\mu$ l der Mischung pro well pipettiert. Die photometrische Bestimmung des umgesetzten XTT erfolgte nach 2 bis 4h bei einer Wellenlänge von 490 nm gegen den Referenzwert von 690 nm im ELISA-Reader.

#### 3.2.4.6 Soft-Agar-Colony-Formation-Assay

Transformierte Zellen haben oft die Fähigkeit, nicht-adhären wachsende Kolonien zu bilden. Semi-solide Medien bieten die Möglichkeit, die Zellen hinsichtlich dieser Eigenschaft genauer zu untersuchen. Die Medien verhindern, dass sich adhären wachsende Zellen anheften können oder miteinander Kontakt aufnehmen. Nicht-transformierte Zellen gehen unter diesen Bedingungen in Apoptose, transformierte Zellen bilden Kolonien, wobei ihre Fähigkeit zur Zellteilung und Wachstum unter diesen erschwerten Bedingungen vom Grad ihrer Malignität abhängt. Als semi-solides Medium wurde hier Agarose benutzt.

##### Materialien:

- 1% (w/v) low-melting-Agarose in sterilem H<sub>2</sub>O
- 2%(w/v) low-melting-Agarose in sterilem H<sub>2</sub>O
- Zellkulturmedium
- 0,005% Kristallviolett (w/v in Methanol)
- 4,5 cm Zellkulturschalen

Direkt vor Aussaat der Zellen wurden 4,5 cm Kulturschalen mit je 1ml in der Mikrowelle aufgeschmolzenen 1% Agarose beschichtet. Die Agarose wurde durch leichtes Schwenken gleichmäßig über den Schalenboden verteilt und die überschüssige Flüssigkeit gleich wieder mit einer Pipette abgenommen, so dass ein dünner Agarosefilm entstand. Aufgeschmolzene 2% Agarose wurde mit auf 40°C vorgewärmtem Zellkulturmedium auf eine Endkonzentration von 0,75% Agarose (w/v) verdünnt. Je  $1 \times 10^3$  bis  $1 \times 10^4$  frisch trypsinierte Zellen wurden in 4 ml der auf 37°C abgekühlten 0,75% Agarose/Medium-Mischung resuspendiert und sofort auf die beschichteten Zellkultur-Platte gegossen. Nach 10 bis 14 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit wurden die Platten mit 0,005% Kristallviolett gefärbt und die Kolonien unter einem Mikroskop ausgezählt.

#### 3.2.5 Apoptose-assays

##### 3.2.5.1 Quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen mittels ELISA nach Kristallviolett-Färbung

##### Materialien:

- 96-Well-Platte
- 0,1% Kristallviolett in Methanol (w/v)
- 33% Essigsäure
- Apoptose-induzierende Substanzen

- CD95-Antikörper (Biocheck),
- Rekombinantes TRAIL-Protein (Alexis)
- Staurosporin, Etoposid

Für den Apoptose-Assay wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zur 70-80% Konfluenz bei 37°C im Begasungsbrutschrank kultiviert. Danach wurden die entsprechenden Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen nach Mediumwechsel zu den Zellen dazugegeben, wobei unbehandelte Zellen stets als Kontrolle mitgeführt wurden. Je nach Zytostatikum und Zellart erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate nach 3 bis 48h. Der Gesamtzustand der Zellen und der Anteil apoptotischer Zellen wurde zunächst mikroskopisch beurteilt. Die Abrundung der Zellen, Chromatin-Kondensation, Abschnürung apoptotischer Vesikel, Kern-Fragmentation und schließlich Lyse der Zellen waren dabei die Erkennbaren Kennzeichen der einzelnen Stadien der Apoptose. Die quantitative Auswertung lebender Zellen fand durch Fixierung mit 0,1% Kristallviolett (je 100 ml/well). Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O wurde das Kristallviolett mit 33% Essigsäure herausgelöst und bei 620nm im ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Der Vergleich der Zellzahl der unbehandelten Proben mit den Zytostatika-behandelten Proben erlaubte die Abschätzung des Anteils an apoptotischen Zellen.

### 3.2.5.2 FACS-Analyse nach Propidium-Iodid-Färbung (Nicoletti)

Die FACS-Analyse erlaubt eine äußerst genaue, schnelle und sehr gut reproduzierbare quantitative Bestimmung apoptotischer Zellen in beliebigen Zellpopulationen, unabhängig von Zellart und Apoptose-induzierenden Substanz. Anhand des DNA-Gehalts kann neben Apoptose auch das Zellzyklus-Stadium (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/Mitose) der Zellen bestimmt werden. So kann z.B. der für Etoposid typische G<sub>2</sub>-Arrest von Zellen nach Behandlung mit dieser Substanz nachgewiesen werden. Zudem können durch entsprechendes Markieren der Zellen während der Messung unerwünschte Zellpopulationen, wie z.B. nekrotische Zellen und Zelltrümmer (erkennbar an ihrer sehr geringen Größe) von der Auswertung ausgeschlossen werden, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse vermieden wird. Das Prinzip der Nicoletti-Färbung für die FACS-Analyse beruht auf der Propidium-Iodid-Färbung der Kern-DNA (Nicoletti *et al*, 1991). Apoptotische Zellkerne erscheinen im FACS-Plot als ein breiter hypodiploider DNA-Peak (schwache Fluoreszenz), der leicht von den beiden schmalen, stark abgegrenzten Peaks starker Fluoreszenz der diploiden DNA der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-zellzyklusphase unterschieden werden kann.

#### Materialien:

- 6-Well-Platten
- Nicoletti-Puffer
- PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1×) (PAA)
- Apoptose-Induzierende Substanzen
  - Staurosporin, Etoposid
- Zellheber (Costar)
- FACS-Röhrchen
- FACS-Gerät

Für den Versuch wurden je nach Zellart  $1 \times 10^5$  bis  $4 \times 10^5$  Zellen/well in eine 6-well-Zellkulturplatte ausgesät und bis zur 70-80% Konfluenz kultiviert. Nach Mediumwechsel erfolgte die Zugabe der entsprechenden Zytostatika in unterschiedlichen Konzentrationen in 0,8-1,0 ml Medium. Als Negativ-Kontrolle wurden stets unbehandelte Zellen mitgeführt. Je nach Zytostatikum und Zellart wurden nach 23 -30h die Zellen geerntet, wobei die im Medium schwimmenden Zellen durch die Zentrifugation und die adhärennten Zellen durch vorsichtiges Abkratzen mit dem Zellschaber und Zentrifugation geerntet wurden. Das Zellpellet wurde mit 1ml PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l Nicoletti-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung dunkel bei 4°C aufbewahrt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **3.2.6 Transfektion von Zelllinien**

#### **3.2.6.1 Liposomale Transfektion mit FuGENE**

Für die transiente Transfektion von Expressionsplasmiden in eukaryontische Zellen wurde das FuGENE 6 Transfektions-Reagenz (Roche) genutzt. Für die Transfektion wurden  $1-3 \times 10^6$  Zellen/well in eine 6-well-Platte ausgesät und bis zur 50-80% Konfluenz heranhezogen. Pro Transfektions-Ansatz wurden 3  $\mu$ l des FuGENE 6-Reagenz mit Serum-freien Medium auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann werden pro Ansatz 1-2  $\mu$ g DNA (0,1-2,0  $\mu$ g/ml) in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt und das verdünnte FuGENE 6-Reagenz tropfenweise dazugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurde das DNA-Fugene Gemisch tropfenweise zu den Zellen (nach vorherigem Mediumwechsel) gegeben. Die Bestimmung des exprimierten Gens erfolgte nach ca. 3-5 Tagen.

#### **3.2.6.2 stabile Transfektion adenoviraler Expressionsplasmide**

Die virale Transfektion der pS11IEG3-IGFBP-4 Expressionsplasmids in Tumorzellen wurde freundlicherweise durch Frau B. Betz durchgeführt. Zunächst wurden für die Virusproduktion 293T-Zellen in 10 cm große, mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturschalen ausgesät ( $4,5 \times 10^6$  Zellen). Am folgenden Tag wurden die Zellen nach Mediumwechsel mit dem jeweiligen Expressionsplasmid, Helfer-Plasmid (pHIT 60) und Hüllen-Plasmid (VSV-G) mit Hilfe des FuGENE-Reagenz kotransfiziert. In 200  $\mu$ l Medium wurden hierzu 60  $\mu$ l des FuGENE-Reagenz sowie je 7  $\mu$ g des jeweiligen Plasmids gemischt und nach 15 min Inkubation bei RT tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48h wurde Zellüberstand mit den produzierten Viren abgenommen und über ein 0,45  $\mu$ m Filter gefiltert. Für die Virus-Transfektion der Tumorzellen wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. An den 3 darauffolgenden Tagen wurden die Tumorzellen pro Tag mit je 1 ml Virus-Überstand transfiziert. Am 4. Tag erfolgte ein Mediumwechsel und am 6. Tag wurde die Zahl der infizierten Zellen anhand des GFP-Expression mittels FACS ermittelt.

#### **3.2.7 Gen-Silencing mittels RNA-Interferenz**

Die hier zum Gen-Silencing ausgewählten Vektor-exprimierten short-hairpin RNAs (shRNAs) imitieren die natürlichen endogenen miRNAs. Die Verwendung von shRNAs anstelle von synthetischen siRNA-Duplexen erlaubt eine stabile Expression und verhindert die Aktivierung der Interferon-Immunantwort.

### 3.2.7.1 Konstruktion geeigneter shRNAs

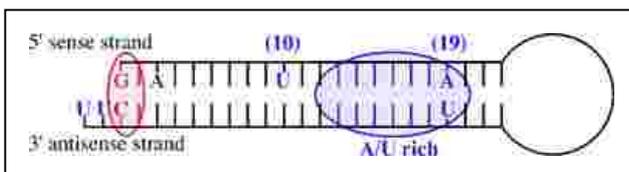
Zur Identifizierung geeigneter siRNA-Targetsequenzen innerhalb des Exons 2 wurde das Computerprogramm „siRNA Target Finder“ von Ambion verwendet. Das Programm sucht automatisch nach geeigneten siRNA-Targetsequenzen, welche spezifische, aufgrund von publizierten Daten und empirischer Erfahrungen aufgestellten Kriterien erfüllen:

1. 21-Nukleotid-Sequenzen, die mit einem AA-Dinukleotid beginnen
2. idealerweise ein G oder C nach dem AA-Dinukleotid
3. idealerweise ein A auf Pos.3, ein U auf Pos.10, ein G auf Pos.13, ein A auf Pos.19 (sense-Strang)
4. GC-Gehalt zwischen 30-50% (falls nicht möglich, GC-Gehalt<60%)
5. keine T- bzw. A-Repeats, die länger als 4 base sind (4-6 T-Nukleotid fungiert als Sttop-Signal für die RNA-Polymerase III)

(zur Übersicht siehe Reynolds *et al*, 2004)

Die siRNA-Targetsequenzen, die von dem Suchprogramm vorgeschlagen wurden, wurden dann mit dem BLAST-Programm ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) mit humanen Sequenzen in der Datenbank verglichen. siRNA-Sequenzen, die mehr als 16-17 Basenpaare in Folge Homologien zu anderen Genen zeigten, wurden aussortiert. Schließlich wurden mindestens 3 siRNA-Targetsequenzen mit den geringsten Homologien und dem niedrigsten GC-Gehalt zur shRNA-Konstruktion ausgewählt.

Für die siRNA-Interferenz mittels lentiviraler Expressionsvektoren mussten geeignete short hairpin RNAs (shRNAs) konstruiert werden. Dazu wurde jede der 3 ausgewählten siRNA-Targetsequenzen als zwei gegenläufige Sequenzen durch ein 9-Nukleotid-Loop miteinander verbunden. Für die Subklonierung in das pBS-Expressionsplasmid wurden zusätzliche Bgl II und Hind III-Schnittstellen an die 5'- und 3'-Enden angehängt. Nach der Transfektion und genomischer Integration in Zielzellen sollte das resultierende mRNA-Transkript sich zu einer Haarschleifen-Struktur (hairpin) falten – mit einem 9-Nukleotiden-Loop und einem „Stiel“ aus den komplementären 19 nt-Targetsequenzen und einem 2-3-U-Überhang am 3'-Ende (siehe Abb. 3.3).



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung eines shRNA-Transkripts. Hervorgehoben sind die Eigenschaften, die für eine stabile Bindung des RISC erforderlich sind (aus: Izquierdo, 2005).

Die shRNAs wurden als 64 bp-Oligos über die Firma metabion GmbH bezogen. Für das Annealing zu dsRNA wurden je 2 µl (1,8 µg/µl) der jeweiligen Oligos (forward und reverse) zu 48 µl Annealing-Puffer dazugegeben und für 4 min bei 95°C sowie 10 min bei 70°C inkubiert. Zur effizienten Ligation in den pBS-H1-Vektor mussten die entstandenen dsRNAs zunächst phosphoryliert werden. Dazu wurden je 5 µl der annealten Oligos zusammen mit 12 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl T4 Ligase-Puffer, 1 µl PNK Kinase für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die PNK-Kinase durch 10 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Anschließend wurden je 5 µl der phosphorylierten Oligos mit 1 µl pBS-H1-Vektor (ca. 100 ng) in 11 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl T4 Ligase-Puffer und 1 µl T4 Ligase (2U) ÜN bei 4°C ligiert.

### 3.2.7.2 Klonierung der shRNAs in pLV-TH

Für die stabile Expression der shRNA in Tumorzellen wurde der lentivirale Expressionsvektor pLV-TH (Wiznerowicz und Trono 2003) genutzt, der von den HIV-1-Vektoren abgeleitet wurde. Der pLV-TH-Vektor nutzt den Polymerase III-Promotor H1, der sich im 3'-Bereich des LTRs befindet, zur Expression der shRNAs. Zunächst wurde der H1-Promotor mit EcoRI und ClaI aus dem pLV-TH rausgeschnitten und in den pBS-Vektor kloniert. Das so entstandene pBS-H1-Plasmid wurde dann mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Hind III direkt downstream hinter dem eingefügten H1-Promotor geschnitten und die doppelsträngige siRNA, die entsprechende BglIII und Hind III-Schnittstellen an ihren überhängenden Enden besitzt, eingefügt. Anschließend wurde die so entstandene H1-siRNA-Kassette mit EcoRI und Cla I aus dem pBS-H1-Plasmid ausgeschnitten und wieder in das pLV-TH-Plasmid ligiert (Schema der Klonierungsstrategie siehe im Ergebnisteil, Punkt 4.7.2). Nach jedem Restriktions- bzw. Ligationsschritt wurden geeignete Restriktionen zur Kontrolle durchgeführt. Zum Schluss wurden die fertigen pLV-TH-siRNA-Expressionsvektoren durch Sequenzierung mit dem T7-Primer kontrolliert.

### 3.2.7.3 Virale Transfektion der siRNA-Expressionsvektoren in Tumorzellen

Die virale Transfektion der siRNA-Expressionsplasmide in Tumorzellen wurde freundlicherweise durch Frau B. Betz durchgeführt. Zunächst wurden für die Virusproduktion 293T-Zellen in 10 cm große, mit 0,1% Gelatine beschichteten Zellkulturschalen ausgesät ( $4,5 \times 10^6$  Zellen). Am folgenden Tag wurden die Zellen nach Mediumwechsel mit dem jeweiligen Expressionsplasmid, Helfer-Plasmid (pCD/NL-BH) und Hüllen-Plasmid (VSV-G) mit Hilfe des FuGENE-Reagenz kotransfiziert. In 200  $\mu$ l Medium wurden hierzu 60  $\mu$ l des FuGENE-Reagenz sowie je 7  $\mu$ g des jeweiligen Plasmids gemischt und nach 15 min Inkubation bei RT tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48h wurde Zellüberstand mit den produzierten Viren abgenommen und über ein 0,45  $\mu$ m Filter gefiltert. Für die Virus-Transfektion der Tumorzellen wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit den Virus-Überständen infiziert. Da für die RNAi-Experimente mindestens 2-3 verschiedene siRNAs (jeweils in pLV-TH kloniert) pro Gen konstruiert wurden, die in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert werden konnten und auch die Möglichkeit zur Variation der Transfektionsparameter bestand, ergab sich pro Target-Gen eine Vielzahl von Transfektionsansätzen. Zum einem wurden die Tumorzellen mit jeweils einer siRNA bzw. mit 2-3 siRNAs gleichzeitig oder auch aufeinanderfolgend transfiziert. Zum anderen wurde auch die Menge des Virusüberstandes pro well variiert (1ml, 0,5 ml, 0,1 ml). Somit umfasste eine Transfektionsrunde pro Targetgen bis zu 15 verschiedene Transfektionsansätze. Gleichzeitig wurde als Kontrolle auch das pLV-TH-Plasmid als Leervektor transfiziert.

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Aufkonzentrierung von Zellkulturüberstand

Für die Isolierung des IGFBP-4-Proteins aus Zellkulturüberständen der Transfektanten war zunächst eine Aufkonzentrierung der Überstände erforderlich. Hierfür wurden 15 ml Zellkultur-Überstand (ohne FCS) von zu 80-90% konfluenten Zellen einer großen Zellkultur-Flasche abgenommen, zur Entfernung schwimmender Zellen kurz abzentrifugiert, in den Filtereinsatz des Aufkonzentrierungsröhrchen (Filter devices 15 000 MW, Millipore) pipettiert und für 20 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Die 15 ml Überstand wurden so auf ca. 250-300  $\mu$ l aufkonzentriert (Faktor 1:29). Der aufkonzentrierte

Überstand wurde mit 1/5 Vol. 6xSDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und bis zur Gelauftragung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.2 Proteinisolierung aus Zelllinien

#### Materialien:

- RIPA-Puffer
- 200 mM NaF
- 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>
- Protease-Inhibitor Complete Mini
- Zellheber

Zum frisch aufgetauten RIPA-Puffer-Aliquot von 8,75 ml wurden 1,25 ml 200 mM NaF [Endkonzentration 25 mM], 100 µl 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> [Endkonz. 2 mM] und eine Protease-Inhibitor-Complete-Mini Tablette zugegeben. Mit so vorbereiteten und auf Eis gekühlten Protein-Lysepuffer wurden entweder Zellen direkt nach Stimulation von den Zellkulturschalen mit Hilfe eines Schabers gelöst (150 µl Puffer/9 cm<sup>2</sup> Kulturschale) – siehe 3.2.4.2 – oder ein zuvor geerntetes und bei -20°C aufbewahrtes Zellpellet wurde in 150-200 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in dem Puffer für 30 min auf Eis lysiert und die Zelltrümmer danach bei 14.000 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit dem Gesamtprotein wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und bei -80°C bis zur Konzentrationsbestimmung und Gelauftragung aufbewahrt.

### 3.3.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Das Prinzip der Proteinbestimmung basiert auf der Biuret-Reaktion der Proteine, die Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> reduzieren. Die Bicinchoninsäure reagiert dann als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv, spezifisch und stabil mit den Cu<sup>+</sup>-Ionen zu einem wasserlöslichen stabilen Komplex, der eine starke Absorption bei 562 nm aufweist. Proteine in wässrigen Lösungen können also bei 562 nm im Photospektrometer mit dieser Methode quantifiziert werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine zuvor erstellte Eichgerade mit BSA ermöglichte die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der gemessenen Absorption bei 562 nm.

### 3.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Hierbei wird die bei der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 an Proteine auftretende Veränderung des Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Der Nachteil dieser Bestimmungsmethode ist, dass einige Detergenzien (z.B. SDS oder Triton) und Neutralsalze, die gerade bei der Proteinisolierung aus Zellen verwendet werden, störend wirken. Deshalb wurde diese Methode nur für die Proteinbestimmung in Zellkultur-Überständen verwendet. Hierfür wurden die Überstände 1:3 bis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Je 10 bzw. 20 µl der Verdünnung wurden mit 790 bzw. 780 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt.

### 3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese trennt denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Das anionische Detergenz SDS (sodium dodecyl sulfate) bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine, die dadurch denaturiert werden und eine stark negative Ladung erhalten, die die normalerweise vorhandenen Ladungen überdeckt. Weitere reduzierende Substanzen (Mercaptoethanol) lösen Disulfidbrücken auf, so dass die Proteine in ihre getrennt werden. So ist die Laufweite der Proteine im SDS-PAGE eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte. Um ein besseres Trennergebnis zu erzielen, durchlaufen die Proteine zunächst ein grobmaschiges Sammelgel, in dem sie zu einer Bande fokussiert werden, was die Bandenschärfe im folgenden Trenngel verbessert.

Die 10% bis 15 % analytischen Trenngele wurden nach der Methode von Lämmli wie folgt hergestellt:

#### Trenngel 10% (15 ml für 2 Gele)

40% Acrylamid	3,75 ml
Trenngelpuffer (1M)	5,625 ml
10% SDS	150 µl
dH <sub>2</sub> O	5,34 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	120 µl
TEMED	12 µl

#### Trenngel 15% (15 ml für 2 Gele)

40% Acrylamid	5,625 ml
Trenngelpuffer (1M)	5,625 ml
10% SDS	150 µl
dH <sub>2</sub> O	3,47 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	120 µl
TEMED	12 µl

Das Trenngel wurde zwischen die für zwei Minigele vorbereiteten Glasplatten eines Mini Protean II-Systems gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach mindestens 30 minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel überschichtet.

#### Sammelgel 4% (5 ml für 2 Gele)

40% Acrylamid	0,5 ml
Sammelgelpuffer (1M)	625 µl
10% SDS	50 µl
dH <sub>2</sub> O	3,795 ml
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl

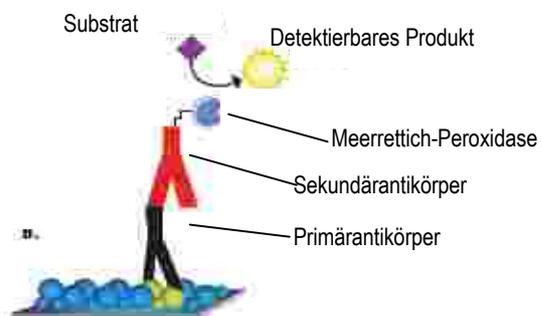
In das flüssige Sammelgel wurden die Kämme luftblasenfrei gesteckt. Nach 30 min wurden die polymerisierten Gele entweder gleich verwendet oder in Frischhaltefolie bei 4°C gelagert und am nächsten Tag benutzt. Nach Zugabe von 6× SDS-Probenpuffer (1/5 des Probenvolumens) wurden die aufzutrennenden Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die fertigen Gele wurden in die vorbereitete Gelkammer eingesetzt und das Pufferreservoir der Elektrophoresekammer mit 1x Elektrophorese-Puffer so aufgefüllt, dass sich Ober- und Unterkante der Glasplatten im Puffer befanden. Nach dem Ausspülen der Sammelgeltaschen werden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Es wurden zwischen 10 und 20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Proteingrößenstandard (Firma) mitaufgetragen. Die Proteine wurden bei 160 -180 V für 45 min – 1h aufgetrennt.

### 3.3.6 Westernblot

Der Westernblot ist ein Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine inerte Membran mit anschließendem Antigen-Antikörper oder Protein- Liganden-Nachweis. Die im Alkalischen negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld, in Richtung positiv geladener Anode, und werden von einer Nitrocellulose- bzw. PVDF-Membran gebunden. Dabei werden die Proteine auf der Membran immobilisiert. Für den Transfer wurde unmittelbar nach der Elektrophorese das Sammelgel entfernt und die Gele für 10 min im Transferpuffer leicht geschüttelt. Die Nitrocellulose-Membran (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences), auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten, wurde ebenfalls für 10 min im Transferpuffer äquiliibriert. Der Blot wurde unter Vermeidung von Luftblasen folgenderweise aufgebaut:

- 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier (in Größe des Gels)
- Nitrocellulose-Membran
- Gel
- 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier (in Größe des Gels)

Anschließend wurde die obere Graphit-Bloteinheit (Katode) unter leichtem Druck aufgesetzt. Die Proteine wurden mit  $1 \text{ mA/cm}^2$  für 30 min auf die Membran transferiert. Um unspezifische Antikörper-Antigen(Protein)-Wechselwirkungen zu verhindern wurde die Nylonmembran nach dem Transfer mit 15 ml Block-Lösung (5% BSA bzw. 5% Magermilchpulver) für 1 h bei RT oder ÜN bei  $4^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden  $5 \times 5$  min Waschschrte mit 0,1% TBST-Puffer durchgeführt. Anschließend folgten fünf Waschvorgänge mit 0,1% TBS-T bei RT für je 5 min. Zum spezifischen Nachweis des gewünschten Proteins wurde der entsprechende Erst-AK in einer vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in Blocklösung angesetzt und die Membran 1-2 h bei RT bzw. ÜN bei  $4^\circ\text{C}$  in der AK-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert.. Es folgten 3-5 Waschvorgänge mit 0,1% TBS-T für 5 min bei RT, die Zugabe des entsprechenden zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Verdünnung laut Hersteller in 0,1% TBS-T). Nach 1h Inkubation bei RT und erneutem fünfmaligen Waschen für 3 min mit TBS-T fand die Detektion der Proteine unter Verwendung eines ECL-Detektionssystem (Amersham) nach Anleitung des Herstellers statt.



**Abb. 3.4:** Prinzip der Protein-Detektion im Western-Blot mit dem ECL-Detektionssystem

### 3.3.7. Immunopräzipitation von Proteinen aus Zellüberstand

Die Protein-G-Sepharose-Partikel wurden 2x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit PBS 1:1 resuspendiert. Zur Verminderung von unspezifischer Proteinbindungen bei der eigentlichen Immunopräzipitation wurde der Zellüberstand zunächst mit der Sepharose vorbehandelt, d.h es wurden je 50 µl Protein-G-Sepharose pro 1 ml Zellüberstand dazugegeben und für 10 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der IGFBP-4-AK bzw. der Kontroll-AK goat-anti-rabbit an die Sepharose-Partikel durch Inkubation ÜN bei 4°C auf dem Schüttler gekoppelt (1-2 µg AK pro 100 µl Sepharose). Zur Immunopräzipitation von IGFBP-4 wurden 100µl der AK-gekoppelter Sepharose-Partikel pro 1 ml Überstand zu dem vorgereinigten Zellübersand dazugegeben und für 1h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Sepharose-Partikel mit dem gebundenen IGFBP-4-Protein abzentrifugiert, 3x in je 2 ml PBS gewaschen, in je 100µl 2xSDS-Lämmli-Puffer gelöst und zur Dissoziation von Antigen und AK 5 min bei 95°C gekocht. Die sepharose-Partikeln wurden abzentrifugiert, der Überstand 1:5 mit 6xSDS-Probenpuffer versetzt und bei -20°C gelagert.

## 3.3 Immunohistochemische Methoden

### 3.3.1. Anzucht von Zellen auf Objektträgern

#### Materialien und Lösungen:

- autoklavierte Objektträger
- Aufbewahrungsmedium
- Fixierlösung
- Quadriperm-Platten

Die Zellen wurden auf sterilen Objektträgern in Quadriperm-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 % herangezogen. Zur Fixierung wurden die Objektträger mit dem Zellrasen für 15 min in die Fixierlösung getaucht. Anschließend erfolgten nacheinander Inkubationen für 5 min. in 1× PBS, 5 min in eiskaltem Methanol (-20°C) und für 1 min in eiskaltem Aceton (-20°C). Zuletzt wurden die Objektträger für 5 min in 1× PBS gewaschen, und im Aufbewahrungsmedium bei -20°C für maximal 6 Monate gelagert.

### 3.3.2 Immunohistochemische Färbung nach der ABC-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC)-Methode unter Verwendung des Vectastain®-ABC-Peroxidase-Kits (Vector Laboratories) durchgeführt (Abb. 3.8-1). Nach Inkubation mit dem entsprechendem Primärantikörper erfolgt eine Inkubation mit dem biotinylierten, gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundär- bzw. Brücken-Antikörper. Ein anschließend zugegebener Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bindet aufgrund der starken Affinität von Avidin zu Biotin an den biotinylierten Sekundärantikörper. Durch die Aktivität der Peroxidase wird das Substrat 3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) (ScyTek) zu einem braunen Präzipitat oxidiert.

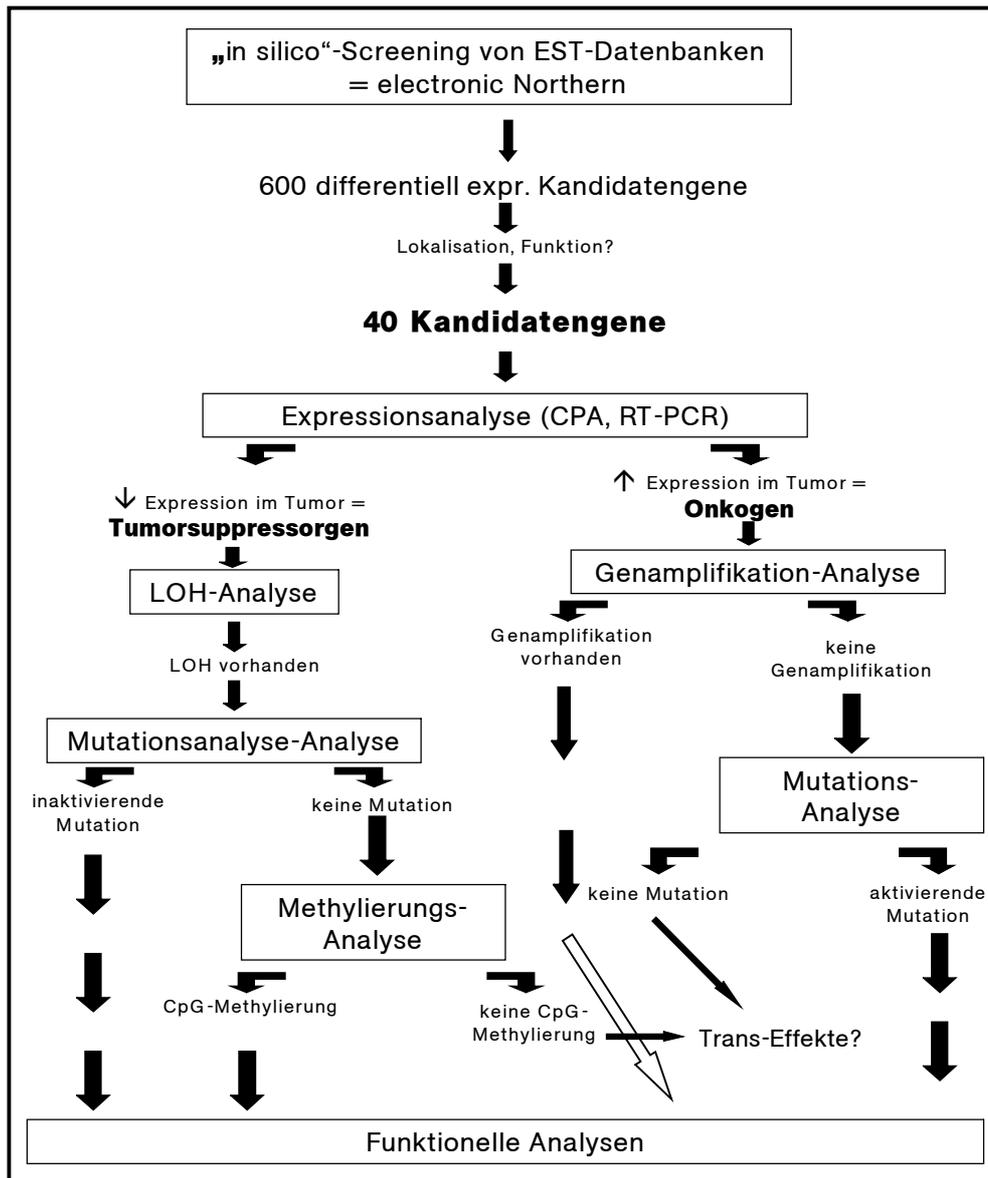
Der Nachweis erfolgte in Feuchtkammern, um die Austrocknung der Zellen auf den Objektträgern zu verhindern. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Inkubation im

Aufbewahrungsmedium mit PBS (pH 7,4) gespült. Anschließend fand die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% Wasserstoffperoxid für 15 min statt, da die Reaktion von DAB mit endogener Peroxidase zu unspezifischen Färbungen führen kann. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungen mit verdünntem Normalserum nach den Anweisungen des Herstellers. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger nach entfernen des überschüssigen Serums mit dem gewünschten Primärantikörper in PBS laut Herstellerempfehlungen inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit dem entsprechendem biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min nach Herstellerangaben. Dann wurden die Zellen für 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Die anschließende Vorbereitung der DAB-Chromogen-Lösung erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers (ScyTek). Nach Zugabe des Peroxidase-Substrates wurden die Zellen mit Leitungswasser gespült. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (nach Mayer, MERCK) für 2 – 3 Sekunden. Hämalaun erzeugt im sauren Milieu (pH 3) eine blaue Zellkernfärbung, die in ihrer Intensität variiert werden kann. Die Objektträger wurden schließlich mit Eukitt® (Kindler GmbH & Co), einem wasserfreien Einschlußmittel für die mikroskopische Technik, eingebettet. Zuvor wurde eine ansteigende Alkohol-Reihe durchgeführt, wobei zuletzt Xylol verwendet wurde, um eine möglichst vollständige Entwässerung der Zellen zu erreichen. Die Auswertung der immunohistochemischen Färbung erfolgte lichtmikroskopisch.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Strategie zur experimentellen Verifizierung von Kandidatengenen

Zur näheren Charakterisierung der ausgewählten Kandidatengene wurde eine geeignete Analyse-Strategie etabliert (siehe Abb. 4.1). Die Ergebnisse der elektronischen Northern wurden zunächst in Kooperation innerhalb des Konsortiums über RNA-Hybridisierung mit sog. Cancer Profiling Arrays (Clontech) und über quantitative RT-PCR“ verifiziert. Kandidatengene, für die eine differentielle Expression im „electronic“ Northern experimentell bestätigt werden konnte, wurden weiter hinsichtlich ihres Inaktivierungs- bzw. Aktivierungsmechanismus untersucht.



**Abbildung 4.1:** Schema der Analyse-Strategie zur Verifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen, die im „electronic Northern“ identifiziert wurden

Die Analyse von potentiellen Tumorsuppressorgen basierte auf den Erkenntnissen der „Two-hit“-Hypothese von Knudson. Ausgehend von der Annahme, dass Tumorsuppressorgene in zwei Schritten über Mutation/Silencing des 1. Allels und anschließendem Verlust des 2. Allels inaktiviert werden, wurde impliziert, dass Tumore mit einem LOH des betroffenen TSG mit höherer Wahrscheinlichkeit eine

zusätzliche inaktivierende Mutation im verbliebenen 2. Allel tragen. Somit konnten über LOH-Analysen mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern aus einem größerem Tumorkollektiv gezielt die Tumore ausgewählt werden, die für eine Mutationsanalyse mittels DHPLC („denaturing high-performance liquid chromatography“) geeignet waren. Tumorsuppressorgene, für die trotz einer signifikant erniedrigten Expression im Tumor keine inaktivierende Mutation nachgewiesen werden konnte, wurden bezüglich einer Promotor-Hypermethylierung als alternativen Inaktivierungs-Mechanismus untersucht. Für diesen Zweck wurde ein bereits zuvor in der Arbeitsgruppe etabliertes Screening-Verfahren genutzt, das auf der Basis von Bisulfit-modifizierter DNA eine sehr sensitive Methylierungsanalyse mittels DHPLC erlaubt (Betz *et al* 2004).

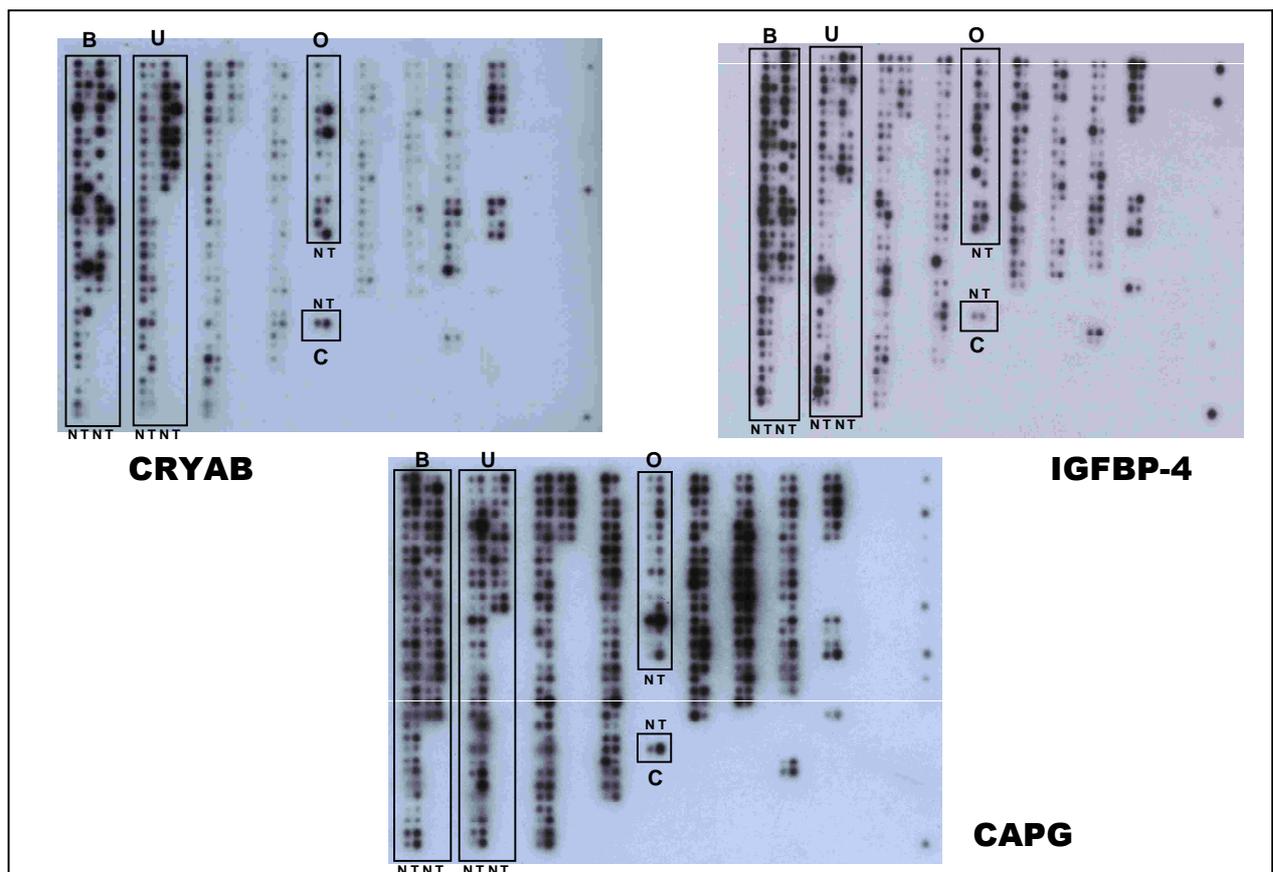
Potentielle Onkogene wurden mittels quantitativer differentieller PCR hinsichtlich Gen-Amplifikation im Tumorgewebe untersucht. Speziell in MaCa ist die Überexpression von Onkogenen in vielen Fällen auf eine Genamplifikation zurückzuführen, wie z.B. im Fall des c-erb2/Her2neu-Gens. Die quantitative differentielle PCR basiert auf der simultanen Amplifikation des zu untersuchenden Onkogens und eines „single copy“-Referenzgens mit fluoreszenzmarkierten Primern und anschließender Fragmentanalyse auf einem DNA-Sequenzier. Diese Technik wurde bereits in unserem Labor zur Untersuchung der Genamplifikation mehrmals erfolgreich eingesetzt (An *et al* 1995). Ausgewählte Tumorsuppressor- und Onkogene, für die eine differentielle Expression und der entsprechende Inaktivierungs- bzw. Aktivierungs-Mechanismus eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Tumorgenese und Progression weiter untersucht.

Die betroffenen Gene wurden, sofern geeignete Antikörper zur Verfügung standen, immunhistochemisch und im Western Blot charakterisiert. Klonierung von full-length-cDNAs in eukaryontische Expressionsvektoren und Transfektion in entsprechende humane Zelllinien ermöglichte eine funktionelle Analyse. Klonierung von putativen TSGs in humane Tumor-Zellen sollte erwartungsgemäß die tumorigenen Eigenschaften dieser Krebszellen zumindest z.T. inhibieren, wohingegen die Klonierung putativer Onkogene in „normale“ Zellen entsprechend zu ihrer Entartung beitragen sollte. Eine Vielzahl von etablierten zellulären Assays, wie Proliferations-, Anchorage-independent-growth- (Poly-Hema)-, Soft Agar-, Invasions- und Apoptose-Assays wurden hier zur genauen Charakterisierung der Transfektanten genutzt. Neben diesen etablierten Techniken wurden auch kürzlich entwickelte Validierungsmethoden, wie das Gen-Silencing über siRNA, eingesetzt.

#### **4.2 Verifizierung der differentiell exprimierten Kandidatengene über Northern Blot und quantitative RT-PCR**

Aus den ca. 600 differentiell exprimierten Kandidatengenen des „electronic Northern“ wurden 40 Gene zur experimentellen Validierung ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren die bekannte bzw. vermutete Funktion der Gene innerhalb Tumor-assoziiertes Signalwege und/oder ihre Lokalisation in chromosomalen Regionen, deren Aberrationen mit der Pathogenese von gynäkologischen Tumoren in Zusammenhang gebracht werden. Für diese ausgewählten Gene wurden die *in silico* Expressionsdaten an Patienten-Tumormaterial über Northern-Blot im sog. Cancer Profiling Array (Clontech) in

Zusammenarbeit mit der Firma metagen GmbH in Berlin und der Arbeitsgruppe von Prof. Meindl aus München verifiziert.



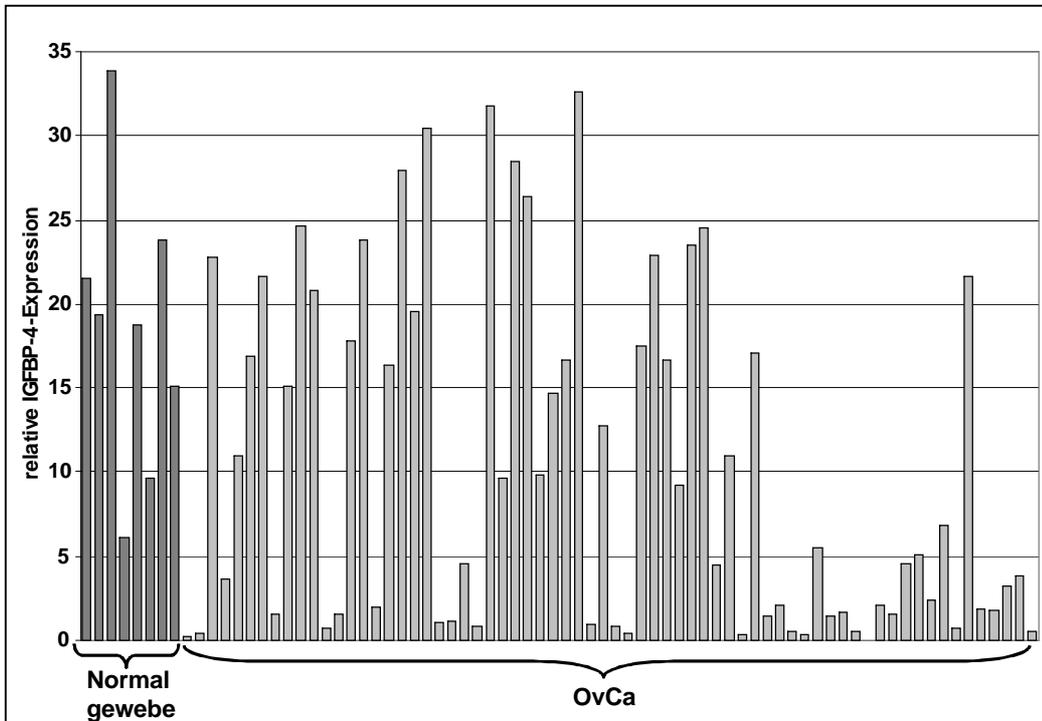
**Abb 4.2:** Repräsentative Beispiele der CPA-Analysen von Kandidatengenen.

Die CPA-Filter enthalten cDNAs aus Normalgewebe/Tumor-Paaren von Brust (50 Paare = B), Uterus (42 Paare = U), Ovar (14 Paare = O) und ein N/T-Paar von Cervix. N = Normalgewebe, T = Tumor. Oben: Beispiele von runterregulierten Genen - IGFBP-4 (Insulin-like growth factor binding protein 4) und CRYAB (Crystallin- $\alpha$ -B). Unten: Beispiel des hoch-regulierten Gens CAPG (Capping protein).

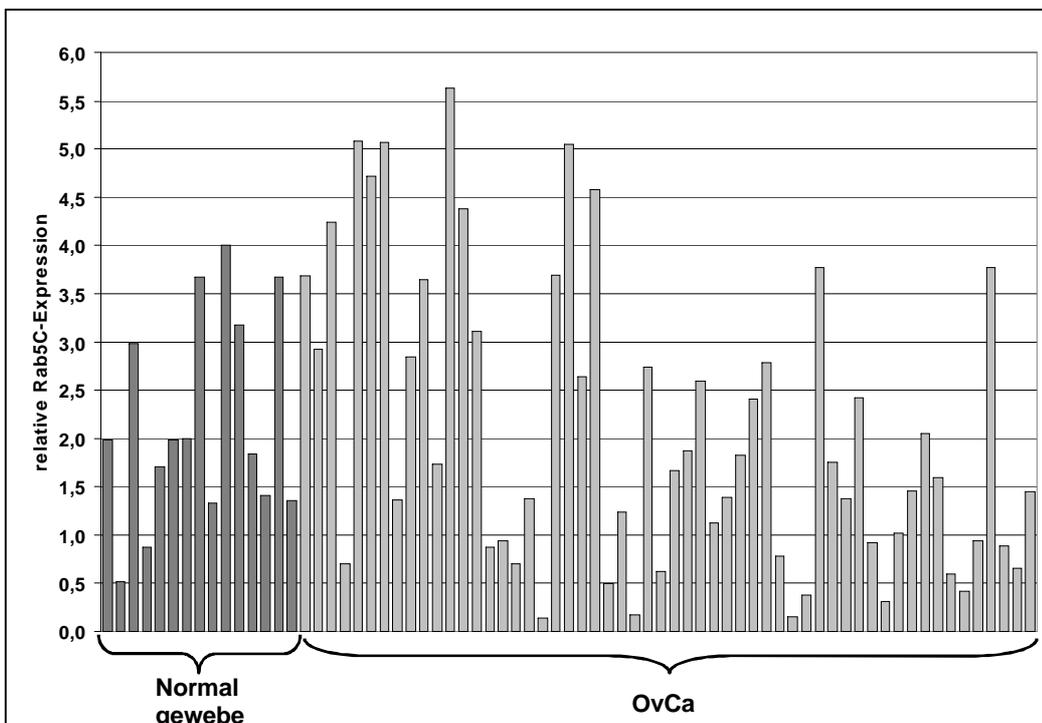
Für 29 dieser 40 Kandidatengene konnte die differentielle Expression bestätigt werden. Dabei zeigte der Großteil der Gene (20 Gene) jeweils in den beiden Hauptidentitäten, Brust und Ovar, eine reduzierte bzw. erhöhte Expression und nur 9 Gene zeigten eine gewebespezifische Expression (differentiell exprimiert nur in MaCa bzw. OvCa).

Die potentiellen Tumorsuppressor-Kandidatengene IGFBP-4 (verringerte Expression v.a. in OvCa), Crystallin- $\alpha$ B (verringerte Expression v.a. in MaCa) und Rab5C (Ras-associated protein RAB5c, runterreguliert nur im Ovar) wurden für eine zusätzliche Verifizierung der Expression mittels quant. RT-PCR ausgewählt. Die Expression von IGFBP-4 und Rab5C wurde in 70 OvCa-Tumorproben (davon 10 N/T-Paare), die Expression von CRYAB entsprechend in 30 Normalgewebe/MaCa-Paaren untersucht. Als Referenzgen diente jeweils die GAPDH. Die PCR-Bedingungen für jedes Kandidatengen wurden so optimiert, dass die Kinetik der PCR-Reaktion und somit die Menge des PCR-Produktes nur von der Kopienanzahl des Zielgens zu Beginn der Reaktion abhängig und nicht durch andere Reaktionsparameter limitiert war. So wurde eine Zyklenzahl gewählt, bei der die PCR im logarithmischen Bereich abläuft sowie die Primer-, Template-, dNTP- und Enzym-Menge so abgestimmt, dass sie weder die Reaktion limitierten noch zu unspezifischer Amplifikation führten. Die Quantifizierung der PCR-

Produkte erfolgte auf dem A.L.F.-DNA-Sequenzierer. Die folgenden Abbildungen zeigen die relative Expression der drei Kandidatengene in den untersuchten Tumorproben im Vergleich zu Normalgewebe-Proben. Die relative Expression ergibt sich aus dem Verhältnis der absoluten Produktmenge des Kandidatengens zu der Produktmenge des co-amplifizierten GAPDH-Gens.

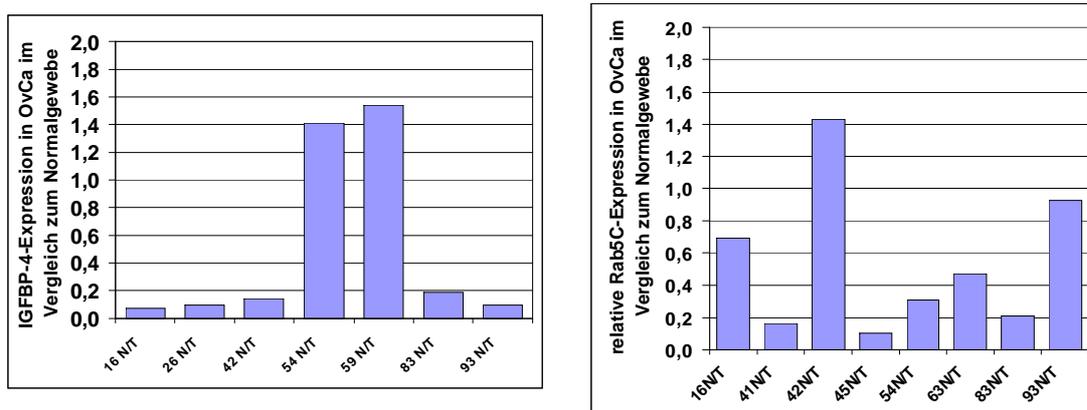


**Abb. 4.3:** relative IGFBP-4-Expression in mittels RT-PCR untersuchten Ovarial-Karzinomen (OvCa) im Vergleich zu Normalgewebe-Proben (detaillierte Auflistung siehe Anhang).



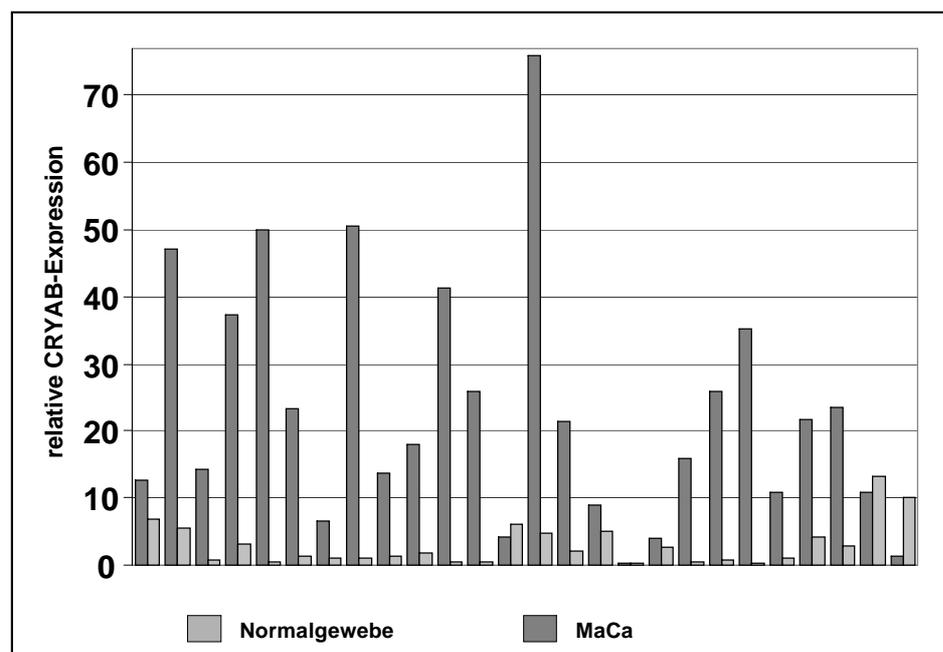
**Abb. 4.4:** relative Rab5C-Expression in mittels RT-PCR untersuchten Ovarial-Karzinomen (OvCa) im Vergleich zu Normalgewebe-Proben (detaillierte Auflistung siehe Anhang).

Für alle drei Kandidatengene konnte die differentielle Expression, wie sie im eNorthern und im CPA identifiziert wurde, bestätigt werden. Der prozentuale Anteil der Tumorproben, bei denen die Genexpression mindestens 2-fach reduziert im Vergleich zum Normalgewebe (korrespondierendes Normalgewebe bzw. Mittelwert aus mehreren Normalgewebeproben) war, entsprach bei den Genen IGFBP-4 und CRYAB den Werten der Array-Analyse (siehe Tabelle 4.1). Für das Rab5C wurde mittels RT-PCR ein etwas geringer Anteil an Tumoren mit verringerter Expression als im CPA nachgewiesen. Von den untersuchten 68 Ovarialkarzinomen zeigten 39 eine mind. 2-fach reduzierte IGFBP-4-Expression (= 57%), im Fall von Rab5C waren es 20 von 56 OvCa (=36%). Die Expressionsanalyse von Normalgewebe/Tumor-Paaren ergab für IGFBP-4 eine erniedrigte Expression in 5 von 7 Proben, für Rab5C entsprechend in 6 von 8 Paaren (siehe Abbildung 4.5)



**Abb. 4.5:** relative IGFBP-4- (links) und Rab5C-Expression (rechts) in OvCa im Vergleich zum entsprechendem Normalgewebe

Die Expressionsanalyse von CRYAB mittels RT-PCR wurde in 27 Normalgewebe/MaCa-Paaren durchgeführt. Hier wiesen 20 von den Tumoren eine mindestens 2-fach reduzierte Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe (=74%).



**Abb. 4.6:** relative CRYAB-Expression in mittels RT-PCR untersuchten Normalgewebe/MaCa-Paaren (detaillierte Auflistung siehe Anhang).

Die Tabelle 4.1 fasst die über CPA und RT-PCR ermittelten Expressionsdaten für alle drei Kandidatengene zusammen:

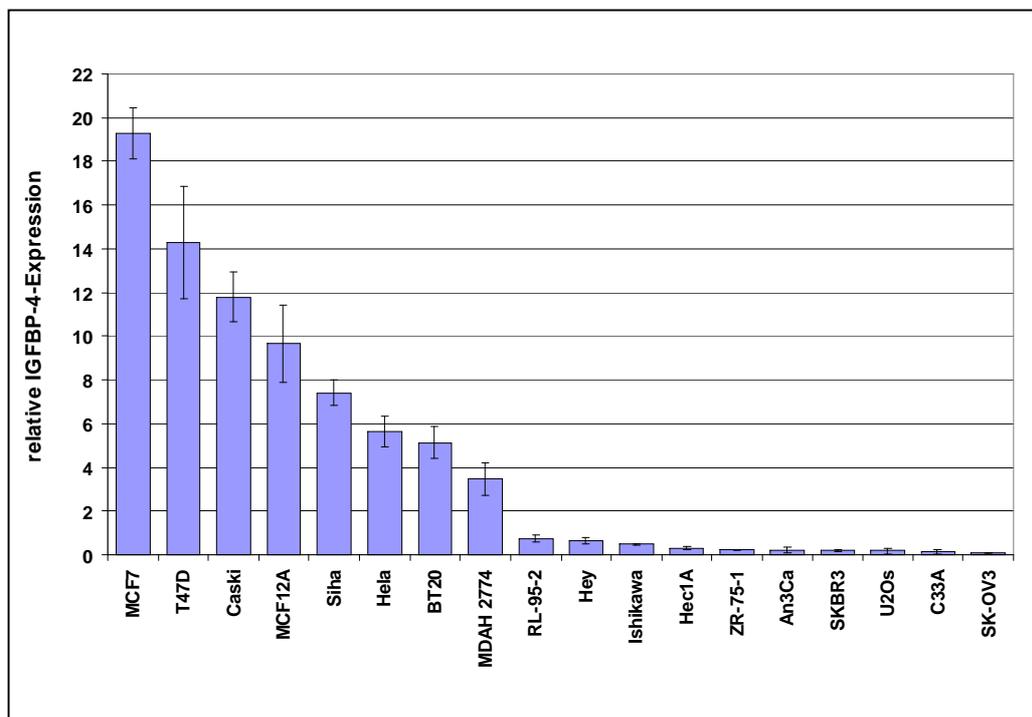
**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der Expressionsdaten von CPA und RT-PCR für die Kandidatengene IGFBP-4, Rab5C und CRYAB. Angegeben in Prozent ist der Anteil der Tumore, die eine mindestens 2-fach reduzierte Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen

	CPA		RT-PCR	
	MaCa n= 50	OvCa n= 14	MaCa n= 30	OvCa n= 70
<b>IGFBP-4</b>	↓28%	↓56%	-	↓57%
<b>Rab5C</b>	=	↓50%	-	↓36%
<b>CRYAB</b>	↓72%	↓56%	↓74%	-

### 4.3 IGFBP-4 als ein neues Tumorsuppressor-Kandidatengene für das OvCa

Für weitere molekulargenetische und funktionelle Analysen wurde das Insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) ausgewählt. Aufgrund seiner Funktion als Inhibitor der mitogenen IGF-I-Wirkung und einer deutlich reduzierten Expression in Ovarial-Karzinomen ist das Protein ein aussichtsreicher Kandidat für ein Tumorsuppressorgen in dieser Art von Tumoren. Die Annahme, dass IGFBP-4 tatsächlich als ein Tumorsuppressor fungieren könnte, wird durch weitere Beobachtungen gestützt. Zum einen ist das Gen in einer chromosomalen Region lokalisiert (17q12-q21), die gehäuft Deletionen sowohl in Mamma- wie auch in Ovarialkarzinomen aufweist. Diese Region beherbergt das bereits gut etablierte Tumorsuppressorgen BRCA1, dessen Keimbahnmutationen für 80% der Fälle des vererbaren Brust/Ovarial-Karzinom-Syndroms und 45% des erblichen Mammakarzinoms verantwortlich sind. Da jedoch kaum BRCA1-Mutationen in sporadischen MaCa und OvCa trotz eines gehäuften LOHs der 17q-Region gefunden wurden, wird vermutet, dass diese Region weitere für die Pathogenese des Mamma- und Ovarialkarzinoms wichtige Tumorsuppressorgene enthält. Eines davon könnte das IGFBP-4-Protein sein. Darüber hinaus wurden andere Mitglieder der IGFBP-Familie bereits als Tumorsuppressorgene identifiziert, wie z.B. das IGFBP-3, für das anti-proliferative und pro-apoptische Wirkung im Mamma-Karzinom nachgewiesen wurde.

Um einen Überblick über die Expressionshöhen von IGFBP-4 auch in anderen Tumorentitäten zu erhalten, wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR in verschiedenen humanen Tumor-Zelllinien untersucht (Abb. 4.7). In MaCa-Zelllinien zeigte IGFBP-4 eine recht heterogene Expression. Es wurde eine auffällig hohe Expression in den MaCa-Zelllinien MCF7 und T47D festgestellt, eine mittlere in der Normalgewebe-Zelllinie MCF12A und in der MaCa-Zelllinie BT20 und stark erniedrigte Expression in ZR-75-1 und SKBR3. Endometrium-Karzinom-Zelllinien zeigten, mit Ausnahme der Zelllinien Caski und Siha, eine eher reduzierte IGFBP-4-Expression. Im Fall von OvCa-Zelllinien zeigten HEY und SKOV3 eine stark reduzierte Expression, nur in MDAH2774 wurde eine mittlere Expression detektiert.



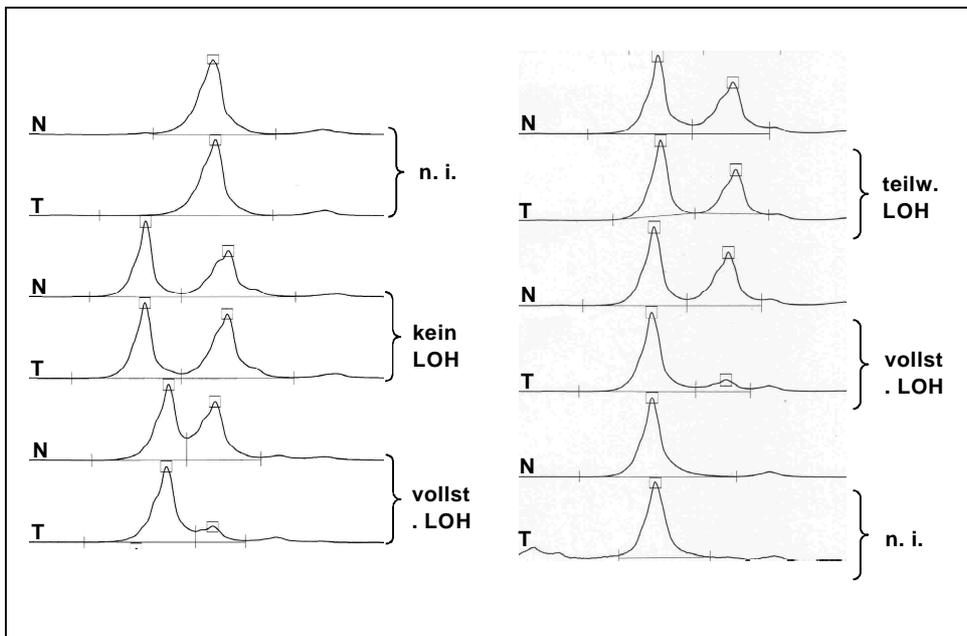
**Abb. 4.7:** relative IGFBP-4-Expression in mittels RT-PCR untersuchten humanen Karzinom-Zelllinien

Die stark reduzierte Expression von IGFBP-4 in OvCa wurde hier durch die Ergebnisse in den OvCa-Zelllinien bestätigt. Bei MaCa-Zelllinien ist die IGFBP-4-Expression je nach Zelllinie sehr unterschiedlich - ähnliche Unterschiede in der Expression wurde im CPA festgestellt, wo MaCa sowohl mit sehr hoher wie auch sehr niedriger Expression identifiziert wurden. Hier könnten möglicherweise noch andere Faktoren, wie z.B. der Hormonrezeptorstatus, Einfluss auf die Genexpression haben.

#### 4.3.1 Identifizierung von OvCa-Tumoren mit einem IGFBP-4-Allelverlust mittels LOH-Feinkartierung

Ziel war es, den Inaktivierungsmechanismus von IGFBP-4 in Ovarial-Tumoren zu identifizieren. Der häufig beobachtete Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“ = LOH) der IGFBP-4-Genregion (17q12-q21) in MaCa und OvCa ist ein indirekter Hinweis auf eine somatische Inaktivierung von IGFBP-4. Ausgehend von dem bereits vorgestellten „Two-hit“-Modell von Knudson wird die rezessive Mutation eines Tumorsuppressorgens erst durch den Verlust des 2. Allels funktionell. Da ein LOH üblicherweise als der zweite Schritt der Gen-Inaktivierung angesehen wird, ist ein LOH in chromosomalen Regionen eines TSG ein Indikator für Mutationen in der verbliebenen Kopie des Gens. Deshalb wurde eine LOH-Analyse von IGFBP-4 durchgeführt, um so relativ schnell OvCa zu identifizieren, die eine inaktivierende Mutation aufweisen könnten. Mit dieser Vorselektion wurde die zeitaufwendige Mutationsanalyse von einer großen Anzahl von Tumorproben vermieden. Für die LOH-Analyse wurden zwei extragenische und ein intragenischer Mikrosatellitenmarker gewählt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden über PCR amplifiziert und in einem Polyacrylamid-Gel im DNA-Sequenzierer analysiert. In heterozygoten Patienten werden die zwei Allele als zwei PCR-Produkte von unterschiedlicher Größe detektiert. Grundsätzlich wurden die zwei höchsten Peaks der A.L.F.-Elektrophoretogramme als die zwei Allel-Peaks gewertet, kleinere Peaks wurden als Polymerase-

Artefakte, die sog. „Stotter-Banden“ interpretiert. Da PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe mit unterschiedlichen Effizienzen amplifiziert werden, wurde das jeweilige Verhältnis der beiden Allel-Peaks sowohl in normaler (= Blut-DNA) wie auch in der Tumor-DNA bestimmt. Die Peakfläche des jeweils längeren Allels wurde durch die Peakfläche des kürzeren Allels geteilt. Das so erhaltene Peak-Verhältnis im Tumor wurde durch das entsprechende Verhältnis in Normal-DNA geteilt, so dass man absolute Werte von 0.0 bis 1.0 erhielt. Ein kompletter Allelverlust ergab theoretisch einen Wert gleich Null, der Erhalt beider Allele einen Wert von 1.0. Von den zunächst drei ausgewählten Mikrosatellitenmarkern erwies sich nur D17S1814 als geeignet für die LOH-Analyse, da die anderen Marker zu niedrige Heterozygotie-Raten aufwiesen und zu viele „Stotter-Banden“ nach der PCR-Amplifikation ergaben. Da die untersuchten OvCa-Proben erwartungsgemäß nicht weniger als 70% Tumorteil besaßen, wurde eine Ratio unter 0.65 bereits als ein LOH gewertet. Von den untersuchten 55 Ovarialkarzinomen wurde in 26 Tumoren ein LOH detektiert, davon in 5 Proben ein vollständiger LOH. Abbildung 4.8 stellt Beispiel-Elektrophoretogramme von ausgewählten Normal/Tumor-Probenpaaren mit einem partiellen bzw. vollständigen Allelverlust im Tumor und einem homozygoten, nicht-informativen Normal/Tumor-DNA-Paar dar.



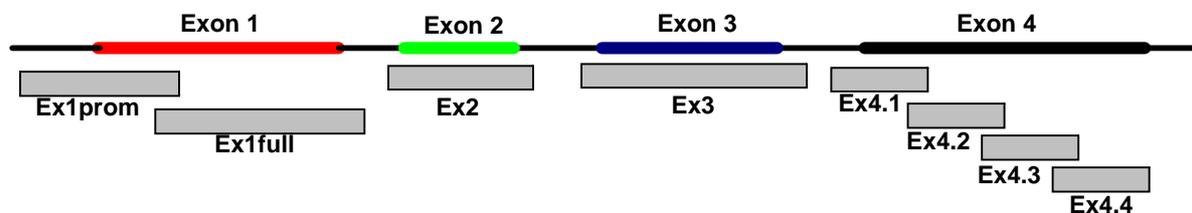
**Abb. 4.8:** Elektrophoretogramme von nicht-informativen Normal- und Tumor-DNA-Proben (nur ein Peak) und N/T-Paaren mit unterschiedlich starkem LOH, erkennbar an der Abnahme der Peakfläche in der Tumor-DNA (N=Normalgewebe-DNA, T=Tumor-DNA; n.i.=nicht informativ)

#### 4.3.2 Mutationsanalyse von IGFBP-4 mittels DHPLC

Die 26 Ovarialkarzinome, bei denen ein LOH der IGFBP-4-Genregion festgestellt wurde, wurden einer Mutationsanalyse mittels DHPLC unterzogen. Erwartungsgemäß sollte das verbliebene Allel in diesen Proben eine inaktivierende Mutation beinhalten, die zu der reduzierten IGFBP-4-Expression führt. Die Analyse mittels DHPLC dient als äußerst sensitive Vorscreeningmethode für auffällige Gen-Fragmente, die dann sequenziert werden. Die Methode basiert auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von Homo- und Heteroduplex-DNA in einem Acetonitrilgradienten. Das Reagenz TEAA (Triethylammoniumacetat) führt zu einer Bindung der DNA-Stränge mit der Säulenmatrix. Diese Bindung

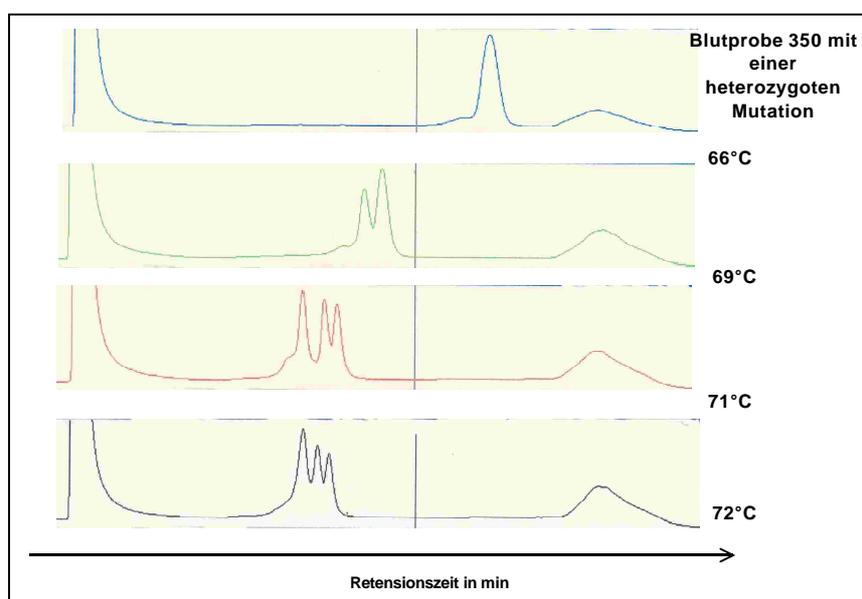
wird mit steigender Konzentration von Acetonitril immer schwächer, bis die DNA schließlich bei einer bestimmten Acetonitrilkonzentration von der Säule eluiert wird. Geschieht das bei einer optimalen Analysetemperatur, werden dabei die Homo- und Heteroduplices, die im Falle einer heterozygoten Mutation entstehen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten eluiert.

Für die Analyse wurde das IGFBP-4-Gen in 8 Fragmente unterteilt (siehe Abb. 4.9), die dann mittels PCR amplifiziert wurden. Die Exons 2 und 3 wurden als je ein Fragment amplifiziert, wobei die Primer im Intronbereich lagen, um eine Analyse des gesamten Exons sowie der Spleißstellen zu ermöglichen. Die Exons 1 und 4 wurden aufgrund ihrer Größe in 2 bzw. in 4 sich überlappende Fragmente unterteilt. Das Exon 4 wurde nicht nur aufgrund seiner Größe unterteilt, sondern auch wegen seiner sehr unterschiedlichen Schmelzdomänen, die von dem WAVEMAKER-Programm vorhergesagt wurden und die eine Analyse des Exons als Ganzes verhinderten. Die Unterteilung des Exons ermöglichte die Analyse jedes Fragments bei der optimalen Temperatur.



**Abb. 4.9:** Schematische Darstellung des IGFBP-4-Gens mit den 4 Exons und die Lokalisierung der 8 amplifizierten DNA-Fragmente für die DHPLC-Mutationsanalyse

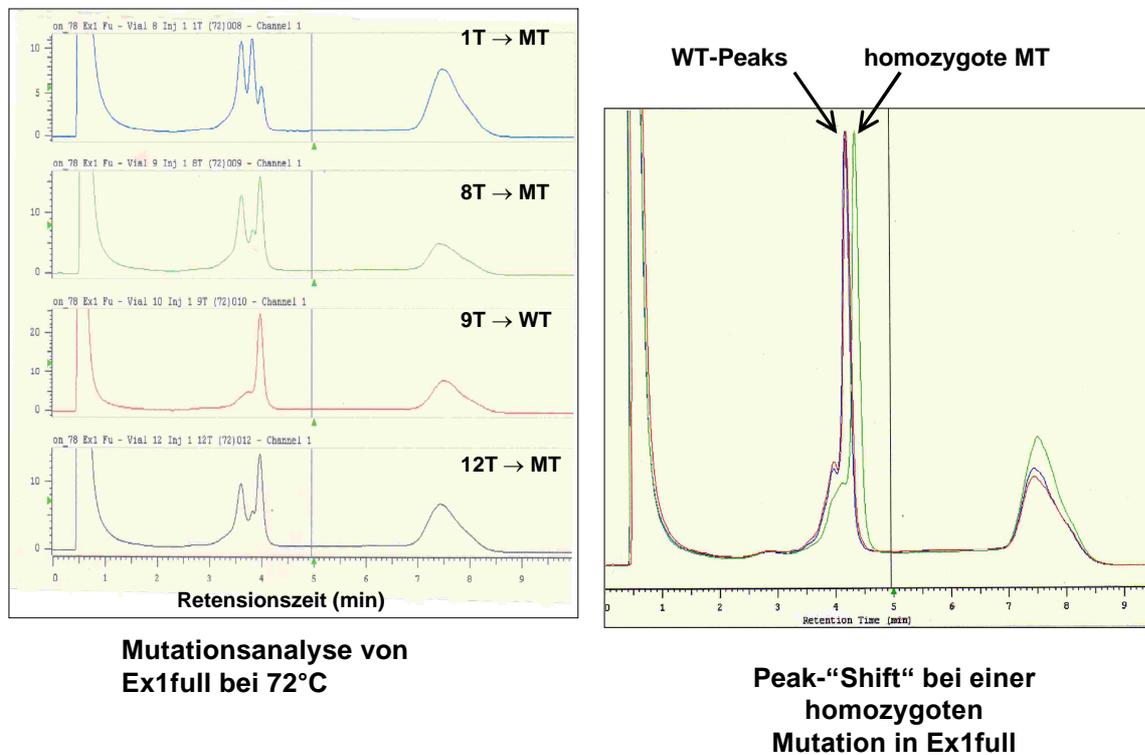
Entscheidend für die Analyse war die Bestimmung der optimalen Elutionsbedingungen und Analysetemperatur für jedes einzelne Fragment. Der Gradient wurde so gewählt, dass das zu untersuchende Fragment nach ca. 4-5 min von der Säule eluiert und klar von dem folgenden Endpeak zu unterscheiden war. Die optimale Analysetemperatur, d.h. die Temperatur, bei der das unterschiedliche Schmelzverhalten am größten ist, wurde zum einem theoretisch mit dem WAVEMAKER-Programm und zum anderen experimentell anhand einer Blutprobe, die einen Polymorphismus enthält, ermittelt. Abbildung 4.10 zeigt die Elutionsprofile einer Blutprobe mit einem SNP („single nucleotid polymorphism“).



**Abb. 4.10:** Elutionsprofile einer DNA-Blutprobe mit einem heterozygoten Polymorphismus bei unterschiedlichen Analysetemperaturen. Bei 66°C wird das DNA-Fragment nicht denaturiert und es liegen nur Homoduplices vor. Bei steigenden Temperaturen zeigt das Elutionsprofil zusätzliche Signale für Homo- und Heteroduplices

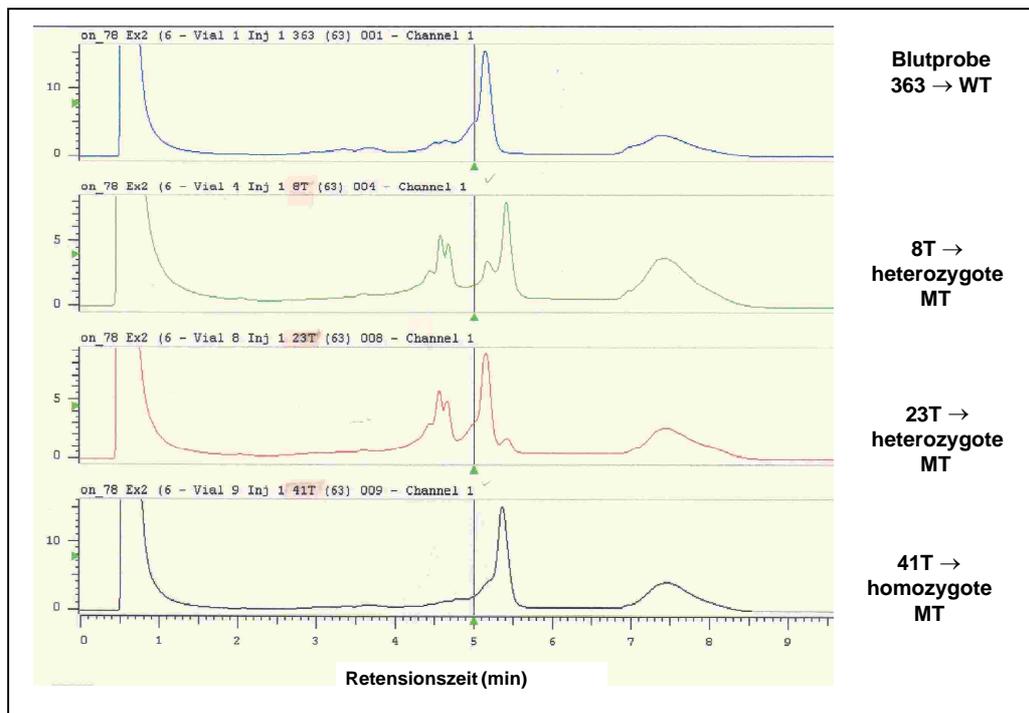
Bei steigender Analysetemperatur erhält man hier neben dem Wildtyp-Peak bis zu drei zusätzliche Peaks, die die unterschiedlichen Heteroduplices darstellen. Bei 66°C kommt es noch nicht zu einer Denaturierung der DNA-Fragmente und somit zur Heteroduplices-Ausbildung. Wildtyp- und mutierte DNA sind hier voneinander nicht unterscheidbar und erscheinen als ein einziger scharfer Peak. Bei 69°C bilden sich nach De- und Renaturierung bereits Homo- und Heteroduplices, die voneinander getrennt werden. Bei der optimalen Temperatur von 71°C sind die beiden Homoduplices (nur WT- bzw. mutierte DNA) von der Heteroduplex deutlich zu unterscheiden.

Auffällige DHPLC-Proben wurden durch Sequenzierung verifiziert und näher charakterisiert. In keinem der analysierten 26 OvCa wurde innerhalb der 8 IGFBP-4-Fragmente eine inaktivierende Mutation gefunden. Lediglich im Exon1 (Analysefragment Ex1full) wurde ein bereits bekannter sowie im Exon 2 ein noch nicht publizierter Polymorphismus gefunden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Elutionsprofile der detektierten Polymorphismen im Vergleich zu WT-Proben.



**Abb. 4.11:** DHPLC-Elutiosprofile des Ex1full-Fragmentes. Links dargestellt OvCa mit einer heterozygoten Mutation, erkennbar an den zusätzlichen Peaks der Heteroduplices im Vergleich zur WT-Probe. Rechts Beispiel einer homozygoten Mutation, erkennbar durch einen Shift des Elutionspeaks (WT=Wildtyp, MT=Mutation)

Im Exon 1 wurde ein bereits publizierter Polymorphismus (SNP-ID: 598892) im Codon 35 (G105A, Leu/Leu) in 18 OvCa (= 62%) und einer Blutprobe identifiziert. In 11 OvCa (=42%) wurde im Exon 2 ein weiterer, noch unbekannter SNP im Codon 125 (C375A; Asn/Asn) gefunden. Da keine inaktivierende Mutationen als Erklärung für die reduzierte IGFBP-4-Expression in OvCa gefunden werden konnten, blieb die Frage nach dem Inaktivierungsmechanismus weiter offen.



**Abb. 4.12:** DHPLC-Elutiosprofile von OvCa mit homo- bzw. heterozygoter Mutation im Exon 2 (WT=Wildtyp, MT=Mutation)

#### 4.4 Promotor-Hypermethylierung von IGFBP-4 in Ovarial-Karzinomen

Gerade in Tumoren sind neben Mutationen auch epigenetische Mechanismen, wie die Hypermethylierung von Promotorsequenzen, sehr häufig an der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beteiligt. Auch das IGFBP-4 könnte durch eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in seinem Promotor inaktiviert sein. Um das zu überprüfen, wurde der IGFBP-4-Promotor einer Methylierungsanalyse mittels DHPLC unterzogen.

##### 4.4.1 Methylierungs-Analyse des IGFBP-4-Promotors mittels DHPLC

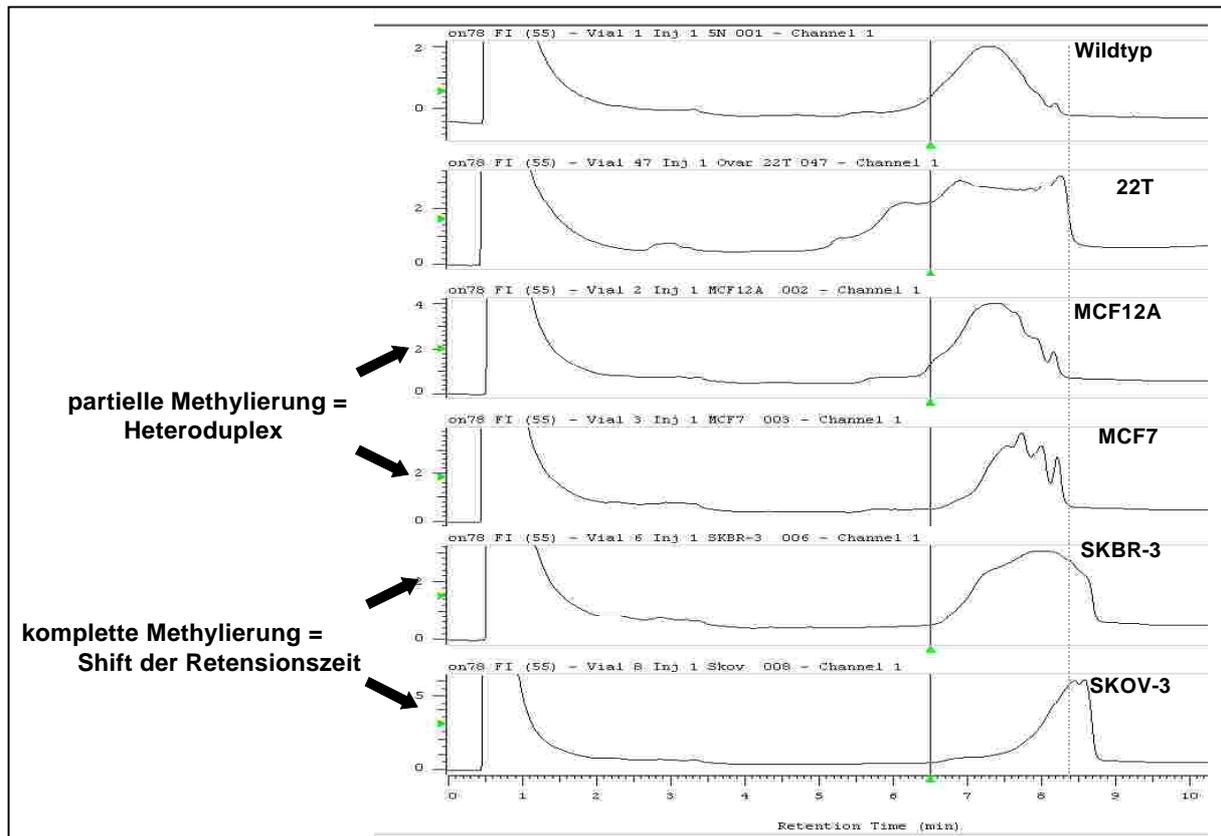
Das IGFBP-4-Gen kommt durchaus für eine Promotormethylierung in Frage, da sein Promotor zahlreiche CpG-Inseln aufweist. Für ein Vorscreening von OvCa mit einer möglichen Promotor-Hypermethylierung wurde hier eine erst vor Kurzem etablierte Analysemethode mittels DHPLC angewendet (Betz *et al*, 2004). Durch Bisulfit-Modifikation der zu untersuchenden DNA erscheint ein methyliertes Cytosin innerhalb einer CpG-Inseln als eine Punktmutation (wird nicht deaminiert und zu Uracil umgewandelt) und kann als solche mit der DHPLC detektiert werden. Methylierung aller CpGs in der untersuchten DNA-Sequenz führt nach Bisulfit-Umwandlung zu einem höheren G/C-Gehalt des resultierenden PCR-Produktes und somit zu einer späteren Retentionszeit in der DHPLC. Selbst die Methylierung einer einzigen CpG-Stelle kann mit dieser Methode detektiert werden, denn nach dem Denaturierung/Renaturierung-Schritt kommt es zur Ausbildung von Heteroduplexen, die leicht an ihrem verändertem Schmelzverhalten unterschieden werden können.

GCATGAGCCACTAC**CG**CCTGGCCTTCTTTTTTCTCTTTCTTTCTTTTTTTT  
 TTTGAGATGGAGTCT**CG**CTCTGT**CG**CCCAGGTTGGAGTGCAGTGG**CG**CAA  
 TCTCAGCTCACTGCAAGCTCCACCTCC**CG**GGATCATGCCATTCTCCTGCC  
 TCAGCCTCCCTAGTAGCTGGGACTACAGGCACCC**CG**CCACC**CG**CC**CG**GGCT  
 AACTTTTTGTATTTTTAGTAGAGAGGGGGTTT**CG**CGTGTAGCCAGGAT  
 GGTCT**CG**ATTTCTGACCT**CG**TGATCTGCC**CG**CCT**CG**GGCTCCCAAAGTG  
 CTGGGATTACAGG**CG**TGAGCCACC**CG**CGCC**CG**GCCTTCTTTCTTTCTTTCT  
 TTTTTAGACAGAGTTTTCTTTCTTTTCCCTAGGCTGGTGTGCAGTGGTACA  
 ATTCTAGCTCACTGCAGCCTCCAACCTCCTGGGCTCAAGTGATCCTCTTGC  
 CTCAGGCTCC**CG**AGTACCTGGGACCACAGGTGAA**CG**CCACCACACCTGGC  
 TAATTTTAAAATTTTTTTGTAGAGACAAGGTCTCACTA**CG**TTGCCCAGAC  
 TGGCTTGAACCTCCTGGGCTCAAGTGATCCTCC**CG**CCTCAGCCTCCAAA  
 GTGCTGACATTACAGGTGTGAGTCACTGCTGCAGGCCCTCAAATCCTTC  
 ACTGCCATCTGGGAAATGATCACAACAGCTCTACAAATACACAATGATTA  
 CAAGGAATGGTGGCCCACTGGAGTTGTT**CG**CAAAACTTGCACATTGC  
 AAGTGGCAATCTCCAGGCCTGCCCTCC**CG**AGTGGGTCTGAATGGG  
 CCTGAGAGGCAAACATCCAAGAAGGAGGAAGAGGCT**CG**GG**CG**CACCTCCC  
 TCCC**CG**GGAGTTCTGCTGATTCCATCTTGGGGAAGCAGGGTGGACCAGGG  
 CCCAAATG**CG**CCCTGGGGAGATT**CG**GGGG**CG**GGAGAGGTTGCAAGGGC  
 AAGTGGCAAGAGCCTGT**CG**TCTTAGGGCCTCCAGGCCTTTCTGTGCC  
 CCTAGCTGTGCCCTGT**CG**CTTTACCCACCTCAGGAGGCTTGGTCTCCAG  
**CG**GTTGAGGCTGGAAGCAC**CG**GGGTG**CG**GTTGAAAG**GGCTCTGTCCAGGA**  
**AGACCGGATCCGCAGAGCTCGGGAGTCCGGGCTAGGAAGTCCCTTTCTCGG**  
 TGGGAGACTGAGG**CG**CCTTGG**CG**GGG**CG**GG**CG**AGACTCCT**CG**AGGTC  
 GGGAAAGGGGGCC**CG**CAGCAGCCCTTGGCTTCCCTTCTCCCTTGCCTC  
 CCCT**CG**GGGCT**CG**GTTCAGAGGCACCTCTGGG**CG**CCTGCTACAGCTTCC  
 AACTG**CG**CC**CG**CTTCTTCTT**CG**GCAGAAA**AGGACTTTCAGATGCGGCGG**  
**CGGCGGCGGCGGCG**ACTCAGGACAG**CG**CCCCCTCCCCCTAA**CG**GCC**CG**CCT  
 CTCCCTCTCCCCCT**CG**CC**CG**CC**CG**GCTCCCCACCTCTGGGAAGG**CG**GCT  
 GGGGTGTGGCCAGGAC**CG**GTATAAAGT**CG**GGGGAG**CG**GTCC**CG**GGC  
 AG**CG**CTC**AGCCCCCTGCCCTCGCCCGCCCGCCCTGCCCTGGGCGGGC**

**schwarz:** Promotorbereich  
**rot:** Exon 1  
**blau:** Methylierungs-  
 primer

**Abb.4.13:** Lokalisierung von CpG-Inseln innerhalb des IGFBP-4-Promotors und des entsprechenden Analyse-Fragments für die Methylierungsanalyse mittels DHPLC

Für die Analyse wurde ein 258 bp großes Promotor-Fragment von IGFBP-4, welches 18 CpGs enthielt (siehe Abb. 4.13), mit Primern von Bisulfit-behandelter DNA aus ausgewählten OvCa und Zelllinien amplifiziert. Da die Primer methyl-unspezifisch waren, wurde hierbei sowohl die unmethylierte wie auch methylierte DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann auf der DHPLC analysiert. Die optimale Analysetemperatur wurde anhand der Schmelzprofile bestimmt, die das WAVEMAKER-Programm für das unmethylierte bzw. vollständig methylierte PCR-Produkt vorhergesagt hat. Aufgrund seines höheren G/C-Gehalts trat bei dem vollständig methylierten Fragment die partielle Denaturierung bei höheren Temperaturen auf als bei dem unmethylierten Fragment. Insgesamt wurden 25 OvCa, 3 OvCa- und 6 MaCa-Zelllinien analysiert. Bei den Zelllinien MCF12A und MDAH wurde keine Methylierung, bei MCF7, ZR-75-1, BT20 und T47-D und eine partielle (Heteroduplices-Signale neben dem Wildtyp-Signal) und bei HEY, SKOV3 und SKBR3 eine komplette Methylierung festgestellt (siehe Abb. 4.14). Der Methylierungsstatus dieser Zelllinien korreliert gut – mit Ausnahme der Zelllinien MCF7 und T47-D. – mit ihrem IGFBP-4-Expressionslevel. MCF12A und MDAH zeigen als Zelllinien ohne eine IGFBP-4 Promotor-Methylierung entsprechend eine mittlere bis hohe IGFBP-4-Expression. Die partielle Methylierung in den Zelllinien BT20 und ZR-75-1 resultiert in einer bereits stark reduzierten IGFBP-4-Expression. Die komplett methylierten Zelllinien HEY, SKBR3 und SKOV3 haben eine kaum nachweisbare IGFBP-4-Expression (siehe Abb. 4.7).



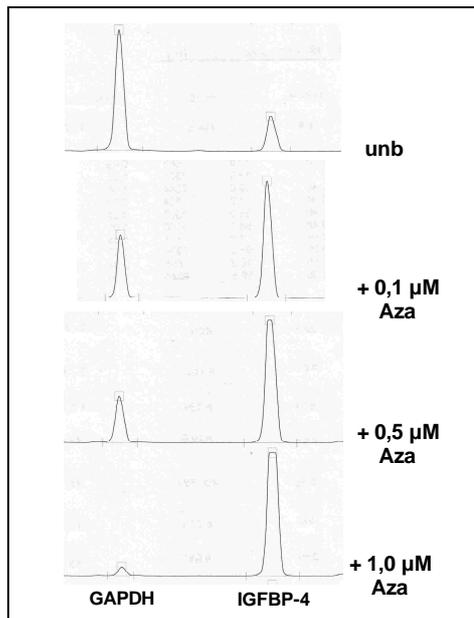
**Abb. 4.14:** DHPLC-Elutiosprofile von Zelllinien und OvCa mit einer partiellen bzw. kompletten Promotor-Hypermethylierung

Ebenfalls bei den untersuchten OvCa korreliert der festgestellte Methylierungsstatus gut mit der IGFBP-4-Expression. Alle Ovarialkarzinome mit einer hohen IGFBP-4-Expression (5 von 25) zeigten keine Promotormethylierung. Bei den restlichen 20 OvCa mit einer reduzierten IGFBP-4-Expression konnte bei 8 eine partielle bis komplette Methylierung detektiert werden. Somit liegt die Annahme nahe, dass Hypermethylierung tatsächlich einen Inaktivierungs-Mechanismus für IGFBP-4 im Ovarialkarzinom und wahrscheinlich auch im Mamma-Karzinom darstellt. Zu beachten bleibt jedoch, dass nur die Methylierung von ganz spezifischen CpGs zur Geninaktivierung führt. Die Zelllinien MCF7 und T47-D zeigen nämlich trotz einer partiellen Methylierung eine sehr hohe IGFBP-4-Expression. Hier sind die betroffenen CpGs höchstwahrscheinlich auch nicht an der Geninaktivierung beteiligt. Umgekehrt zeigen nicht alle niedrig-exprimierende OvCa eine Hypermethylierung, so dass hier auch andere trans-Effekte an dem IGFBP-4-Silencing beteiligt sein müssen.

#### 4.4.2 Reexpression von IGFBP-4 nach Behandlung mit einem Methyltransferase-inhibitor

Um die Hypermethylierung als einen primären Inaktivierungsmechanismus von IGFBP-4 in OvCa zu verifizieren, wurden die hypermethylierten Zelllinien HEY, SKOV3 und SKBR3 mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5'-aza-2'-deoxycytidin (5'-aza-dC) für 48h behandelt und anschließend hinsichtlich der IGFBP-4-Expression untersucht. Als Negativ-Kontrollen dienen die nicht-methylierten Zelllinien MCF12A und MDAH. 5'-aza-dC verhindert als ein Cytosin-Analog die *de novo*-Methylierung durch die Methyltransferase von neu synthetisierten DNA-Strängen. Somit steigt in Gegenwart von 5'-aza-dC nach jeder Zellteilung der Anteil von nicht-methylierter DNA, so dass es schliesslich zu einer genom-weiten Demethylierung kommt. Sollte die detektierte Hypermethylierung des IGFBP-4-Promotors

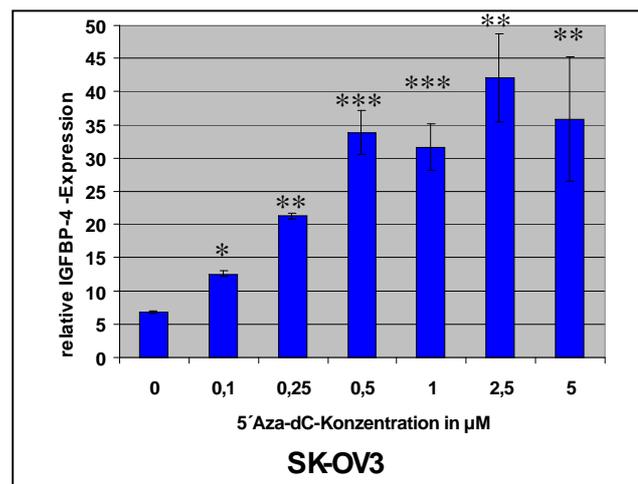
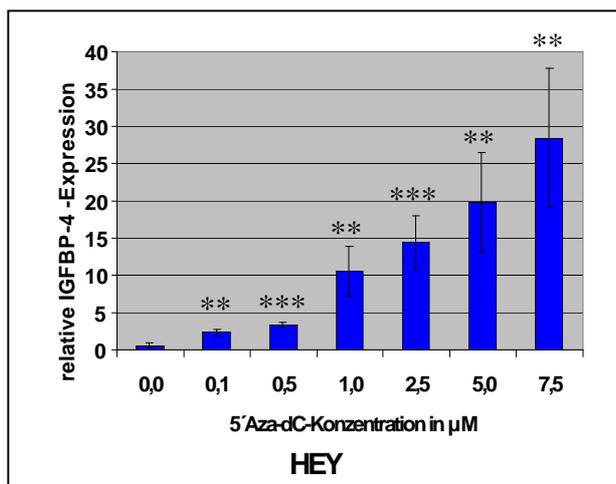
tatsächlich für den Expressionsrückgang dieses Gens in den Tumoren verantwortlich sein, müsste eine durch 5'-aza-dC vermittelte Demethylierung wieder zur Reaktivierung der Genexpression führen.



**Abb. 4.15:** Konzentrationsabhängige Reexpression von IGFBP-4 nach 5'-aza-dC-Behandlung der Zelllinie HEY.

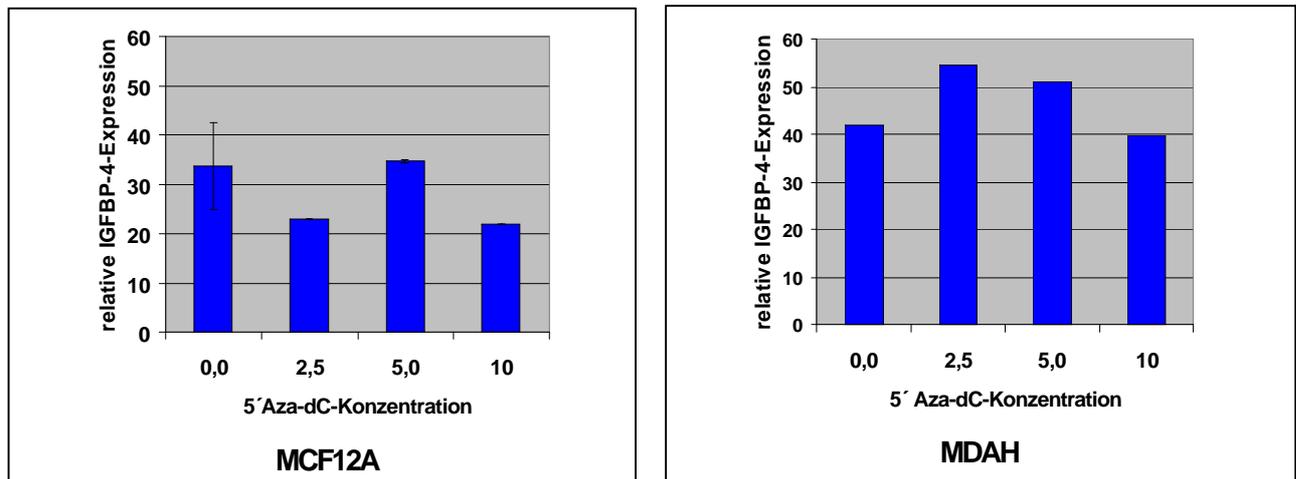
Die Zellen wurden für 48h mit 5'-aza-dC behandelt und nach weiteren 48h wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR und Auftragung auf den A.L.F.-DNA-Sequenzierer quantifiziert. Die Reexpression ist an der Zunahme des IGFBP-4-Produkt-Peaks (rechts) im Verhältnis zu dem GAPDH-Referenz-Peak zu erkennen (Aza= 5'-aza-dC).

Tatsächlich führte die 5'-aza-dC-Behandlung bei den hypermethylierten OvCa-Zelllinien HEY und SKOV3 konzentrationsabhängig zu einer Reexpression von IGFBP-4 (siehe Abb. 4.15 und 4.16). Bereits die geringste 5'-aza-dC Konzentration bewirkte in beiden Zelllinien eine deutliche Expressionserhöhung (siehe Abb. 4.16). Bei den höchsten 5'-aza-dC-Konzentrationen konnte ein Expressionslevel erreicht werden, der vergleichbar mit dem in der nicht-methylierten Zelllinie MDAH war. Dabei reichte bei SKOV3 bereits eine Konzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  für diesen Effekt aus, die Zelllinie HEY erforderte hier eine etwas höhere Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 4.16:** Konzentrationsabhängige Expressionserhöhung von IGFBP-4 nach 5'-aza-dC-Behandlung der Zelllinien HEY und SKOV3.

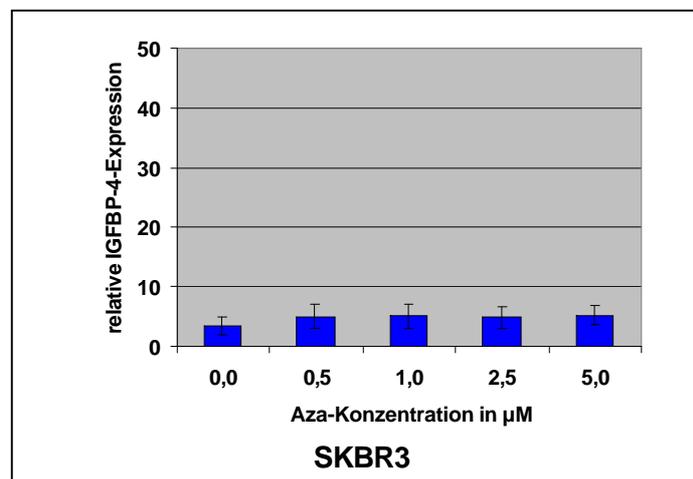
Die Zellen wurden für 48h mit 5'-aza-dC behandelt und nach weiteren 48h wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR und Auftragung auf den A.L.F.-DNA-Sequenzierer im Verhältnis zum GAPDH-Referenzgen quantifiziert (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ ; jeweils relativ zu 0  $\mu\text{M}$  Aza)



**Abb. 4.17:** 5`-aza-dC hat keinen Einfluss auf die IGFBP-4-Expression in den nicht-methylierten Zelllinien MCF12A (MaCa) und MDAH2774 (OvCa).

Die Zellen wurden für 48h mit 5`-aza-dC behandelt und nach weiteren 48h wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR und Auftragung auf den A.L.F.-DNA-Sequenzierer im Verhältnis zum GAPDH-Referenzgen quantifiziert.

Bei den nicht-methylierten Zelllinien MCF12A und MDAH hatte 5`-aza-dC keinen nennenswerten Einfluss auf die IGFBP-4-Expression, so dass hier unspezifische Wirkungen des Cytosin-Analogs ausgeschlossen werden konnten (siehe Abb. 4.17). Entgegen den Erwartungen konnte trotz 5`-aza-dC-Behandlung (in der höchst-möglichen, noch nicht cytotoxischen Konzentration) keine IGFBP-4-Reexpression in der MaCa-Zelllinie SKBR3 erreicht werden (siehe Abb. 4.18). Da sie, im Gegensatz zu den anderen zwei methylierten Zelllinien HEY und SKOV3, Östrogen-Rezeptor-negativ war, lag hier die Vermutung nahe, dass ein Fehlen des Östrogen-Rezeptors die IGFBP-4-Expression trotz Promotor-Demethylierung verhinderte. Zahlreiche Hinweise aus der Literatur bezüglich einer Östrogen-Abhängigkeit von IGFBP-4 bestärkten diese Annahme.



**Abb. 4.18:** Fehlende IGFBP-4-Reexpression trotz Behandlung mit 5`-aza-dC in der MaCa-Zelllinie SKBR3.

Die Zellen wurden für 48h mit 5`-aza-dC behandelt und nach weiteren 48h wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR und Auftragung auf den A.L.F.-DNA-Sequenzierer im Verhältnis zum GAPDH-Referenzgen quantifiziert. (Aza= 5`-aza-dC).

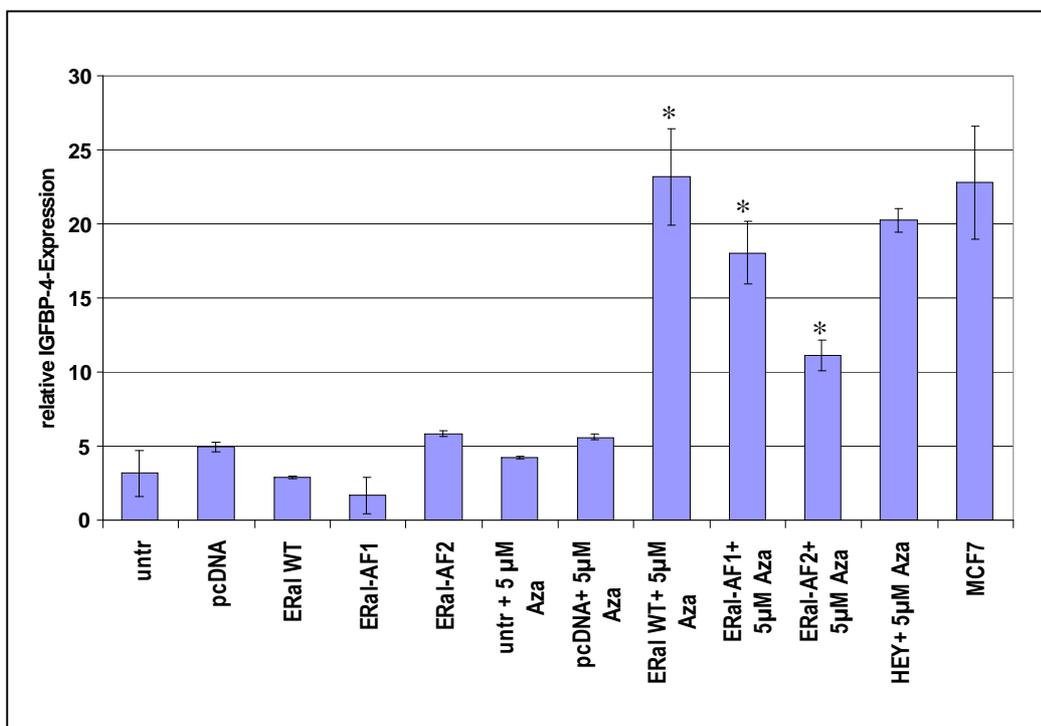
#### 4.5 Estrogen-Rezeptor-Abhängigkeit von IGFBP-4 in OvCa

Es gibt bereits zahlreiche Publikationen die belegen, dass IGFBP-4 durch 17 $\beta$ -Estradiol induziert wird und das anti-Östrogene diese Induktion blockieren (Sheikh *et al* 1993, Owens *et al* 1993, Pratt u. Pollak 1993, Schrope *et al* 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass IGFBP-4 positiv mit dem Östrogenrezeptor(ER)-Status in MaCa korreliert (Clemmons *et al* 1990, Figuerora *et al* 1993). In vor Kurzem publizierten Microarray-Analysen von Östrogen-behandelten MaCa-Zelllinien und ER-positiven

versus ER-negativen Mammakarzinomen wurde das IGFBP-4 als ein ER-Targetgen identifiziert. Es wurde deshalb vermutet, dass neben der Promotor-Hypermethylierung auch der ER-Status eine wichtige Rolle in der Modulation der IGFBP-4-Expression spielt.

#### 4.5.1 IGFBP-4-Reexpression in ER $\alpha$ -SKBR3-Transfektanten nach 5'-Aza-dC-Behandlung

Für die experimentelle Verifizierung der Annahme, dass die stark reduzierte IGFBP-4-Expression in der MaCa-Zelllinie SKBR3 nicht nur auf die Promotor-Hypermethylierung, sondern auch auf den negativen ER-Status zurückzuführen sei, wurden die SKBR3-Zellen mit einem ER $\alpha$ -Wildtyp-Expressionsplasmid transfiziert. Zur Überprüfung, welche Rezeptordomänen für eine eventuelle IGFBP-4-Aktivierung erforderlich sind, wurden zusätzlich verschiedene ER-Deletionsvarianten transfiziert. Nach Selektion der SKBR3-Transfektanten wurden diese für 48h mit 5'-aza-dC behandelt und einer IGFBP-4-Expressionsanalyse unterzogen.



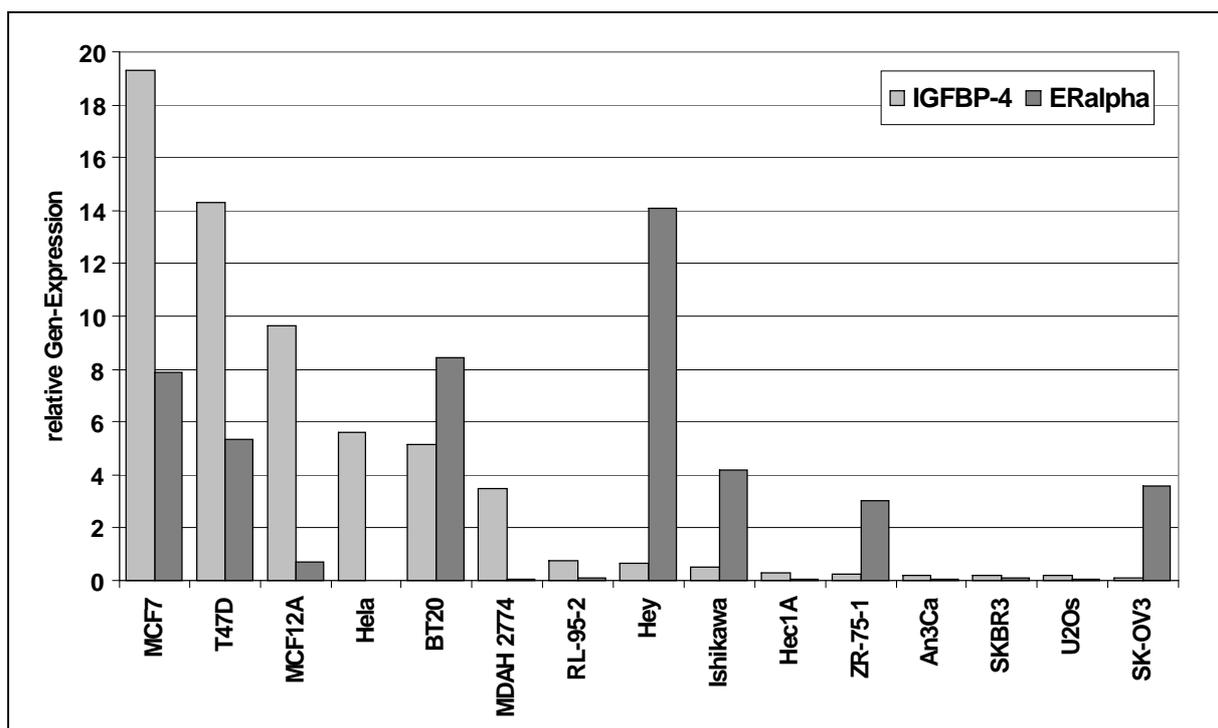
**Abb. 4.19:** Reexpression von IGFBP-4 nach 5'-aza-dC-Behandlung der ER $\alpha$ -SKBR3-Transfektanten. Die SKBR3-Zellen wurden mit dem ER $\alpha$ -WT-Expressionsplasmid sowie zwei verschiedenen ER-Deletionsvarianten transient transfiziert und für 48h mit 5'-aza-dC behandelt. Nach weiteren 48h wurde die IGFBP-4-Expression mittels RT-PCR und Auftragung auf den A.L.F.-DNA-Sequenzierer im Verhältnis zum GAPDH-Referenzgen quantifiziert (pcDNA=Leervektor; ER $\alpha$ WT=ER $\alpha$ -Wildtyp, ER $\alpha$ AF1=ER $\alpha$  ohne die AF1-Aktivierungsdomäne; ER $\alpha$ AF2=ER $\alpha$  ohne die AF2-Aktivierungsdomäne; \*, p<0,05 relativ zu pcDNA+Aza).

Nach der Transfektion des Östrogenrezeptors in die SKBR3-Zellen konnte ein markanter Expressionsanstieg von IGFBP-4 beobachtet werden, jedoch erst nach der Behandlung mit 5'-aza-dC (Abb. 4.19). Das bedeutet, dass die Promotor-Hypermethylierung der primäre Inaktivierungsmechanismus von IGFBP-4 ist. Solange aber kein funktioneller Östrogen-Rezeptor vorhanden ist, reicht allein die Promotor-Demethylierung zur Gen-Reexpression nicht aus – der Rezeptor ist für die Genexpression als Aktivator unbedingt notwendig. Der Vergleich der IGFBP-4-Expressionslevel der ER-WT- und Deletions-Transfektanten zeigt, dass für die stimulatorische Wirkung des Östrogen-Rezeptors

keine der beiden bekannten Aktivierungsdomänen AF1 und AF2 unbedingt notwendig ist. Zwar weisen die ER-WT-Transfektanten nach 5`-aza-dC-Behandlung die höchste IGFBP-4-Expression auf – vergleichbar mit der Expression der hoch-exprimierenden Zelllinie MCF7 – jedoch auch in den beiden Deletionsvarianten kommt es zu einer 2- bis 3-fachen Expressionserhöhung im Vergleich zu Leervektor-Zellen. Somit muss die IGFBP-4-Aktivierung v. a. über andere Bereiche des Östrogen-Rezeptors vermittelt werden. Nur die Aktivierungsdomäne AF2 scheint zumindest teilweise an der IGFBP-4-Aktivierung beteiligt zu sein, denn die Deletionsvariante ohne diese Domäne zeigt die schwächste IGFBP-4-Stimulation.

#### 4.5.2 ER-Expressionsanalyse in OvCa und Zelllinien

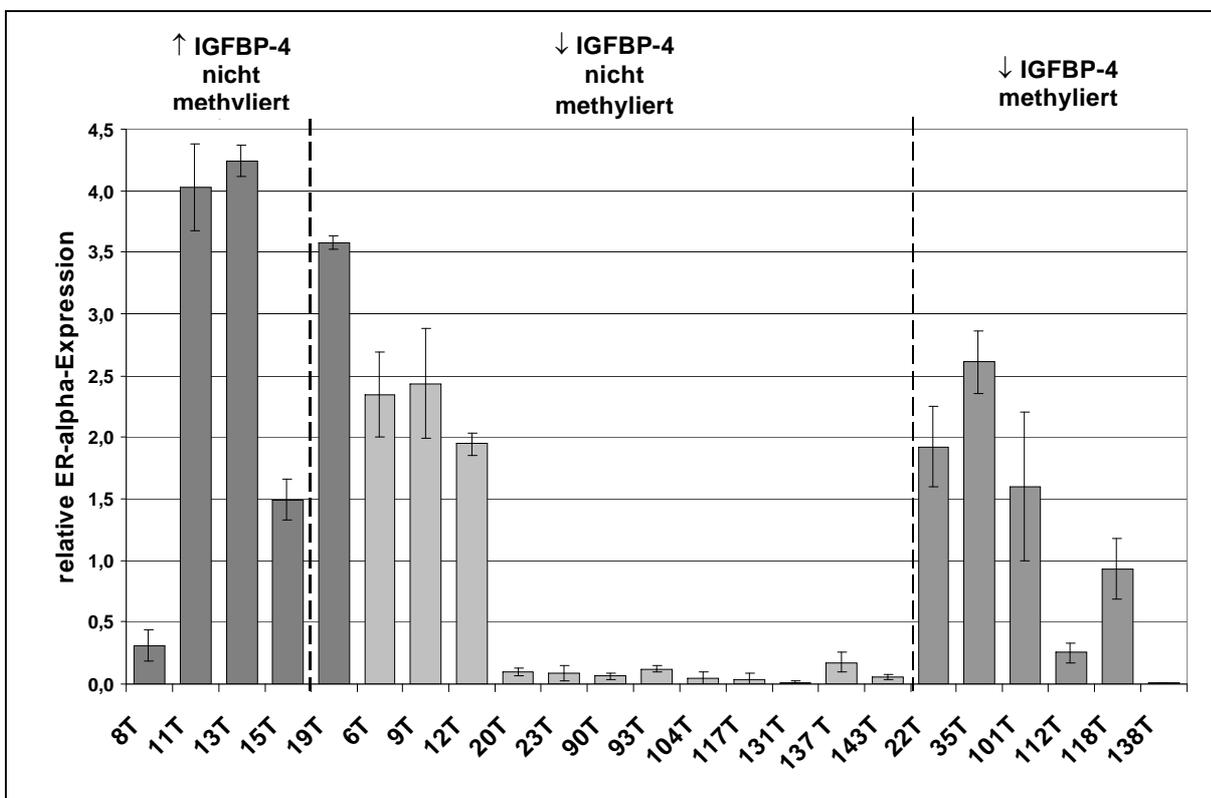
Nachdem gezeigt wurde, dass der Östrogen-Rezeptor neben der Promotor-Hypermethylierung an der Modulation der IGFBP-4-Expression in einer MaCa-Zelllinie beteiligt ist, stellte sich nun die Frage, inwieweit der ER-Status die IGFBP-4 Expression in den bislang untersuchten OvCa und anderen Zelllinien beeinflusst. Möglicherweise könnte ein Fehlen des Östrogenrezeptors die erniedrigte IGFBP-4-Expression in den als nicht-methyliert identifizierten OvCa erklären. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Expression des Östrogen-Rezeptors mittels quantitativer RT-PCR in den bislang untersuchten Zelllinien und Ovarialkarzinomen bestimmt (Abb. 4.20).



**Abb. 4.20:** relative ERalpha-Expression im Vergleich zur relativen IGFBP-4-Expression in mittels quantitativer RT-PCR untersuchten humanen Tumor-Zelllinien

Die in den Zelllinien ermittelten Expressionsniveaus des Östrogen-Rezeptors entsprechen weitgehend den Literaturdaten. Nur bei der MaCa-Zelllinie BT20 wurde ein nicht den publizierten Daten entsprechendes Ergebnis erreicht, d.h. die Zelllinie zeigte eine recht hohe ER-Expression, obwohl sie laut Literatur ER-negativ sein sollte. Vergleicht man die ER-Expression mit der Expression von IGFBP-4, erkennt man dass Zelllinien mit einer hohen ER-Expression auch eine entsprechend hohe IGFBP-4-

Expression aufweisen. Die Ausnahmen bilden die Zelllinien, bei denen die IGFBP-4-Expression durch eine partielle (BT20, ZR-75-1) bzw. komplette Promotor-Hypermethylierung unterdrückt wird. Zelllinien mit einer deutlich reduzierten ER-Expression zeigen auch eine extrem niedrige IGFBP-4-Expression – darunter sind v. a. die meisten Endometrium-Karzinom-Zelllinien. Ihr Methylierungsstatus bezüglich des IGFBP-4-Promotors wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, so dass man hier nicht feststellen kann, ob das IGFBP-4-Silencing allein auf den negativen ER-Status zurückzuführen ist oder ob auch hier eine Hypermethylierung der primäre Inaktivierungsmechanismus ist. Bei der Endometrium-Karzinom-Zelllinie Ishikawa ist die IGFBP-4-Expression trotz deutlicher ER-Expression deutlich vermindert, wofür höchstwahrscheinlich, genauso wie im Fall von ZR-75-1, HEY und SKOV3, die Promotor-Hypermethylierung verantwortlich ist. Die einzigen Befunde, die gegen eine ER-Abhängigkeit von IGFBP-4 sprechen würden, findet man bei den Zelllinien MCF12A, Hela und MDAH2774. Sie alle zeigen trotz einer sehr niedriger ER-Expression eine recht starke IGFBP-4-Expression.



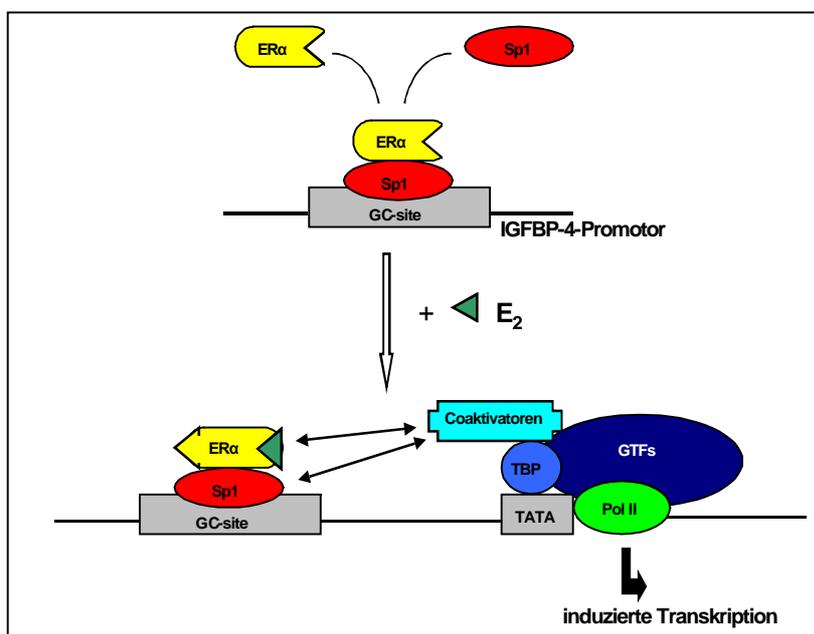
**Abb. 4.21:** relative ERalpha-Expression in mittels quantitativer RT-PCR untersuchten methylierten und nicht-methylierten OvCa

Die Ergebnisse für die untersuchten OvCa bestätigen wiederum die ER-abhängige IGFBP-4-Stimulation (Abb. 4.21). Auch hier ist die Promotor-Hypermethylierung der primäre Inaktivierungsmechanismus, da alle Tumore, die eine reduzierte IGFBP-4-Expression trotz hoher ER-Expression auch methyliert sind. Unter den nicht-methylierten OvCa zeigen Tumore mit einer hohen IGFBP-4-Expression eine entsprechend hohe ER-Expression und Tumore mit einer reduzierten IGFBP-4-Expression eine vorwiegend stark reduzierte ER-Expression. In diesen Fällen führt der negative ER-Status zu einer stark reduzierten IGFBP-4-Expression, obwohl keine Promotorhypermethylierung vorliegt. Somit bestimmt das Zusammenspiel von Hypermethylierung und ER-Stimulation die IGFBP-4-Expression in Ovarial-

Karzinomen und Tumor-Zelllinien, wobei die Hypermethylierung der primäre Inaktivierungsmechanismus ist.

#### 4.6 IGFBP-4-Genregulation über GC-reiche Sequenzen als Bindestellen für ER/Sp1-Komplexe

Über welchen Mechanismus wirkt nun der Östrogenrezeptor auf die IGFBP-4-Genregulation? In seiner Arbeit von 1999 konnte Quin *et al* zeigen, dass die trans-Aktivierung von IGFBP-4 durch 17 $\beta$ -Östradiol in MCF7-Zellen durch zwei GC-reiche Sequenzen innerhalb des IGFBP-4-Promotors vermittelt werden (Abb. 4.22). Dabei interagiert der Östrogenrezeptor mit Sp1-Proteinen, die dann im Komplex mit dem ER an die beiden GC-reichen Bindestellen an den Positionen (-559 bis -553) und (-72 bis -64) binden und die IGFBP-4-Expression induzieren. Somit tritt hier ein weiterer Faktor innerhalb der IGFBP-4-Genmodulation ins Blickfeld, nämlich das Sp1-Protein.



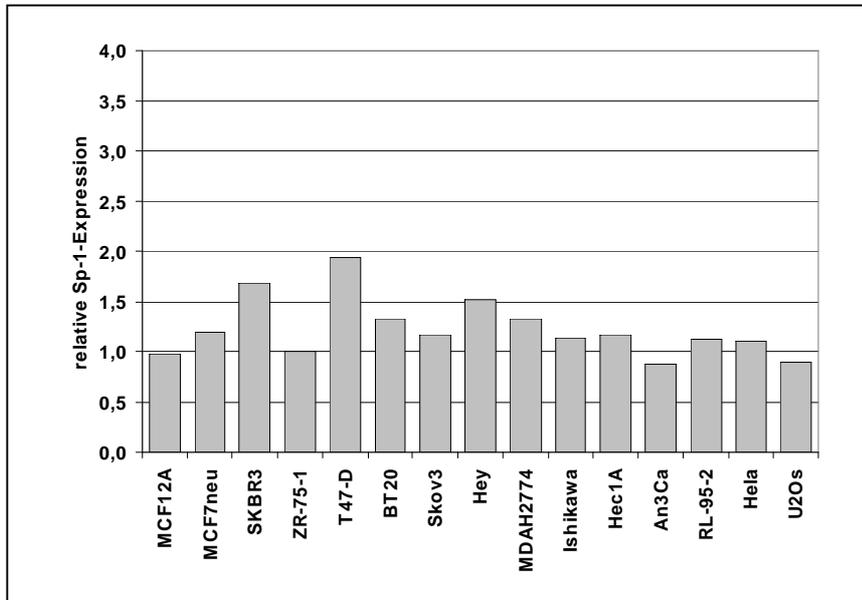
**Abb. 4.22:** Mechanismus der trans-Aktivierung der IGFBP-4-Expression durch Östrogen nach Quin *et al*.

ER $\alpha$  und Sp1 binden als Komplex an GC-reiche Sequenzen im IGFBP-4-Promotor. Durch zusätzliche Bindung von Östrogen kommt es zur Konformationsänderungen des Komplexes und zur Wechselwirkung mit Coaktivatoren des Polymerase II-Initiationskomplexes was letztendlich zur Induktion der Transkription führt.

##### 4.6.1 Sp1-Protein als ein weiterer Regulationsfaktor für IGFBP-4: Sp1-Expressionsanalyse

Um zu überprüfen, inwiefern die Sp1-Expression Einfluss auf das IGFBP-4-Niveau in Zelllinien und methylierten und nicht-methylierten OvCa hat, wurde in diesen Proben die Sp1-Expression mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Es zeigte sich, dass Sp1 ziemlich gleichmäßig und ubiquitär sowohl in Zelllinien wie auch in OvCa exprimiert wird, was auch für das Protein als einen wichtiger Signaltransduktionsfaktor zu erwarten war. Es zeigte sich keinerlei Korrelation zwischen Sp1- und IGFBP-4-Expression sowie Methylierungsstatus.



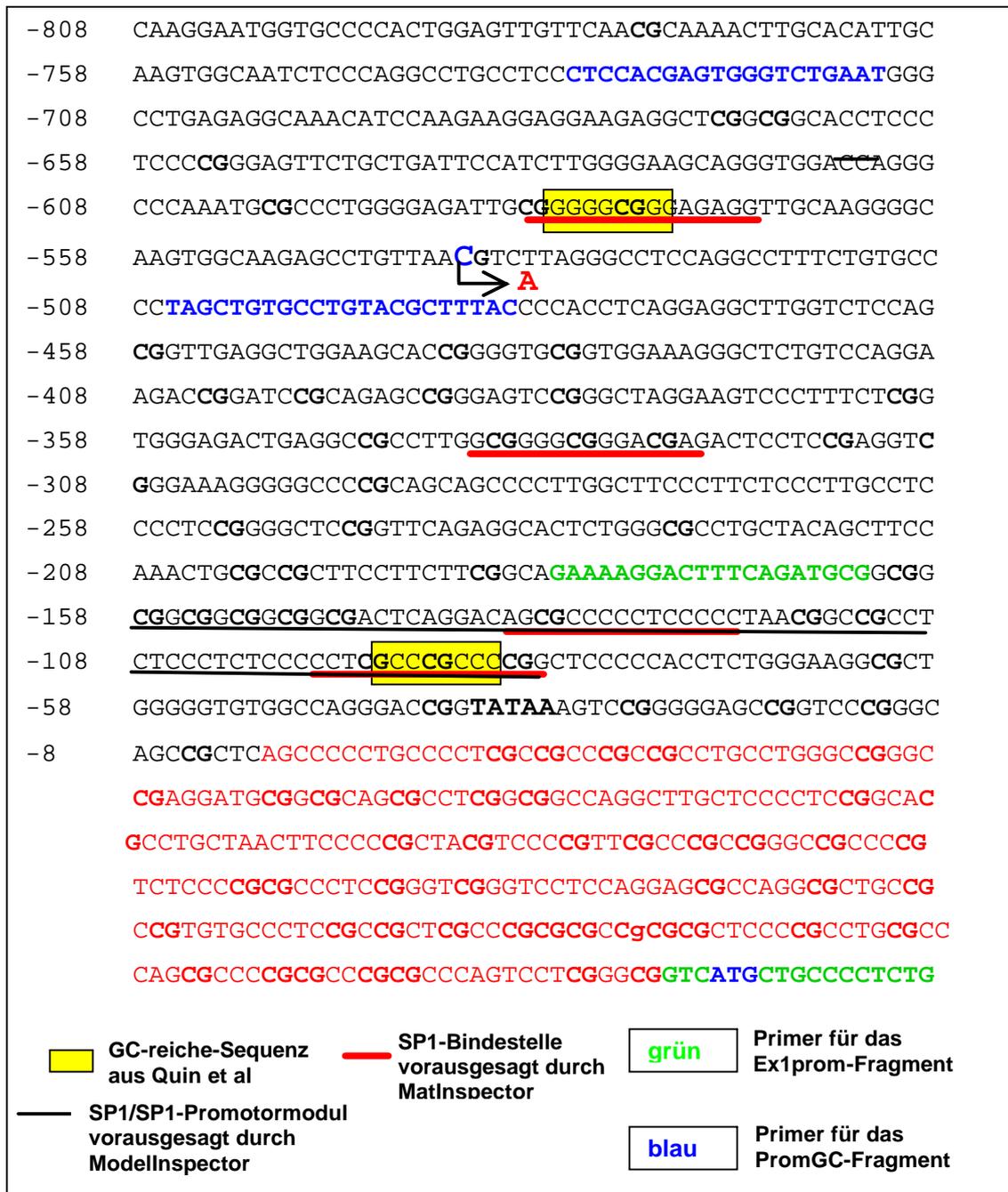
**Abb. 4.23:** relative Sp1-Expression in humanen Tumor-Zelllinien.

#### 4.6.2 Mutationsanalyse der GC-reichen ER/Sp1-Bindesequenzen innerhalb des IGFBP-4-Promotors

Quin *et al* hat im Rahmen seiner Untersuchung der zwei GC-reichen Sp1/ER-Bindestellen innerhalb des IGFBP-4-Promotors nachgewiesen, dass Mutationen innerhalb dieser kurzen Sequenzen, die v.a. die dort lokalisierten CpG-Inseln betrafen, die Bindung des Sp1/ER-Komplexes völlig verhinderten. Deshalb sollten nun gezielt die beiden GC-reichen-Bindesequenzen nach möglichen Mutationen durchsucht werden, um möglicherweise noch einen neben der Promotor-Hypermethylierung, weiteren Inaktivierungsmechanismus von IGFBP-4 in OvCa nachzuweisen.

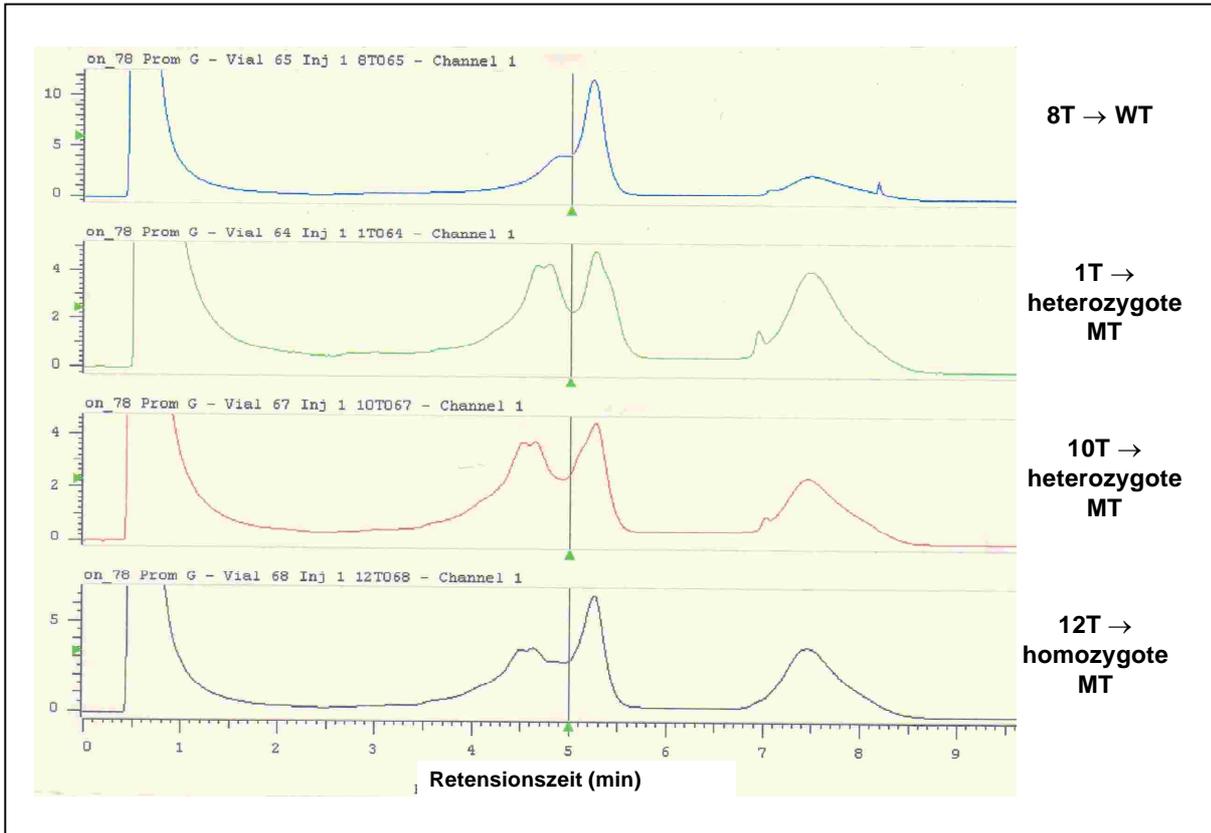
Zunächst wurde überprüft, ob die von Quin *et al* beschriebenen Bindesequenzen auch mit gängigen Transkriptionsfaktor-Bindestellen-Suchprogrammen innerhalb des IGFBP-4-Promotors identifiziert werden können. Für die *in silico* Analyse wurden die beiden Suchprogramme MatInspector und ModellInspector von der Firma Genomatix in München genutzt (Werner T 2001). MatInspector dient zur Identifikation von einzelnen Transkriptionsfaktor (TF)-Bindestellen, ModellInspector sucht nach sog. Promotor-Modulen, auch als "composite regulatory elements" bezeichnet, die aus zwei nah beieinander liegenden Bindestellen für zwei TF bestehen und eine funktionelle Einheit bilden. Als Eingabe-Sequenz wurden 1000bp vor dem Beginn des Exons 1 der IGFBP-4-Sequenz gewählt.

Abbildung 4.24 zeigt die Lokalisierung der beiden von Quin *et al* beschriebenen GC-reichen Sequenzen sowie eine Auswahl der von den beiden Coputerprogrammen identifizierten TF-Bindestellen bzw. TF-Modulen. Die beiden GC-reichen-Bindesequenzen wurden durch das MatInspector-Suchprogramm als Sp1-Bindestellen identifiziert, wobei das Programm noch zwei weitere putative Sp1-Bindestellen zwischen den beiden GC-reichen-Sequenzen gefunden hat. Auch das andere Suchprogramm, ModellInspector, identifizierte ein aus zwei SP1-Bindestellen bestehendes Promotormodul, welches u. a. die -72 bis -64 GC-reiche-Bindesequenz enthält. Damit wurde die von Quin *et al* experimentell gezeigte SP1-Bindung an die GC-reichen Sequenzen auch theoretisch bestätigt.



**Abb. 4.24:** IGFBP-4-Promotorbereich (schwarz) und Anfang von Exon 1 (rot). Dargestellt sind die beiden von Quin *et al* postulierten GC-reichen-Bindesequenzen sowie eine Auswahl der über die Genomatix-Suchprogramme identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen und Promotor-Module. In grün und blau sind die Primersequenzen der beiden Mutationsanalyse-Fragmente PromGC und Ex1prom gekennzeichnet. Gezeigt ist auch die Lokalisierung der innerhalb des PromGC-Fragmentes identifizierten Punktmutation.

Bezüglich der Mutationsanalyse der beiden Sequenzen musste nur die weiter aufwärts liegende Bindestelle zusätzlich neu untersucht werden, da die exonnahe -72 bis -64 Sequenz bereits innerhalb der Mutationsanalyse des Exon1prom-Fragmentes überprüft wurde (siehe Abb. 4.24). Für die Mutationsanalyse der -559 bis -553 Sequenz wurde mittels neu konstruierter Primer das PromGC-Fragment amplifiziert und auf der DHPLC analysiert. Von den 25 analysierten OvCa zeigten 15 Tumore ein auffälliges DHPLC-Elutionsprofil, dass auf eine heterozygote Mutation hinwies. Ein Tumor zeigte ein Shift des Elutionspeaks, was charakteristisch für eine homozygote Mutation wäre (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25:** DHPLC-Elutiosprofile von OvCa mit heterozygoter Mutation im PromGC-Fragment (WT=Wildtyp, MT=Mutation).

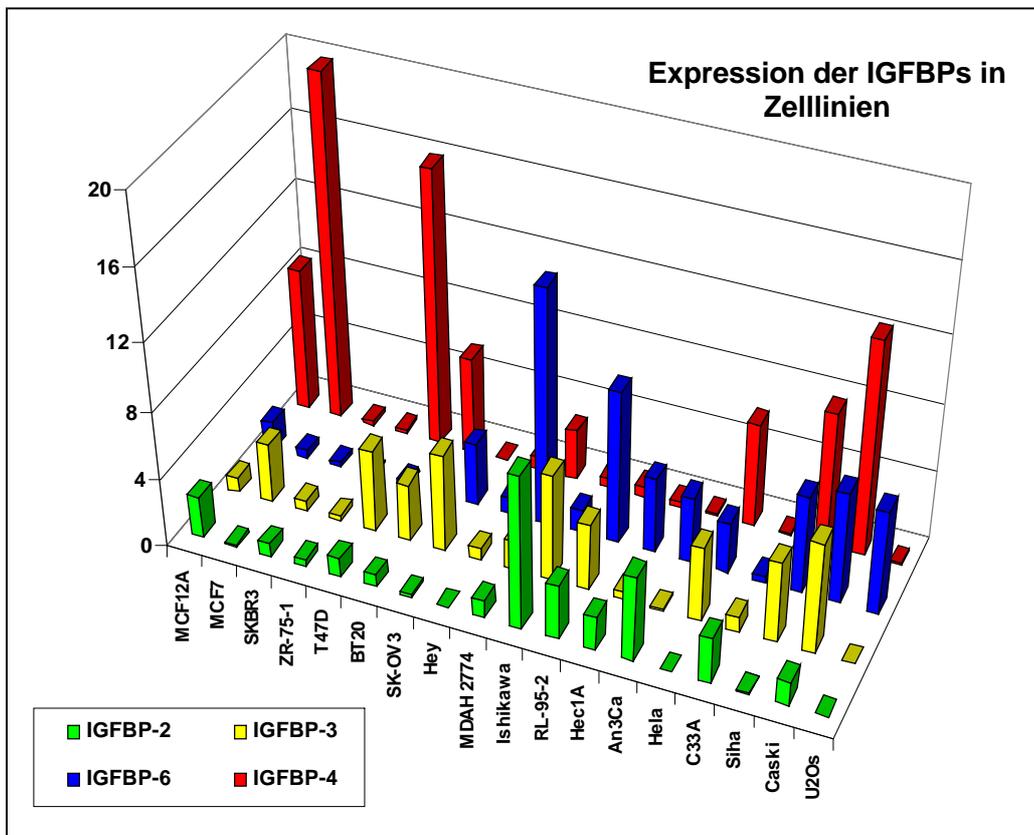
Die Sequenzierung der auffälligen Fragmente ergab in allen Fällen eine heterozygote Punktmutation C→A an Pos. -538 innerhalb einer CG-Site, die jedoch 36 bp sequenzabwärts vom GC-reichen-Fragment lokalisiert ist. In diesem Bereich hat keines der verwendeten Computer-Suchprogramme eine putative Transkriptionsfaktor-Bindestelle identifiziert. Somit stellt sich die Frage, inwieweit diese Mutation eine funktionelle Bedeutung hinsichtlich der benachbarten GC-reichen-Bindestelle hat. Eine Antwort auf diese Fragen würde eine Klonierung des mutierten und des Wildtyp-Promotorfragmentes in einen Luciferase-Expressionsvektor und ein Vergleich der Promotoraktivitäten liefern. Da die identifizierte Mutation eine GC-site betrifft, könnte sie auch eine mögliche Methylierung an dieser Stelle verhindern und so die IGFBP-4-Expression beeinflussen. Somit wäre hier auch eine detaillierte Methylierungsanalyse dieser Region notwendig.

#### 4.7 Zusammenhang der IGFBP-4-Expression mit der Expression anderer IGFbps

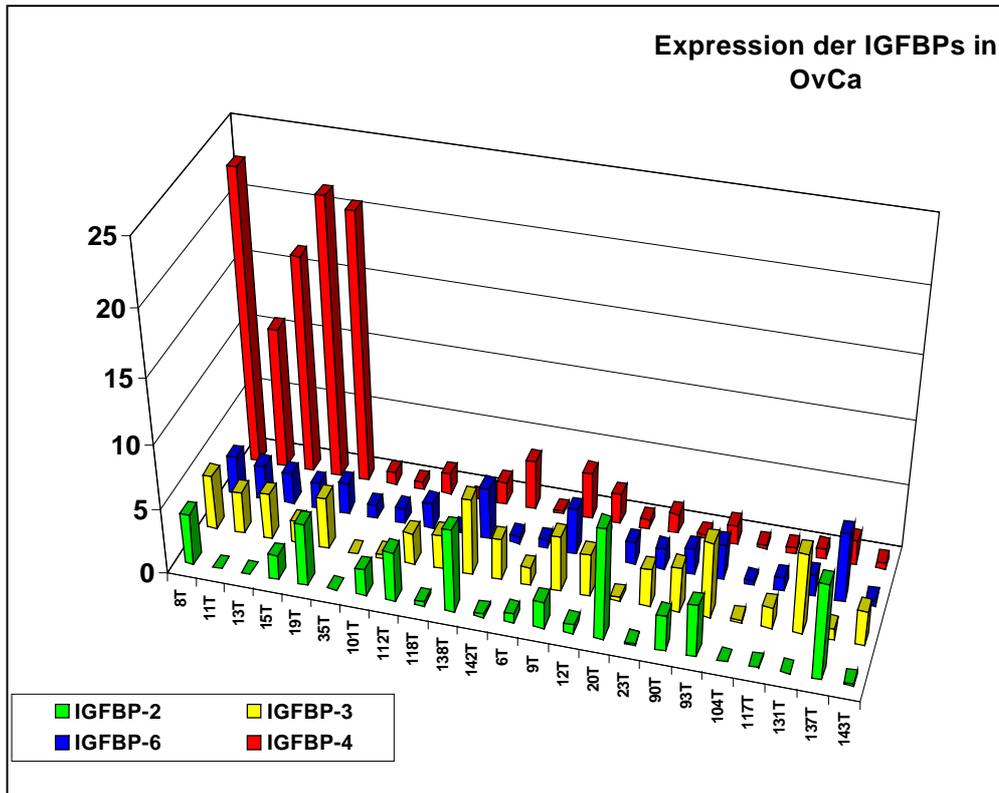
Studien zur IGFBP-4-Funktion in anderen Tumorentitäten haben gezeigt, dass das Insulin-growth factor Bindeprotein im engen Zusammenhang mit den anderen IGFbps steht. Die in funktionellen Assays beobachteten Effekte waren oft nicht nur alleine auf die Wirkung des IGFBP-4 zurückzuführen sondern ergaben sich aus einem komplexen Zusammenspiel mehrerer IGFbps. Es ist bekannt, dass einzelne IGFbps sowohl synergistisch, häufiger aber antagonistisch wirken und dass sie sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen. Eine wichtige Rolle als Regulator spielt hier das IGF-I, welches abhängig vom IGFBP sehr unterschiedlich die Modulation der Bindeproteine beeinflusst. Es verringert z.B. den IGFBP-4-Level durch Aktivierung einer spez. Protease und erhöht gleichzeitig den IGFBP-5-Level durch Genexpression-Stimulation (Firth und Baxter, 2002). Im zellulären Kontext kann somit das IGFBP-4 als

nur einer von vielen Wirkungspartnern des komplexen IGF-Systems betrachtet werden. In Prostata-Karzinomen z.B. wurde der Zusammenhang von IGFBP-4 mit den Bindeproteinen IGFBP-2, -3 und -6 beschrieben (Drivdahl *et al*, 2001). Um sich einen Überblick über die Zusammenhänge der IGFBP-4-Expression mit der Expression dieser drei IGFBPs besonders im Hinblick auf das Ovarialkarzinom zu verschaffen, wurde eine Expressionsanalyse von IGFBP-2, -3 und -6 mittels quantitativer RT-PCR in humanen Tumor-Zelllinien und in OvCa durchgeführt.

Sowohl in den Zelllinien wie auch in den OvCa waren auf den ersten Blick keine deutlichen Zusammenhänge zwischen der IGFBP-4-Expression und der Expression der anderen drei IGFBPs zu erkennen (Abb. 4.26 und 4.27). IGFBP-2 zeigte eine sehr niedrige Expression (außer MDAH 2774) in OvCa-Zelllinien, eine sehr heterogene Expression in Endometrium-Karzinom-Zelllinien und eine mittlere bis niedrige Expression in MaCa-Zelllinien. IGFBP-3 wies in allen Zelllinien eine sehr heterogene Expression, wobei in der Mehrheit der Zelllinien IGFBP-3-Expression direkt mit dem IGFBP-4-Level korrelierte. IGFBP-6 war verglichen mit OvCa- und Endometrium-Ca-Zelllinien in MaCa-Zelllinien eher niedrig exprimiert. In MaCa- und OvCa-Zelllinien zeichnete sich ein eher reziproker Zusammenhang zwischen IGFBP-4 und -6 Expression ab. Die genaue statistische Analyse der Ergebnisse (Spearman-Korrelation) zeigte, dass nur die IGFBP-3-Expression mit dem IGFBP-4-Expressionslevel signifikant korreliert (siehe Tabelle 4.2). Bei den untersuchten OvCa ergab die statistische Analyse der Expressionswerte einen schwachen direkten Zusammenhang zwischen den Expressionslevels von IGFBP-4 und IGFBP-3 sowie einen stärkeren Zusammenhang mit der IGFBP-6-Expression.



**Abb.4.26:** Vergleich der relativen Expressionshöhen von IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 und IGFBP-6 in mittels quantitativer RT-PCR untersuchten humanen Tumor-Zelllinien.

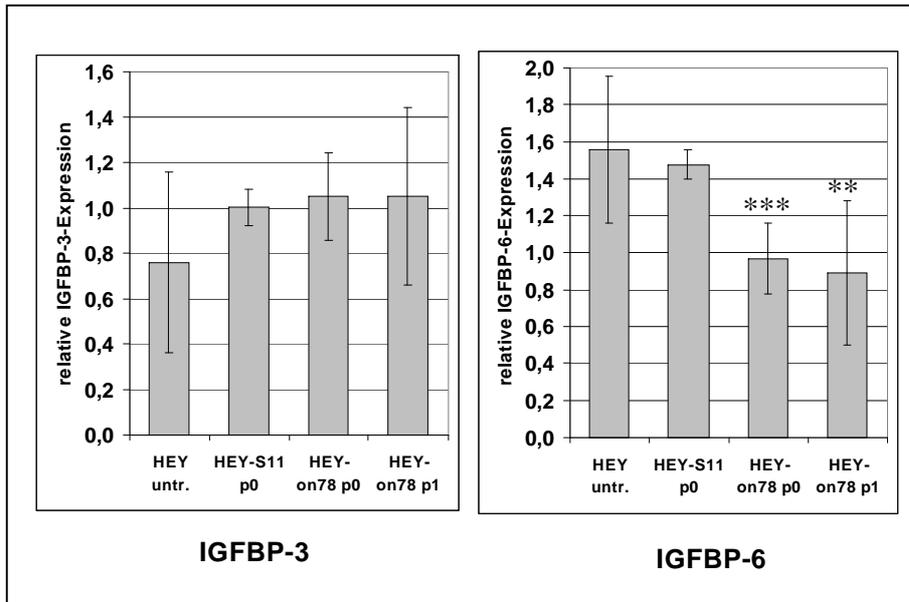


**Abb.4.27:** Vergleich der relativen Expressionshöhen von IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 und IGFBP-6 in mittels quantitativer RT-PCR untersuchten OvCa.

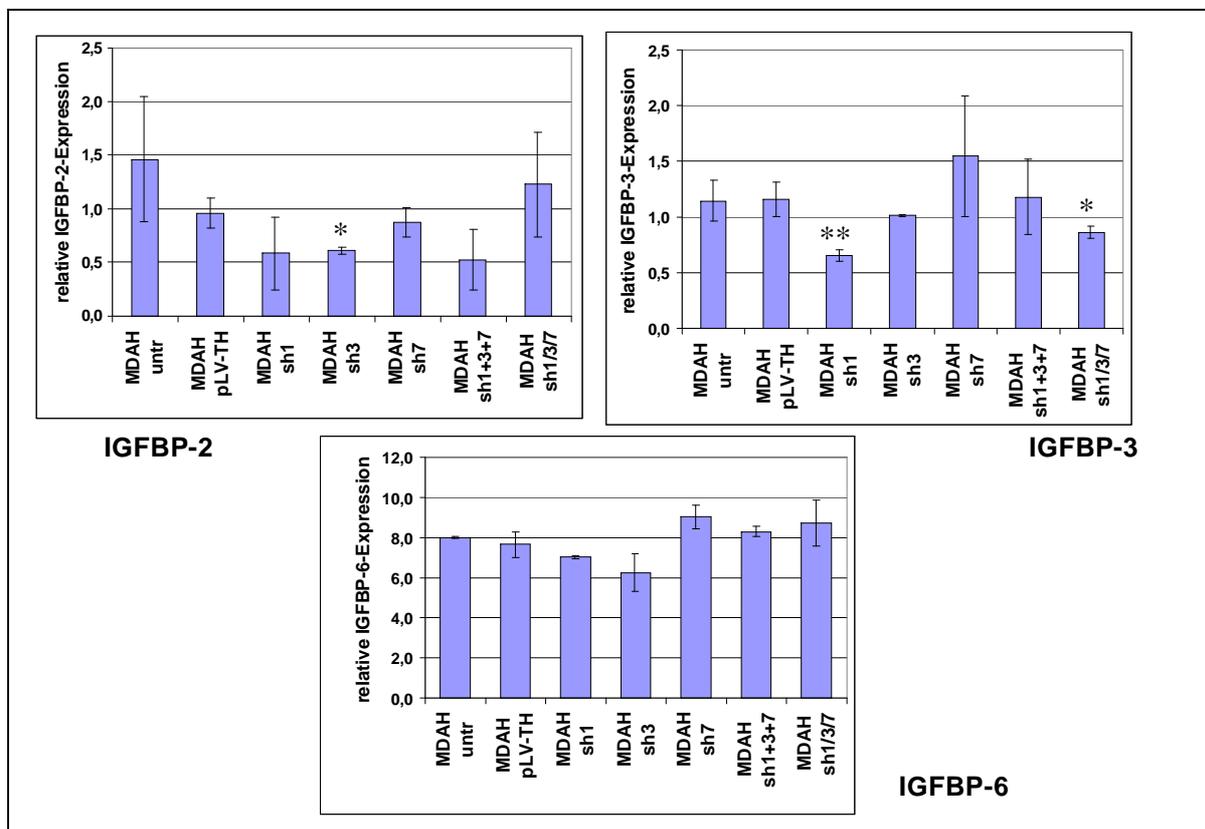
**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der statistischen Analyse der Expressionswerte der IGFBPs in Tumor-Zelllinien und OvCa. Berechnet wurde der Korrelationskoeffizient  $r$  sowie der P-Wert nach Spearman. Die Korrelation gilt als signifikant, wenn  $p < 0,05$  war.

	Korrelation zwischen IGFBP-4-Expression und...	Korrelationskoeffizient $r$	P-Wert	Korrelation	Signifikanz der Korrelation
Zelllinien	IGFBP-2	-0,1322	0,6001	nein	ns
	IGFBP-3	0,4946	0,0369	schwach	signifikant
	IGFBP-6	0,0279	0,9126	nein	ns
OvCa	IGFBP-2	0,1642	0,4541	nein	ns
	IGFBP-3	0,4289	0,0412	schwach	signifikant
	IGFBP-6	0,6494	0,0008	mittel	extrem signifikant

Zur weiteren Klärung dieser Zusammenhänge wurde die Expression der drei IGFBPs in den HEY-IGFBP-4-Transfektanten und in den MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten untersucht. Die IGFBP-2-Expression in den HEY-Transfektanten lag unter der Nachweisgrenze. Im Fall von IGFBP-3 hatte eine IGFBP-4-Überexpression in HEY-Zellen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression (siehe Abb. 4.28). Bei IGFBP-6 konnte ein signifikanter reziproker Zusammenhang mit der IGFBP-4-Expression festgestellt werden – im Gegensatz zu den Ovarialkarzinomen, wo ein direkter Zusammenhang detektiert werden konnte. Die IGFBP-4-Überexpression in den Transfektanten führte zu einem Expressionsrückgang von IGFBP-6 um fast 50% (Abb. 4.28). Der erwartete umgekehrte Effekt bei den MDAH-IGFBP-4-siRNA-Zellen war jedoch nicht mehr so deutlich (Abb. 4.29). Die Zellen mit der shRNA sh7, die das stärkste IGFBP4-Silencing bewirkte, zeigten auch die stärkste IGFBP-6-Expression, jedoch war hier dieser Expressionsunterschied im Vergleich zu untransfizierten und Leervektorzellen laut statistischer Analyse (studentischer t-Test) nicht signifikant.



**Abb.4.28:** relative Expression von IGFBP-3 und IGFBP-6 in HEY-IGFBP-4-Transfektanten (\*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ; relativ zu HEY-S11 p0)



**Abb.4.29:** relative Expression von IGFBP-2, IGFBP-3 und IGFBP-6 in MDAH-siIGFBP-4-siRNA-Transfektanten (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ )

Das IGFBP-4-Silencing mittels siRNA in MDAH-Zellen führte auf den ersten Blick zu einer Reduktion der IGFBP-2-Expression (siehe Abb.4.28). Die beobachteten Expressionsunterschiede waren jedoch mit Ausnahme von MDAH-sh3 nicht signifikant. Im Fall der mit sh3-siRNA transfizierter MDAH-2774-Zellen kann der IGFBP-2-Expressionsrückgang höchstwahrscheinlich als unspezifische-siRNA-Wirkung erklärt werden. Aufgrund der hohen Homologien der IGFBPs könnte die sh3-siRNA zufällig auch an die IGFBP-2-mRNA binden. Solche nicht 100% homologe Bindung könnte für eine zumindest teilweise Stilllegung

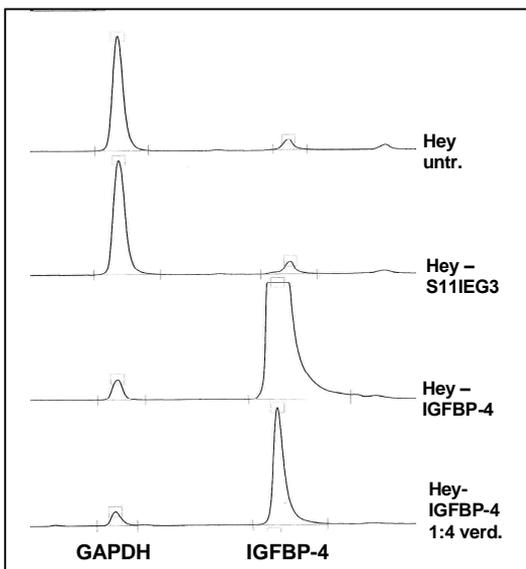
des IGFBP-2-Gens reichen. Ein weiterer Hinweis für unspezifische Effekte ist die fehlende Korrelation zwischen IGFBP-4- und IGFBP-2-Expression. Unspezifische shRNA-Effekte sind ebenfalls für den IGFBP-3-Expressionsrückgang in den sh1- und sh1/3/7-Transfektanten verantwortlich.

#### 4.8 Funktionelle Bedeutung von IGFBP-4

Entscheidend für die Bedeutung des Insulin-like growth factor binding protein 4 als neues Tumorsuppressorgen für das Ovarialkarzinom ist dessen nachweisbare tumorsuppressive Funktion *in vivo*. Um solche Effekte zu untersuchen wurden verschiedene funktionelle Assays im Zellkulturmodell entwickelt. Dafür wurde in geeigneten OvCa-Zelllinien das IGFBP-4 über einen viralen Vektor überexprimiert bzw. über shRNAs die IGFBP-4-Expression reduziert.

##### 4.8.1 Stabile Expression von IGFBP-4 in OvCa-Zelllinien über einen retroviralen Vektor

Der RZPD-IGFBP-4 „full-length“-Klon (ID: IMAGp958N141460) wurde in den retro-viralen Expressionsvektor S11IEG3 kloniert und in HEY- und SKOV3-Zellen stabil transfiziert. Um eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erzielen wurden die Zellen mit dem maximalen Virusüberstand von 1 ml pro Loch einer 6-well-Platte transfiziert. Die Transfektionseffizienzen wurden nach Anzucht einer genügend großen Anzahl an Transfektanten anhand der GFP-Expression mittels FACS ermittelt. Die IGFBP-4-Expression wurde dann sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR wie auch auf Proteinebene mittels Western-Blot und Immunhistochemie überprüft. Die HEY-Zellen konnten erheblich besser mit dem viralen Expressionsvektor transfiziert werden – ihre Transfektionsraten lagen hier bei 83%, wohingegen die SKOV3-Zellen nur maximal zu 28% transfiziert wurden.



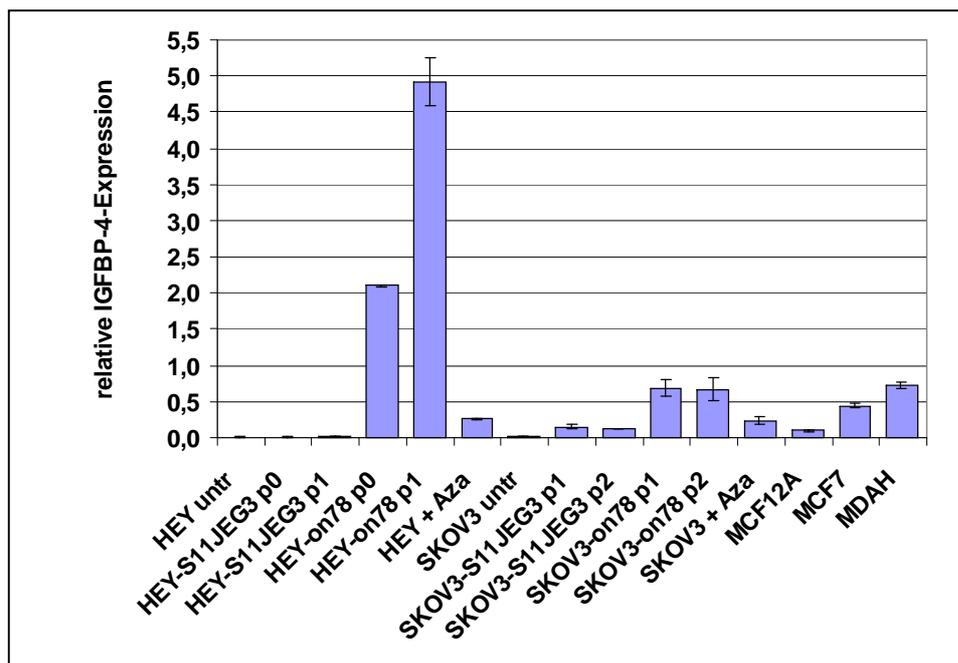
**Abb. 4.30:** A.L.F.-Elektrophoretogramm, welches die Überexpression von IGFBP-4 in HEY-Transfektanten verdeutlicht

Die IGFBP-4-Expression steigt nach der Transfektion des IGFBP-4-S11IEG3-Expressionsplasmids um fast das 100-fache an, was an der entsprechenden Zunahme der Peakfläche des IGFBP-4-Produktes im Vergleich zur Peakfläche des Referenzgens GAPDH zu erkennen ist. Die IGFBP-4-Expression in den Transfektanten ist so stark, dass das entsprechende PCR-Produkt für die A.L.F.-Analyse 1:4 verdünnt werden muss, um die gesamte Peakfläche erfassen zu können.

Nach der Transfektion des IGFBP-4-S11IEG3-Expressionsplasmids stieg die IGFBP-4-Expression stark an. Auf der mRNA-Ebene konnte eine ca. 100-fache Expressionserhöhung gegenüber der untransfizierten bzw. mit Leervektor transfizierten HEY-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.30 und 4.31). Die IGFBP-4-Expression stieg nach der ersten Passagierung noch auf das Doppelte an. Damit überstieg die Expressionshöhe des IGFBP-4 in den Transfektanten um fast das 20-fache die Expression

der 5`-aza-dC-behandelter HEY-Zellen und war selbst 7- bis 10-fach höher als in den hoch-exprimierenden Zelllinien MCF7 und MDAH2774. Somit führt die Transkription über den starken CMV-Promotor des Expressionsplasmids hier zu einer starken Überexpression des Gens.

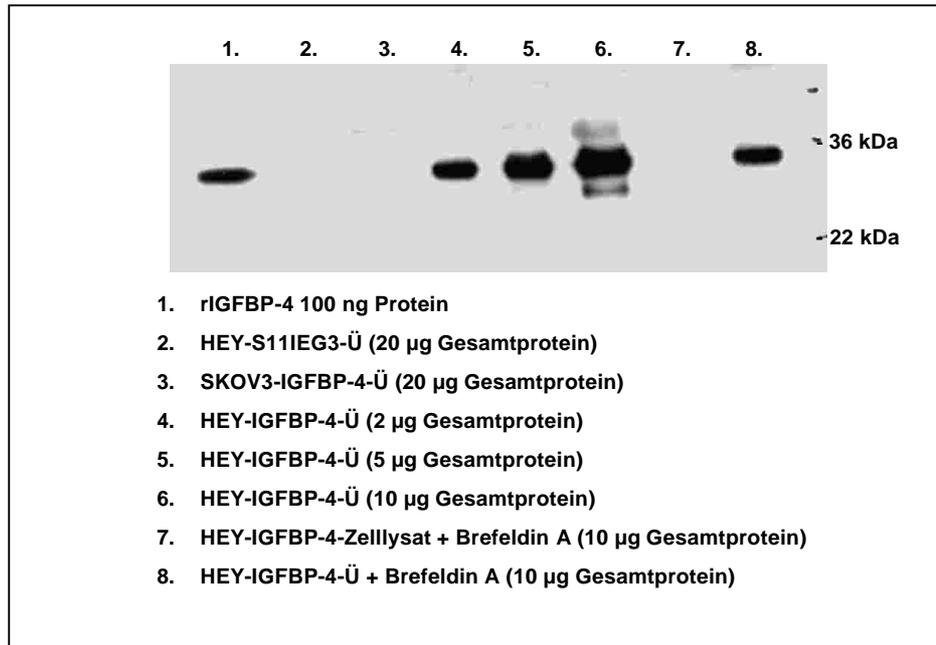
Im Vergleich dazu zeigten die SKOV3-Transfektanten eine enttäuschend geringe Zunahme der IGFBP-4-Expression, auch wenn man die im Vergleich zu HEY-Zellen deutlich niedrigeren Transfektionsraten berücksichtigt. Die Expression erreichte hier nur maximal das 5-fache des Expressionslevels der untransfizierten bzw. der mit Leervektor transfizierten SKOV3-Zellen und das 3-fache des Expressionslevels der 5`-aza-dC-behandelter SKOV3-Zellen. Die maximale IGFBP-4-Expression der Transfektanten entsprach in etwa der Expression in den MDAH-2774-Zelllinie.



**Abb. 4.31:** relative IGFBP-4-Expression der HEY- und SKOV3-IGFBP-4-Transfektanten im Vergleich zu 5`-aza-dC-behandelten HEY-Zellen und hochexpressierenden Zelllinien.  
(untr=untransfiziert, -S11JEG3=Leervektor, -on78=IGFBP-4-Expressionsvektor, p0=Zellen direkt nach der Transfektion, p1, p2=Zellen nach einer bzw. zwei Passagierungen nach der Transfektion, Aza=5`-aza-dC)

Auf der Proteinebene war IGFBP-4 auch bei der starken Überexpression in HEY-Transfektanten nur im Zellkultur-Überstand, jedoch nicht im Zelllysat nachweisbar (Abb. 4.32). Das ist dadurch erklärbar, dass IGFBP-4 als Protein normalerweise sezerniert und dass deshalb nur ein sehr geringere Anteil des Proteins sich im Cytoplasma befindet. Dafür war das Protein in großen Mengen im Zellüberstand vorhanden (zur Abschätzung der IGFBP-4-Proteinmenge im Zellüberstand siehe Punkt 4.8.7). Bereits 2 µl des aufkonzentrierten Zellkultur-Überstandes (entspricht ca. 1: 200 des Gesamtvolumens) reichten aus, um im Western-Blot das IGFBP-4 als Proteinbande von starker Signalintensität zu detektieren (Siehe Spur 4 in Abb. 4.32). Durch Brefeldin A-Behandlung (1µg/ml für 22h) der HEY-Transfektanten wurde versucht, die Protein-Sekretion über den Golgi-Apparat in den Zellen zu unterbinden und das IGFBP-4-Protein so im Cytoplasma zu akkumulieren. Brefeldin A ist ein Antibiotikum, das spezifisch über die Inhibition der Bildung von Transport-Vesikeln die Protein-Sekretion über den Golgi-Apparat blockiert (Sciaky *et al*, 1997). Die densitrometrische Auswertung der Spuren 6 und 8 in Abb. 4.32 (Zellüberstand

von HEY-Zellen vor und nach Brefeldin-Behandlung) ergab, dass nach der Brefeldin A-Behandlung die Menge des sezernierten IGFBP-4-Proteins um ca. 50%-60% abnahm. Dieser Anteil müsste im Cytoplasma verblieben sein und entsprechend auch im Zelllysate im Westernblot detektierbar sein was jedoch aus unerklärlichen Gründen nicht der Fall ist.



**Abb. 4.32:** Western-Blot der HEY- und SKOV3-IGFBP-4-Transfektanten.

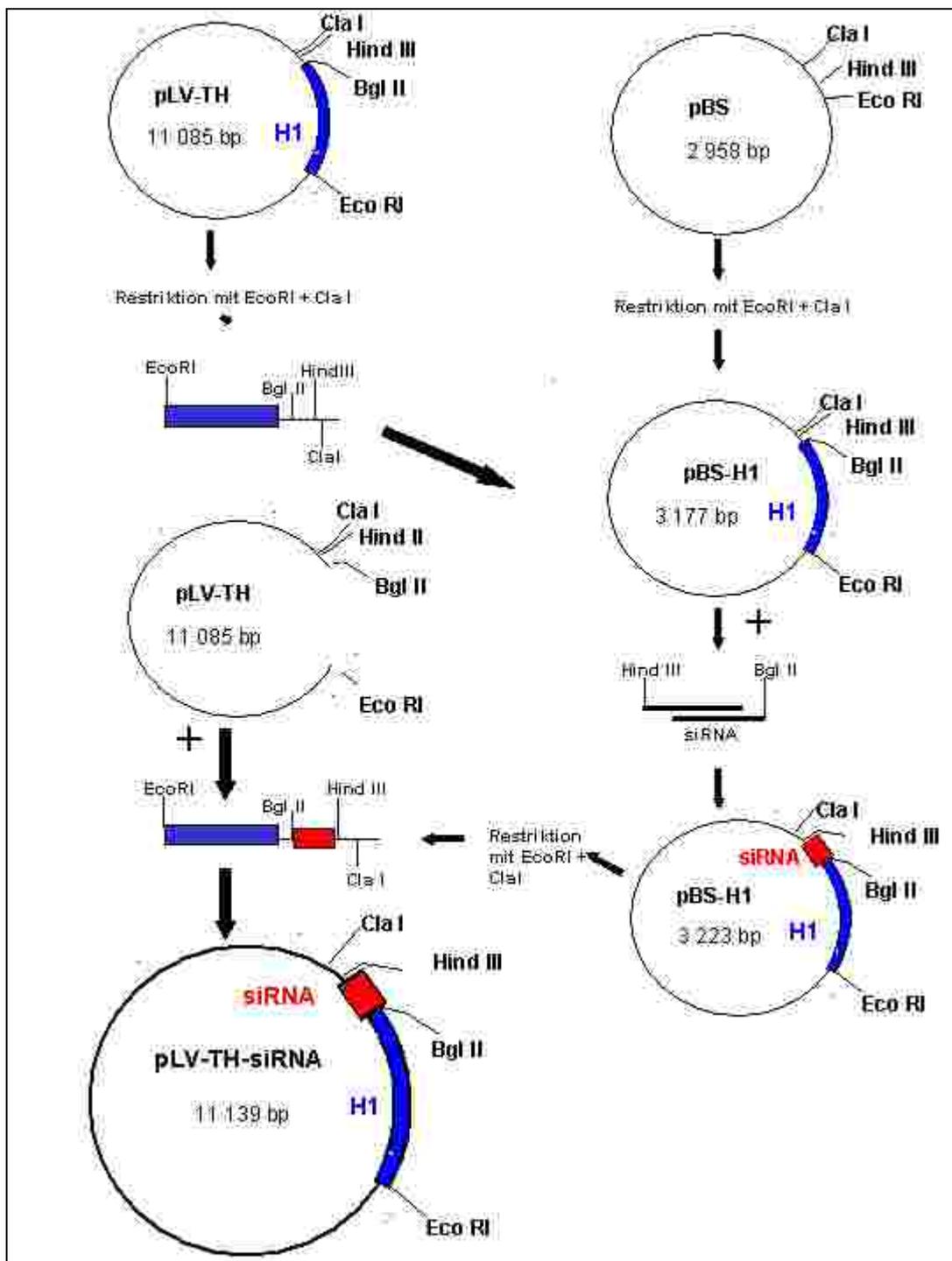
Das IGFBP-4-Protein ist nur im Zellüberstand von HEY-Transfektanten nachweisbar. Die Behandlung der HEY-Transfektanten mit Brefeldin A, welches den Golgi-Apparat blockiert, führt zu keiner nachweisbaren Akkumulation des IGFBP-4-Proteins im Cytoplasma (rIGFBP-4=rekombinantes IGFBP-4-Protein, Ü=Zellüberstand).

#### 4.8.2 IGFBP-4-Silencing in MDAH-2774-Zellen über lentiviral transfizierte shRNAs

Die spezifische Inaktivierung des IGFBP-4-Proteins über RNA-Interferenz in geeigneten Zelllinien sollte zur weiteren funktionellen Charakterisierung beitragen. Die hier zum Gen-„Silencing“ ausgewählten Vektor-exprimierten short-hairpin RNAs (shRNAs) imitieren die natürlichen endogenen miRNAs. Die Verwendung von shRNAs anstelle von synthetischen siRNA-Duplexen bietet gegenüber synthetischen dsRNAs bzw. siRNA-Duplexen eine Reihe von Vorteilen. Zum einen gewährleistet die Verwendung eines lentiviralen Vektorsystems hohe Transfektionsraten und eine stabile siRNA-Expression. Zum anderen wird die Aktivierung der anti-viralen Interferon-Immunantwort in den Wirtszellen verhindert. Lentivirale Expressionsvektoren erlauben zudem die Transfektion von verschiedenen Zelltypen und integrieren nur in replizierende Zellen, was besonders für die Transfektion von stark proliferierenden Tumorzellen von Vorteil ist.

Für die shRNA-Konstruktion wurden mit Hilfe des Computerprogramms „siRNA Target Finder“ von Ambion drei unterschiedliche siRNA-Targetsequenzen mit den geringsten Homologien zu anderen IGFBP-4-Exons, welches als einziger Bereich keine starken Homologien zu anderen IGFBP-Proteinen und keine konservierten Domänen aufwies. Die drei shRNAs (als sh1, sh3 und sh7

bezeichnet) wurden dann in den lentiviralen Expressionsvektor pLV-TH hinter den H1-Promotor kloniert. Die einzelnen Schritte der Klonierungsstrategie sind in Abb. 4.33 schematisch dargestellt.



**Abb. 4.33:** Klonierungsstrategie für die sh-RNAs. Die Doppelstrang-shRNAs wurden einzeln erst hinter den H1-promotor in den pBS-vektor kloniert und dann H1/shRNA-Exprssionskassette in den lentiviralen pLV-TH-Vektor kloniert.

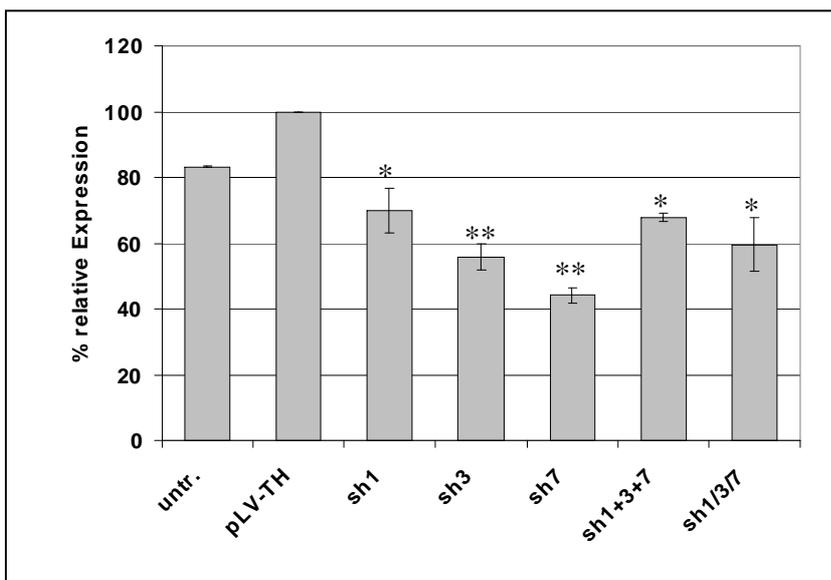
Die entsprechende Virusproduktion erfolgte in der Verpackungszelllinie 293. Für die virale Transfektion wurde die OvCa-Zelllinie MDAH-2774 ausgewählt. Um die beste RNA-Interferenz und eine höchstmögliche Transfektionsrate bei gleichzeitig möglichst niedriger Insertionshäufigkeit ins Wirtsgenom (bei zu hoher Insertionsrate steigt die Gefahr der Insertion innerhalb wichtiger Sequenzen) zu erreichen, wurden verschiedene Transfektionsansätze durchgeführt. Zum einem wurde das Volumen des

Virusüberstandes variiert, zum anderen wurden die einzelnen siRNAs in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert. Einen Überblick über die einzelnen Transfektionsansätze bietet die Tabelle 4.3:

**Tabelle 4.3:** Zusammenstellung der einzelnen Transfektionsansätze, die im Rahmen der viralen Transfektion von IGFBP-4-spezifischen shRNAs in MDAH-Zellen durchgeführt wurden (pLV-TH=Leervektor, sh1, sh3, sh7=drei verschiedene IGFBP-4-spezifische shRNAs).

transfizierte shRNA	Volumen des für die Transfektion eingesetzten Virusüberstands (maximales Volumen beträgt 1 ml = 1)			Anzahl der Ansätze
	1	1/2	1/10	
pLV-TH	1	1/2	1/10	3
sh1 (Codon 111-117)	1	1/2	1/10	3
sh3 (Codon 125-131)	1	1/2	1/10	3
sh7 (Codon 146-152)	1	1/2	1/10	3
sh1+sh3+sh7 (alle shRNAs gleichzeitig transfiziert)	1	1/2	1/10	3
sh1/sh3/sh7 (shRNAs nacheinander an 3 darauffolgenden Tagen transfiziert)	1	1/2	1/10	3
<b>Gesamtanzahl der Transfektionsansätze</b>				30

Mittels FACS wurden die Transfektionseffizienzen analog zu den IGFBP-4-Transfektanten anhand der GFP-Expression ermittelt. Die Transfektionseffizienz war abhängig von dem Volumen des zur Transfektion eingesetzten Virus-Überstandes. Das maximale Volumen sowie die Hälfte des max. Volumens lieferten ähnlich hohe Transfektionsraten zwischen 80-84%. Die Behandlung der Zellen mit nur 1/10 des Volumens ergab eine deutlich niedrige Transfektionsrate von 45-50%. Die Bestimmung der IGFBP-4-Expression erfolgte in den Ansätzen, die mit  $\frac{1}{2}$  des Virusüberstandes behandelt wurden, da diese Proben wie gewünscht eine hohe Transfektionsrate bei wahrscheinlich nicht so hohen Insertionsrate zeigten.



**Abb. 4.34:** Runterregulierung der IGFBP-4-Expression in den MDAH-siRNA-Transfektanten mittels RNA-Interferenz. Die sh7 shRNA bewirkt die stärkste Abnahme des IGFBP-4 auf mRNA-Ebene (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

Auf mRNA-Ebene zeigten die einzelnen shRNA-Ansätze eine recht unterschiedliche Effektivität (Abb. 4.34). Die sh7 shRNA bewirkte von allen drei shRNAs die stärkste Abnahme der IGFBP-4-Expression um rund 60% im Vergleich zu Leervektor-Zellen. Beachtet man die entsprechende Transfektionsrate von 80% muss der tatsächlicher Expressionrückgang in den sh7-transfizierten MDAH-2774-Zellen sogar noch höher liegen. Eine Kombination aller drei shRNAs, ob gleichzeitig oder hintereinander transfiziert, führte nicht, wie man es erwarten könnte, zu einer Potenzierung der RNA-Interferenz. Interessanterweise verursachte die Transfektion des Leervektors eine Zunahme der IGFBP-4-Expression gegenüber untransfizierten Zellen um fast 20%.

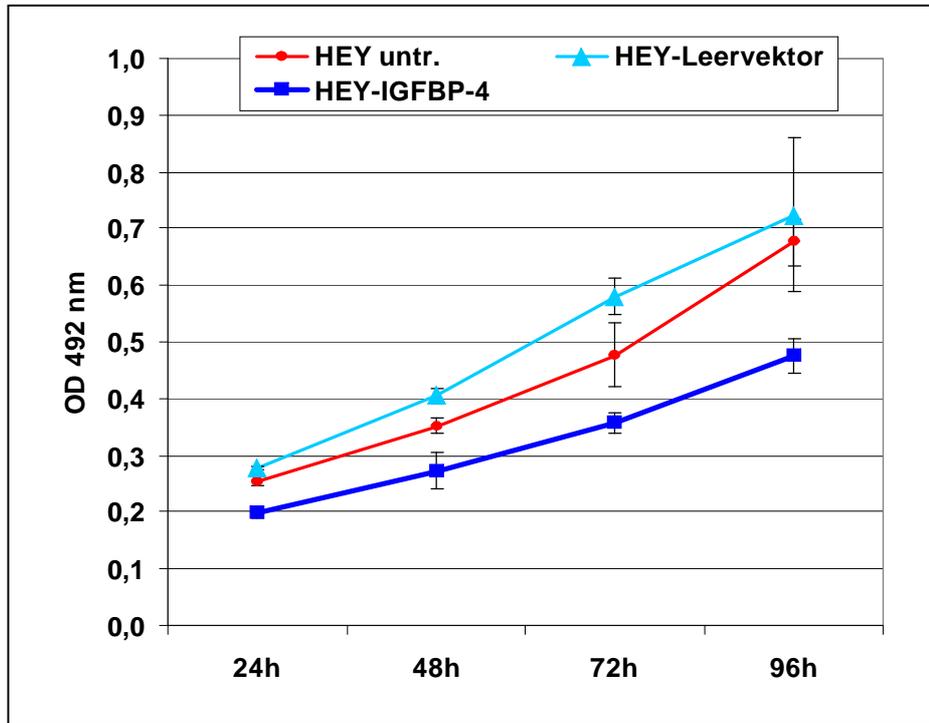
Ein entsprechender Rückgang der IGFBP-4-Expression in den MDAH-sh7-Transfektanten auf Protein-Ebene konnte nicht nachgewiesen werden, da das IGFBP-4-Protein im Zellüberstand im Westernblot selbst bei nicht transfizierten Zellen nicht nachweisbar war. Wahrscheinlich war die von den MDAH-Zellen sezernierte IGFBP-4-Menge zu gering, um im Western-Blot detektiert zu werden. Verständlicherweise konnte in diesem Fall eine eventuelle weitere Reduzierung des Protein-Levels nicht gezeigt werden.

#### 4.8.3 Proliferation von OvCa-Zelllinien in Abhängigkeit von der IGFBP-4-Expression

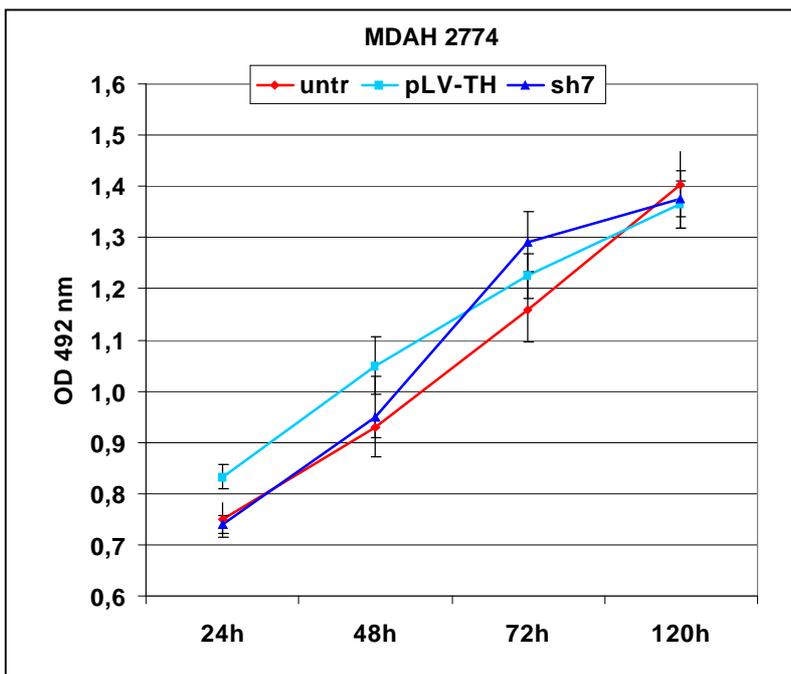
Die Hauptaufgabe des IGFBP-4-Proteins ist die Inhibition des mitogenen IGF-I. Somit dürfte es in der Zelle den größten Einfluss auf die Proliferation haben. Eine Verminderung der IGF-induzierten Zellproliferation durch IGFBP-4 wurde bereits für zahlreiche Zelltypen und verschiedene Tumore sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* nachgewiesen. Eine ähnliche Wirkung des IGFBP-4 im Ovarialkarzinom liegt deshalb nahe und würde seine Funktion als Tumorsuppressorgen bestätigen. In diesem Zusammenhang wurde die Proliferation von OvCa-Zellen in Abhängigkeit von der IGFBP-4-Expression im Proliferationsassay überprüft.

Die IGFBP-4-Expressionserhöhung in den HEY-Transfektanten führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation ( $p < 0,001$ ). Diese war bereits 24 Stunden nach Zellaussaat zu beobachten und hielt innerhalb der nächsten 3 Versuchstagen an (Abb. 4.36). Nach insgesamt 96h zeigten die HEY-Transfektanten im Vergleich zu den untransfizierten und den Leervektor-transfizierten Zellen eine um ca. 35% verminderte Zellproliferation. Die mit dem Leervektor transfizierten HEY-Zellen wiesen eine etwas stärkere Zellproliferation als die untransfizierten Zellen auf, was ein allgemein bei viralen Transfektionen zu beobachtetes Phänomen ist.

Eine Reduktion der IGFBP-4-Expression durch siRNA in MDAH-Zellen müsste erwartungsgemäß zu einem umgekehrten Effekt führen, d.h. zu einer verstärkten Zellproliferation. Die mit der sh7-shRNA transfizierten MDAH-Zellen zeigten jedoch kein wesentlich verändertes Proliferationsverhalten (Abb.4.37). Die von der sh7-shRNA bewirkte Runterregulierung der IGFBP-4-mRNA um 60% könnte demnach für die Ausbildung eines veränderten Phänotyps nicht ausreichen.



**Abb. 4.36:** Abnahme der relativen Zellproliferation in den HEY-IGFBP-4-Transfektanten im Vergleich zu untransfizierten und mit Leervektor transfizierten HEY-Zellen.

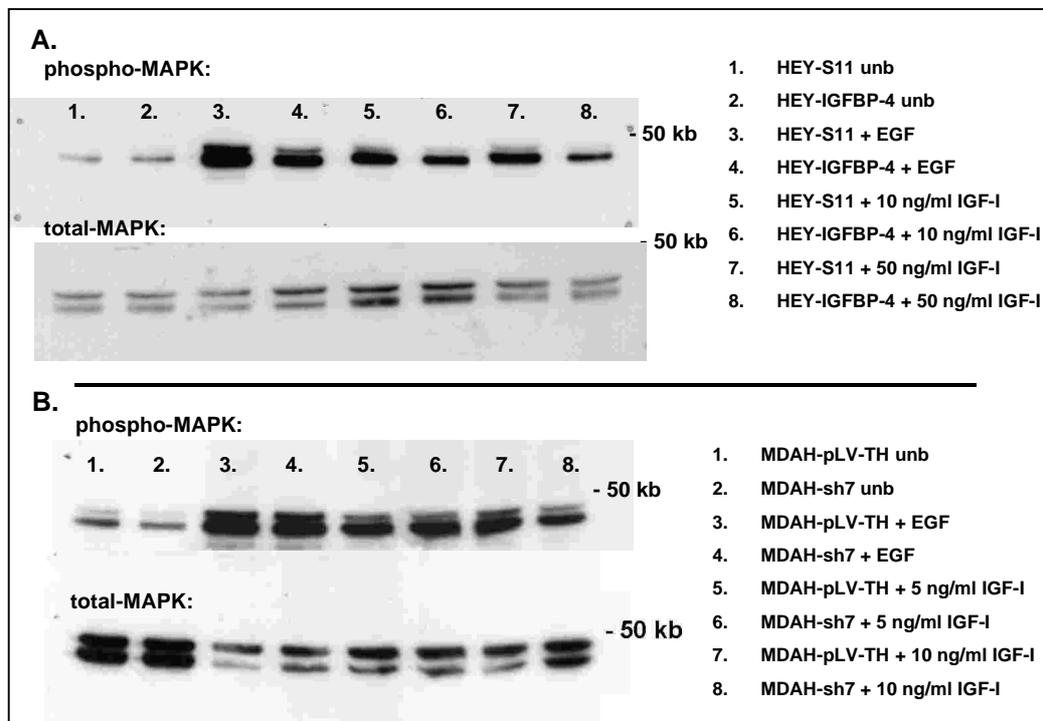


**Abb. 4.37:** relative Zellproliferation in den MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten (untr=untransfiziert, pLV-TH=Leervektor, sh7=mit der sh7-shRNA transfizierte Zellen).

#### 4.8.4 Einfluss von IGFBP-4 auf den MAPK-Signalweg

Die folgenden Western-Blot-Experimente sollten nun klären, über welchen Signalweg die gezeigte anti-proliferative Wirkung des IGFBP-4 vermittelt wird. Die Wachstumshemmung von Zellen in Gegenwart von IGFBP-4 ist höchstwahrscheinlich die Folge eines Abfangens des mitogenen IGF-I durch das Bindeprotein. IGF-I aktiviert über seine Bindung an den IGF-I-Rezeptor unterschiedlichste Signalwege, darunter v. a. den Ras/MAPK-Signalweg und den Phosphoinositol-3-Kinase-Signalweg. Da die Regulation des zellulären Wachstums und der Mitogenese hauptsächlich über den MAPK-Signalweg

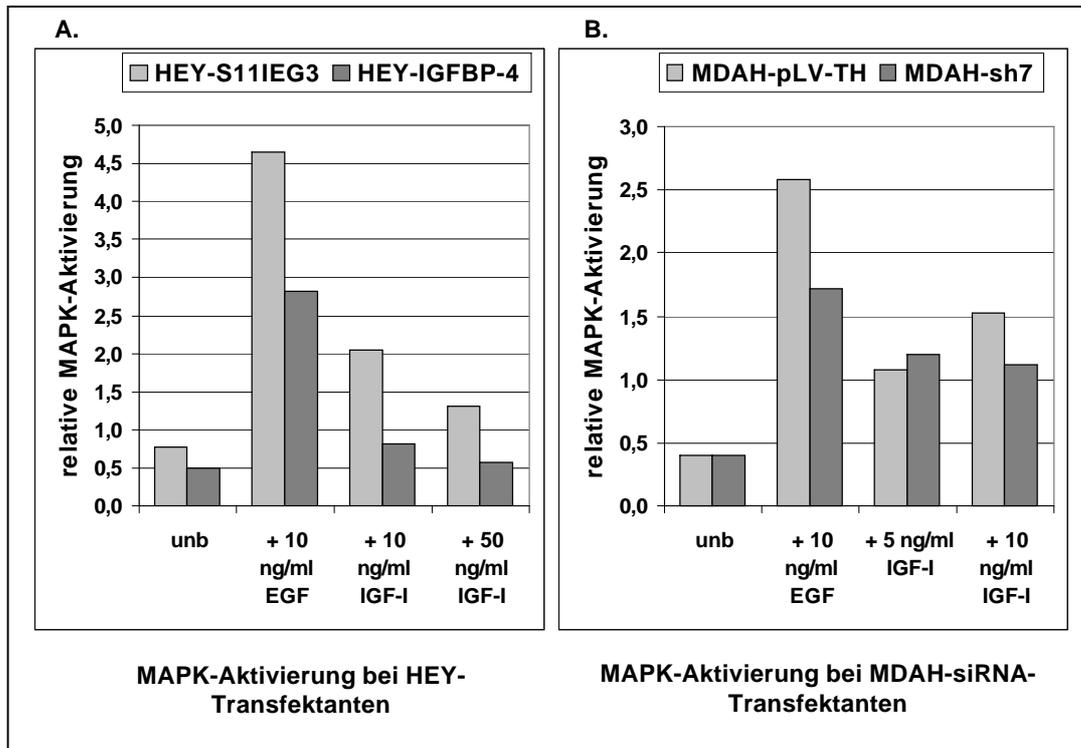
abläuft, wird die antiproliferative IGFBP-4-Wirkung am ehesten die Signalmoleküle dieses Signalweges beeinflussen. Um das zu belegen, wurde die Aktivierung von Erk-1 und Erk-2, zwei Mitgliedern der MAP-Kinase-Familie in IGFBP-4-Transfektanten nach IGF-I-Stimulation im Western-Blot untersucht.



**Abb. 4.38:** Aktivierung der Erk-1/Erk-2-Map-Kinasen in den IGFBP-4-Hey-Transfektanten (A) und MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten (B) nach Stimulation mit IGF-I.

(HEY-S11=mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen, HEY-IGFBP-4=mit IGFBP-4 transfizierte Zellen, MDAH-pLV-TH=mit Leervektor transfizierte MDAH-Zellen, MDAH-sh7= mit der sh7-shRNA transfizierte MDAH-Zellen)

Die IGFBP-4-Überexpression in den Transfektanten führte zu einer geringeren Erk-1/Erk-2-Aktivierung nach IGF-I-Stimulation (Abb.4.38 A und 4.39). Behandlung der HEY-Zellen mit IGF-I für 15 min reichte aus, um eine MAPK-Aktivierung hervorzurufen, die vergleichbar war mit der Stimulation durch den sehr potenten EGF (Epidermal Growth Factor). Diese Aktivierung war in den IGFBP-4 hoch-exprimierenden HEY-Transfektanten deutlich niedriger, auch bei höheren IGF-I-Konzentrationen. Bereits die unbehandelten HEY-Zellen wiesen eine detektierbare MAPK-Aktivierung auf, was den bislang publizierten Berichten über eine erhöhte Basalaktivität von MAPK speziell in Tumorzellen entsprechen würde. Interessanterweise konnte man selbst in diesen unbehandelten Zellen eine niedrigere Erk-1/Erk-2-Aktivierung in den IGFBP-4Transfektanten beobachten, wenn auch nicht so deutlich wie nach einer IGF-I-Stimulation. Die Aktivierung der MAPK mit EGF war in den IGFBP-4-Transfektanten ebenfalls reduziert, was aus der densitometrischen Auswertung des Western-Blots ersichtlich wird. Diese Beobachtungen würden darauf hinweisen, dass der anti-proliferative IGFBP-4-Effekt nicht nur über das Abfangen des Wachstumsfaktors IGF-I vermittelt wird, sondern dass ein hoher IGFBP-4-Level das Aktivierungspotential der zellulären MAPK herabsetzt und dass dieser Effekt durch das Abfangen des IGF-I nur noch verstärkt wird.



**Abb. 4.39:** densitometrische Auswertung des Western-Blots von Abb. 4.38.

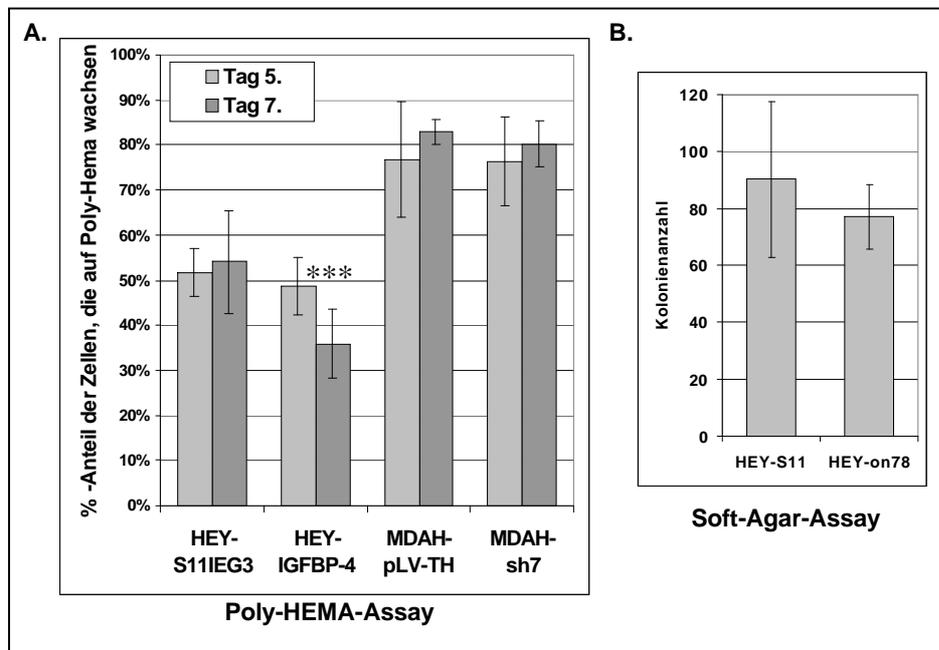
Zur Bestimmung der relativen Aktivierung der Erk-1/Erk-2-MAP-Kinasen in den IGFBP-4-Hey-Transfektanten (A) und MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten (B) nach Stimulation mit IGF-I wurden die absoluten Signalintensitäten der phospho-MAPK auf die absoluten Signalintensitäten der jeweiligen total-MAPK normiert.

Die Untersuchung der MAPK-Aktivierung in den MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Es konnte keine verstärkte Aktivierung der Proteinkinasen, bedingt durch die Abnahme der IGFBP-4-Expression in den siRNA-Transfektanten, festgestellt werden. Im Gegenteil – die Stimulation mit EGF bzw. mit 50  $\mu$ M IGF-I bewirkte sogar eine geringere MAPK-Aktivierung in den sh7-MDAH-Zellen. Da jedoch bereits im Proliferationsassay keine Unterschiede zwischen den mit Leervektor und den mit IGFBP-4-siRNA transfizierten MDAH-Zellen aufgezeigt werden konnten, waren auch keine großen Unterschiede in der Aktivierung der Signalproteine zu erwarten.

#### 4.8.5 Einfluss von IGFBP-4 auf die Zelladhäsion („Anchorage independent growth“)

Der Wachstumsfaktor IGF-I spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Modulation der Zellproliferation- und -Differenzierung, sondern fördert *in vitro* auch die tumorigenen Eigenschaften von Zellen, wie Invasivität und Kolonienbildung im semisoliden Medium. Die Fähigkeit von Zellen, verankerungsunabhängig zu wachsen („Anchorage independent growth“), ist ein wichtiger Hinweis auf ihre fortgeschrittene Transformation und ist Voraussetzung einer Tumorbildung. Embryonale Maus-Fibroblasten, die keinen IGF-I-Rezeptor exprimierten, konnten durch die meisten bekannten viralen und zellulären Onkogene nicht transformiert werden. Mit IGFBP-4 transfizierte kolorektale Tumor-Zellen zeigten eine dramatische Reduktion der Kolonienbildung im Soft-Agar-Assay. Dieser Effekt konnte auch nicht durch Zugabe von IGF-II im Überschuss aufgehoben werden und wurde selbst in IGF-II-insensitiven IGFBP-4-Transfektanten beobachtet, was auf einen IGF-unabhängigen Mechanismus hinweisen würde.

Im Hinblick dieser publizierter Daten wurde anhand des sog. Poly-HEMA-Assays überprüft, ob das IGFBP-4 auch in Ovarial-Karzinom-Zellen einen Einfluss auf das verankerungs-unabhängige Wachstum hat. Poly-HEMA verhindert die Anheftung der Zellen an den Boden des Zellkulturgefäßes und zwingt die Zellen zu einem Wachstum als frei schwimmende Kolonien. Je eher die Zellen dazu in der Lage sind (nicht-transformierte Zellen sterben normalerweise ohne Bodenhaftung ab), desto fortgeschrittener sind sie in ihrer Transformation.



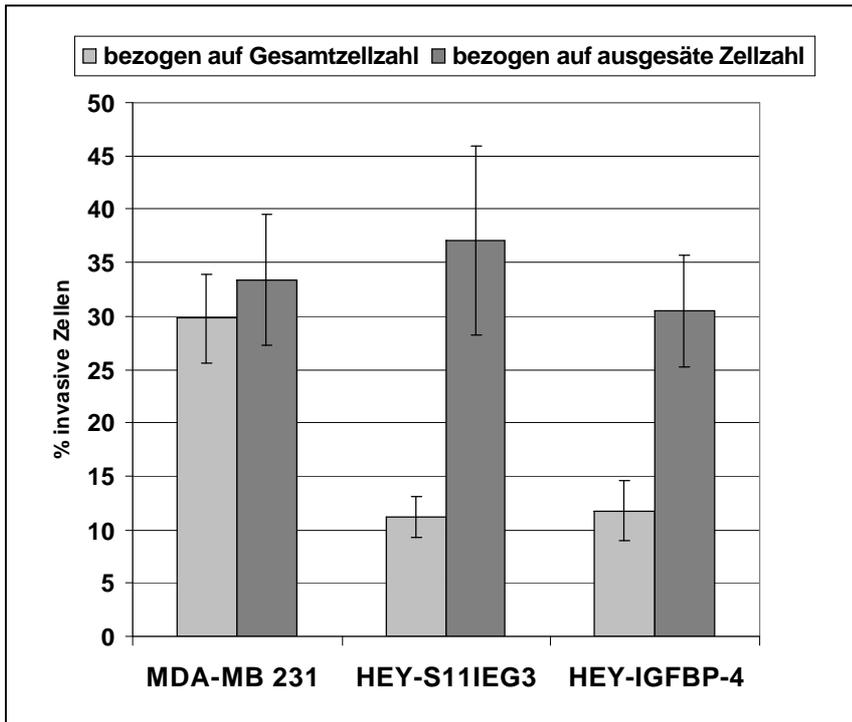
**Abb. 4.40:** Untersuchung des Verankerungs-unabhängigen Wachstums (=“anchorage independent growth“) von IGFBP-4-HEY-Transfektanten und MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten im Poly-HEMA-Assay (A) und Soft-Agar-Assay (B). [\*\*\*,  $p < 0,001$  relativ zu HEY-S11IEG3].

Im Fall der untersuchten IGFBP-4-HEY-Transfektanten war der Anteil der Zellen, die auf Poly-HEMA wachsen konnten, am 7. Versuchstag um ca. 25% niedriger im Vergleich zu Leervektor-Zellen (Abb. 4.40). Bei den MDAH-siRNA-Transfektanten konnten keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten beobachtet werden. Der Befund für die IGFBP-4-HEY-Transfektanten wurde in einem alternativen Versuchsansatz, dem sog. Soft-Agar-Assay, verifiziert. Hierbei wurden die Zellen in einem semisolidem Medium aus 0,25% Agarose kultiviert und ihre Fähigkeit zur Koloniebildung beobachtet. Die Kolonienanzahl der IGFBP-4-Transfektanten im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen nach 21 Tagen war nur etwas geringer, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p=0,0933$  relativ zu Leervektor-Zellen). Der für kolorektale Tumorzellen nachgewiesener starker IGFBP-4-Effekt auf die Koloniebildung konnte hier für Ovarial-Karzinomzellen nicht bestätigt werden.

#### 4.8.6 Einfluss von IGFBP-4 auf die Invasivität von OvCa-Zellen

Ähnlich wie die Koloniebildung ist auch die Fähigkeit zur Invasion eine wichtige tumorigene Eigenschaft sowohl *in vitro* wie auch *in vivo*. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass das IGFBP-4 über die Modulation von IGF auch die Invasivität von Zellen beeinflusst. Die Wirkung von IGFBP-4 auf die Invasionsfähigkeit von OvCa-Zellen wurde anhand der IGFBP-4-HEY-Transfektanten in einem sog.

Invasionsassay beobachtet. Hierbei durchwandern die Zellen eine die extrazelluläre Matrix simulierende Matrigelschicht. Als Positivkontrolle diente hier die MaCa-Zelllinie MDA-MB-231, dessen starke Invasivität bereits mit diesem Assay nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 4.41:** Einfluss der IGFBP-4-Überexpression in den HEY-Transfektanten auf die Zell-Invasivität. Als Positivkontrolle diente die hoch-invasive MaCa-Zelllinie MDA-MB-231.

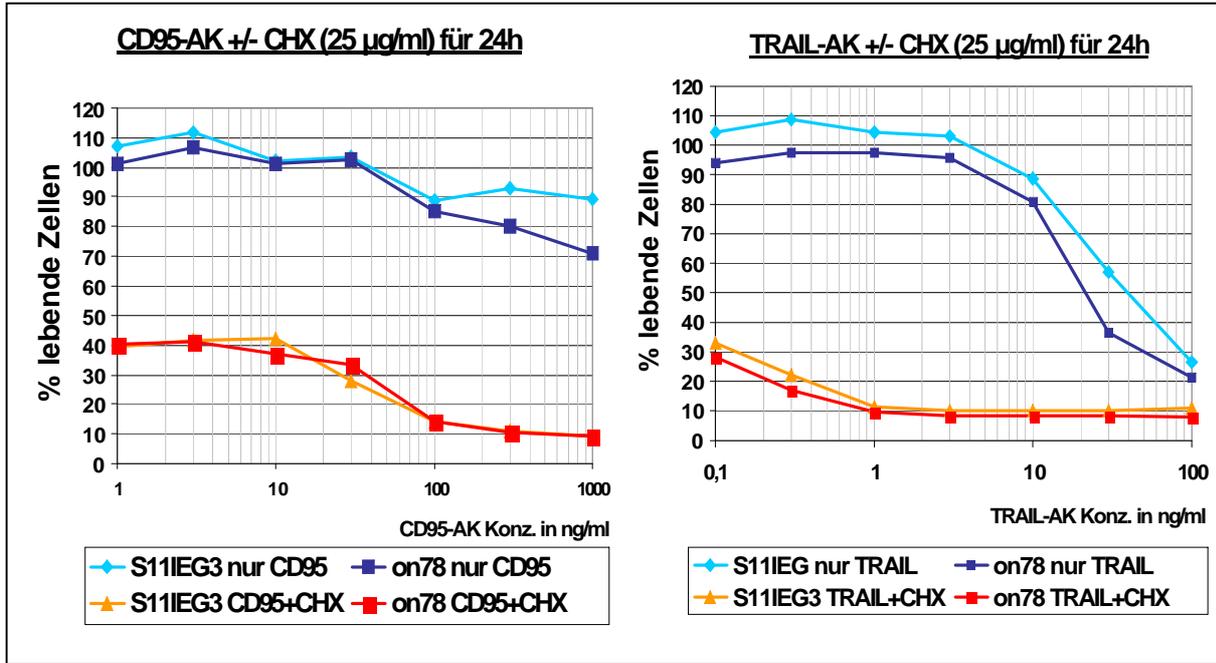
Es wurde keine Veränderung des Invasionsverhalten der HEY-Zellen nach IGFBP-4-Überexpression festgestellt. Die HEY-Zellen wiesen grundsätzlich eine viel niedrigere Invasivität als die MDA-MB-231-Zellen auf, wobei hier nur die Werte, die auf die Gesamtzellzahl bezogen sind, beachtet wurden. Die deutlich höheren prozentualen Anteile im Fall der auf die ausgesäte Zellzahl bezogenen Werte täuschen nämlich nur eine hohe Invasivität vor. Sie kommen durch die starke Proliferation der Zellen in den 48h, die zwischen Zellaussaat und Assay-Auswertung lagen, zustande so das bezogen auf die Ausgangszellzahl der Anteil der invasiven Zellen automatisch höher liegt. Ein erwarteter Rückgang der Invasivität nach IGFBP-4-Überexpression könnte in diesem Versuchsansatz möglicherweise gar nicht mehr detektiert werden. Aufgrund ihrer sehr niedrigen Ausgangs-Invasivität scheint die HEY-Zelllinie für diesen Assay nämlich nicht geeignet zu sein. Hier wäre die Transfektion von IGFBP-4 in eine Zelllinie erforderlich, die bereits ein erhöhtes Invasionspotential aufweist, wie z.B. die MDA-MB 231-Zelllinie.

#### 4.8.7 Rolle des IGFBP-4 für die Etoposid-vermittelte Apoptose in Hey-Zellen

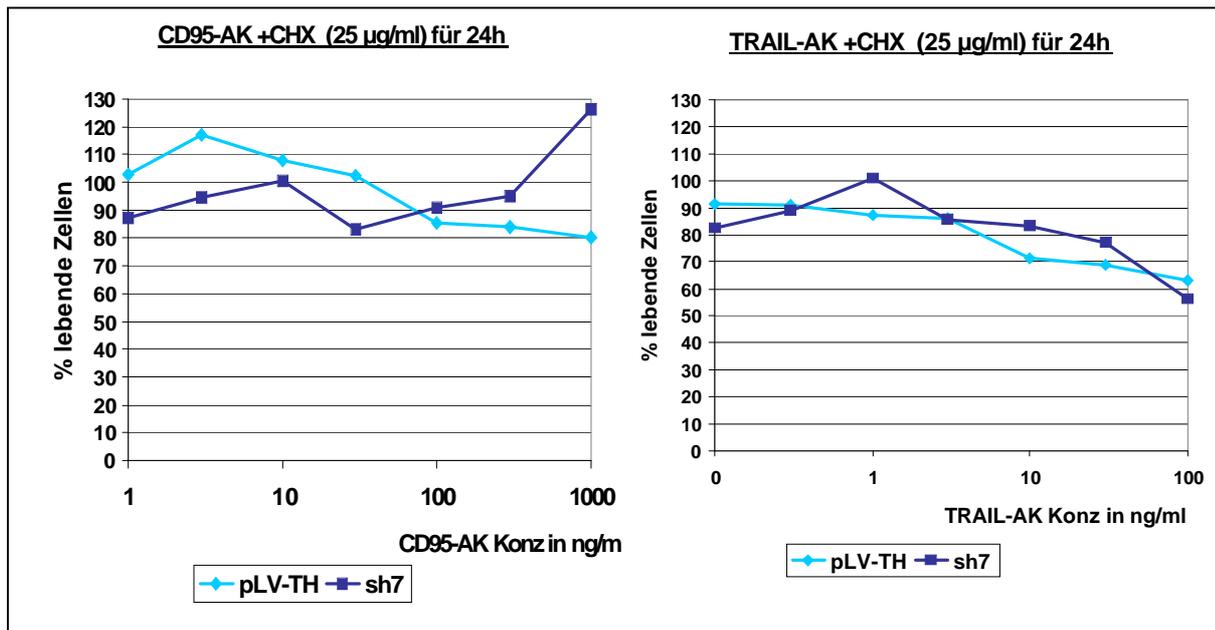
Die protektive Wirkung von IGF und des IGF-IR im Hinblick auf das Überleben von Zellen ist bereits seit mehreren Jahren bekannt. IGF-I wirkt hier über die Aktivierung von „Survival“-Signalwegen als ein potenter Gegenspieler der Apoptose. Somit liegt es nahe, dass das IGFBP-4 über die IGF-I-Modulation auch den programmierten Zelltod beeinflusst. Da einige Forscher gezeigt haben, dass die IGFBP-4-Wirkung auf die Apoptose in manchen Tumorarten sowohl IGF-abhängig wie auch IGF-unabhängig sein kann, ist es um so interessanter den Einfluss von IGFBP-4 auf die Apoptose in OvCa-Zellen zu untersuchen.

Zunächst galt es zu klären, ob das IGFBP-4 überhaupt einen Einfluss auf die Apoptose hat, und wenn ja, in welchen der beiden bekannten Hauptwege der Apoptose – den Rezeptor-vermittelten oder den mitochondrialen Weg – es involviert sein könnte. Dafür wurden mit den HEY- und den MDAH-2774-Transfektanten Vorexperimente durchgeführt. Nach Behandlung der Zellen mit jeweils unterschiedlichen Antikörpern bzw. Cytostatika wurde die Anzahl der lebenden Zellen im Kristallviolettassay bestimmt. Die verwendeten Substanzen aktivierten gezielt einen der beiden Apoptosewege. So löste die Zugabe des CD95- bzw. des TRAIL-Antikörpers den Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg.

Grundsätzlich zeigten die Vorexperimente eine sehr unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelllinien auf die verschiedenen Apoptose-auslösenden Substanzen auf. Die HEY-Zellen reagierten deutlich sensitiver auf die CD95- und TRAIL-AK als die MDAH-2774-Zellen. Bereits ab 100 ng/ml des CD-95-Antikörpers bzw. ab 1 ng des TRAIL-AK waren erste apoptotische HEY-Zellen bereits nach 4h Behandlung zu beobachten. Nach 24h waren bei 1 mg/ml CD95-AK ein Fünftel der Zellen und bei 100 ng/ml TRAIL-AK bis zu 80% der Zellen tot. Eine Ko-Inkubation mit dem Antibiotikum Cycloheximid (CHX), welches die Proteinsynthese durch die Hemmung der Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Ribosomenuntereinheit unterbindet, verstärkte erheblich die apoptotische Wirkung der beiden Antikörper in den HEY-Zellen (Abb. 4.42). Bereits die niedrigsten AK-Konzentrationen führten zu einer Apoptose von 30-40% der Zellen. Es ließ sich jedoch kein klarer Unterschied im Apoptose-Verhalten zwischen den mit Leervektor und den mit IGFBP-4 transfizierten Zellen feststellen. Die MDAH-2774-Zellen erwiesen sich im Vergleich zu den HEY-Zellen als resistent gegenüber der Rezeptor-vermittelten Apoptose (Abb. 4.43). Selbst in Gegenwart von Cycloheximid betrug der Anteil der apoptotischen Zellen bei den höchsten Antikörper-Konzentrationen maximal 20% (CD95-AK) bis 40% (TRAIL-AK). Ohne die Ko-Inkubation mit Cycloheximid reagierten die Zellen nicht auf die Antikörper. Auch hier war kein Unterschied zwischen den mit Leervektor und den mit siRNA-transfizierten Zellen zu erkennen.



**Abb. 4.42:** Prozentualer Anteil der im Kristallviolett-Assay ermittelten lebenden Zellen nach CD95-AK bzw. TRAIL-AK-induzierter Apoptose in HEY-IGFBP-4-Transfektanten (S11IEG3=mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen, on78=mit IGFBP-4 transfizierte HEY-Zellen, CHX=Cycloheximid).



**Abb. 4.43:** Prozentualer Anteil der im Kristallviolett-Assay ermittelten lebenden Zellen nach CD95-AK bzw. TRAIL-AK-induzierter Apoptose in MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten

Die Behandlung von HEY-Zellen mit den beiden Cytostatika Etoposid bzw. Staurosporin löste in beiden Fällen innerhalb von 20h eine starke Apoptose aus (Abb. 4.44), jedoch nur bei Etoposid konnte man einen deutlichen Unterschied zwischen IGFBP-4-Transfektanten und Kontrollzellen erkennen. Hier zeigten die IGFBP-4-Transfektanten eine deutlich höhere Apoptoserate, und das unabhängig von der Etoposid-Konzentration. Nach Behandlung mit 100 µg/ml Etoposid waren nach 20h mehr als doppelt so viele HEY-Transfektanten als Kontrollzellen abgestorben.

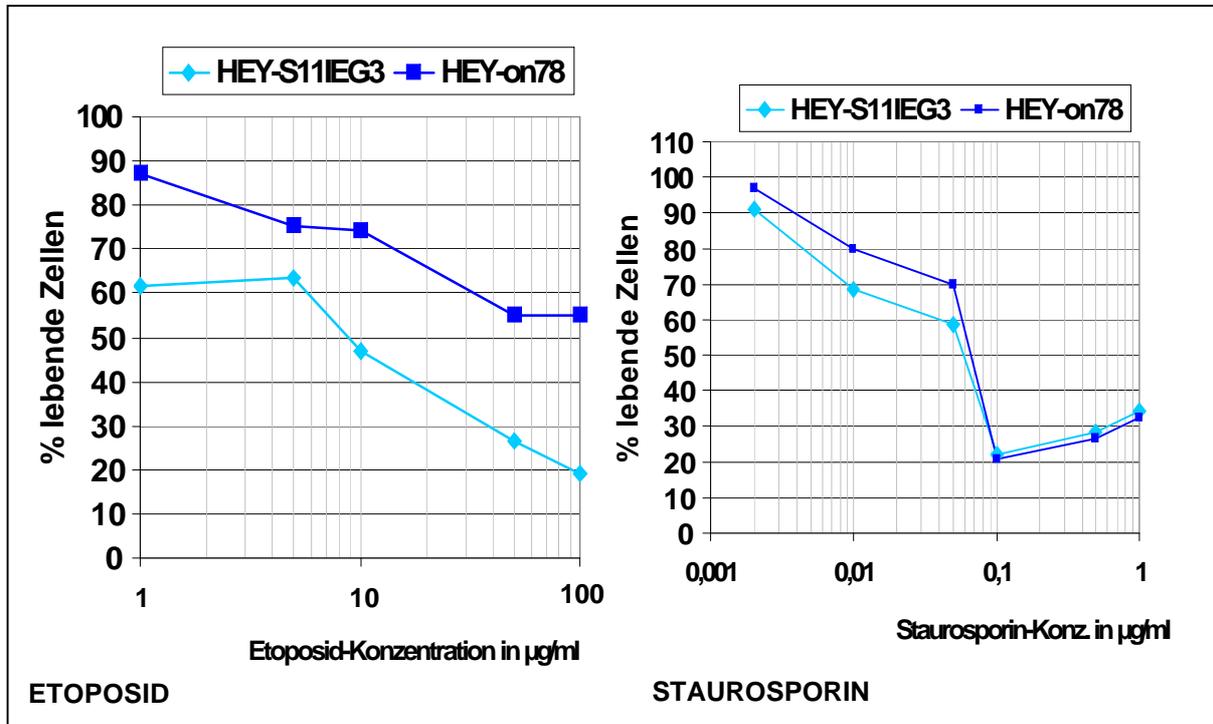


Abb. 4.44: Prozentualer Anteil der im Kristallviolett-Assay ermittelten lebenden Zellen nach Etoposid bzw. Staurosporin-induzierter Apoptose in HEY-IGFBP-4-Transfektanten

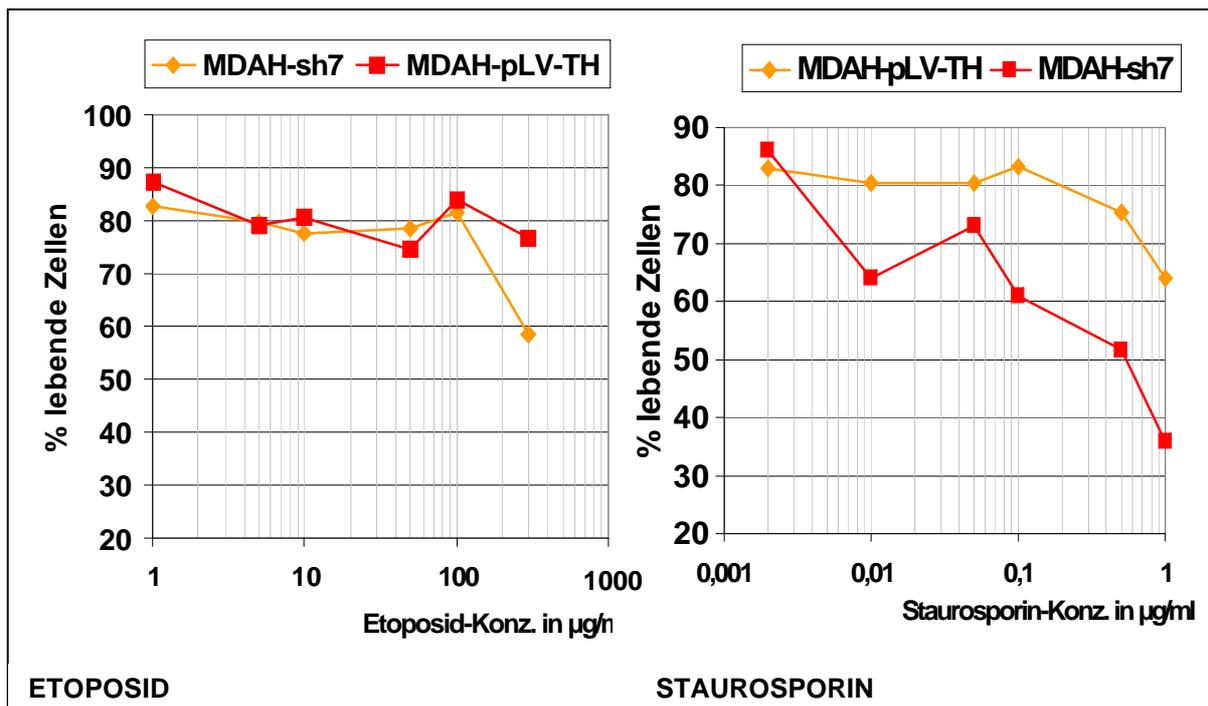
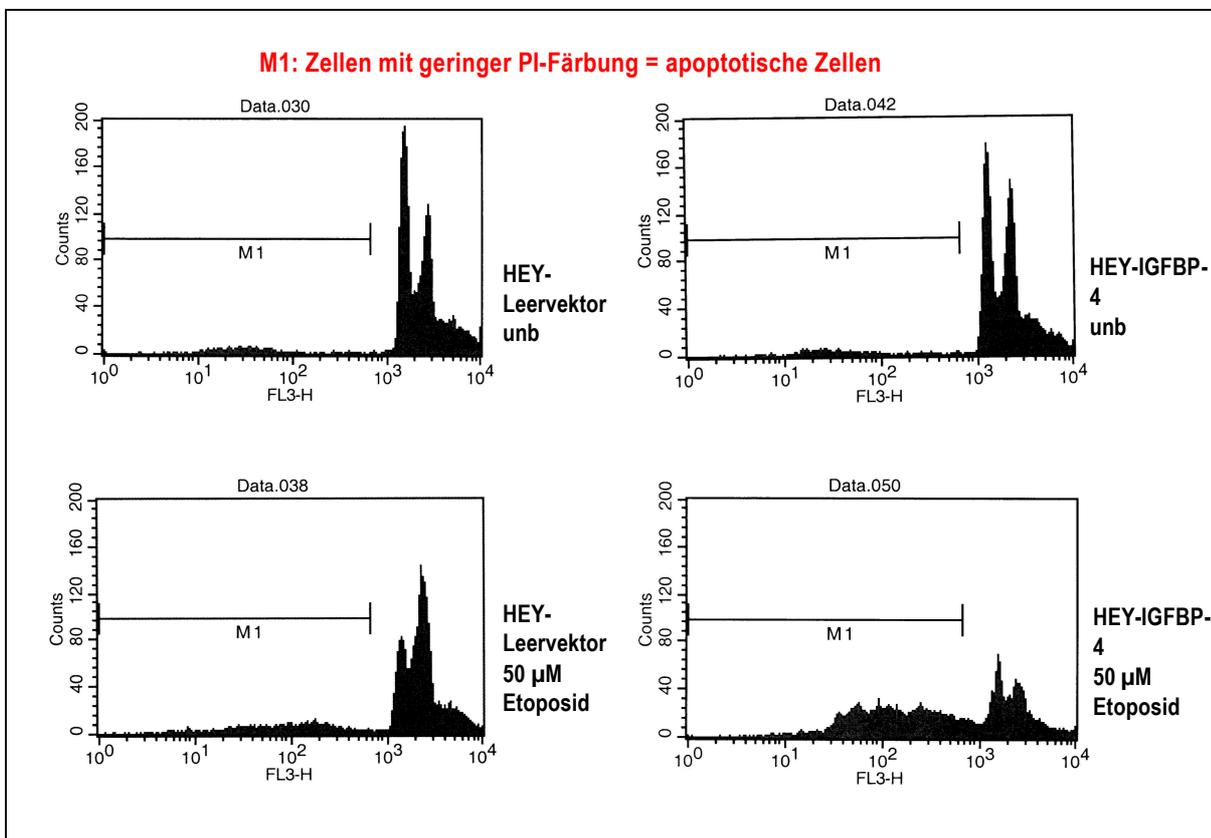


Abb. 4.45: Prozentualer Anteil der im Kristallviolett-Assay ermittelten lebenden Zellen nach Etoposid bzw. Staurosporin-induzierter Apoptose in MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten

Die MDAH-Zellen, sowohl die Kontrollzellen wie auch die siRNA-Transfektanten, reagierten nur sehr schwach auf die Etoposidbehandlung (Abb. 4.45). Lediglich bei der höchsten Etoposid-Konzentration zeigten die sh7-Transfektanten eine stärkere Apoptose, was jedoch ein „Ausreißer“ innerhalb der Messung sein könnte. Dafür führte die Behandlung mit Staurosporin zu einer deutlichen Apoptose. Entgegen den Erwartungen waren jedoch die sh7-transfizierten MDAH-Zellen sensibler als die Leervektor-transfizierten Zellen. Wie dieses Phänomen zu erklären ist, bleibt noch fraglich. Genauso

wenig ist es bekannt, inwieweit sich die durch Etoposid und Staurosporin ausgelösten mitochondrialen Apoptosewege auf molekularer Ebene unterscheiden.

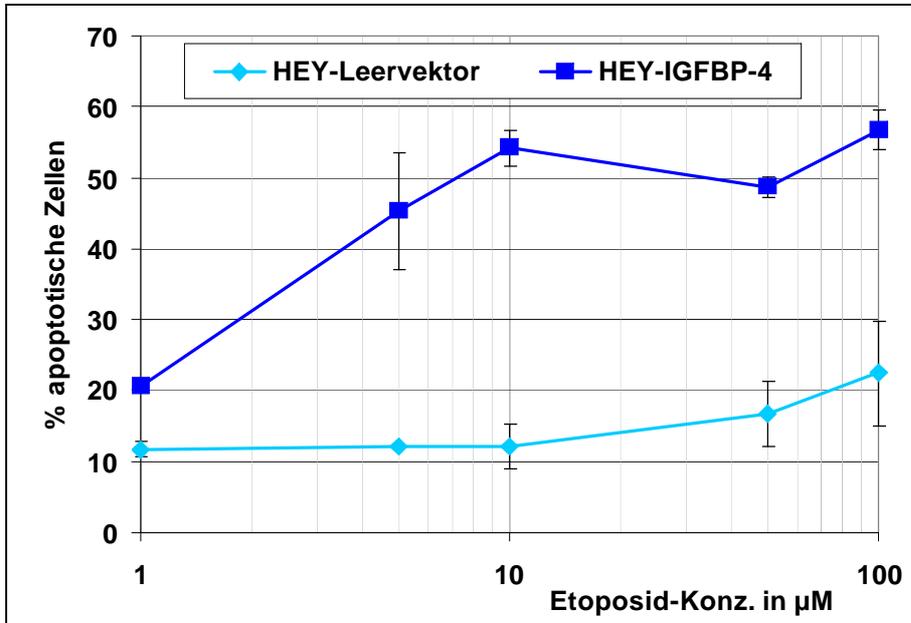
Da der in den mit Etoposid-behandelten HEY-Zellen beobachtete Effekt die erwartete höhere Apoptose-Sensitivität der IGFBP-4-Transfektanten bestätigte, wurde dieser noch genauer mittels FACS-Analyse untersucht. Die FACS-Analyse bietet eine sensitivere und besser reproduzierbare Methode zur Bestimmung apoptotischer Zellen als der Kristallviolett-Assay. Apoptotische Zellen können in einem bereits früheren Stadium detektiert werden, in dem eine DNA-Fragmentierung schon erfolgt ist, die Zellen jedoch noch nicht absterben. Außerdem kann man hier den genauen Einfluss des Etoposids auf die einzelnen Zellzyklusphasen untersuchen. Durch die vorherige Propidium-Iodid-Anfärbung können die apoptotischen Zellen anhand der Fragmentierung ihrer Kern-DNA detektiert werden. Diese erscheint im FACS-Plot als ein breiter Peak von schwacher Fluoreszenz, der sich deutlich von den beiden hochfluoreszierenden schmalen  $G_1$  und  $G_2$ -Peaks abhebt (siehe Abb. 4.46)



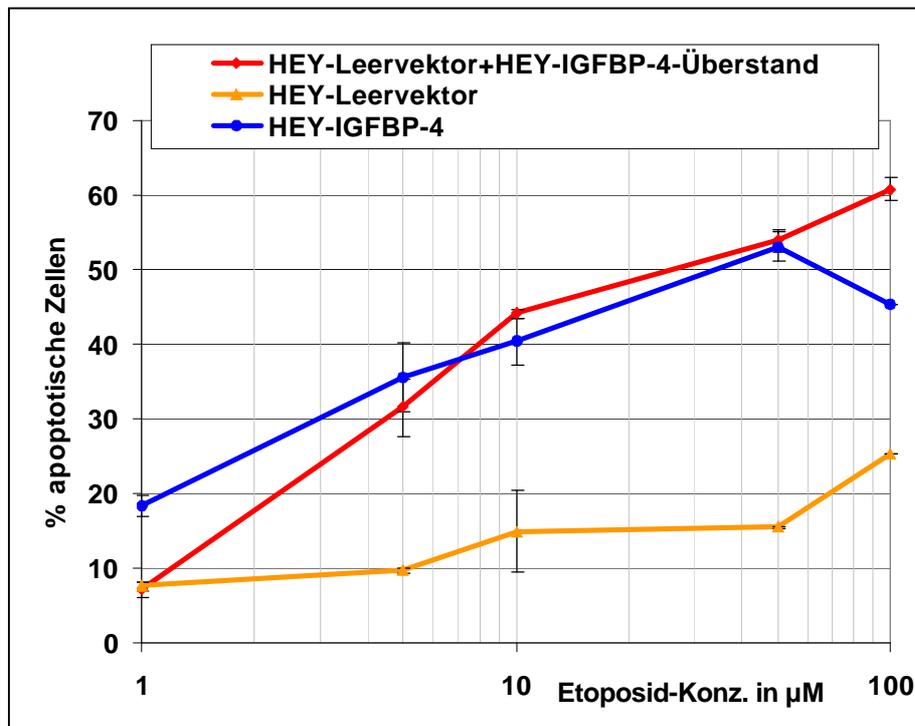
**Abb. 4.46:** FACS-Plots der HEY-IGFBP-4-Transfektanten nach Behandlung mit Etoposid.

Die IGFBP-4-Transfektanten zeigen in Gegenwart von Etoposid eine verstärkte Apoptose, die anhand des breiten, Peaks fragmentierter Kern-DNA zu erkennen ist. In Kontrollzellen verursacht Etoposid nur einen  $G_2$ -Arrest der Zellen.

Die FACS-Ergebnisse bestätigten die Befunde des Kristallviolett-Assays. Anhand der FACS-Plots konnte man erkennen, dass das Etoposid einen  $G_2$ -Arrest in den Zellen verursachte (Zunahme des zweiten  $G_2$ -Peaks bei gleichzeitiger Abnahme des ersten  $G_1$ -Peaks). Die mit dem Leervektor transfizierte HEY-Zellen verbleiben in diesem  $G_2$ -Arrest, wohingegen die IGFBP-4-Transfektanten in die Apoptose übergehen. Diese steigt mit Zunahme der Etoposidkonzentration und erreicht bei 100  $\mu\text{M}$  Etoposid 60%, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, die eine maximale Apoptoserate von 20% aufweisen (Abb. 4.47)



**Abb. 4.47:** Apoptoserate von IGFBP-4-HEY-Transfektanten im Vergleich zu Kontroll-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Etoposid-Konzentrationen für 24h

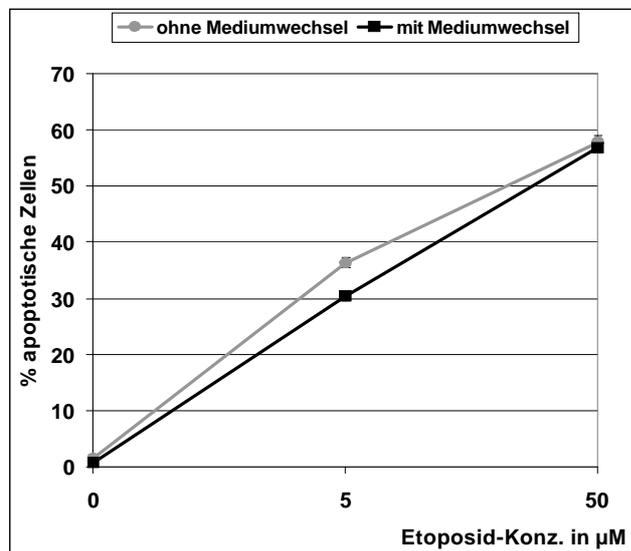


**Abb. 4.48:** Die Zugabe von IGFBP-4-HEY-Transfektanten-Überstand zu -Leervektor-Transfektanten führt in diesen Zellen nach Etoposid-Behandlung zu einer vergleichbar hohen Apoptoserate wie in den IGFBP-4-HEY-Transfektanten

Angesichts des durch die Western-Blot-Experimente bestätigten Befundes, dass das IGFBP-4 von den HEY-Zellen zum größten Teil in das Zellkulturmedium sezerniert wird, stellte sich nun die Frage, ob der apoptotische Effekt durch die sezernierte Form des IGFBP-4-Proteins vermittelt wird. Zur Klärung dieser Frage wurden mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen gleichzeitig mit Etoposid und mit dem Zellkulturüberstand von IGFBP-4-HEY-Transfektanten behandelt und hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens im FACS untersucht. Sollte der apoptotische Effekt tatsächlich durch das sezernierte Protein vermittelt werden, müsste das in dem Transfektanten-Überstand angereicherte IGFBP-4 in den

Leervektor-Zellen zu einer ähnlich hohen Apoptoserate führen, wie in den IGFBP-4-Transfektanten selbst. Tatsächlich führte die gleichzeitige Behandlung der Leervektor-Zellen mit Transfektanten-Überstand und Etoposid zu einer vergleichbar deutlichen Zunahme der Apoptose wie bei den IGFBP-4-Transfektanten (Abb. 4.48). Auch die Co-Kultivierung der Leervektor-Transfektanten mit IGFBP-4-Transfektanten im selben Kulturmedium führte zum gleichen Ergebnis. Das Experiment zeigte hier zusätzlich, dass allein der Stoffaustausch zwischen den beiden Zellarten, sprich der Austausch des IGFBP-4-Proteins – zur Auslösung der Apoptose in den Leervektor-Zellen ausreichte. Die beiden Zellarten wurden nämlich räumlich voneinander getrennt kultiviert – die Leervektor-Zellen wuchsen auf dem Boden einer 6-well-Platte und die IGFBP-4-Transfektanten in einem Transwell-Filtereinsatz. Dessen Poren waren zu klein, das die HEY-Zellen durchwandern konnten, jedoch groß genug, um den Stoffaustausch zwischen den beiden Zellarten zu ermöglichen.

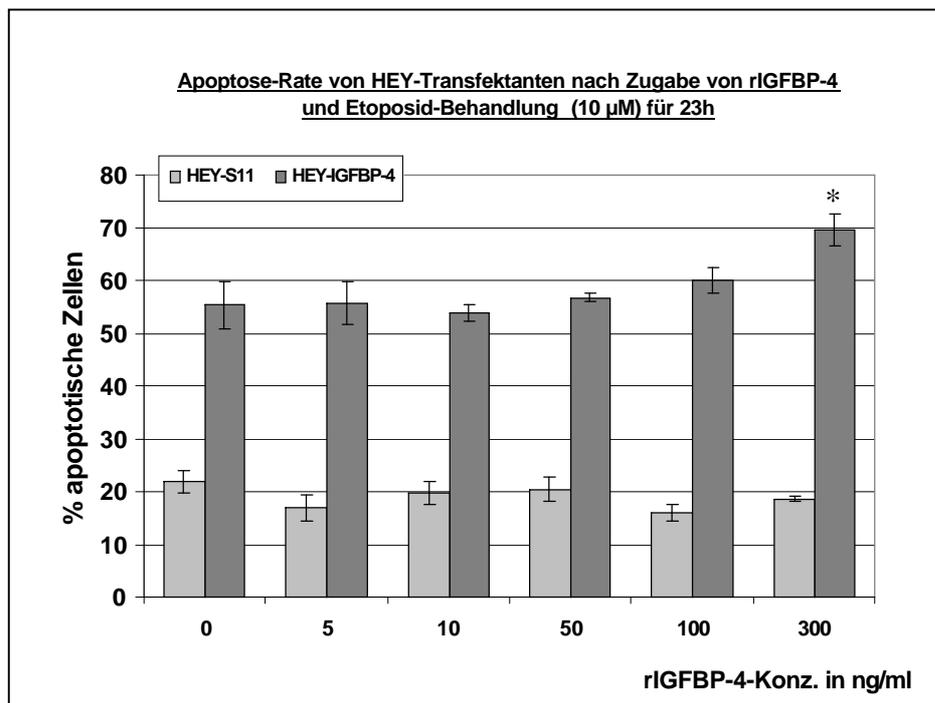
Beide Experimente bestätigten also deutlich, dass die Etoposid-induzierte Apoptose in HEY-Zellen durch die sezernierte Form des Proteins vermittelt wird. Somit müsste der Grad der IGFBP-4-Anreicherung im Zellkulturmedium die Stärke des apoptotischen Effektes bestimmen. In den bislang durchgeführten Apoptose-Experimenten wurde stets vor der Etoposid-Behandlung das Zellkulturmedium gegen frisches ausgetauscht und damit das bis zu diesem Zeitpunkt im Medium angereicherte IGFBP-4 entfernt, so dass der anschließend beobachtete apoptotische Effekt möglicherweise abgeschwächt wurde. Deshalb wurde ein Experiment durchgeführt, in dem vor der Etoposid-Behandlung kein Mediumwechsel durchgeführt wurde, so dass es nach den folgenden 24h Inkubation zu einer stärkeren IGFBP-4-Anreicherung im Medium und somit zu einer höheren Apoptose-Rate kommen müsste.



**Abb.4.49:** Vergleich der Etoposid-induzierten Apoptose von IGFBP-4-HEY-Transfektanten mit bzw. ohne vorherigen Mediumwechsel

Eine Erhöhung der Apoptose-Rate wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 4.49). Möglicherweise ist das Protein im Zellkulturmedium nicht stabil genug, dass es zu dessen weiteren Anreicherung kommen könnte. Die Menge, die während der 24 Stunden der Etoposid-Inkubation in den Zellkulturüberstand durch die Zellen sezerniert wird, reicht für den apoptotischen Effekt aber aus.

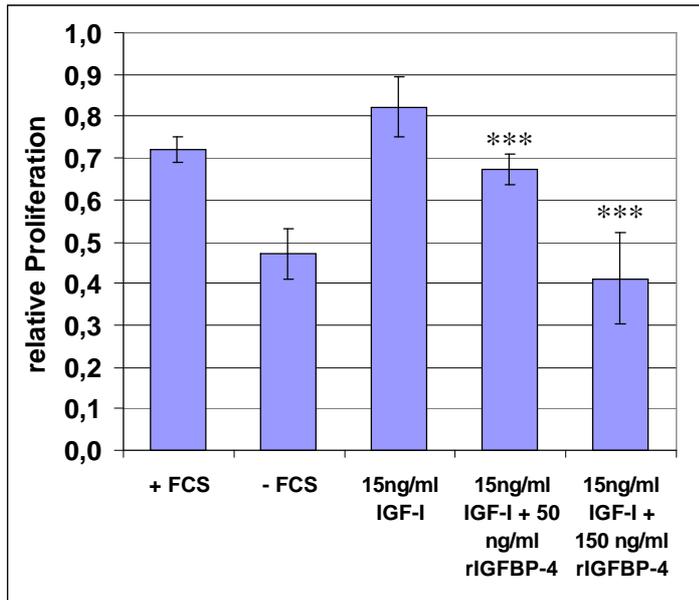
Da die Etoposid-induzierte Apoptose durch die exogene Zufuhr von IGFBP-4 vermittelt wird, müsste eine Behandlung von HEY-Zellen mit einem rekombinanten IGFBP-4-Protein die gleichen Effekte hervorrufen. Demnach wurden mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines humanen rekombinanten IGFBP-4-Proteins und 10  $\mu\text{M}$  Etoposid für 23h behandelt. Zum einen sollte eindeutig gezeigt werden, dass die Apoptose-Erhöhung tatsächlich über IGFBP-4 vermittelt wird und kein trans-Effekt ist und zum anderen sollte die Abhängigkeit dieses Effektes von der IGFBP-4-Konzentration genauer untersucht werden. Leider führte die Zugabe von rekombinatem IGFBP-4 (rIGFBP-4) selbst bei der höchsten Konzentration von 300ng/ml zu keiner Apoptose-Erhöhung in den Leervektortransfektanten gegenüber unbehandelten Zellen. Nur nach der entsprechenden Behandlung von IGFBP-4-HEY-Transfektanten konnte man bei den höchsten rIGFBP-4-Konzentrationen eine weitere Zunahme der apoptotischen Zellen um ca. 25% beobachten.



**Abb. 4.50:** Etoposid-induzierte Apoptose in mit Leervektor (HEY-S11) bzw. mit IGFBP-4 (HEY-IGFBP-4) transfizierten HEY-Zellen nach Zugabe von rekombinanten IGFBP-4-Protein (\*,  $p < 0,05$  relativ zu 0 ng/ml rIGFBP-4).

Der fehlende Effekt bei den Leervektor-Zellen deutet darauf hin, dass entweder das rekombinante Protein nicht funktionell ist oder dass die eingesetzten Konzentrationen zu gering waren. Die Funktionalität des rekombinanten Proteins wurde anhand seiner Fähigkeit zur Hemmung der IGF-I-vermittelten Proliferation von MCF7-Zellen überprüft. MCF7-Zellen, die sehr sensitiv auf die mitogene Wirkung von IGF-I reagieren, wurden für 24h im serum-freien Medium kultiviert und anschließend mit 15 ng/ml IGF-I alleine bzw. mit IGF-I und zwei verschiedenen Konzentrationen von rIGFBP-4 behandelt. Nach 3 Tagen Inkubation wurde die relative Proliferation der Zellen im MTS-Proliferationsassay bestimmt (Abb. 4.51). Die Kultivierung im serum-freien Medium führte aufgrund des Entzugs der Wachstumsfaktoren zu einem Rückgang der proliferierenden Zellen, der durch IGF-I wieder aufgehoben wurde. Dieser mitogener IGF-I-Effekt wurde durch die Zugabe von rIGFBP-4 konzentrationsabhängig gehemmt und zwar durch die Bindung der IGF-I-Moleküle an die IGFBP-4-Proteine. Dabei reichten 150 ng/ml des rekombinanten

IGFBP-4-Proteins aus, um den IGF-I-Effekt völlig zu blockieren. Somit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante IGFBP-4-Protein zumindest im Hinblick auf seine IGF-I-Bindung, funktionell ist.



**Abb. 4.51:** relative Proliferation von MCF7-Zellen nach IGF-I-Zugabe in Gegenwart von rekombinatem IGFBP-4-Protein (\*\*\*,  $p < 0,001$  relativ zu MCF7-Zellen +IGF-I ohne rIGFBP-4).

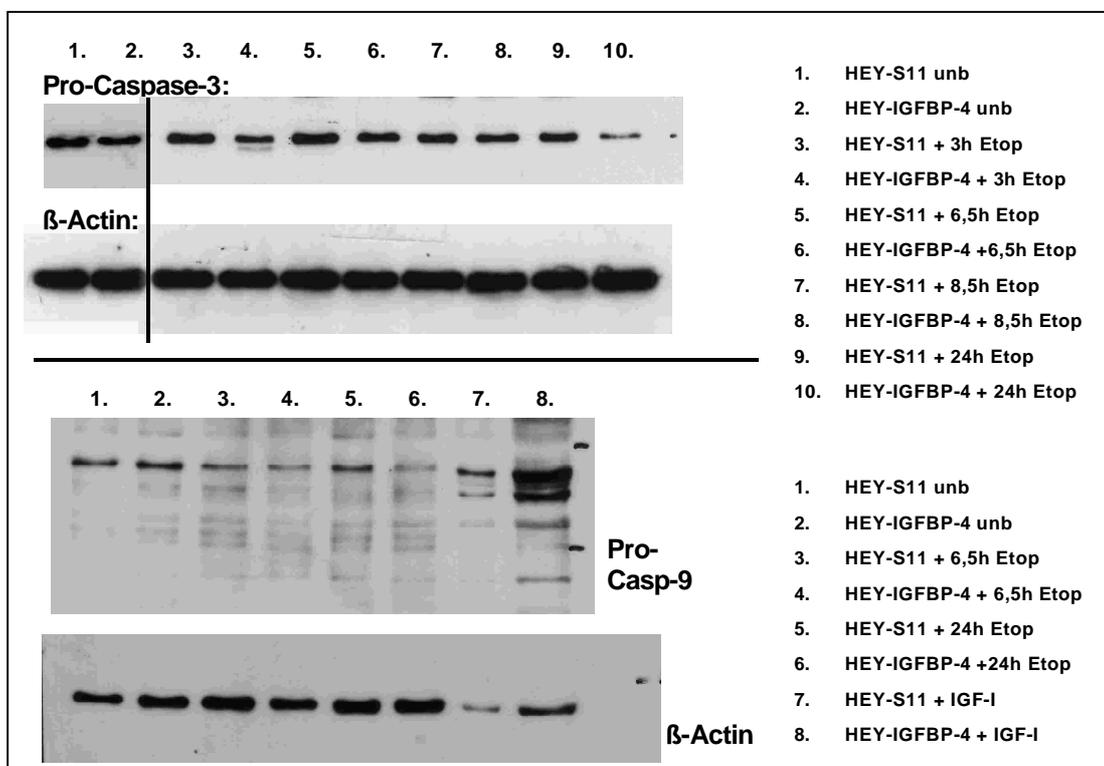
Als Erklärung für den fehlenden Effekt in HEY-Zellen würde also die zu geringe Konzentration des eingesetzten rekombinanten Proteins bleiben. Möglicherweise ist die IGFBP-4-Konzentration im IGFBP-4-HEY-Transfektanten-Überstand viel höher als die hier eingesetzten Konzentrationen des rIGFBP-4. Um dies zu klären, wurde die Konzentration des IGFBP-4 im Transfektanten-Überstand anhand der densitometrischen Auswertung des Western-Blots von Abbildung 4.32 bestimmt. Dabei diente die Bandenstärke der 100 ng des rekombinanten IGFBP-4-Proteins als Mengenstandard. Unter Berücksichtigung des Aufkonzentrierungsfaktors während der Einengung des Zellkulturüberstandes für den Western-Blot wurde auf diese Weise abgeschätzt, dass in 1 ml des Transfektanten-Überstandes – abgenommen von nahezu konfluenten HEY-Zellen (ca.  $1-3 \times 10^7$  Zellen) nach 3 Tagen – zwischen 0,6 und 1 µg IGFBP4-Protein enthalten war. Bezogen auf die Proteinmenge des Überstandes kamen so auf 1 µg Gesamtprotein zwischen 30 und 70 ng des IGFBP-4-Proteins. Da in den Apoptose-Versuchen stets mit 1 ml des Transfektanten-Überstandes pro Versuchsprobe gearbeitet wurde, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte auf eine vergleichbare Menge des IGFBP-4-Proteins zurückzuführen sind. Die in dem oben beschriebenen Experiment eingesetzte maximale Konzentration des rekombinanten IGFBP-4 von 150 ng/ml lag also deutlich unter der minimalen Konzentration des IGFBP-4-Proteins im Transfektanten-Überstand. Somit ist der fehlende apoptose-fördernde Effekt des rekombinanten Proteins in Leervektor-Zellen höchstwahrscheinlich auf die zu geringe Konzentration zurückzuführen.

#### 4.8.8 Einfluss von IGFBP-4 auf pro- und anti-apoptotische Signalwege in HEY-Zellen

Es wurde nun untersucht, über welche Signalwege das IGFBP-4 die Etoposid-vermittelte Apoptose verstärkt und welche Apoptose-Aktivatoren dabei eine Rolle spielen. Als ein zentrales Effektor-Molekül der Apoptose wurde die Aktivierung der Caspase-3 sowie die Aktivierung der Caspase-9, als einer typischen Caspase des mitochondrialen Apoptose-Weges, im Western-Blot verifiziert. Caspasen

werden durch proteolytische Spaltung ihrer inaktiven Pro-Form aktiviert. Somit wurde die Aktivierung der jeweiligen Caspase anhand einer Abnahme der inaktiven Pro-Form und gegebenenfalls durch das Erscheinen von aktiven Spaltprodukten detektiert, und zwar zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Etoposid.

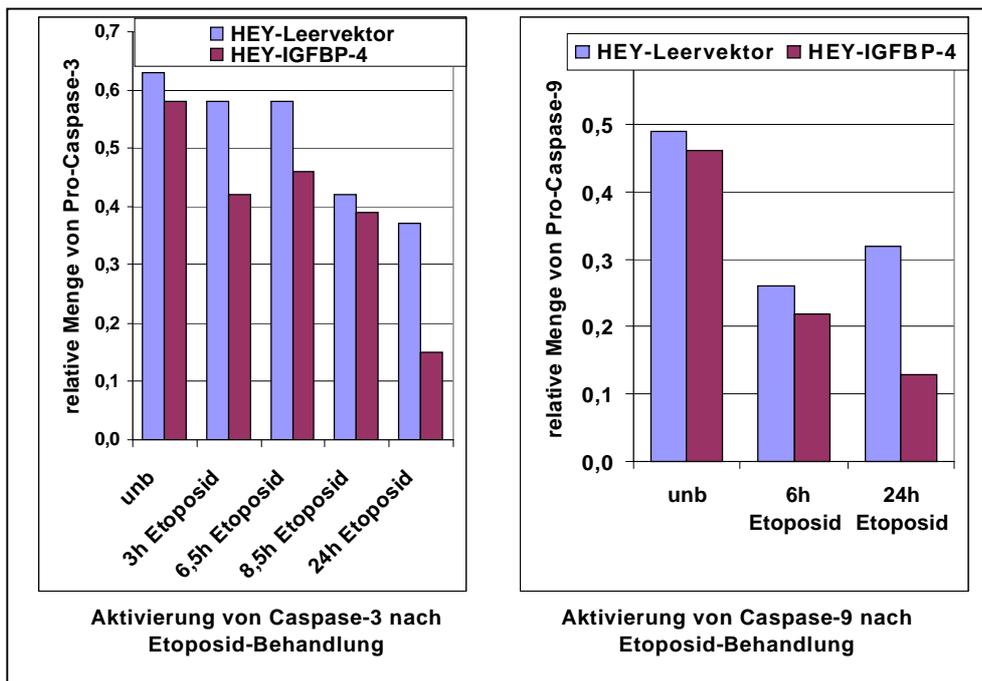
Beide Caspasen wurden durch Etoposid-Behandlung (10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) in HEY-Zellen aktiviert, wobei in beiden Fällen die Aktivierung in den IGFBP-4-Transfektanten höher war als in den mit Leervektor transfizierten Zellen (siehe Abb. 4.52 und 4.53). Eine deutliche Aktivierung der Caspase-3 war bei den IGFBP-4-Transfektanten bereits 3h nach Etoposid-Zugabe zu erkennen. Eine entsprechende Aktivierung in den Leervektor-Transfektanten erfolgte hingegen erst nach 8,5 Stunden. Der Unterschied in der Caspase-3-Aktivierung zwischen den Leervektor- und den IGFBP-4-Transfektanten nach 24h Etoposid-Inkubation war am höchsten. In den IGFBP-4-Transfektanten war die relative Menge der inaktiven Pro-Caspase um mehr als 50% geringer als in den Leervektor-Transfektanten (Abb. 4.53).



**Abb. 4.52:** Kinetik der Aktivierung der Caspase-3 (A) bzw. der Caspase-9 (B) in den IGFBP-4-Hey-Transfektanten nach Behandlung mit Etoposid (10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ). Die Abnahme der inaktiven Pro-Caspase, verursacht durch proteolytische Spaltung in kleinere Produkte – hier nur im Caspase-9-Western-Blot ansatzweise erkennbar – ist ein Hinweis auf eine Aktivierung (HEY-S11=mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen, HEY-IGFBP-4=mit IGFBP-4 transfizierte Zellen, Etop=Etoposid, unb=unbehandelt).

Unterschiede in der Caspase-9-Aktivierung zwischen den Leervektor- und den IGFBP-4-Transfektanten wurden erst nach 24h Etoposid-Inkubation sichtbar. Die Menge der in den mit IGFBP-4 transfizierten Zellen detektierten inaktiven Pro-Caspase-9 sank dann um mehr als die Hälfte im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen, was gleichbedeutend mit einer doppelt so starken Caspase-9-Aktivierung ist.

Angesichts des durch die Western-Blot-Experimente bestätigten Befundes, dass das IGFBP-4 von den HEY-Zellen zum größten Teil in das Zellkulturmedium sezerniert wird, stellte sich nun die Frage, ob der apoptotische Effekt durch die sezernierte Form des IGFBP-4-Proteins vermittelt wird. Zur Klärung dieser Frage wurden mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen gleichzeitig mit Etoposid und mit dem Zellkulturüberstand von IGFBP-4-HEY-Transfektanten behandelt und hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens im FACS untersucht. Sollte der apoptotische Effekt tatsächlich durch das sezernierte Protein vermittelt werden, müsste das in dem Transfektanten-Überstand angereicherte IGFBP-4 in den Leervektor-Zellen zu einer ähnlich hohen Apoptoserate führen, wie in den IGFBP-4-Transfektanten selbst. Tatsächlich führte die gleichzeitige Behandlung der Leervektor-Zellen mit Transfektanten-Überstand und Etoposid zu einer vergleichbar deutlichen Zunahme der Apoptose wie bei den IGFBP-4-Transfektanten (Abb. 4.48). Auch die Co-Kultivierung der Leervektor-Transfektanten mit IGFBP-4-Transfektanten im selben Kulturmedium führte zum gleichen Ergebnis. Das Experiment zeigte hier zusätzlich, dass allein der Stoffaustausch zwischen den beiden Zellarten, sprich der Austausch des IGFBP-4-Proteins – zur Auslösung der Apoptose in den Leervektor-Zellen ausreichte. Die beiden Zellarten wurden nämlich räumlich voneinander getrennt kultiviert – die Leervektor-Zellen wuchsen auf dem Boden einer 6-well-Platte und die IGFBP-4-Transfektanten in einem Transwell-Filtereinsatz. Dessen Poren waren zu klein, das die HEY-Zellen durchwandern konnten, jedoch groß genug, um den Stoffaustausch zwischen den beiden Zellarten zu ermöglichen.



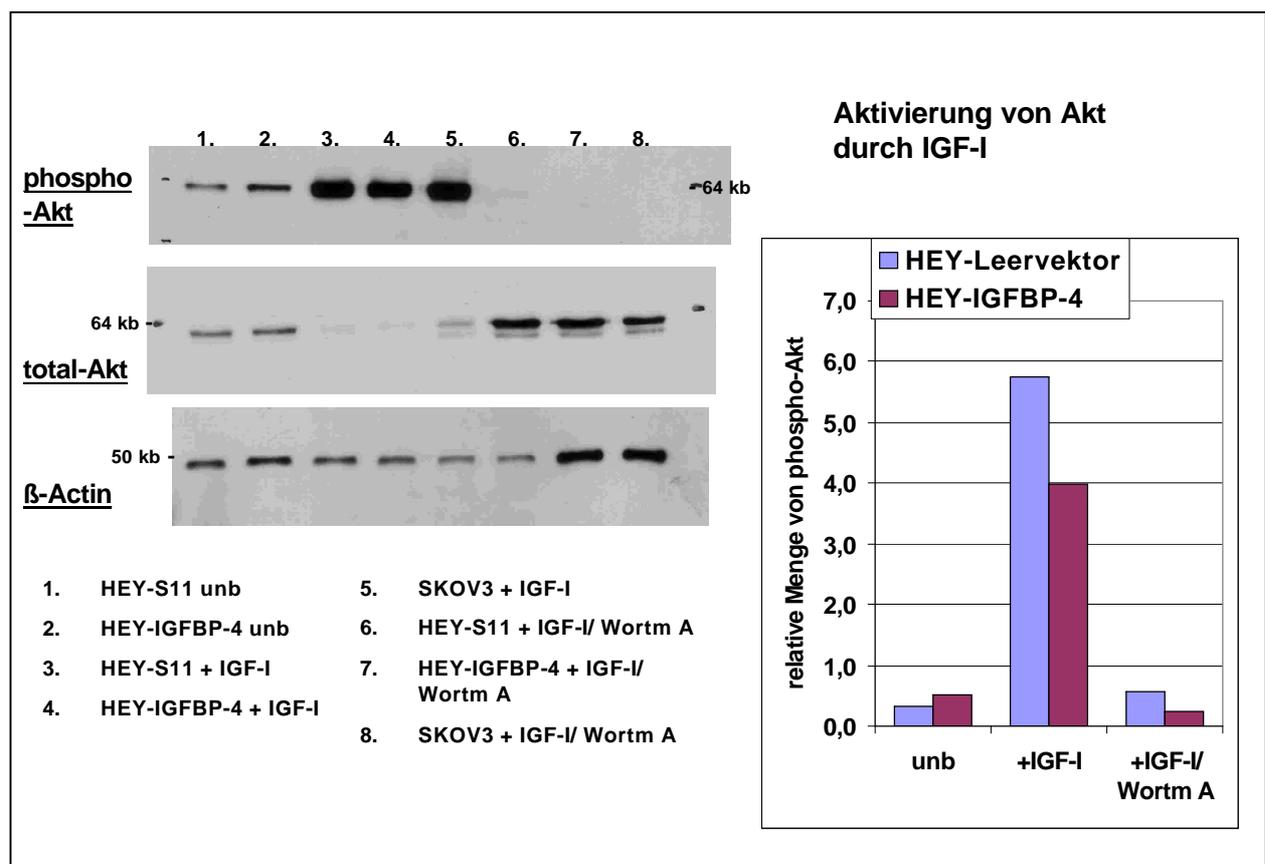
**Abb. 4.53:** densitometrische Auswertung des Western-Blots von Abb. 4.52.

Zur Bestimmung der relativen Aktivierung der Caspase-3 bzw. Caspase-9 in den IGFBP-4-HEY-Transfektanten nach Etoposid-Behandlung wurden die absoluten Signalintensitäten der inaktiven Pro-Form auf die absoluten Signalintensitäten des  $\beta$ -Actins normiert.

Die Western-Blot-Auswertungen zeigten, dass das IGFBP-4 die Apoptose in den HEY-Transfektanten über die verschieden starke Caspasen-Aktivierung moduliert. Caspasen stehen jedoch relativ weit unten innerhalb des Apoptose-Signalweges. Es stellte sich nun die Frage, ob das IGFBP-4 tatsächlich direkt auf die Caspasen wirkt oder, was viel wahrscheinlicher ist, indirekt als IGF-Modulator das Apoptose-

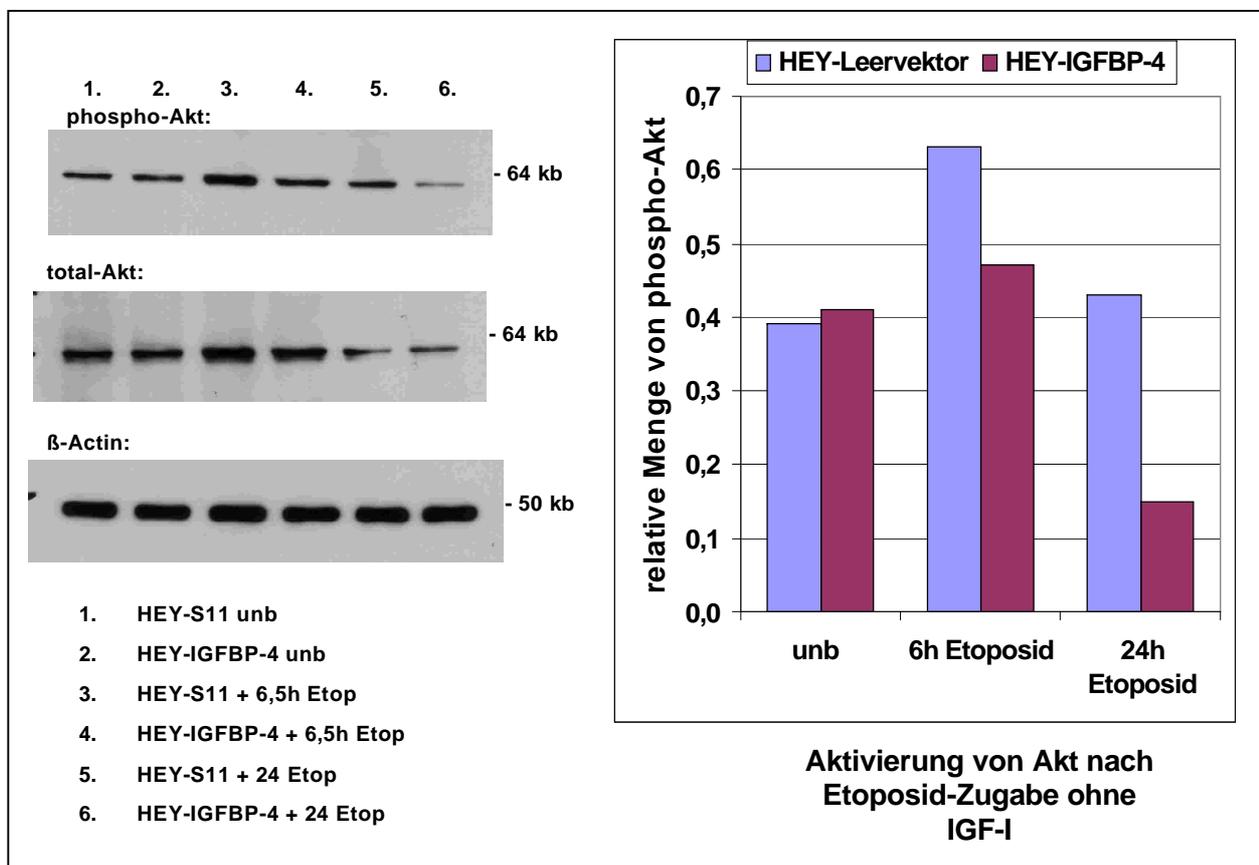
Signalling beeinflusst. Das IGF-I schaltet, als Gegenspieler der Apoptose, über die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) den „Survival-Pathway“ ein und wirkt somit dem programmierten Zelltod entgegen. Die Aktivierung von PI-3K führt zur Phosphorylierung einer Vielzahl von Signalmolekülen, darunter vor allem der Serin/Threonin-Protein-Kinase Akt, die wiederum durch Inhibierung pro-apoptotischer bzw. Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle die apoptotische Kaskade unterbindet. Durch das Abfangen des IGFs durch IGFBP-4 müsste es somit in den HEY-Transfektanten zu einer schwächeren Akt-Aktivierung kommen. Dieses wurde anhand von Western-Blots überprüft.

Zunächst wurde untersucht, ob Akt spezifisch durch IGF-I in HEY-Zellen induziert werden kann. Der in Abbildung 4.54 dargestellte Western-Blot zeigt, dass das Akt sehr stark durch IGF-I sowohl in den mit Leervektor, wie auch in den mit IGFBP-4 transfizierten Zellen aktiviert wird. Die densitometrische Auswertung der Akt-Aktivierung und Normierung auf  $\beta$ -Actin macht deutlich, dass das Akt in den Leervektorzellen durch IGF-I stärker aktiviert wird als in den IGFBP-4-Transfektanten, was die Annahme bestätigen würde, dass das sezernierte IGFBP-4 ein Teil der IGF-Moleküle abfängt und damit die Akt-Aktivierung drosselt (Abb. 4.55). Die basale Akt-Aktivierung in IGF-unbehandelten HEY-Zellen ist jedoch in den IGFBP-4-Transfektanten genauso hoch ist wie in den Kontrollzellen. Dies spricht zusätzlich für eine IGF-Abhängigkeit dieses IGFBP-4-Effektes. Die Akt-Aktivierung durch IGF-I ist spezifisch, denn sie wird vollständig durch den Akt-spezifischen Inhibitor Wortmanin A blockiert.



**Abb. 4.54:** Aktivierung der Serin/Threonin-Protein-Kinase Akt in HEY und SKOV3-Zellen durch IGF-I und Blockierung dieser Aktivierung durch Zugabe von Wortmanin A: Western-Blot und densitometrische Auswertung. Zur Bestimmung der relativen Menge des phosphorylierten Akt-Proteins wurden die absoluten Signalintensitäten des phospho-Akts auf die absoluten Signalintensitäten des  $\beta$ -Actins normiert (HEY-S11=mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen, HEY-IGFBP-4=mit IGFBP-4 transfizierte HEY-Zellen, Wortm A=Wortmanin A).

Anschließend wurde die Akt-Aktivierung in den mit Leervektor bzw. mit IGFBP-4 transfizierten HEY-Zellen nach Auslösen der Apoptose durch Etoposid-Behandlung untersucht. Dabei wurde kein exogenes IGF-I zugesetzt. Auch hier waren keine Unterschiede in der basalen Akt-Aktivität zwischen den unbehandelten IGFBP-4- und Leervektor-Transfektanten zu erkennen. Unter Einfluss von Etoposid (10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) wurde Akt im Vergleich zu IGF-I nur geringfügig aktiviert, und zwar nur in den mit Leervektor transfizierten Zellen. Nach 6h Etoposid-Behandlung kam es in den Leervektor-Transfektanten zu einer Zunahme der phospho-Akt-Menge um ca. 30% im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wohingegen die phospho-Akt-Menge in den IGFBP-4-Transfektanten nahezu unverändert blieb (Zunahme nur um ca. 10%). und nach insgesamt 24h Etoposid-Inkubation sogar noch unter den Level der unbehandelten Zellen fiel. In den Leervektor-Transfektanten sank nach 24h die Menge des phosphorylierten Akt-Proteins wieder auf den Level der unbehandelten Zellen. Demnach blieb die Akt-Aktivierung als anti-apoptotische Gegensteuerung in den IGFBP-4-Transfektanten im Gegensatz zu den Leervektor-Transfektanten vollständig aus.



**Abb. 4.56:** Aktivierung der Serin/Threonin-Protein-Kinase Akt in HEY-Transfektanten nach Etoposid-Behandlung (10  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ).

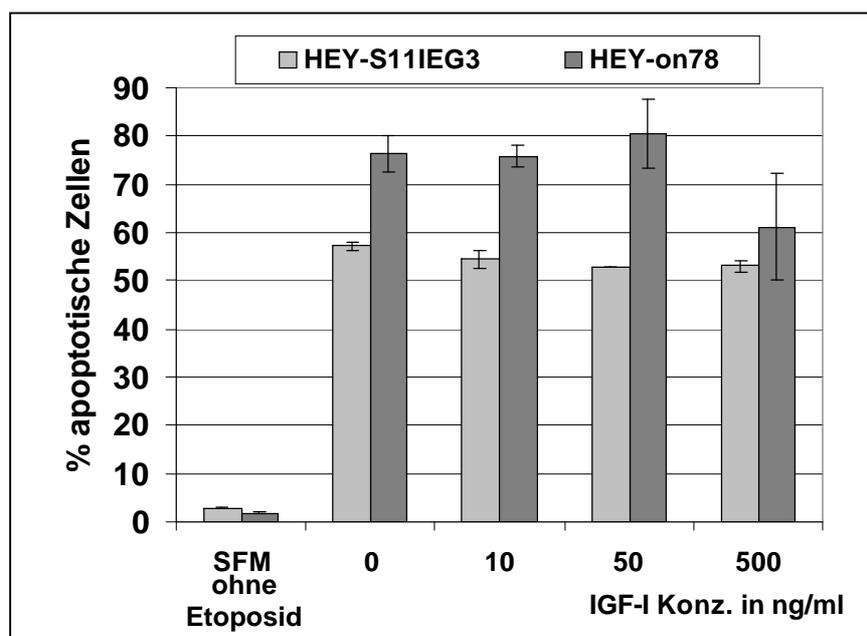
Zur Bestimmung der relativen Menge des phosphorylierten Akt-Proteins wurden die absoluten Signalintensitäten des phospho-Akts auf die absoluten Signalintensitäten des  $\beta$ -Actins normiert (HEY-S11=mit Leervektor transfizierte HEY-Zellen, HEY-IGFBP-4=mit IGFBP-4 transfizierte HEY-Zellen).

#### 4.8.9 IGF-Abhängigkeit des pro-apoptotischen IGFBP-4-Effektes

Um zu überprüfen, ob die Apoptose-verstärkende Wirkung von IGFBP-4 ausschließlich IGF-I-abhängig ist oder ob hier auch zusätzlich IGF-unabhängige Effekte eine Rolle spielen, wurde die Apoptose von in Serum-freien Medium kultivierten HEY-Transfektanten nach Zugabe von steigenden

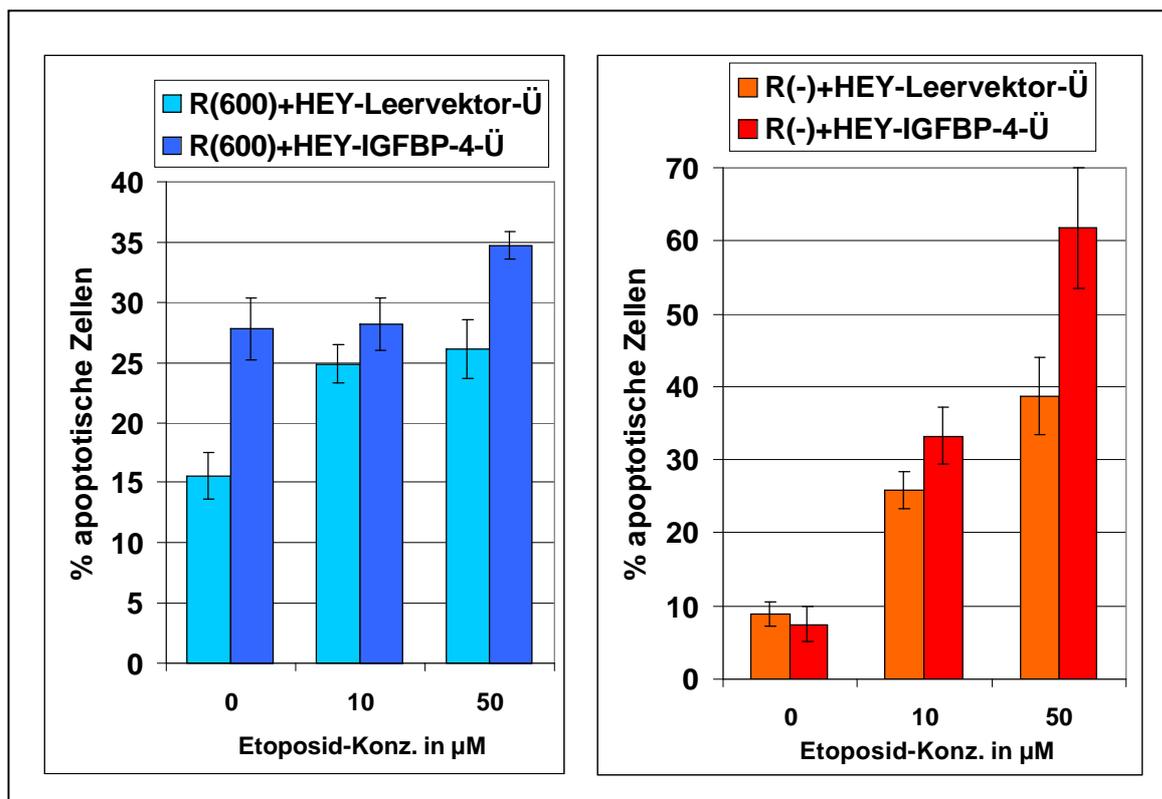
Konzentrationen an IGF-I untersucht (Abb. 4.57). Bei ausschließlicher IGF-Abhängigkeit müsste ein Überschuss an IGF-I den Effekt aufheben, bei IGF-unabhängiger Wirkung müsste der Effekt zumindest teilweise bestehen bleiben.

Für diesen Versuch wurden die HEY-Zellen zuvor für 24h im Serum-freien Medium kultiviert, um – abgesehen von der endogenen IGF-I-Produktion – möglichst IGF-I-freie Bedingungen zu gewährleisten. Kontroll-Messungen ergaben, dass die Kultivierung der HEY-Zellen im Serum-freien Medium (SFM) für die Dauer des Versuches zu keinem verstärkten Absterben der Zellen im Vergleich zu im Vollmedium kultivierten Zellen führte. Die Etoposid-Behandlung für 23h (50  $\mu$ M) führte sowohl in den mit Leervektor wie auch in den mit IGFBP-4 transfizierten Zellen zu einer starken Apoptose. Diese war bei den IGFBP-4-Transfektanten sowohl bei IGF-I-Mangel wie auch nach IGF-I-Zugabe (mit Ausnahme der höchsten IGF-I-Konzentration) höher war als in den Leervektor-Zellen. Laut Erwartungen müsste die Apoptoserate bei steigender IGF-I-Konzentration aufgrund der Aktivierung des „Survival-Pathways“ durch das IGF-I sowohl bei den mit Leervektor- wie auch bei den mit IGFBP-4 transfizierten HEY-Zellen zu einem gewissen Grad abnehmen. Durch das Abfangen der IGF-Moleküle durch IGFBP-4 müsste dieser Effekt in den IGFBP-4-Transfektanten jedoch erst bei wesentlich höheren Konzentrationen auftreten als bei den Leervektor-Transfektanten. Die Zugabe von IGF-I hatte, entgegen den Erwartungen, keinen Einfluss auf die Apoptose-Rate der mit Leervektor transfizierten Zellen. Bei den IGFBP-4-Transfektanten führte erst ein starker IGF-I-Überschuss zu einer Reduktion der Apoptose auf den Level der Leervektor-Transfektanten. Damit liefert der Versuch Hinweise sowohl für IGF-abhängige wie auch für IGF-unabhängige IGFBP-4-Effekte. Eine stärkere Apoptose der IGFBP-4-Transfektanten auch bei IGF-I-Mangel (0 ng/ml IGF-I) bedeutet, dass das IGFBP-4 nicht nur über Abfangen der IGF-I-Moleküle die Apoptose fördert. Auf der anderen Seite wurde der IGFBP-4-Effekt auf die Apoptose bei einer hohen IGF-Konzentration offensichtlich aufgehoben, was in Richtung einer IGF-Abhängigkeit deutet.



**Abb. 4.57:** Etoposid-induzierte Apoptose in HEY-IGFBP-4-Transfektanten bei steigenden IGF-I-Konzentrationen nach Etoposid-Behandlung im Vergleich zu Leervektor-Transfektanten (50  $\mu$ M/ml für 23h).

Die Möglichkeit, das IGFBP-4 auch unabhängig von IGF und dem IGF-I-Rezeptor Apoptose induzieren könnte, wurde durch Apoptose-Assays von IGF-I-Rezeptor-negativen  $R^{(-)}$ -Zellen untersucht.  $R^{(-)}$ -Zellen sind embryonale Fibroblasten, die aus IGF-I-R „Knockout“-Mäusen gewonnen wurden (Sell *et al*, 1993; Sell *et al*, 1994). Bereits publizierte Studien zeigten, dass diese Zellen weder IGFs binden noch auf IGFs reagieren. Untersuchungen von Sell *et al* (1995) ergaben zudem, dass IGF-I keinen Einfluss auf die Etoposid-induzierte Apoptose in diesen Zellen hatte. Als Positiv-Kontrolle für die Analysen wurden R-Zellen mit einer definierten Menge ( $30 \times 10^3$  IGF-I-Rezeptoren/Zelle) an membrangebundenen IGF-I-Rezeptoren ( $R^{600}$ -Zellen) genutzt (Valentinis *et al*, 1999). Beide Zellarten wurden mit dem IGFBP-4-Transfektanten-Überstand und mit Etoposid behandelt und im FACS hinsichtlich der Apoptoserate untersucht. Die Funktionalität des verwendeten IGFBP-4-Transfektanten-Überstandes hinsichtlich der Apoptose-Induktion wurde parallel durch Behandlung von Leervektor-Transfektanten getestet. Die Analyse der R-Zellen im FACS war etwas erschwert, da durch die zellspezifische starke Streuung der Zellen nicht immer eine exakte Abgrenzung von nekrotischen Zellen und Zelltrümmer möglich war. Somit war die gemessene Apoptoserate gegebenenfalls durch die miterfassten nekrotischen Zellen etwas verfälscht. Zudem zeigten die R-Zellen je nach Zelldichte und Zellzyklusstadium vor der Aussaat für den Versuch unterschiedliche Sensitivität auf Etoposid. Somit war eine mehrfache Durchführung des Versuches für eine eindeutige Verifizierung der Ergebnisse nötig. Abbildung 4.58 zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt fünf durchgeführten Versuchen.



**Abb. 4.58:** Etoposid-induzierte Apoptose in IGFBP-4-Transfektanten-Überstand bzw. Leervektor-Transfektanten-Überstand behandelten IGF-IR-negativen  $R^{(-)}$ -Zellen im Vergleich zu Rezeptor-positiven  $R^{600}$ -Zellen.

Der erste sehr auffällige Befund war, dass die R<sup>(600)</sup>-Zellen bereits ohne Etoposid-Induktion eine deutlich erhöhte basale Apoptose nach Behandlung mit IGFBP-4-Transfektanten zeigten. Die Zugabe von 10 µM Etoposid bewirkte dann auch in den mit Leervektor-Zellen-Überstand behandelten R<sup>(600)</sup>-Zellen einen Anstieg der Apoptose, so dass der Anteil der apoptotischen Zellen nun in beiden Zellarten nahezu gleich war. Eine weitere Erhöhung der Etoposid-Konzentration auf 50 µM führte nur bei den mit IGFBP-4-Transfektanten-Überstand behandelten Zellen zu einer weiteren Verstärkung der Apoptose. Im Gegensatz dazu war bei Etoposid-unbehandelten R<sup>(-)</sup>-Zellen kein Einfluss des IGFBP-4-Proteins auf den basalen Apoptose-Level zu erkennen. Erst bei einer hohen Etoposid-Konzentration zeigten die mit IGFBP-4-Transfektanten-Überstand behandelten Zellen eine deutlich höhere Apoptose-Rate als die mit Kontrollzellen-Überstand behandelten R<sup>(-)</sup>-Zellen.

Diese Ergebnisse demonstrieren zum einem, dass der Apoptose-fördernde IGFBP-4-Effekt nicht nur für die HEY-Zellen spezifisch ist und allein durch die exogene Zugabe von IGFBP-4 erreicht werden kann. Weil die R<sup>(-)</sup>-Zellen keine Tumor-Zellen sind, wurde auch gezeigt, dass die IGFBP-4-Wirkung nicht an tumorspezifische Eigenschaften von Tumorzellen gebunden ist. Die erhöhte Apoptose-Rate in Etoposid-unbehandelten R<sup>(600)</sup> -Zellen deutet an, dass das IGFBP-4 unter Umständen in machen Zellarten auch unabhängig vom apoptotischen Stimulus Einfluss auf die basale Zell-Apoptose haben kann. In diesen Fällen scheint der IGFBP-4-Effekt hauptsächlich auf der Hemmung der anti-apoptotischen IGF-Wirkung zu basieren, da er nur IGF-IR-positiven R<sup>(600)</sup> -Zellen zu beobachten war. IGF-abhängig abläuft. Die starke apoptose-Förderung durch IGFBP-4 in IGF-IR-negativen R-Zellen bei höheren Etoposid-Konzentrationen ist jedoch ein wichtiger Hinweis dafür, dass das IGFBP-4 auch über IGF-unabhängige, noch ungeklärte Mechanismen die Etoposid-induzierte Apoptose beeinflusst.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 „Electronic Northern von EST-Bibliotheken als neue Methode zur Identifizierung tumorassoziierter Gene

Die Tumorentstehung und –Progression ist ein komplizierter Mehrschritt-Prozess, der zu einer Fehlregulation zellulärer Stoffwechselwege führt. Er basiert auf genetischen Alterationen einer Vielzahl von Genen, die als Signalmoleküle wiederum selbst die Expression weiterer, in wichtige Signalwege involvierter Gene beeinflussen. Die Identifizierung einer möglichst großen Anzahl von fehlerhaft exprimierten Genen ist somit für die Aufklärung der molekularen Karzinogenese von großer Bedeutung und könnte mögliche Ansatzpunkte für diagnostische und therapeutische Strategien bieten.

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms und die Entwicklung neuartiger Technologien zur standardisierten Detektion von DNA und RNA im großen Maßstab, v.a. durch Hybridisierung von Microarray-Chips, resultierte in einem enormen Zuwachs an genetischen Informationen. Die in genomweiten Datenbanken erfassten Expressions-Profile von Tausenden von Geweben und Tumorproben ermöglichen es nun, tumor-relevante Gene nicht nur über aufwendige experimentelle Methoden, sondern auch mit bioinformatischen Ansätzen durch Vergleich der Expressionsprofile von Normal- und Tumorgewebe zu identifizieren. Eine solche *in silico* Expressionsanalyse von EST-Bibliotheken bildete die Grundlage für diese Arbeit (Dahl *et al*, 2005). Im Rahmen dieser Analyse konnten ca. 600 differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, aus denen rund 40 Kandidatengene für eine weitere Verifizierung ausgewählt wurden. Für 29 dieser Kandidatengene konnte die differentielle Expression experimentell in sog. „Dot-Blot“-Analysen im „Cancer Profiling Array (CPA) und mit *real-time* bzw. quantitativer RT-PCR bestätigt werden. Statistisch gesehen stimmten so für rund 75% der Gene die eNorthern-Daten mit den Expressionsanalysen von Tumorproben überein. Die eNorthern-Analyse liefert damit ähnlich verlässliche Ergebnisse wie z.B. das Differential Display oder die Microarray-Chip-Hybridisierung und bietet somit eine zeit- und kostensparende Alternative zu den experimentell aufwendigen Methoden. Die ständig wachsende Zahl von cDNA-Bibliotheken und die fortschreitende Katalogisierung der in den Datenbanken gesammelten Expressionsprofile nach Tumortyp, klinischen Daten, etc. könnte die Effektivität und Aussagekraft dieser Methode in der Zukunft noch steigern.

### 5.2 Das IGFBP-4 -Kandidatengen als ein neues Tumorsuppressorgen beim Ovarial-Karzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus den 40 Kandidatengenen das Insulin-like growth factor-binding protein 4 (IGFBP-4) als potentielles Tumorsuppressorgen für weitere molekularbiologische und funktionelle Analysen ausgewählt. Als einziges der sechs gut charakterisierten IGFBPs scheint es ausschließlich als ein IGF-Inhibitor zu wirken (Wetterau *et al*, 1999). In bislang allen *in vitro* untersuchten Zelltypen, darunter auch zahlreichen Tumorarten, inhibierte IGFBP-4 die IGF-induzierte Zellproliferation und Differenzierung, wie z.B. in Knochen-Zellen (Schiltz *et al*, 1993; Mohan *et al*, 1995), Muskelzellen (Damon *et al*, 1998a; Ewton *et al*, 1998; Gustafsson *et al*, 1999), B104 Ratten -Neuroblastoma-Zellen (Cheung *et al*, 1991), humanen Kolon-Adenokarzinom-Zellen HT-29 (Culouscou und Shoyab, 1991) und humanen Prostata-Karzinomzellen M12 (Damon *et al*, 1998b). Ebenfalls *in vivo* fungiert IGFBP-4 als ein funktioneller IGF-Antagonist und hemmt z.B. das Knochenwachstum (Mohan *et al*, 1989). Transgene Mäuse, die IGFBP-4 selektiv in glatten Muskelzellen exprimierten entwickelten eine Muskel-Hypoplasie

(Wang J *et al*, 1998; Zhang *et al*, 2002), im Gegensatz zu einer Muskel-Hypertrophie, die durch IGF-I-Überexpression ausgelöst wurde (Wang *et al*, 1997). Die generell proliferationshemmende Funktion des IGFBP-4 in fast allen Gewebetypen sowie die chromosomale Lokalisierung des IGFBP-4-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21.2), einer Region mit häufigen Allelverlust sowohl in Mamma- (Phelan *et al*, 1998; Ito 1995; Lindblom *et al*, 1993; Niederacher *et al*, 1997) wie auch in Ovarial-Karzinomen (Werheim *et al*, 1996; Parella *et al*, 2003; Zborovskaya *et al*, 1999; Okada *et al*, 2002) sprechen dafür, dass das Protein als ein Tumorsuppressor fungieren könnte.

Der Transfer des Chromosoms 17 in die MaCa-Zelllinie MCF7 resultierte in einem Wachstums-Arrest (Plummer *et al*, 1997) und der Transfer in die stark metastasierende Zelllinie MDA-MB-231 in einer verringerter Tumorbildung in Nacktmäusen (Negrini *et al*, 1994). Beide Arme des Chromosoms 17 beherbergen Gene, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden, z.B. das Gen TP53 (17q13) sowie das c-erbB2/HER2neu-Gen (17q12), und das BRCA1-Gen (17q12), welches in nächster Nähe zum IGFBP-4-Gen liegt. BRCA1-Keimbahn-Mutationen sind für 80% der Fälle des vererbaren Brust/Ovarial-Karzinom-Syndroms und für 45% der Fälle des familiären Brustkrebs verantwortlich. Mutationen werden jedoch kaum in sporadischen MaCa und OvCa gefunden, obwohl die entsprechende chromosomale Region gehäuft Allelverluste (LOH) aufweist. Deshalb wird vermutet, dass diese Region weitere für die Pathogenese des sporadischen Mamma- und Ovarialkarzinoms wichtige Tumorsuppressorgene enthält. Ob eines davon das IGFBP-4-Gen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand von molekularbiologischen und funktionellen Analysen zu klären versucht.

Die im eNorthern detektierte differentielle Expression des IGFBP-4 Gens konnte sowohl im Cancer Profiling Array wie auch über quantitative RT-PCR an Normal/Tumor-Paaren von Mamma- und Ovarialkarzinomen eindeutig bestätigt werden. Dabei wurde eine besonders häufige IGFBP-4-Expressionsreduktion in Ovarialkarzinomen festgestellt. Über die Hälfte der untersuchten OvCa zeigten sowohl im Array wie auch in der RT-PCR eine starke Reduktion der IGFBP-4-Expression. Die IGFBP-4-Expression wurde bereits in verschiedenen Tumorarten untersucht, wie z.B. Lungen-Adenokarzinome (Price *et al*, 1995), nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (Noll *et al*, 1996), Brustkrebs (Quin *et al*, 1999), Kolonkarzinome (Michell *et al* 1997), Magenkrebs (Yi *et al*, 2001), Gliome (Bradshaw *et al*, 1999), Hepatome (Scharf *et al* 1998), Myelome (Feliars *et al* 1999), Neuroblastome (Cheung *et al*, 1991, Babajko und Binoux, 1996), Osteosarkome (Mohan *et al*, 1995b) und Prostata-Karzinome (Damon *et al*, 1998b, Drivdahl *et al*, 2001). Kaum eine Studie befasste sich jedoch mit dem IGFBP-4 im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom, obwohl das IGFBP-4 im Ovar eine wichtige Funktion innerhalb der Follikelreifung übernimmt. Erst vor Kurzem wurde im Rahmen einer Microarray-Analyse von Warrenfeltz *et al* (2004) in malignen Ovarialtumoren eine starke Reduzierung der IGFBP-4-Genexpression identifiziert, was die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen IGFBP-4-Expressionsrückgang in OvCa bestätigt. Interessanterweise korrelierte in der Studie von Warrenfeltz *et al* die Abnahme der IGFBP-4-Expression mit der steigenden Malignität der untersuchten OvCa. Benigne Adenome zeigten eine „normale“ IGFBP-4-Expression, „Borderline“-Tumore von geringer Malignität eine bereits 2-fach reduzierte Expression und in stark malignen Adenokarzinomen war die IGFBP-4-Expression kaum mehr nachweisbar. Diese Befunde suggerieren, dass der Verlust der IGFBP-4-Expression mit der Pathogenese des ovariellen Adenokarzinoms assoziiert ist. Andere Mitglieder der

IGFBP-Familie werden bereits als prognostische Marker für das Ovarialkarzinom diskutiert. Erhöhte Serum-Spiegel von IGFBP-2 zum Zeitpunkt der Diagnose korrelierten mit der Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs (Baron-Hay *et al*, 2003) und Serum-Konzentrationen von IGFBP-3 und IGF-I von gesunden Frauen wurden zur Risiko-Abschätzung einer Ovarialkarzinom-Erkrankung genutzt (Lukanova *et al*, 2002).

IGFs fördern im Ovar als Verstärker der Gonadotropinwirkung die Steroidhormon-produktion und das Follikelwachstum. Das IGFBP-4 hemmt diese IGF-Wirkung und führt damit selektiv zur Proliferationshemmung und zur follikulären Atresie. In androgen-dominanten kleinantralen Follikeln wurden höhere IGFBP-4-Konzentrationen als in östrogen-dominanten präovulatorischen Follikeln gefunden. Somit ist die Bioverfügbarkeit der IGFs in kleineren Follikeln durch die Sequestrierung durch IGFBP-4 deutlich herabgesetzt, was ein Absterben dieser Follikel hervorruft (Cataldo *et al*, 1992, San Roman und Magoffin, 1992). Eine Fehlregulation des IGFBP-4-Proteins im Ovar ist wahrscheinlich hauptverantwortlich für das Polycystische Ovarial-Syndrom (PCOS), welches durch eine Hyperandrogenämie und das Fehlen von ovulatorischen Zyklen charakterisiert ist (Giudice *et al*, 1995). Die stark erniedrigte Expression von IGFBP-4 in Ovarialkarzinomen führt demnach höchstwahrscheinlich zu einer verstärkten mitogenen IGF-Wirkung und fördert somit die Tumorentstehung und –Progression.

Die Frage nach dem Inaktivierungsmechanismus von IGFBP-4 wurde anhand von Mutations- und Methylierungsanalysen der betroffenen Ovarial-Karzinome geklärt. Die zuvor durchgeführte LOH-Analyse der OvCa mittels PCR-amplifizierter, fluoreszenz-markierter Mikrosatellitenmarker bestätigte den in der Literatur beschriebenen häufigen Allelverlust der chromosomalen IGFBP-4-Genregion. Rund 47% der untersuchten OvCa zeigten einen Verlust der Heterozygotität der IGFBP-4-Region. Ausgehend von der „Two-hit“-Hypothese von Knudson, die eine Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens für eine phänotypische Ausprägung des Genverlustes voraussetzt, müsste das zweite IGFBP-4-Allel in den LOH-positiven OvCa inaktiviert vorliegen – stillgelegt durch eine Mutation oder durch eine Promotorhypermethylierung. Die erste Möglichkeit konnte nach einer Mutationsanalyse mittels DHPLC ausgeschlossen werden, da außer zwei „single-nucleotide“ Polymorphismen keinerlei inaktivierende Mutationen identifiziert wurden. Das IGFBP-4-Gen stellt mit seinen zahlreichen CpG-Inseln im Promotor jedoch einen idealen Kandidaten für eine Hypermethylierung dar. Außerdem wurde beobachtet, dass für manche LOH-Regionen eher epigenetische als genetische Alterationen die dort lokalisierten Tumorsuppressorgene betreffen und dass einige Gene in Tumoren ausschließlich über Hypermethylierung inaktiviert werden. Es wird vermutet, dass mindestens so viele Tumorsuppressorgene durch epigenetisches Silencing wie durch Mutationen inaktiviert werden. Die chromosomale Region des IGFBP-4-Gens könnte ebenfalls ein für die chromosomale Inaktivierung prädestinierter Bereich sein. Das in der gleichen Region lokalisierte BRCA1-Gen liegt in 11-13% der sporadischen Mammakarzinome hypermethyliert vor (Catteau *et al*, 1999; Esteller *et al*, 2000), wobei das 2.Allel in den betroffenen Tumoren stets durch einen LOH verlorengegangen ist. Es wurde zudem gezeigt, dass die CpG-Methylierung des BRCA1-Promotors immer durch eine Histon-Deacetylierung und resultierende Veränderungen der Chromatin-Struktur begleitet wurden. Es ist durchaus vorstellbar, dass diese chromosomalen Strukturveränderungen, die zum inaktiven Chromatin führen, auch auf die benachbarte IGFBP-4-Genregion übergreifen könnten.

Deshalb wurden ausgewählte OvCa und Tumor-Zelllinien nach aberranten Methylierungsmustern des IGFBP-4-Promotors durchsucht. Tatsächlich wurde in 7 von 9 untersuchten Zelllinien und in 40% der untersuchten OvCa eine Promotorhypermethylierung detektiert. Das Erscheinen von Heteroduplices in den Elutionsprofilen wies auf eine partielle Methylierung in den meisten Zelllinien und OvCa hin. Der Methylierungsstatus korrelierte sowohl in den Zelllinien wie auch in den OvCa mit der IGFBP-4-Expression, da alle methylierten OvCa und Zelllinien sich durch einen Verlust der IGFBP-4-Expression auszeichneten. Die zwei Ausnahmefälle unter den methylierten Zelllinien – MCF7 und T47-D – die eine hohe IGFBP-4-Expression trotz partieller Methylierung zeigten, sind ein Hinweis, dass für eine vollständige Stilllegung der IGFBP-4-Expression ein ganz bestimmtes Methylierungsmuster erforderlich ist. Diese Hypothese müsste jedoch durch eine detaillierte Methylierungsmuster-Analyse verifiziert werden.

Durch Behandlung der hypermethylierten OvCa-Zelllinien HEY und SKOV3 mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5`-Aza-dC konnte eine vollständige IGFBP-4-Reexpression in diesen Zelllinien erreicht werden. Damit konnte ein funktioneller Nachweis erbracht werden, dass das IGFBP-4-Gen in humanen OvCa-Zelllinien und Ovarial-Tumoren durch Promotorhypermethylierung inaktiviert wird. Eine vergleichbare Promotor-Hypermethylierung wurde bislang nur für zwei weitere IGFBP-2 in Leber-Karzinomen (Chiba *et al*, 2005) und für das IGFBP-3 ebenfalls in Leberkarzinomen (Hanafusa *et al*, 2005 und 2002) und in NSCLC („non-small-cell-lung-cancer“-Tumoren (Chang *et al*, 2004 und 2002). Die Behandlung der hypermethylierten Zelllinien mit 5`-Aza-dC zeigte zudem, dass die Demethylierung des Promotors zur IGFBP-4-Reexpression zwar notwendig ist, alleine aber nicht ausreicht. Wie das Beispiel der ER-negativen MaCa-Zelllinie SKBR3 verdeutlichte, muss für eine IGFBP-4-Genaktivierung neben der Demethylierung des Promotors ein funktioneller Östrogen-Rezeptor vorhanden sein, der als transkriptioneller Aktivator wirkt. Erst nach Transfektion eines Östrogen-Rezeptors konnte nach der 5`-Aza-dC-Behandlung die IGFBP-4-Expression in den SKBR3-Zellen wieder reaktiviert werden. Dass für die 5`-Aza-dC-vermittelte Gen-Reaktivierung noch weitere spezifische transkriptionelle Aktivatoren erforderlich sind, wurde schon oft innerhalb von Methylierungsstudien beobachtet. So zeigte eine genomweite Microarray-Analyse von 3 Dickdarm-Tumor-Zelllinien und einer normalen Brustepithel-Zelllinie (HMEC) nach 5`-Aza-dC-Behandlung., dass Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor nur durchschnittlich 0,67% der über 25.000 untersuchten Gene aktivierte (Karpf *et al*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass viele der Gene, darunter v.a. zahlreiche Tumor-Antigene, nur in den Tumor-Zelllinien, nicht aber in den HMEC-Normalzellen reaktiviert wurden, obwohl in allen Zelllinien das 5`-Aza-dC zu einer gleich starken CpG-Demethylierung führte. Basierend auf diesen Ergebnissen schlugen die Autoren ein generelles Modell der 5`-Aza-dC-induzierten Gen-Reaktivierung vor. Das Modell unterscheidet 3 verschiedene Aktivierungs-Zustände eines Promotors: den durch Hypermethylierung „stillgelegten“ Zustand, den „permissiven“ Zustand und den aktivierten Zustand. Für viele nicht-gewebe-spezifischen Gene reicht ein Rückgang der Promotor-Hypermethylierung nach 5`-Aza-dC-Behandlung zur Gen-Expression aus. Bei stringenter regulierten Genen, darunter vielen tumorspezifischen Genen, führt die Promotor-Demethylierung lediglich zu einer Umwandlung des stillgelegten Promotors in einen „permissiven“ Promotor, der nun zugänglich ist für spezielle transkriptionelle Aktivatoren. Erst die Bindung dieser Faktoren an den unmethylierten Promotor führt zur Reaktivierung des Gens.

Im Fall von IGFBP-4 übernimmt der Östrogen-Rezeptor (ER) die Rolle eines solchen Transkriptions-Aktivators. Die ER-abhängige IGFBP-4-Regulation ist schon seit längerem bekannt. Die IGFBP-4-Expression in MaCa korreliert positiv mit dem ER-Status (Clemmons *et al*, 1990; Figueroa *et al*, 1993). 17 $\beta$ -Östradiol induziert IGFBP-4-mRNA und -Proteinexpression in ER-positiven Mamma-Karzinomen und Antiöstrogene wie das Tamoxifen inhibieren diese Antwort (Sheikh *et al*, 1993; Owens *et al*, 1993; Pratt und Pollak, 1993; Schrope *et al*, 1995). Unabhängige Microarray-Studien von ER-positiven MaCa-Zelllinien MCF7 (Wang DY *et al*, 2004; Inoue *et al*, 2002) und ZR-75-1 (Soulez und Parker, 2001) identifizierten das IGFBP-4 als ein Östrogen-induzierbares Gen. Eine Korrelation zwischen ER-Status und IGFBP-4-Expression konnte auch im Rahmen dieser Arbeit in Tumor-Zelllinien und OvCa nachgewiesen werden.

Bis jetzt ist noch wenig über den genauen Mechanismus der ER-vermittelten IGFBP-4-Aktivierung bekannt. Es wurden zwar keine klassischen palindromen ER-Bindesequenzen innerhalb des IGFBP-4-Promotors gefunden, dafür aber eine AP1- und zahlreiche Sp1-Bindestellen (Dai *et al*, 1997; Quin X *et al*, 1997), über die eine Östrogen-induzierte Transaktivierung ablaufen könnte (Porter *et al*, 1997; Duan *et al*, 1998; Wang F *et al*, 1998; Sun *et al*, 1998; Xie *et al*, 1999; Webb *et al*, 1995). Tatsächlich konnte Qin C *et al* 1999 zeigen, dass die Trans-Aktivierung von IGFBP-4 durch 17 $\beta$ -Östradiol in MCF7-Zellen durch zwei GC-reiche Sp1-Bindesequenzen innerhalb des IGFBP-4-Promotors reguliert wird. An diese Sequenzen bindet ein aktivierender ER/Sp1-Komplex, wobei die DNA-Bindung nur über das Sp1-Protein abläuft. Es wird vermutet, dass das mit Sp1 komplexierte ER nach Östrogen-Bindung einer Konformationsänderung unterliegt, die eine folgende Interaktion des ER/Sp1-Komplexes mit weiteren Coaktivatoren bzw. allgemeinen Transkriptionsfaktoren ermöglicht und zur Genstimulation führt. Eine weitere Studie zeigte, dass die Aktivierung über ER/Sp1-Komplexe zellspezifisch ist und von der Expression weiterer nukleärer Co-Aktivatoren und/oder Co-Repressoren abhängt (Saville *et al*, 2000). Laut CAT-Aktivitätsassays in MCF7- und MDA-MB 231-Zellen wird die Aktivierung von der AF1-Domäne des ER $\alpha$  vermittelt, unabhängig vom ER-Subtyp-Kontext. Dies konnte für die ER-abhängige IGFBP-4-Aktivierung nicht bestätigt werden. Die IGFBP-4-Expression in SKBR3-Zellen, die zuvor mit der AF1-Deletionsvariante des ER transfiziert wurden, war nach 5'-Aza-dC-Behandlung nur geringfügig schwächer als in den ER-Wildtyp-Transfektanten. Hier scheint eher die AF2-Domäne eine wichtigere, jedoch nicht essentielle Funktion zu spielen, denn ihre Deletion führt zu einer fast zweifach geringeren IGFBP-4-Reexpression als beim Wildtyp-ER.

Ob in den hier untersuchten OvCa-Zelllinien die E<sub>2</sub>-vermittelte IGFBP-4-Genaktivierung tatsächlich über solche ER $\alpha$ /Sp1-Komplexe stattfindet, wurde experimentell nicht untersucht. Es konnte zwar eine zum Teil starke IGFBP-4-Stimulation nach E<sub>2</sub>-Behandlung in ER-positiven MaCa-Zelllinien erreicht werden, doch eine vergleichbare E<sub>2</sub>-Behandlung der ER-positiven OvCa-Zelllinien HEY und SKOV3 lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Im Rahmen einer *in silico* Analyse des IGFBP-4-Promotorfragments mit Hilfe von zwei Transkriptionsfaktor-Bindestellen-Suchprogrammen wurden die von Qin beschriebenen GC-reichen Sequenzen als putative Sp1-Bindestellen identifiziert. Die IGFBP-4-Regulation wird jedoch nicht durch Modulation der Sp1-Expression vermittelt, da in allen untersuchten OvCa und Tumor-Zelllinien das Sp1-Protein ubiquitär exprimiert wurde, unabhängig vom Methylierungsstatus und IGFBP-4-Expressionslevel. Quin C hat in Bindungs- und Expressionsstudien gezeigt, dass Mutationen innerhalb der GC-reichen

Bindesequenzen, besonders Mutationen, die die dort lokalisierten CpG-Inseln betrafen, die Bindung des ER/Sp1-Komplexes und die Transaktivierung völlig verhinderten. In den hier untersuchten OvCa wurde keine Mutation innerhalb der beiden GC-reichen Sequenzen gefunden, jedoch wurde in 15 von 25 Tumoren eine Punktmutation C→A innerhalb einer CpG-Insel detektiert, die 36 bp sequenzabwärts von der -559/-553 Sp1-Bindestelle lag. Die Frage, ob diese Mutation sich funktionell auf diese benachbarte Sp1-Bindestelle auswirkt oder ob sie gegebenenfalls eine Methylierung an dieser Stelle verhindert, wurde im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr vertieft. In diesem Bereich befand sich jedenfalls laut Literatur und der Promotor-Computeranalyse keine bekannte TF-Bindestelle. Innerhalb des Promotors von IGFBP-3 ist ebenfalls eine polymorphe Variation im -202 Locus (A→C) bekannt. Interessanterweise wurde herausgefunden, dass sie die Serum-Spiegel von IGFBP-3 sowohl von gesunden Männern (Deal *et al*, 2001) wie auch von Brustkrebspatientinnen (Schernhammer *et al*, 2003) beeinflusst. In beiden Fällen war die IGFBP-3-Konzentration im Serum bei Personen mit einem AA-Genotyp am höchsten und verringerte sich schrittweise in Gegenwart von einer bzw. 2 Kopien des C-Allels. *In vitro*-Studien dokumentierten zudem eine signifikant stärkere Promotoraktivität des A-Allels im Vergleich mit dem C-Allel. Ob die detektierte Mutation im IGFBP-4-Promotor einen ähnlichen Einfluss auf den IGFBP-4-Proteinspiegel hat, wurde hier nicht geklärt.

Im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung von IGFBP-4 im Ovarial-Karzinom muss das Protein im Zusammenhang mit den anderen IGFBNs betrachtet werden, da zahlreiche Studien einen engen „crosstalk“ der einzelnen IGFBNs belegten. Dieser ist allein durch die Tatsache bedingt, dass alle IGFBNs innerhalb des selben IGF-Systems wirken und die IGF-Aktivität modulieren. Sie üben sowohl synergistische wie auch antagonistische Effekte aus und beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Expression. Das IGFBP-4 wird z.B. im Ovar durch IGFBP-2 und -5 reguliert. In atretischen Follikeln, die einen hohen IGFBP-4-Spiegel aufweisen, verhindern diese beiden IGFBNs durch ihre Heparin-Bindedomäne im C-Terminus die Proteolyse von IGFBP-4 (Mazerbourg *et al*, 2000). Auf ähnliche Weise können auch IGFBP-3- und -6 die IGFBP-4-Proteolyse durch die IGFBP-4-spezifische Protease PAPP-A blockieren (Fowlkes *et al* 1997). Zwei unabhängige Studien zur IGFBP-4-Rolle in Prostata-Karzinomen haben verdeutlicht, dass eine starke Veränderung der IGFBP-4-Expression, sei es durch Überexpression oder „knock-out“ durch antisense-cDNA, zu einer Expressionsveränderung anderer IGFBNs führt und dass die dabei beobachteten phänotypischen Effekte auf das Zusammenspiel mehrerer IGFBNs zurückzuführen sind. In der ersten Studie wurde das IGFBP-4-Protein in der Prostata-Karzinom-Zelllinie M12 überexprimiert, was zur verminderten Proliferation und Kolonie-Bildung im Soft-Agar, verstärkter Apoptose und verzögertem Tumorwachstum in Nackt-Mäusen führte (Damon *et al*, 1998). Erstaunlicherweise wurden in dem zweiten Experiment, in dem man in der gleichen Zelllinie die IGFBP-4-Expression mit antisense-cDNA inhibierte, genau die gleichen Beobachtungen gemacht, obwohl hier eigentlich umgekehrte Effekte zu erwarten wären (Drivdahl *et al*, 2001). Erst die genaue Untersuchung der Expressionshöhen anderer IGFBNs lieferte eine Erklärung für dieses Phänomen. Die Reduktion der IGFBP-4-Expression in M12-Zellen löste nämlich gleichzeitig eine derart starke Hochregulierung von IGFBP-3 und -6 aus, dass die verminderte IGFBP-4-Wirkung durch die beiden anderen IGFBNs nicht nur vollständig kompensiert werden konnte sondern sogar noch tumor-inhibierende Effekte erzeugte. Die IGFBP-4-Überexpression in M12-Zellen bewirkte hingegen eine verminderte IGFBP-2-Expression, die den antitumoralen Effekt von IGFBP-4 wahrscheinlich noch verstärkte.

Da beide Studien einen Zusammenhang der IGFBP-4-Expression mit der Expression der IGF-Bindeproteine 2, 3 und 6 belegten, wurde die Expression dieser IGFBPs in OvCa und Tumor-Zelllinien untersucht. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der IGFBP-4-Expression und der Expression der anderen IGFBPs festgestellt werden. Nur in IGFBP-4-HEY-Transfektanten wurde die IGFBP-4-Überexpression von einem deutlichen Rückgang der IGFBP-6-Expression begleitet. Über einen möglichen Einfluss dieses Expressionsrückgangs auf den Phänotyp der transfizierten Zellen wird noch im nächsten Kapitel näher diskutiert. Der entgegengesetzte Effekt nach IGFBP-4-Inaktivierung, so wie ihn Drivdahl beobachtete, war jedoch in den MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten nur ansatzweise sichtbar.

### 5.3 Funktionelle Bedeutung des IGFBP-4 im Ovarial-Karzinom

Es ist bereits unbestritten, dass die IGFs wichtige Mediatoren für das Wachstum und Entwicklung von Zellen sind. Die proliferationsfördernde Wirkung von IGF sowohl in gesunden wie auch malignen Zellen wird v.a. über den ras/raf/MAP-Kinase-Signalweg vermittelt. Dieser wird über die Bindung des phosphorylierten IRS-1-Substrats an die Signalproteine shc oder grb2 und die anschließende Kopplung an das Sos-Protein aktiviert (Skolnik *et al*, 1993). Über die Phosphorylierung der MKK1 (MAP Kinase kinase 1) und MKK2 werden schließlich die zwei MAP-Kinasen Erk-1 (extracellular signal related protein kinase 1) und Erk-2 aktiviert, die dann in den Zellkern gelangen und dort zahlreiche Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, wie c-fos, c-jun und c-myc. Das IGFBP-4 wirkt – wie bereits für viele Zelltypen gezeigt wurde – als Zellproliferations-Inhibitor, weil es anscheinend durch das Abfangen der IGF-Moleküle den IGF-IR-Signalweg unterbindet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine ähnliche proliferationshemmende Wirkung des IGFBP-4-Proteins in OvCa-Zelllinien festgestellt werden. Nach der Reexpression von IGFBP-4 nach 5'-Aza-dC-Behandlung wurde eine verminderte Zellproliferation der betroffenen HEY-Zellen beobachtet. Da jedoch hier die cytotoxische Wirkung des Cytosins-Analogs die Ergebnisse beeinflusste, wurde der mögliche anti-mitogene IGFBP-4-Effekt in HEY-IGFBP-4-Transfektanten und MDAH-siRNA-Transfektanten verifiziert. Die IGFBP-4 hoch-exprimierenden HEY-Transfektanten zeigten ebenfalls um ca. ein Drittel vermindertes Zellwachstum im Vergleich zu Kontroll-Zellen, wobei dieser Effekt für die gesamte Versuchsdauer von 4 Tagen anhielt. Die mit der IGFBP-4-siRNA transfizierten MDAH-Zellen zeigten im Vergleich zu untransfizierten und mit Leervektor transfizierten Zellen kein verändertes Wachstumsverhalten, was möglicherweise darauf hinweist, dass die gewünschte IGFBP-4-Runterregulierung über siRNA nur auf der mRNA- nicht jedoch auf der Protein-Ebene erreicht wurde.

Der beobachtete Proliferationsrückgang der HEY-Transfektanten könnte als zu gering erscheinen – im Vergleich zu der sehr starken IGFBP-4-Überexpression in diesen Zellen. Ausgehend von der im Western-Blot nachgewiesenen enormen IGFBP-4-Proteinmenge im Zellüberstand der IGFBP-4-Transfektanten dürfte man annehmen, dass das im solchen Überschuss befindliche Bindeprotein alle IGF-Moleküle im Zellkulturmedium restlos abfangen und somit zu einer wesentlich stärkeren Wachstumshemmung führen müsste. Die Zunahme der IGFBP-4-Proteinmenge in den IGFBP-4-Transfektanten war jedoch gleichzeitig mit einem Expressionsrückgang von IGFBP-6 verbunden. Verringerte IGFBP-6-Mengen könnten z.B. eine erhöhte Bioverfügbarkeit des anderen Wachstumsfaktors IGF-II hervorrufen – IGFBP-6 weist eine

viel höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I auf – und so den antiproliferativen Effekt des IGFBP-4 etwas abschwächen. Es liegt nahe, dass die HEY-Zellen nicht nur durch das IGF-I mitogen stimuliert werden. Für andere OvCa-Zelllinien wurde der Einfluss anderer Wachstumsfaktoren bereits gezeigt. Müller *et al* (2000) konnte durch Zugabe eines IGF-I-Antikörpers die basale Proliferation von NIH:OVCAR-3-Zellen nicht hemmen, hingegen bewirkte die Zugabe eines IGF-IR-AK eine starke Inhibition, so dass die Autoren die IGF-IR-Aktivierung durch einen weiteren Liganden postulierten.

Western-Blot-Untersuchungen belegten, dass die anti-proliferative IGFBP-4-Wirkung in den HEY-IGFBP-4-Transfektanten über die Hemmung der MAPK-Aktivierung vermittelt wird. Das in den HEY-Transfektanten hoch exprimierte IGFBP-4 inhibierte fast vollständig die IGF-I stimulierte Erk1/Erk2-Phosphorylierung, selbst bei relativ hohen IGF-I-Konzentrationen. Die relative Menge der aktivierten Erk-Proteine war hier nach IGF-Stimulation nicht wesentlich höher als in den unstimulierten, im Serum-freien Medium kultivierten Zellen. Diese zeigten eine zwar schwache, aber dennoch deutliche MAPK-Basalaktivität, die bei den HEY-Transfektanten etwas geringer war. Diese basale MAPK-Aktivierung kann nicht nur durch eine endogene IGF-I-Produktion erklärt werden, da diese in den HEY-Transfektanten durch den IGFBP-4-Überschuss völlig kompensiert werden müsste. Eher ist es ein Hinweis, dass in den HEY-Zellen entweder neben dem IGF-I auch andere, wahrscheinlich autokrin produzierte Liganden über den IGF-IR-Rezeptor oder über einen anderen Signalweg eine basale MAPK-Aktivität aufrechterhalten. Die erfolgreiche *in vitro* Zucht von embryonalen Maus-Fibroblasten, die keinen IGF-I-Rezeptor (IGFI-IR) exprimieren ist ein Beweis, dass der IGF-IR für das Zellwachstum nicht unentbehrlich ist. Einige Studien belegen, dass die IGF-I-Achse zwar für die initiale Zell-Transformation essentiell ist, jedoch in der späteren Tumor-Progression an Bedeutung verliert. Am Beispiel des Prostata-Karzinoms konnte gezeigt werden, wie im Laufe der Entwicklung von der benignen, immortalisierten Zelllinie P69 bis zu der malignen M12-Zelllinie es zu einer Abnahme der an der Zelloberfläche exprimierten IGF-I-Rezeptoren und zur Abschwächung der IGF-Antwort kommt (Plymate *et al*, 1996 und 1997). Die Hey-Zellen könnten eine ähnliche Unabhängigkeit von exogenem IGF-I erlangt haben, sei es durch Ankurbelung der autokrinen IGF-I-Produktion, durch Verstärkung des Post-Rezeptor-Signallings oder durch ein Ausweichen auf andere Signalwege. Es gibt Hinweise, dass gerade die Tumorzellen die IGF-Achse umgehen, in dem sie andere Signalwege verstärkt nutzen. Dies ist im Fall des IGF-Signalweges relativ leicht, denn die durch diesen Weg aktivierten Effektormoleküle werden auch von zahlreichen anderen Signal-Kaskaden angesprochen. Die IGFs selbst wirken synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren und es gibt wichtige Interaktionen zwischen dem IGF-IR und Östrogen- bzw. EGF-Rezeptoren (Lee *et al*, 2001). In MaCa-Zellen verstärken Östrogene den mitogenen IGF-I-Effekt und induzieren die IGF-I-, IRS-1- und IGF-IR-Expression (Ruan *et al*, 1995; Stewart *et al*, 1990; Thorsen *et al*, 1992; Clarke *et al*, 1997; Lee *et al*, 1999). Östrogene hemmen im Brustgewebe die Synthese von einigen IGFBPs (Owens *et al*, 1993; Manni *et al*, 1994; Huynh *et al*, 1996) und erhöhen die Konzentration an iGFBP-Proteasen (Mathieu *et al*, 1991). Auf der anderen Seite erhöht das IGF-I die transkriptionelle Aktivität von ER und verstärkt damit die Expression ER-abhängiger Gene, wie z.B. des Progesteron-Rezeptors (Lee *et al*, 1997) und auch des IGFBP-4. Da das direkte Target-Protein des IGF-I-Rezeptors, das IRS-1, auch durch Insulin über den Insulin-Rezeptor aktiviert werden kann, besteht zwischen dem IGF-I und dem Insulin-Signalweg ein enger Zusammenhang. Gerade für OvCa-Zellen, wie z.B. die HEY-Zellen, ist es sehr wahrscheinlich dass sie den Insulin-Weg alternativ zum IGF-I-Weg nutzen. Insulin nimmt nämlich auch,

neben dem IGF-I, an der Regulation der Steroidgenese und Ovulation teil, obwohl das Ovar nicht zu den klassischen Ziel-Organen des Insulins gehört (Poretsky *et al*, 1999). In Granulosa-Zellen stimuliert es die Progesteron-Produktion und IGF-IR-Expression sowie erhöht die Bioverfügbarkeit von IGFs durch IGFBP-1-Runterregulierung (Poretzky *et al*, 1996 und 1998). Es ist nicht auszuschließen, dass die HEY-Transfektanten den durch den IGFBP-4-Überschuss verursachten IGF-Mangel durch einen „Umschalt-Mechanismus“ auf den Insulin-Signalweg (vermittelt über den klassischen Insulin-Rezeptor oder auch über den IGF-IR) rekompensieren.

Die MTS-Proliferationsassays und die Western-Blots von HEY-IGFBP-4-Transfektanten belegten, dass das IGFBP4 die IGF-I-vermittelte Proliferation von OvCa-Zellen durch Hemmung der MAPK-Aktivierung abschwächt. Ob diese Hemmung alleine auf die Sequestrierung der IGF-I-Moleküle zurückzuführen ist oder ob hier auch IGF-unabhängige Mechanismen eine Rolle spielen, konnte anhand der durchgeführten Versuche nicht beantwortet werden. Hierzu müsste man die HEY-Transfektanten mit einem hohen IGF-I-Überschuss bzw. mit dem IGF-I-Analog *des(1-3)*IGF-I, welches den IGF-IR aktiviert aber an keine IGFBPs bindet, behandeln. Eine in Gegenwart von *des(1-3)* IGF-I zu beobachtende Proliferationshemmung bzw. MAPK-Inhibition würden auf IGF-unabhängige IGFBP-4-Effekte hindeuten. Die geringere MAPK-Aktivierung in den HEY-Transfektanten nach EGF-Stimulation würde die Hypothese unterstützen, dass hier das IGFBP-4 zumindest zum Teil IGF-unabhängig wirkt. Da jedoch der gleiche Effekt bei den MDAH-siRNA-Transfektanten beobachtet wurde, bleibt es fraglich ob dieser tatsächlich IGFBP-4 spezifisch ist. Proliferationsstudien von zahlreichen Tumor-Zelllinien, auch OvCa-Zelllinien, in denen eine vergleichbare Wachstumshemmung durch IGF-IR-Antikörper bzw. IGF-IR-antisense-Strategien erzielt wurde sprechen dafür, dass der IGFBP-4-vermittelte Effekt auf der direkten Blockierung des IGF-IR-Signalweges über Liganden-Entzug basiert. Auf der anderen Seite gibt es das IGFBP-3 Hinweise, dass es die Aktivierung des IGF-IR-Rezeptors ohne IGF-Bindung direkt über die Aktivierung einer spezifischen Phosphotyrosin-Phosphatase hemmen kann (Ricort und Binoux, 2002). Durch die Aktivierung dieser Phosphotyrosin-Phosphatase wurde die durch IGF-I-Bindung stimulierte IGF-I-Rezeptor-Phosphorylierung rückgängig gemacht und damit die Aktivierung der zwei wichtigen „downstream“-Signalkaskaden, des PI3-Kinase- und des MAPK-Signalweges gehemmt. Somit konnte das IGFBP-3 auch bei IGF-I Überschuss die mitogene IGF-IR-Wirkung effektiv unterbinden. Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für das IGFBP-4 in Frage kommt, müsste in weiteren Experimenten geklärt werden.

Der IGF-I-Rezeptor spielt nicht nur für die Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle sondern ist auch entscheidend, wenn nicht sogar unentbehrlich für die Transformation von Tumorzellen und den Erhalt des transformierten Phänotyps (Baserga *et al*, 2003). Sell *et al* entdeckte 1993, dass IGF-IR-negative Maus-Fibroblasten sich im Gegensatz zu ihren parentalen, IGF-IR-positiven 3T3-Fibroblasten durch keines der bekannten viralen oder zellulären Onkogene transformieren ließen. Erst nach Wiedereinführung des IGF-I-Rezeptors erlangten die Zellen ihre Fähigkeit zur Transformation (Morrison *et al*, 2002). IGF-IR-anti-sense-Strategien, IGF-IR-Antikörper und die Expression von dominant-negativen IGF-IR-Konstrukten führten zu einer Umkehr des transformierten Zell-Phänotyps *in vitro* und zur Inhibition der Tumor- und Metastasen-Bildung *in vivo* (Übersicht in Grothey *et al*, 1999). Zusätzlich zu dem transformierenden Effekt der IGF-IR-Aktivierung wurde gezeigt, dass das IGF-I die Expression von

Metalloproteinasen reguliert und somit die invasiven Fähigkeiten von malignen Zellen beeinflusst (Long *et al*, 1998).

Die wichtigsten onkogenen Merkmale transformierter Zellen sind neben der ungehemmten Proliferation ihr verankerungs-unabhängiges Wachstum („anchorage-independent growth“) und die Fähigkeit zur Metastasierung. Normale adhärenente Zellen gehen kurz nach dem Kontaktverlust zu ihrem Substrat in die Apoptose über, ein Phänomen, das als „Anoikis“ bekannt ist. *In vitro*-transformierte Krebs-Zellen hingegen haben die Fähigkeit, ohne einen Kontakt zu der extrazellulären Matrix (ECM) und außerhalb des Zellverbandes zu überleben und zu wachsen. Dabei scheint der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)- und zum Teil der MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle zu spielen (Wang LH, 2004). Beide Signalwege werden über den IGF-I-Rezeptor reguliert, so dass sowohl die IGFs wie auch die IGF-Bindeproteine entscheidend die Zell-Adhäsion und Migration beeinflussen. IGF-I verstärkt die Zelladhäsion an Matrix-Proteine und einige IGFBPs, wie z.B. das IGFBP-1 können diesen Effekt blockieren (Imay *et al*, 1997; Leng *et al*, 2001; Zhang und Yee 2002). Eine Runterregulierung der IGF-I-Expression führte zur verminderter Integrin- $\beta$ 1-Expression und damit zur Stimulation des verankerungs-unabhängigen Wachstums (Tashiro *et al*, 2003). Die IGF-Bindeproteine IGFBP-1- und-2 besitzen in ihrer C-terminalen Domäne ein RGD-Integrin-Bindemotif und zumindest für das IGFBP-1 konnte ein IGF-unabhängiger Effekt auf die Zelladhäsion über die Bindung an den Fibronectin-Rezeptor nachgewiesen werden (Jones *et al*, 1993). Auch für das IGFBP-4 gibt es Hinweise auf eine Beteiligung an Zell-Adhäsions- und Invasions-Prozessen, obwohl es nicht über ein solches RGD-Motiv verfügt. In der bereits erwähnten Studie von Damon *et al* (1998) resultierte die Überexpression von IGFBP-4 in der Prostata-Karzinom-Zelllinie M12 in einer signifikanten Inhibition der Kolonie-Bildung im Soft Agar, jedoch war dieser Effekt nicht lang anhaltend. Die Transkriptom-Analyse der Dickdarm-Karzinom-Zelllinie LS1034 nach IGFBP-4-Überexpression zeigte, dass IGFBP-4 die Expression einiger an der Zell-Bewegung beteiligten Gene reguliert, wie z.B. der Calpain Protease CAPN2, Ezrin und COX-2, und damit zur Reduktion der Zell-Migration und Tumor-Ausbreitung beiträgt (Diehl *et al* 2004). Zudem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die oben genannte Zelllinie sich durch eine stark reduzierte Proliferation, Zellmigration im Matrigel und Kolonien-Bildung im semi-solidem Medium auszeichnete. Interessant war, dass der IGFBP-4-vermittelte Effekt auf das verankerungs-unabhängige Wachstum IGF-unabhängig war.

Die Untersuchungen der HEY-IGFBP-4-Transfektanten und der MDAH-IGFBP-4-siRNA-Transfektanten bezüglich ihrer Fähigkeit zum verankerungs-unabhängigem Wachstum und zur Invasion im Poly-HEMA-, Soft-Agar- und im Invasions-Assay lieferten keine eindeutigen Hinweise für eine Beteiligung des IGFBP-4-Proteins an diesen Prozessen. Die HEY-IGFBP-4-Transfektanten zeigten zwar ein etwas verringertes Wachstum auf Poly-HEMA beschichteten Platten, dieser Befund konnte aber im Soft-Agar-Assay nicht überzeugend reproduziert werden. Der Einfluss des IGFBP-4-Proteins auf die Invasion von OvCa-Zellen konnte nicht eindeutig geklärt werden, da die für den Invasionsassay eingesetzte HEY-Zelllinie sich grundsätzlich als zu wenig invasiv erwies, um im Rahmen des Versuches eine IGFBP-4-vermittelte Hemmung der Zell-Migration zu zeigen.

Bereits seit mehreren Jahren ist bekannt, dass der IGF-I-Rezeptor und seine Liganden auch als „survival“-Faktoren wirken und den apoptotischen Zelltod verhindern. Gerade für die Therapie des

Ovarial-Karzinoms ist die Apoptose ein Schlüssel-Mechanismus, da sie oft über den Erfolg einer Behandlung entscheidet. Die bevorzugte Chemotherapie der Ovarialtumore wird durch die sehr häufig auftretenden Chemoresistenzen erschwert. Heute weiß man, dass die Wirkung eines chemotherapeutischen Mittels auf einen Tumor wesentlich durch die Fähigkeit der Krebszellen zur Apoptose bestimmt wird und dass eine Fehlregulation von pro- und anti-apoptischen Signalwegen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Chemoresistenzen spielt (Fraser *et al*, 2003a). Die Entscheidung, ob eine Tumorzelle als Antwort auf ein Cytostatikum stirbt oder nicht wird von dem Gleichgewicht von pro- und anti-apoptischen Faktoren in der Zelle bestimmt und eine Störung dieses Gleichgewichtes kann zur Entwicklung einer Chemoresistenz führen.

IGFs tragen durch das über den IGF-IR vermittelte anti-apoptische Signalling wesentlich zur Entwicklung von Chemoresistenzen bei. In physiologischen Konzentrationen schützen IGF-I und IGF-II viele Zelltypen vor einer Vielzahl von apoptotischen Stimuli, wie Etoposid, Überexpression von c-myc, Wachstumsfaktor-Mangel, Fas-Aktivierung und UVB-Bestrahlung (Übersicht in Butt *et al*, 1999). Die Unterbrechung des IGF/IGF-IR-Signalweges durch Inhibierung der IGF-I, IGF-II oder der IGF-IR-Funktion führt meistens zu einer massiven Apoptose *in vitro* (Lamm *et al*, 1998; Stewart *et al*, 1996; Rininsland *et al*, 1997; Yin *et al*, 1998). Auch *in vivo* löst eine Reduktion der IGF-I und IGF-IR-Expression die Apoptose aus (Petrik *et al*, 1998; Christofori *et al*, 1994; Neunschwander, 1996). Die Signalwege, über die der IGF-I-Rezeptor die Zellen vor Apoptose schützt sind gut bekannt. Die Haupt-Signalkaskade wird durch die Interaktion des Rezeptors mit IRS-1 initiiert, die anschließend zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges führt, welcher wiederum den Akt/Protein B-Kinase-Signalweg einschaltet. Ebenfalls ist bekannt, dass der IGF-IR anti-apoptische Signale auch über alternative Signalwege vermittelt, wie z.B. über den MAPK-Weg durch Aktivierung des Shc-Proteins (Scheid *et al*, 1998) oder über die Interaktion mit 14.3.3-Proteinen und Translokation von c-Raf und Nedd4 in die Mitochondrien (Peruzzi *et al*, 2001). Alle drei Signalwege führen schließlich zur Phosphorylierung und damit zur Inaktivierung des pro-apoptischen Proteins Bad und zur Hemmung von Caspasen (Singleton *et al*, 1996; Wang *et al*, 1998; Suzuki *et al*, 1998; Yung *et al*, 1996).

Das IGFBP-4 als IGF-I-Modulator könnte neben seiner anti-proliferativen Wirkung auch Einfluss auf die Apoptose von OvCa-Zellen haben. Für das viel besser untersuchte IGFBP-3 wird sogar postuliert, dass die antiproliferative Wirkung des Proteins hauptsächlich auf eine Förderung der Apoptose zurückzuführen ist (Butt und Williams, 2001). Eine Behandlung der MaCa-Zelllinie MCF7 mit rekombinantem IGFBP-3 führte z.B. zu einem 3,5-fachen Anstieg der Apoptose-Induktion (Nickerson *et al*, 1999). Für das IGFBP-4 gibt es ebenfalls sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* Hinweise auf eine Beteiligung an der Apoptose. Eine durch Kastration induzierte Apoptose im Prostata-Gewebe von Ratten wird durch eine Erhöhung der IGFBP-4-Expression begleitet (Bruyninx *et al*, 2000) und IGFBP-4-transgene Mäuse zeigen eine erniedrigte Zellproliferation und erhöhte Apoptose in Thymus und Milz (Zhou *et al*, 2004). *In vitro* führte die Überexpression von IGFBP-4 in Prostata-Karzinom-Zellen zur verstärkten Apoptose nach 6-Hydroxyurea-Behandlung (Damon *et al*, 1998). Gerade im Ovar übernimmt das IGFBP-4 eine wichtige Rolle innerhalb der apoptotischer Prozesse während der Follikelreifung. Wie bereits erwähnt, weisen atretische Follikel deutlich höhere IGFBP-4-Konzentrationen auf als gesunde Follikel. Das in Granulosa-Zellen Apoptose-vermittelnde INF-gamma erhöht den IGFBP-4-Protein-Level und hemmt die IGFBP-4-

Protease-Aktivität in diesen Zellen (Cataldo *et al*, 1998). Die nachgewiesene IGFBP-4-Runterregulierung in den OvCa könnte die Ursache dafür sein, dass diese Zellen unempfindlich gegenüber apoptotischen Signalen werden und damit ungehemmt wachsen können.

Tatsächlich konnte anhand von Kritallviolett-Assays und FACS-Analysen gezeigt werden, dass die IGFBP-4-hochexprimierenden HEY-Transfektanten verstärkt auf die apoptotische Wirkung von Etoposid reagieren. Der durch IGFBP-4 vermittelte pro-apoptotischer Effekt scheint dabei abhängig vom apoptotischen Stimulus zu sein, da weder die Behandlung mit CD95-Antikörper, TRAIL noch Staurosporin zur verstärkten Apoptose in den HEY-IGFBP-4-Transfektanten führte. Im Gegensatz zu IGFBP-3, welches ohne zusätzliche apoptotische Stimuli selbst die Apoptose auslösen kann, wirkt das IGFBP-4 nur in Gegenwart von Etoposid. Unbehandelte IGFBP-4-Transfektanten zeigen keine erhöhte Apoptose im Vergleich zu mit Leervektor transfizierten Zellen. Damit scheint das IGFBP-4 eine Vermittler-Rolle innerhalb des Apoptose-Mechanismus als Verstärker des durch Etoposid ausgelösten Zelltod-Signals zu spielen. Auch für das IGFBP-3 wurde eine Verstärkung der Apoptose nach Bestrahlung (Williams *et al*, 2000; Butt *et al*, 2000) und Ceramid-Behandlung (Gill *et al*, 1997) beschrieben. Es wird vermutet, dass das IGFBP-3 dabei mit verschiedenen intrazellulären Mediatoren der Apoptose interagiert. So ist die IGFBP-3-Expression in humanen MaCa-Zellen mit einer signifikanten Zunahme der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bad und einer Abnahme der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL assoziiert (Butt *et al*, 2000). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die IGFBP-3-Expression in MCF7-Zellen zur IGF-unabhängigen Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und der Caspase-7 führt (Kim *et al*, 2004) und dass ein Caspasen-Inhibitor die IGFBP-3 vermittelte Apoptose in T47-D-Zellen blockiert (Butt *et al*, 2002).

Da die verstärkte Apoptose von HEY-IGFBP-4-Transfektanten speziell in Gegenwart von Etoposid beobachtet wurde, stellt sich die Frage ob die Art der durch das Etoposid ausgelösten Zellantwort den IGFBP-4-Effekt bestimmt. Etoposid induziert DNA-Doppelstrangbrüche und verursacht als ein Topoisomerase-II-Inhibitor einen p53-unabhängigen G<sub>2</sub>-Zellzyklus-Arrest, wie anhand von embryonalen Maus-Fibroblasten gezeigt wurde (Attardi *et al*, 2004). Die FACS-Analysen veranschaulichten, dass der gleiche Effekt in der HEY-Zelllinie ausgelöst wurde. Die steigende Etoposid-Konzentration führte zu einer Akkumulierung der Zellen in der späten S/G<sub>2</sub>-Phase. Die mit Leervektor transfizierten HEY-Zellen verblieben auch bei hohen Etoposid-Konzentrationen in diesem G<sub>2</sub>-Arrest, die mit IGFBP-4 transfizierten Zellen hingegen gingen schon ab einer Etoposid-Konzentration von 5 µM deutlich in die Apoptose über, die dann mit weiterer Etoposid-Zunahme immer stärker wurde.

Die Schlüsselrolle in der Zellantwort auf eine DNA-Schädigung, wie sie von Etoposid verursacht wird, übernimmt das p53-Protein, welches entweder einen G<sub>1</sub>-Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose induziert. Diese Effekte werden über die Aktivierung verschiedener „downstream“ Gene vermittelt, wie z.B. p21/WAF (Zellzyklus-Arrest) oder Bax (Apoptose). Die Mechanismen, die zur Entscheidung für einen Zellzyklus-Arrest oder Apoptose beitragen, sind noch nicht völlig aufgeklärt. Man glaubt aber, dass sie von der Verfügbarkeit von verschiedenen „Survival“-Faktoren abhängen und dass das p53-Protein verschiedene Zustände annehmen kann, in denen es entweder die Zellzyklus-Progression hemmt oder die Apoptose auslöst. Entsprechend konnten p53-Mutanten konstruiert werden, denen entweder die

Fähigkeit zur Zellzyklus-Arrest-Induktion oder zur Apoptose-Induktion fehlte. Eine DNA-Schädigung konnte nur in p53-Wildtyp exprimierenden MaCa-Zellen Apoptose hervorrufen, wobei dem programmierten Zelltod eine IGFBP-3-Hochregulierung vorausgegangen ist. In MaCa-Zellen, die mutierte Formen des p53-Proteins exprimierten, konnte erst nach einer IGFBP-3-Überexpression eine entsprechende Apoptose ausgelöst werden (Butt 1999). Damit scheint das IGFBP-3 ein wichtiger Mediator für die p53-abhängige Apoptose zu sein. Tatsächlich fand man innerhalb des 1. und 2. Introns und im p53-Promotor 3 Bindestellen (Buckbinder *et al*, 1995; Bourdon *et al*, 1997), an die nur das Wildtyp-p53-Protein binden und eine Induktion eines Reporter-Plasmids induzieren konnte. Ob das IGFBP-4 auf ähnlich direkte Weise mit dem p53-Protein zusammenhängt, ist eher fraglich, da bislang keine p53-Bindestellen innerhalb des Gens identifiziert wurden. Wahrscheinlicher ist es, dass das IGFBP-4 indirekt über die Modulation des IGF-Systems die pro-apoptotische Wirkung des p53-Proteins unterstützt, da p53 zusätzlich seinen pro-apoptotischen Effekt über eine direkte transkriptionelle Repression der IGF-IR-Promotoraktivität vermittelt (Werner 1998). Der durch das IGFBP-4 zusätzlich ausgelöste IGF-I-Entzug könnte zusammen mit der p53-vermittelten Runterregulierung des IGF-I-Rezeptors das Gleichgewicht von pro- und anti-apoptotischen Faktoren zugunsten der pro-apoptotischen Signale verschieben, so dass sich die Zelle letztendlich für eine Apoptose „entscheidet“. Der Befund, dass der pro-apoptotische Effekt von IGFBP-4 durch das ins Zellkulturmedium sezernierte Protein vermittelt wird, bestärkt zusätzlich die Annahme, dass das IGFBP-4 über die IGF-I-Sequestrierung die Apoptose fördert.

Nachdem der pro-apoptotische Effekt von IGFBP-4 in OvCa eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde versucht zu klären, über welche Signalwege dieser Effekt vermittelt wird. Da Etoposid bekannterweise den mitochondrialen Weg der Apoptose auslöst, wurde die Aktivierung der für diesen Weg spezifischen Caspase-9 und der „downstream“ Effektor-Caspase-3 untersucht. Das Etoposid löste sowohl in den mit Leervektor wie auch in den mit IGFBP-4 transfizierten HEY-Zellen eine Aktivierung der beiden Caspasen aus. In den IGFBP-4-Transfektanten erfolgte diese Aktivierung aber deutlich schneller und wurde mit der Zeit auch deutlich stärker als in den Kontrollzellen. Nach 24 Stunden Etoposid-Behandlung – dem Zeitraum, in dem der Unterschied in der Apoptose-Rate der beiden Zelltypen unter dem Mikroskop am deutlichsten zu erkennen war – zeigten die IGFBP-4-Transfektanten eine mehr als doppelt so starke Caspasen-Aktivierung wie die Kontrollzellen. Es blieb die Frage, ob das IGFBP-4 über Stimulation pro-apoptotischer Signalkaskaden, z.B. nach Bindung an einen hypothetischen Membranrezeptor, zur verstärkten Caspasen-Aktivierung beiträgt oder ob diese eine Folge der durch IGFBP-4 verminderten Bioverfügbarkeit des IGF-I ist.

Im Rahmen der apoptotischen Antwort löst das IGF-I über die Bindung an seinen Rezeptor die Aktivierung des „Survival“-PI3K/Akt-Signalweges aus, der die Apoptose wahrscheinlich über die Hochregulierung des anti-apoptotischen Faktors Xiap (Asselin *et al*, 2001) und über die Aktivierung des MDM2-Proteins (Murine Double Minute-2) hemmt. Der Phosphoinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg scheint gerade in der Apoptose von Ovarial-Karzinom-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Die Signalproteine innerhalb dieser Kaskade liegen in OvCa oft verändert vor und hohe PI3K- und Akt-Levels werden mit schlechter Prognose und Chemoresistenz assoziiert (Cheng *et al*, 2002). Amplifikationen bzw. Mutationen von Akt und der Untereinheiten der PI3-Kinase wurden in Brust- Ovar- und Bauchspeicheldrüsen-Tumoren detektiert (Cheng *et al*, 1996; Shayesteh *et al*, 1999; Bellacosa *et al*,

1995; Ruggeri *et al*, 1998; Philip *et al*, 2001; Jimenez *et al*, 1998). OvCa-Zellen, die ein konstitutiv aktives Akt2 (Yuan *et al*, 2003; Fraser *et al*, 2003b) bzw. eine konstitutiv aktive PI3-Kinase exprimierten (Hu *et al*, 2003), waren resistent gegenüber Cisplatin bzw. Paclitaxel und diese Resistenz konnte oft durch den Einsatz eines PI3K-Inhibitors überwunden werden. Das sezernierte IGFBP-4-Protein könnte durch das Abfangen der IGF-I-Moleküle die Aktivierung dieses „Survival“-Signalweges in den OvCa-Zellen unterbinden und eine verstärkte Apoptose als Etoposid Antwort ermöglichen. Diese Hypothese wird von der Studie von Tanaka *et al* (2004) unterstützt, in der gezeigt wurde, dass die Expression einer antisense-cDNA für PAPP-A, einer IGFBP-4-spezifischen Protease, in HRA-OvCa-Zellen zu einer Erhöhung des IGFBP-4-Proteinlevels und zur schwächeren Akt-Aktivierung durch IGF-I führte.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot-Experimente von IGF-I stimulierten HEY-Transfektanten bestätigten die Annahme, dass das IGFBP-4-Protein durch das Abfangen der IGF-I-Moleküle die Aktivierung des Akt-„Survival“-Signalweges vermindert. Western-Blot-Analysen von Etoposid-behandelten HEY-Transfektanten zeigten, dass das IGFBP-4-Protein zur Verstärkung der Etoposid-vermittelten Apoptose führt – zum einen über die verstärkte Aktivierung von pro-apoptotischen Caspasen und zum anderen über die Hemmung der Akt-Aktivierung. Diese beiden IGFBP-4-Effekte, da sie ohne Zusatz von exogenem IGF-I zu beobachten waren, würden – neben der IGF-Sequestrierung – auch auf eine Beteiligung von IGF-unabhängigen Mechanismen hindeuten. Für das IGFBP-3 wurde ein solcher direkter Einfluss auf die Apoptose in Prostata-Karzinomzellen bereits nachgewiesen (Rajah *et al*, 2002). Das IGFBP-3 inaktiviert in diesen Zellen über Induktion der Serin-Phosphorylierung das anti-apoptotische Bcl-2-Protein, so dass dadurch die Aktivität der pro-apoptotischen Bax-Proteine überwiegt und es zur Caspasen-Aktivierung kommt. Die Autoren dieser Arbeit postulieren, dass das IGFBP-3 hierbei über einen putativen Transmembranrezeptor wirkt. Zahlreiche andere Studien belegten die IGF-unabhängige IGFBP-3-Wirkung auf die Apoptose: IGFBP-3 induzierte Apoptose in IGF-IR-negativen Maus-Fibroblasten (Rajah *et al*, 1997) und in PC-3-Prostata-Karzinom-Zellen in Gegenwart eines starken IGF-I-Überschusses (Gill *et al*, 1997). IGFBP-3-Mutanten, die selbst keine IGFs binden, konnten ebenfalls PC3-Zellen zur Apoptose stimulieren (Hong *et al*, 2002). Auch für das IGFBP-4 gibt es Hinweise für Effekte, die ohne Beteiligung des IGF/IGF-IR-Systems ausgeübt werden. IGFBP-4 inhibierte die Steroidhormon-Produktion von Granulosazellen auch in Gegenwart eines IGF-IR-Antikörpers (Wright *et al*, 2002) und hemmte den mitogenen IGF-Einfluss auf HT29-Adenokarzinomzellen trotz eines IGF-I/Insulin-Überschusses (Sigh *et al*, 1994). Den bislang einzigen Hinweis für IGF-unabhängige IGFBP-4-Effekte auf die Apoptose liefert die Arbeit von Perks *et al* (1999), in der jedoch eine inhibierende Wirkung des IGFBP-4 auf die Ceramid-induzierte Apoptose in IGF-IR-negativen Hs578T-MaCa-Zellen berichtet wurde.

Da für das IGFBP-3-Protein eine IGF-unabhängig vermittelte Apoptose bereits nachgewiesen wurde und auch für das IGFBP-4 Hinweise für IGF-unabhängige Mechanismen vorliegen, wurde der IGFBP-4-Effekt auf die Apoptose im Hinblick auf die IGF-Abhängigkeit noch in weiteren Experimenten untersucht. Ein Vergleich der Etoposid-induzierten Apoptoseraten zwischen den IGFBP-4-Transfektanten und den Kontrollzellen bei steigenden IGF-I-Konzentrationen verdeutlichte, dass an der IGFBP-4-vermittelten Apoptose sowohl IGF-abhängige wie auch IGF-unabhängige Mechanismen beteiligt sind: (1.) IGFBP-4 erhöht die Etoposid-induzierte Apoptose unabhängig vom IGF-I-Signalling, da auch in Serum-freien

Medium, d.h. unter IGF-I-Mangel kultivierte (abgesehen von der endogenen IGF-I-Produktion) IGFBP-4-Transfektanten eine höhere Apoptose-Rate als Leervektor-Transfektanten zeigen. (2.) Eine hohe IGF-I-Konzentration von 500 ng/ml bewirkt einen Ausgleich der Apoptoseraten von Leervektor- und IGFBP-4-Transfektanten, was auf eine IGF-Abhängigkeit hinweisen würde.

Einen weiteren Hinweis für sowohl IGF-abhängige wie auch IGF-unabhängige IGFBP-4-Effekte auf die Apoptose lieferten die Untersuchungen von IGF-IR-negativen ( $R^{-}$ -Zellen) und IGF-IR-positiven ( $R^{(600)}$ -Zellen) embryonalen Maus-Fibroblasten, die mit HEY-IGFBP-4-Transfektantenüberstand behandelt wurden. In beiden Zellarten konnte nach Zugabe des Transfektanten-Überstandes eine deutlich höhere Apoptose erreicht werden. Das zeigte eindeutig, dass der Apoptose-verstärkende Effekt tatsächlich vom sezernierten IGFBP-4 vermittelt wird und dass dieser Effekt nicht zellspezifisch ist. Der IGFBP-4-Effekt auf die Etoposid-induzierte Apoptose in den Maus-Fibroblasten war je nach IGF-IR-Status der Zellen unterschiedlich. In den IGF-IR-positiven Zellen induzierte das IGFBP-4 eine Apoptose bereits ohne Etoposid-Behandlung, wohingegen in den IGF-IR-negativen Zellen das IGFBP-4 erst bei einer hohen Etoposid-Konzentration zur Apoptose-Erhöhung führte.

Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte ein folgendes Modell der IGFBP-4-vermittelten Apoptose aufgestellt werden: Das IGFBP-4 verstärkt die Etoposid-induzierte Apoptose zum einem IGF-abhängig, in dem es als sezerniertes Protein die IGF-Moleküle abfängt und so die Phosphorylierung des IGF-I-Rezeptors und damit die Aktivierung des „Survival“-Signalweges über die PI3-Kinase und Akt verhindert. In manchen Zelltypen (hier in  $R^{(600)}$ -Zellen gezeigt) kann das IGFBP-4 sogar ohne einen Etoposid-Stimulus selbst die Apoptose induzieren. Hierfür ist aber vermutlich der IGF-I-Rezeptor erforderlich, da dieser Effekt nur in den IGF-IR-positiven Maus-Fibroblasten beobachtet wurde. Zusätzlich kann das IGFBP-4 die durch Etoposid-induzierte Apoptose unabhängig vom IGF-IR verstärken, womöglich über die Bindung an einen eigenen membranständigen Rezeptor, über den dann pro-apoptotische Signalkaskaden angesprochen werden. Für die Induktion dieses IGF-unabhängigen, pro-apoptotischen IGFBP-4-Effektes scheint jedoch ein exogener apoptotischer Stimulus, z.B. in Form von Etoposid, erforderlich zu sein. Möglicherweise wird der putative IGFBP-4-Rezeptor erst unter Etoposid-Einfluss vollständig aktiviert oder das Etoposid fördert die Expression von speziellen Mediatoren, die für die IGFBP-4 vermittelte pro-apoptotische Signalkaskade benötigt werden. Grundsätzlich scheint die IGFBP-4-vermittelte Apoptose nicht zellspezifisch und nicht nur auf klassische Krebszellen beschränkt zu sein. Da diese IGFBP-4-Effekte bislang nur in Gegenwart von sehr hohen IGFBP-4-Konzentrationen untersucht wurden, bleibt es noch zu klären, ob das IGFBP-4 auch unter physiologischen Bedingungen pro-apoptotische Effekte ausübt und ob diese auch in anderen Tumor-Zelllinien zu beobachten sind.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Durch den bio-informatischen Vergleich von RNA-Expressionsprofilen auf der Basis von EST-Datenbanken („electronic Northern“) wurden mehr als 600 Kandidatengene identifiziert, die in gynäkologischen Tumoren eine differenzielle Expression zeigen. Die Daten dieser „*in silico*“ Analyse konnten für einen Großteil der Gene – im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell für die drei Kandidatengene Rab5C, CRYAB und IGFBP-4 – experimentell über RNA-Hybridisierung mittels „Cancer Profiling Arrays“ (Clontech) und über quantitative RT-PCR von RNA aus Normal/Tumorgewebe-Paaren bestätigt werden. Für eine weitere molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung wurde das Kandidatengen IGFBP-4 ausgewählt.

Das IGFBP-4, das Insulin-like growth factor-binding protein-4, gehört zu der Familie der IGF-Bindeproteine, die für die Stabilisierung und den Transport der IGFs in der Zirkulation und deren gewebe- und zell-spezifische Regulation sorgen. Durch das Abfangen der IGFs von dem IGF-I-Rezeptor können sie die Mitogenese, die Differenzierung, die Invasion und das Überleben von Zellen blockieren. Für viele Mitglieder der IGFBP-Familie wurden bereits anti-tumorale, auch IGF-unabhängige Effekte nachgewiesen und einige IGF-Bindeproteine werden bereits als Zielmoleküle in der Diagnostik oder Therapie diskutiert. Auch für das IGFBP-4 gibt es Hinweise auf seine antimitogene Effekte auf Tumorzellen, doch wurde diese Protein im Zusammenhang mit gynäkologischen Tumoren und speziell dem Ovarial-Karzinom noch kaum untersucht.

Das IGFBP-4 zeigte sowohl im „electronic Northern“, wie auch im Cancer-Profiling-Array und in der quantitativen RT-PCR-Analyse eines Tumor-Kollektivs einen besonders starken Expressionsrückgang in Ovarial-Karzinomen. In fast 60% der untersuchten Tumore lag die IGFBP-4-Expression deutlich reduziert vor. Die LOH-Analyse mit Mikrosatelliten-Markern ergab in fast der Hälfte der betroffenen OvCa einen Allelverlust der IGFBP-4-Genregion. Über ein DHPLC-Screening-Verfahren auf Basis von Bisulfit-modifizierter DNA wurde in 8 von 20 OvCa und in 3 MaCa- und 2 OvCa-Zelllinien eine CpG-Methylierung innerhalb des IGFBP-4-Promotors identifiziert. Die Promotor-Hypermethylierung korrelierte gut mit der IGFBP-4-Expression: komplett methylierte OvCa und Zelllinien (HEY, SKOV3, SKBR3) zeigten eine stärkere IGFBP-4-Reduktion als nur partiell methylierte Proben. Die Behandlung der Zelllinien HEY und SKOV3 mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5'-Aza-2'-deoxycytidin führte konzentrationsabhängig zu einer Reexpression von IGFBP-4. Zudem wurde erkannt, dass neben der Promotor-Hypermethylierung der Östrogen-Rezeptor (ER) vermutlich als transkriptioneller Aktivator zur IGFBP-4-Regulation beiträgt. In der methylierten, ER-negativen MaCa-Zelllinie SKBR3 konnte erst nach der Transfektion eines funktionellen ER die IGFBP-4-Reaktivierung durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung erreicht werden. Die in der Literatur bereits für das Mamma-Karzinom beschriebene ER-Abhängigkeit der IGFBP-4-Expression wurde hier auch für Ovarial-Karzinome nachgewiesen. Der negative ER-Status erklärte damit die niedrige IGFBP-4-Expression in Ovarial-Tumoren, die keine Promotor-Hypermethylierung aufwiesen.

Um die biologische Relevanz des IGFBP-4 für die Entstehung und Progression des Ovarialkarzinoms zu untersuchen, wurde durch stabile Transfektion von Expressionsvektoren bzw. IGFBP-4-spezifischen

short-hairpin-RNAs (shRNAs) versucht, das IGFBP-4-Protein in geeigneten OvCa-Zelllinien zu überexprimieren bzw. auszuschalten. Über quantitative RT-PCR und Western Blot-Analysen wurde eine sehr starke IGFBP-4-Überexpression in der transfizierten Zelllinie HEY festgestellt. Ein durch RNA-Interferenz vermittelte Hemmung der IGFBP-4-Expression in der MDAH 2774-Zelllinie konnte nur auf mRNA-Ebene eindeutig bestätigt werden. Da die MDAH-shRNA-Transfektanten, im Gegensatz zu den HEY-IGFBP-4-Transfektanten, keinen von den Kontrollzellen abweichenden Phänotyp zeigten, wurde die angestrebte IGFBP-4-Stillegung auf Proteinebene wohl gar nicht oder nur unzureichend erzielt. Die starke IGFBP-4-Überexpression in HEY-Zellen resultierte in einer deutlich verminderten Zellproliferation, die durch eine fast vollständige Blockierung des MAPK-Signalwegs begleitet war. Dieser proliferationshemmende IGFBP-4-Effekt war nur in Gegenwart von IGF-I deutlich zu erkennen, so dass er wahrscheinlich IGF-abhängig auf der Sequestrierung der freien IGF-I-Moleküle und damit der Verminderung des mitogenen IGF-I R-Signallings basierte. Dieser IGFBP-4-Effekt wurde vermutlich durch den gleichzeitigen Expressionsrückgang von IGFBP-6 und der damit verbundenen höheren Bioverfügbarkeit von IGF-II sowie dem „Umschalten“ der Zellen auf einen alternativen, IGF-IR-unabhängigen Signalweg etwas abgeschwächt. Die Kennzeichen eines transformierten Phänotyps – die Fähigkeit zur Kolonienbildung (auf Poly-HEMA beschichteten Platten bzw. im Soft-Agar) und Invasion, wurden in den HEY-Zellen von der IGFBP-4-Expression nicht beeinflusst.

Anhand von Kristallviolettassays und FACS-Analysen konnte die Beteiligung des IGFBP-4-Proteins an pro-apoptischen Prozessen gezeigt werden. HEY-IGFBP-4-Transfektanten reagierten deutlich sensibler auf den Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid als die Kontrollzellen. Unter IGFBP-4-Einfluss gingen die Zellen bei bereits viel niedrigeren Etoposid-Konzentrationen in die Apoptose über. Diese pro-apoptische Wirkung wurde dabei von dem sezernierten IGFBP-4-Protein zell-unspezifisch vermittelt, da die Zugabe von IGFBP-4-Transfektanten-Überstand zu HEY-Leervektor-Zellen bzw. primären embryonalen Maus-Fibroblasten deren Apoptose-Antwort auf Etoposid deutlich steigerte. Diese wurde über den mitochondrialen Signalweg vermittelt und umfasste die Aktivierung der Caspasen 3 und 9. Es wurde festgestellt, dass das IGFBP-4 die IGF-IR-induzierte Aktivierung des PI3K/Akt-„Survival“-Signalweges blockiert und damit zu einer deutlich stärkeren Aktivierung der beiden Caspasen beiträgt. Dieser Einfluss auf die Apoptose involviert offensichtlich sowohl IGF-abhängige wie auch IGF-unabhängige Mechanismen. Der IGFBP-4-Effekt wurde auf der einen Seite bei hohen IGF-I-Konzentrationen aufgehoben, was für eine IGF-Abhängigkeit spricht, auf der anderen Seite wiesen HEY-IGFBP-4-Transfektanten auch in Abwesenheit von IGF-I (im Serum-freien Medium) eine höhere Apoptose-Rate nach Etoposid-Behandlung und die Zugabe von Transfektanten-Kultur-Überstand verstärkte auch in IGF-IR-negativen Maus-Fibroblasten deutlich die Etoposid-induzierte Apoptose. Aufgrund dieser Daten kann folgendes hypothetisches Modell der pro-apoptischen IGFBP-4-Wirkung aufgestellt werden: das IGFBP-4 kann sowohl IGF-abhängig über die IGF-Sequestrierung und Blockierung des „Survival“-Pathways wie auch IGF-unabhängig, womöglich über die Wechselwirkung mit einem putativen Transmembranrezeptor, pro-apoptische Effekte ausüben.

## 7. SUMMARY

More than 600 candidate genes were identified as differentially expressed in gynaecological tumors by a bioinformatic RNA-expression-profiling based on a screen of EST-databases. The data of this "*in silico*"-Analysis could be validated experimentally for the most of the genes – in this dissertation especially for the three candidate genes Rab5C, CRYAB and IGFBP-4, by RNA-hybridisation in Cancer Profiling Arrays (Clontech) and quantitative RT-PCR using RNAs derived from matched tumor/normal-samples. The candidate gene IGFBP-4 was selected for further molecular and functional characterisation.

IGFBP-4, the insulin-like growth factor-binding protein-4 belongs to the family of the IGF-binding proteins, which are responsible for the stabilisation and transport of the IGFs in circulation and tissue- and cell-specific IGF-modulation. By sequestering the IGFs away from the IGF-I-receptor they may inhibit IGF-actions like mitogenesis, differentiation, invasion and cell survival. IGF-dependent and –independent anti-cancer effects have been already shown for many of the IGFBP-family members and some of the IGF-binding proteins are discussed as target molecules for tumor diagnostics or therapy. For IGFBP-4 there are several lines of evidence for anti-mitogenic effects on tumor cells as well, however the protein have not been investigated in association with gynaecological tumors, especially with ovarian cancer, so far.

IGFBP-4 showed both in the electronic Northern as in the Cancer Profiling Array and in the RT-PCR-analysis of a tumor-set a strong downregulation especially in ovarian cancer (OvCa) specimens. In nearly 60% of the investigated ovarian tumors the IGFBP-4 was found to be much lower expressed compared to normal tissue. The LOH-Analysis with microsatellite markers revealed in nearly the half of the affected OvCa an allelic loss of the IGFBP-4 gene region. Through a DHPLC-screening-method based on bisulfite-modified DNA a CpG-methylation within the IGFBP-4-promotor was identified in 8 of 20 OvCa and in 3 breast cancer- and 2 ovarian cancer-cell lines. The promotor-hypermethylation correlated with the IGFBP-4-expression level: complete methylated OvCa and cell lines showed a stronger IGFBP-4-reduction than only partial methylated samples. Treatment of the HEY und SKOV3 cell lines with the methyltransferase-inhibitor 5'-Aza-2'-dC resulted dose-dependent in a reexpression of IGFBP-4. Furthermore it could be noticed that in addition to promotor-hypermethylation, the estrogen-receptor (ER) contributes as a transcriptional activator to the IGFBP-4-regulation. IGFBP-4-reactivation by 5'-Aza-2'-dC-treatment could be only achieved after transfection of a functional ER. The already in breast tumors described ER-dependence of the IGFBP-4-expression could be demonstrated in this study also for ovarian tumors. The negative ER-status explained thereby the low IGFBP-4-expression in OvCa, which do not inherit a promotor-hypermethylation.

To investigate the biological relevance of IGFBP-4 in the development and progression of ovarian cancer it was tried to overexpress and to knock-down the IGFBP-4-protein in suitable cell lines by stable transfection of an expression plasmid and IGFBP-4-specific short-hairpin RNAs (shRNAs), respectively. A strong IGFBP-4-overexpression was detected in the transfected HEY ovarian cancer cell line by quantitative RT-PCR and Western Blot-Analysis. A RNA-interference-mediated inhibition of IGFBP-4-Expression in the ovarian cancer cell line MDAH 2774 could be confirmed only at the mRNA-level. The MDAH-transfectants showed, unlike the HEY-IGFBP-4-transfectants, no different phenotype compared

with control cells. Therefore, the IGFBP-4-silencing at the protein-level was probably not achieved at all or it was too weak to cause a change of the phenotype. The strong IGFBP-4-overexpression in HEY-cells lead to a significantly reduced cell proliferation was accompanied by a nearly complete inhibition of the MAPK-signal transduction pathway. This anti-proliferative IGFBP-4-effect appeared only in the presence of IGF-I, suggesting that it is IGF-dependent and act through the sequestration of the IGF-I-molecules from their receptor which reduces the mitogenic IGF-IR-signaling. The IGFBP-4-effect was probably reduced by the simultaneous downregulation of IGFBP-6 and the associated increased bio-availability of IGF-II as well as by a "switch" on an alternative IGF-IR-independent pathway. The IGFBP-4-expression did not affect the markers for progressed cellular transformation of the HEY-cells – the anchorage-independent colony formation (measured on Poly-HEMA-coated plates and in soft agar) and the invasive capacity.

Crystalviolet-assays and FACS-analysis revealed a contribution of the IGFBP-4-protein to pro-apoptotic processes. HEY-transfectants responded quite more sensitive to the topoisomerase-II-inhibitor etoposide than control cells. In the presence of IGFBP-4 the cells underwent apoptosis already under low etoposide-concentrations. This pro-apoptotic effect was mediated cell-unspecific by the secreted IGFBP-4-protein, because the addition of IGFBP-4-transfectants' supernatant to *mock*-vector transfected HEY cells or primary embryonal mouse fibroblasts significantly increased the etoposide-induced apoptotic-response. This response was mediated by the mitochondrial apoptotic pathway and involved the activation of the caspases –3 and –9. It was found that IGFBP-4 inhibits the IGF-IR-induced activation of the PI3K/Akt-survival-pathway leading thereby to a significant stronger activation of the both caspases. This IGFBP-4-specific impact on apoptosis involves obviously IGF-dependent as well as IGF-independent mechanisms. On the one side the IGFBP-4-effect was totally compensated under a high IGF-I-concentration, which would suggest an IGF-dependent mechanism. On the other side the HEY-transfectants showed an increased apoptosis-rate after etoposide-stimulation even in the absence of IGF-I (cultured under serum-free conditions) and the addition of transfectants' supernatant enhanced the etoposide-induced apoptosis also in IGF-IR-negative mouse fibroblasts. Based on these findings a putative model for the pro-apoptotic IGFBP-4-action can be drawn: IGFBP-4 exerts its pro-apoptotic effects via an IGF-dependent mechanism by sequestering IGFs away from the IGF-IR and inhibition of the survival-pathway and by an IGF-independent pathway as well, probably via interaction with a putative transmembrane signaling receptor.

**8. LITERATUR**

- ALBERTSON DG, PINKEL D [2003] Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Human Molecular Genetics* **12**, R145–R152
- ASSELIN E, MILLS GB, TSANG BK [2001] XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Research* **61**, 1862-1868
- ATTARDI LD, DE VRIES A, JACKS T [2004] Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene* **23**, 973-980
- ATTWOOD JT, YUNG RL, RICHARDSON BC [2002] DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 241-257
- BABAJKO S, BINOX M [1996] Modulation by retinoic acid of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein expression in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *European Journal of Endocrinology* **134**, 474-480
- BACH LA, RECHLER MM [1995] Insulin-like growth factor binding proteins. *Diabetes Reviews* **3**, 38-61
- BACHRACH LK, NANTO-SALONEN K, TAPANAINEN P, ROSENFELD RG, GARGOSKY SE [1995] Insulin-like growth factor binding protein production in human follicular thyroid carcinoma cells. *Growth Regulation* **5**, 109-118
- BAJALICA S; ALLANDER SV; EHRENBORG E; BRONDUM-NIELSEN K; LUTHMAN H; LARSSON C [1992] Localization of the human insulin-like growth-factor-binding protein 4 gene to chromosomal region 17q12-21.1. *Human Genetics*. **89**, 234-236
- BALDWIN AS [2001] Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Journal of Clinical Investigation* **108**, 241-246
- BALLIF BA, BLENIS J [2001] Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein-kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth and Differentiation* **12**, 397-408
- BARON-HAY S, BOYLE F, FERRIER A, SCOTT C [2004] Elevated serum insulin-like growth factor binding protein-2 as prognostic marker in patients with ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* **10**, 1796-1806
- BASERGA R, PERUZZI F, REISS K [2003] The IGF-I Receptor in Cancer Biology. *International Journal of Cancer* **107**, 873-877
- BAYLIN SB, ESTELLER M, ROUNTREE MR, BACHMAN KE, SCHUEBEL K, HERMAN JG [2001] Abberant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* **10**, 687-692
- BELLACOSA A, DE FEO D, GODWIN AK, BELL DW, CHENG JK, ALTOMARE DA, WAN M, DUBEAU L, SCAMBIA G, MASCIULLO V [1995] Molecular alteration of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer* **64**, 280-285
- BIRD AP [1986] CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213
- BISHOP JL [1983] Cellular oncogenes and retroviruses. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 301-354
- BLAGOSKLONNY MV, PARDEE AB [2002] The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle* **1**, 103–110
- BOURDON J-C, DEGUIN-CHAMBON V, LELONG J-C ET AL [1997] Further characterisation of the p53 responsive element – identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* **14**, 85-94
- BRADSHAW SL, D'ERCOLE AJ, HAN VK [1999] Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in C6 glioma cells results in conditional alteration of cellular growth. *Endocrinology* **140**, 575-584

- BRUYNINX M, AMMAR H, REITER E, CORNET A, CLOSSET J** [2000] Genes upregulated during castration-induced rat prostatic apoptosis: cloning and characterization of new cDNAs *BJU Int.* **85**, 1134-1142
- BUCKBINDER L, TALBOTT R, VELASCO-MIGUEL S ET AL** [1995] Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* **377**, 646-649
- BUNN RC, FOWLKES JL** [2003] Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **14**, 176-181
- BUTLER AA, BLAKESLEY VA, POULAKI V, TSOKOS M, WOOD TL, LEROITH D, POULIKI V** [1998] Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression. *Cancer Research* **58**, 3021-3027
- BUTT A.J.; FIRTH SM, BAXTER RC** [1999] The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology* **77**, 256-262
- BUTT AJ, FIRTH S, KING MA, BAXTER RC** [2000] Insulin-like growth factor binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 39174-39181
- BUTT AJ, WILLIAMS AC** [2001] IGFBP-3 and apoptosis - a licence to kill? *Apoptosis* **6**, 199-205
- CANMAN CE, GILMER TM, COUTTS SB, KASTAN MB** [1995] Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Development* **9**, 600-611
- CANTLEY LC** [2002] The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-1657
- CATALDO NA, GIUDICE LC** [1992] Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlate with functional status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **74**, 821-829
- CATTEAU A, HARRIS WH, XU CF, SOLOMON E** [1999] Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* **18**, 1957-1965
- CHANG YS, WANG L, LIU D, MAO L, HONG WK, KHURI FR, LEE HY** [2002] Correlation between Insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* **12**, 3669-3675
- CHANG YS, WANG L, SUH Y-A, MAO L, KARPEN SJ, KHURI FR, HONG WK, LEEH-Y** [2004] Mechanisms underlying lack of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in non-small lung cancer. *Oncogene* **23**
- CHENG JQ, JIANG X, FRASER M, LI M, DAN HC, SUN M, TSANG BK** [2002] Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/akt pathway. *Drug Resistance Updates* **5**, 131-146
- CHENG JQ, RUGGERI B, KLEIN WM, SONODA G, ALTOMARE DA, WATSON DK, TESTA JR** [1996] Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3636-3641
- CHEUNG PT, SMITH EP, SHIMASAKI S, LING N, CHERNAUSEK SD** [1991] Characterisation of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* **129** 1006-1015
- CHIBA T, YOKOSUKA O, FUKAI K, HIRASAWA Y, TADA M, MIKATA R, IMAZAKI F, TANIGUCHI H, IWAMA A, MIYAZAKI M, OCHIAI T, SAISHO H** [2005] Identification and investigation of methylated genes in hepatoma. *European Journal of Cancer* **41**, 1185-1194
- CHO KR, VOGELSTEIN B** [1992] Genetic alteration in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* **70**, 1727-1731
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N** [1987] Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159

- CHRISTOFORI G, NAIK P, HANAHAN D** [1994] A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis. *Nature* **369**, 414-418
- CLARK SJ, HARRISON J, PAUL CL, FROMMER M** [1994] High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acid Research* **22**, 2990-2997
- CLARKE RB, HOWELL A, ANDERSON E** [1997] Type I insulin-like growth factor receptor gene expression in normal human breast tissue treated with oestrogen and progesterone. *British Journal of Cancer* **75**, 251-257
- CLASSON M, HARLOW E** [2002] The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews in Cancer* **2**, 910-917
- CLEMMONS DR** [1999] IGF binding proteins and extracellular matrix. In: *The IGF System: Molecular Biology, Physiology, and Clinical Applications*, RG Rosenfeld and CT Roberts, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 273-279
- CLEMMONS DR** [2001] Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocrine Reviews* **22**, 800-817
- CLEMMONS DR, CAMACHO-HUBNER C, CORONADO E, OSBORNE CK** [1990] Insulin-like growth factor binding protein secretion by breast carcinoma cell lines: correlation with estrogen receptor status. *Endocrinology* **127**, 2679-2686
- COLLINS FS, GREEN ED, GUTTMACHER AE, GUYER MS** [2003] A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 835-847
- CULOUSCOU JM, SHOYAB M** [1991] Purification of a colon cancer cell growth inhibitor and its identification as an insulin-like growth factor binding protein. *Cancer Research* **51**, 2813-2819
- DAHL E, SADR-NABAVI S., KLOPOCKI E, BETZ B, GRUBE S, KREUTZFELD R, HIMMELFARB M, AN H-X, GELLING S, KLAMAN I, HINZMANN B, KRISTIANSEN G, GRÜTZMANN R, KUNER R, PETSCHKE B, RHIEM K, WIECHEN K, SERS C, WIESTLER O, SCHNEIDER A, HÖFLER H, NÄHRIG J, DIETEL M, SCHÄFER R, ROSENTHAL A, SCHMUTZLER R, DÜRST M, MEINDL A, NIEDERACHER D** [2005] Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Journal of Pathology* **20**, 21-28
- DAI B, WIDEN SG, MIFFLIN R, SINGH P** [1997] Cloning of the functional promoter for human insulin-like growth factor binding protein-4 gene: endogenous regulation. *Endocrinology* **138**, 332-343
- DAMON SE, HAUGK KL, BIRNBAUM RS, QUINN SL** [1998a] Retrovirally mediated overexpression of insulin-like growth factor binding protein 4 gene: endogenous regulation. *Endocrinology* **138**, 332-343
- DAMON SE, MADDISON L, WARE JL, PLYMATE SR** [1998b] Overexpression of an inhibitory insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), IGFBP-4, delays onset of prostate tumor formation. *Endocrinology* **139** 3456-3464
- DEAL C, MA J, WILKIN F, PAQUETTE J, ROZEN F, GE B, HUDSON T, STAMPFER M, POLLAK M** [2001] Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **86**, 1274-1280
- DEVERAUX QL, REED JC** [1999] IAP family proteins: Suppressors of apoptosis. *Genes Development* **13**, 239-252
- DIEHL D, LAHM H, WOLF E, BAUERSACHS S** [2005] Transcriptome analysis of a human colorectal cancer cell line shows molecular targets of insulin-like growth factor-binding protein-4 overexpression. *International Journal of Cancer* **113**, 588-599
- DONG Z, HUANG C, MA WY** [1999] PI-3 kinase in signal transduction, cell transformation, and as a target for chemoprevention of cancer. *Anticancer Research* **19**, 3743-3747
- DOWNWARD J** [2003] Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews in Cancer* **3**, 11-22

- DRIVDAHL RH, SPRENGER C, TRIMM K, PLYMATE SR** [2001] Inhibition of growth and increased expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) and -6 in prostate cancer cells stably transfected with antisense IGFBP-4 complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* **142**, 1990-1998
- DUAN R, PORTER W, SAFE S** [1998] Estrogen induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology* **139**, 1981-1990
- DUESBERG P, LI, R** [2003] Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2**, 202-210
- DUPONT J, LE ROITH D** [2001] Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF7 breast cancer cells: new insights into their synergetic effects. *Journal of Clinical Pathology* **54**, 149-154
- EADS CA, DANENBERG KD, KAWAKAMI K** [1999] CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase over expression. *Cancer Research* **59**, 2302-2306
- EARNSHOW WC, MARTINS LM KAUFMANN SH** [1999] Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Reviews in Biochemistry* **68**, 383-424
- EL-DEIRY WS, NELKIN BD, CELANO P** [1991] High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl Acad Sci USA* **88**, 3470-3474
- ESTELLER M, SILVA JM, DOMINGUEZ G, BONILLA F, MATIAS-GUIU X, LERMA E, BUSSAGLIA E, PRAT J, HARKES IC, REPASKY EA, GABRIELSON E, SCHUTTE M, BAYLIN SB, HERMAN JG** [2000] Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *Journal of National Cancer Institute* **92**, 564-569
- EWTON DZ, COOLOCAN SA, MOHAN S, CHERNAUSEK SD FLORINI JR** [1998] Modulation of insulin-like growth factor actions in L6A1 myoblasts by insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 and IGFBP-5: a dual role for IGFBP-5. *Journal of Cellular Physiology* **177**, 47-57
- FELIERS D, WOODRUFF K, ABOUD S** [1999] Potential role of insulin-like growth factor binding protein-4 in the uncoupling of bone turnover in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* **104**, 715-722
- FERRY RJ JR, KATZ LE, GRIMBERG A, COHEN P, WEINZIMER SA** [1999] Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Hormone and Metabolism Research* **31**, 192-202
- FIGUEROA JA, JACKSON JC, MCGUIRE WL, KRYWICKI RF, YEE D** [1993] Expression of insulin-like growth factor binding proteins in human breast cancer correlates with estrogen receptor status. *Journal of Cell Biochemistry* **52**, 196-205
- FIRTH SM, BAXTER RC** [2002] Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine Reviews* **23**, 824-54
- FOWLKES JL, THRAILKILL KM, GEORGE-NASCIMENTO C, ROSENBERG CK, SERRA DM** [1997] Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibits IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* **138**, 2280-2285
- FRASER M, LEUNG B, JAHANI-ASL A, YAN X, THOMPSON WE, TSANG BK** [2003] Chemoresistance in human ovarian cancer: the role of apoptotic regulators. *Reproductive Biology and Endocrinology*
- FRASER M, LEUNG B, YAN X, DAN HC, CHENG JQ, TSANG BK** [2003] p53 is a determinant of XIAP/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Research*
- FURSTENBERGER G, SENN HJ** [2002] Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncology* **5**, 298-302
- FUTREAL PA ET AL** [2004] A census of human cancer genes. *Nature Reviews in Cancer* **4**, 177-183
- GIBSON LF, FORTNEY J, MAGRO G, ERICSON SG, LYNCH JP, LANDRETH KS** [1999] Regulation of BAX and Bcl-2 expression in breast cancer cells by chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment* **55**, 107-117

GILL ZP, PERKS CM, NEWCOMB PV, HOLLY JMP [1997] Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 predisposes breast cancer cells to programmed cell death in a non-IGF-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 26602-26607

GIOVANNUCCI E [2001] Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *Journal of Nutrition* **131**, 3109S-3120S

GIUDICE LC, VAN DESSEL HJ, CATALDO NA, CHANDRASEKHER YA, YAP OW, FAUSER BC [1995] Circulating and ovarian IGF binding Proteins:potential roles in normo-ovulatory cycles and in polycystic ovarian syndrome. *Progress in Growth Factor Research* **6**, 397-408

GRAFF JR, GABRIELSON E, FUJII H, BAYLIN SB, HERMAN JG [2000] Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogenous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *Journal of Biology and Chemistry* **275**, 2727-2732

GROSS A, McDONNELL JM, KORSMEYER SJ [1999] Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Development* **13**, 1899-1911

GROTHEY A, VOIGT C, SCHÖBER C, MÜLLER T, DEMPKE W, SCHMOLL HJ [1999] The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *Journal of Cancer research in Clinical Oncology* **125**, 166-173

GSCHWIND A, FISCHER OM, ULLRICH A [2004] The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature Reviews in Cancer* **4**, 361-370

GUSTAFSSON T, ANDERSSON P, ARNQVIST HJ [1999] Different inhibitory actions of IGFBP-1, -2 and -4 on IGF-I-effects in vascular smooth muscle cells. *Journal of Endocrinology* **161**, 245-253

HANAFUSA T, SHINJI T, SHIRAHA H, NOUSO K, IWASAKI Y, YUMOTO E, ONO T, KOIDE N [2005] Functional promoter upstream p53 regulatory sequence that is silenced by tumor specific methylation. *Cancer* **5**, 9

HANAFUSA T, YUMOTO E, NOUSO K, NAKATSUKASA H, ONISHI T, FUJIKAWA T, TANIYAMA M, NAKAMURA S, UEMURA M, TAKUMA Y, YUMOTO E, HIGASHI T, TSUJI T [2002] Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* **176**, 149-158

HANAHAN D, WEINBERG RA [2000] The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70

HERMAN JG, MERLO A, MAO L [1995] Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Research* **55**, 4525-4530

HERR I, DEBATIN K-M [2001] Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **98**, 2603-2614

HONG J, ZHANG G, DONG F, RECHLER MM [2002] Insulin-like growth factor-binding protein-3 mutants that do not bind IGF-I or IGF-II stimulate apoptosis in human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 10489-10497

HU L, HOFMANN J, LU Y, MILLS GB, JAFFE RB [2003] Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficiency of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Research* **62**, 1087-1092

HUYNH H, YANG X, POLLAK M [1996] Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1016-1021

HWA V, OH Y, ROSENFELD RG [1999] The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews* **20**, 761-87

IMAY Y, BUSBY WH, SMITH CE, CLARKE JB, GARMONG AJ, HORWITZ GD, REES C, CLEMMONS DR [1997] Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 2596-2605

- INOUE A, YOSHIDA N, OMOTO Y, OGUCHI S, YAMORI T, KIYAMA R, HAYASHI S** [2002] Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**, 175-192
- ITO I, YOSHIMOTO M, IWASE T ET AL** [1995] Association of genetic alterations on chromosome 17 and loss of hormone receptors in breast cancer ) *British Journal of Cancer* **71**, 438-441
- JIMENEZ C, JONES DR, RODRIGUEZ-VICIANA P, GONZALEZ-GARCIA A, LEONARDO E, WENNSTROM S, VON KOBBE C, TORAN JL, BORLADO LR, CXAVO V, COPIN SG, ALBAR JP, GASPAS ML, DIEZ E, MARCOS M;A, DOWNWARD J, MARTINEZ AC, MERIDA I CARRERA AC** [1998] Identification and characterisation of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide-3-kinase. *EMBO Journal* **17**, 743-753
- JONES AP, BAYLIN SP** [2002] The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* **3**, 415-428
- JONES AP, LAIRD PW** [1999] Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* **21**, 163-167
- JONES JL, CLEMMONS DR** [1995] Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Reviews* **16**, 3-34
- JONES JL, GOCKERMAN A, BUSBY WH, WRIGHT G, CLEMMONS DR** [1993] Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the  $\alpha_5\beta_1$  integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10553-10557
- JUNG Y-K, MIURA M, YUAN J** [1996] Suppression of Interleukin-1  $\beta$ -converting enzyme-mediated cell death by insulin-like growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5112-5117
- KARPF AR, PETERSON PW, RAWLINS JT, DALLEY BK, YANG Q, ALBERTSEN H, JONES DA** [1999] Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of the signal transducer and activator of transcription 1, 2 and 3 genes in colon tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **82**, 2560-2564
- KAUFMANN SH, EARNSHAW WC** [2000] Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cellular Research* **256**, 42-49
- KHANDWALA HM, MCCUTCHEON IE, FLYVBJERG A, FRIEND KE** [2000] The Effects of Insulin-Like Growth Factors on Tumorigenesis and Neoplastic Growth. *Endocrine Reviews* **21**, 215-244
- KIEFER MC, SCHMID C, WALDVOGEL M, SCHLAPFER I, FUTO E, MASIAZ FR, GREEN K, BARR PJ, ZAPF J** [1992] Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding proteins 4, 5, and 6 produced in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 12692-12699
- KIEFER MC, MASIAZ FR, BAUER DM, ZAPF J** [1991] Identification and molecular cloning of two new 30-kDa insulin-like growth factor binding proteins isolated from adult human serum. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 9043-9049
- KIM EJ, SCHAFFER BS, KANG YH, MACDONALD RG, PARK JH** [2002] Decreased production of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-6 by transfection of colon cancer cells with an antisense IGFBP-6 cDNA construct leads to stimulation of cell proliferation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **17**, 563-570
- LAMM GM, CHRISTOFORI G** [1998] Impairment of survival factor function potentiates chemotherapy-induced apoptosis in tumor cells. *Cancer Research* **58**, 801-807
- LANGER CJ** [2004] Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC. *International Journal of Radiation Oncology and Biological Physiology* **58**, 991-1002
- LASKY T, SILBERGELD E** [1996] P53 mutations associated with breast, colorectal, liver, lung and ovarian cancers. *Environment Health Perspectives* **104**, 1324-1331
- LEE K-W, COHEN P** [2002] Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *Journal of Endocrinology* **175**, 33-40

- LEE AV, CUI X, OESTERREICH S [2001] Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signalling in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 7, 4429-4435
- LEE AV, JACKSON JG, GOOCH JL, HILSENBECK SG, CORONADO-HEINSOHN E, OSBORNE CK, YEE D [1999] Enhancement of insulin-like growth factor signalling in human breast cancer: Estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Molecular Endocrinology* 13, 787-796
- LEE AV, WENG CN, JACKSON JG, YEE D [1997] Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells. *Journal of Endocrinology* 152, 39-47
- LENG SL, LEEDING KS, WHITEHEAD RH, BACH LA [2001] Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM1215 colon cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 174, 121-127
- LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B [1998]. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649
- LEROITH D, HELMAN L [2004] The new kid on the block(ade) of the IGF-1 receptor. *Cancer Cell* 5, 201-202
- LEROITH D, WERNER H, BEITNER-JOHNSON D, ROBERTS CT JR. [1995] Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrinology Reviews* 16, 143-163
- LEUNG LK, WANG TTY [1999] Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Research and Treatment* 55, 73-83
- LINDBLOM A, SKOOG L, ANDERSEN TI, ROTSTEIN S, NORDENSKJOLD M, LARSSON C [1993] Four separate regions of chromosome 17 show loss of heterozygosity in familial breast carcinomas. *Human Genetics* 91, 6-12
- LIU JP, BAKER J, PERKINS AS, ROBERTSON EJ, EFSTRATIADIS A [1993] Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type 1 IGF receptor (IGF1R). *Cell* 75, 59-72
- LIU Y-Y, HAN TY, GIULIAO AE, ISHIKAWA S, HIRABAYASHI Y, CABOT MC [1999] Glycosylation of ceramide potentiates cellular resistance to tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 252, 464-470
- LONG L, NAVAB R, BRODT P [1998] Regulation of the Mr 72,000 type IV collagenase by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Research* 58, 3243-3247
- LUKANOVA A, LUNDIN E, TONIOLO P, MICHELI A, AKHMEDKHANOV A, RINALDI S, MITI P, LENNER P, BIESSY C, KROGH V, ZELENIUCH-JACQUOTTE A, BERRINO F, HALLMANS G, RIBOLI E, KAAKS R [2002] Circulating levels of insulin-like growth factor-I and risk of ovarian cancer. *International Journal of Cancer* 101, 549-554
- MAILE LA, HOLLY JM [1999] Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: Occurrence, identification, role and regulation. *Growth Hormones and IGF Research* 9, 85-95
- MALUMBRES M, CARNERO A [2003] Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle research* 5, 5-18
- MANNI A, BADGER B, WEI L, ZAENGLEIN A, GROVE R, KHIN S [1994] Hormonal regulation of insulin-like growth factor II and insulin-like growth factor-binding protein expression by breast cancer cells in vivo: evidence for stromal epithelial interactions. *Cancer Research* 54, 2934-2942
- MAREEL M, BRACKE M, VAN ROY F [1995] cancer metastasis: negative regulation by an invasion-suppressor complex. *Cancer Detection and Prevention* 19, 451-464
- MARSHMAN E, STREULI CH [2002] Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function. *Breast Cancer Research* 4, 231-239
- MASER RS, DEPINHO RA [2002] Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science* 297, 565-569

- MATHIEU M, VIGNON F, CAPONY F, ROCHEFORT H** [1991] Estradiol down-regulates the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor gene and induces cathepsin-D in breast cancer cells: a receptor saturation mechanism to increase the secretion of lysosomal proenzymes. *Molecular Endocrinology* **5**, 815-822
- MAZERBOURG S, CALLEBAUT I, ZAPF J, MOHAN S, OVERGAARD M, MONGET P** [2004] Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth Hormones and IGF Research* **2**, 71-84
- MAZERBOURG S, ZAPF J, BAR RS, BRIGSTOCK DR, MONGET P** [2000] Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine and porcine preovulatory follicles: regulation by IGFs and heparin-binding domains-containing peptides. *Biology of Reproduction* **63**, 390-400
- MECHTERSHEIMER G ET AL** [2004] Gastrointestinal stromal tumours and their response to treatment with the tyrosine kinase inhibitor imatinib. *Virchows Archivs* **444**, 108–118
- MICHELL NP, DENT S, LANGMAN MJ, EGGO MC** [1997] Insulin-like growth factor binding proteins as mediators of IGF-I effects on colon cancer cell proliferation. *Growth Factors* **14**, 269-277
- MITELMAN F** [2000] Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutational Research* **462**, 247–253
- MOHAN S, BAUTISTA CM, WERGEDAL J, BAYLINK DJ** [1989] Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor (IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: a potential local regulator of IGF action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8338-8342
- MOHAN S, NAKAO J, HONDA Y, LANDALE E, LESER U, DONY C, LANG K, BAYLINK DJ** [1995] Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 3817-3820
- MOHAN S, BAYLINK DJ** [2002] IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and – independent mechanisms. *Journal of Endocrinology* **175**, 19-31
- MORRISON KB, TONGON CE, GARNETT MJ, DEAL C, SORENSEN PHB** [2002] ETV6-NTRK3 transformation requires insulin-like growth factor I receptor signaling and is associated with constitutive IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Oncogene* **21**, 5684-5695
- MOSCHOS SJ, MANTZOROS CS** [2002] The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* **63**, 317-32
- MURPHY LJ** [1998] Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *Journal of Molecular Endocrinology* **21**, 97-107
- MÜLLER M, DIETEL M, TURZYNSKI A, WIECHEN K** [1998] Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer* **77**, 567-571
- NEGRINI M, SABBIONI S, HALDER S, POSSATI L, CASTAGNOLI A, CORALLINI A, BARBANTI-BRODANO G, CROCE CM** [1994] Tumor and growth suppression of breast cancer cells by chromosome 17-associated functions. *Cancer Research* **54**, 1818-1824
- NEUENSCHWANDER S, SCHWARTZ A, WOOD TL, ROBERTS CT, HENNINGHAUSEN L, LEROITH D** [1996] Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in transgenic mouse model. *Journal of Clinical Investigation* **97**, 2225-2232
- NICKERSON T, HUYNH H** [1999] Vitamin D analogue EB1089-induced apoptosis prostate regression is associated with increased gene expression of insulin-like growth factor binding proteins. *Journal of Endocrinology* **160**, 223-229
- NICOLETTI I, MIGLIORATI G, PAGLIACCI MC, GRIGNANI F, RICCARDI C** [1991] A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* **139**, 271-279

- NIEDERACHER D, PICARD F, VAN ROEYEN C, AN H-X, BENDER HG, BECKMANN MW** [1997] Patterns of allelic loss on chromosome 17 in sporadic breast carcinomas detected by fluorescent-labeled microsatellite analysis. *Gene, Chromosomes & Cancer* **18**, 181-192
- NOLL K, WEGMANN BR, HAVEMANN K, JAQUES G** [1996] Insulin-like growth factors stimulate the release of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) and degradation of IGFBP-4 in nonsmall cell lung cancer cell lines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 2653-2662
- OKADA S, TSUDA H, TAKARABE T, YOSHIKAWA H, TAKETANI Y, HIROHASHI S** [2002] Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types. *Japanese Journal of Cancer Research* **93**, 798-806
- OREN M** [2003] Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation* **10**, 431-442
- ORTEGA S, MALUMBRES M, BARBACID M** [2002] Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochemical and Biophysical Acta* **1602**, 73-87
- OWENS PC, GILL PG, DE YOUNG NJ, WEGER MA, KNOWLES SE, MOYSE KJ** [1993] Estrogen and progesterone regulate secretion of insulin-like growth factor binding proteins by human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **193**, 467-473
- PARELLA P, ZANGEN R, SIDRANSKY D, NICOL T** [2003] Molecular analysis of peritoneal fluid in ovarian cancer patients. *Mod Pathol* **16**, 636-640
- PERKS CM, BOWEN S, GILL ZP, NEWCOMB PV, HOLLY JMP** [1999] Differential IGF-Independent Effects of Insulin-Like Growth factor Binding Proteins (1-6) on apoptosis of Breast Epithelial Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **75**, 652-664
- PEGRAM MD, KONECNY G, SLAMON DJ** [2000] The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treatment Research* **103**, 57-75
- PERUZZI F, PRISCO M, MORRIONE A, VALENTINIS B, BASERGA R** [2001] Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 25990-25996
- PETLEY T, GRAFF K, JIANG W, YANG H, FLORINI J** [1999] Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses. *Hormone and Metabolism Research* **31**, 70-76
- PETRIK J, ARANY E, McDONALD TJ, HILL DJ** [1998] Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* **139**, 2994-3004
- PHELAN CM, BORG A, CUNY M, CRICHTON DN, BALDERSSON T, ANDERSEN TI, CALIGO MA, LIDEREAU R, LINDBLOM A, SEITZS, KELSELL D, HAMANN U, RIO P, THORLACIUS S, PAPPJ, OLAH E, PONDER B, BIGNON YJ, SCHERNECK S, BARKARDOTTIR R, BORRESEN-DALE AL, EYFJORD J, THEILLET C, THOMPSON AM, LARSSON C ET AL** [1998] Consortium study on 1280 breast carcinomas: allelic loss on chromosome 17 targets subregions associated with family history and clinical parameters. *Cancer Research* **58**, 1004-1012
- PHILIP AJ, CAMPBELL IG, LEET C, VINCAN E, ROCKMAN SP, WHITEHEAD RH, THOMAS RJ, PHILLIPS WA** [2001] The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Research* **61**, 7426-7429
- PIHAN G, DOXSEY SJ** [2003] Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* **4**, 89-94
- PLUMMER SJ, ADAMS L, SIMMONS JA, CASEY G** [1997] Localisation of a growth suppressor activity in the MCF-7 breast cancer cells to the chromosome 17q24-q25. *Oncogene* **14**, 2339-2345

- PLYMATE SR, BAE VL, MADDISON L QUINN LS** [1997] Reexpression of the type-I- insulin-like growth factor receptor inhibits the malignant phenotype of simian virus 40 T antigen immortalized human prostate epithelial cells. *Endocrinology* **138**, 1728-1735
- PLYMATE S, TENNANT M, BIRNBAUM R, TRASHER JB, CHATTA G., WARE J** [1996] The effect of the insulin-like growth factor system in human prostate of immortalization and transformation by Simian virus-40 T-antigen. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* **81**, 3709-3716
- POLLAK MN, SCHERNHAMMER ES, HANKINSON SE** [2004] Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nature Reviews in Cancer* **4**, 505-518
- POLYAK K, RIGGINS GJ** [2001] Gene discovery using the serial analysis of gene expression technique: implications for cancer research. *Journal of Clinical Oncology* **19**, 2948-2958
- PORETSKY L, CATALDO N, ROSENWAKS Z, GIUDICE L** [1999] The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Reviews* **200**, 535-582
- PORETSKY L, CHANDRASEKHAR YA, BAI C, LIU HC ROSENWAKS Z, GIUDICE L** [1996a] Insulin receptor mediates inhibitory effect of insulin, but not of IGF-I, on insulin-like growth factor binding protein I (IGFBP-1) production in human granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 493-496
- PORETSKY L, GLOVER B, LAUMAS V, KALIN M, DUNAIF A** [1996b] Insulin-like growth factor II (IGF-II) inhibits insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) production in luteinized human granulosa cells with a potency similar to insulin-like growth factor I (IGF-I) and higher than insulin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81**, 3412-3414
- PORTER W, SAVILLE B, HOIVIK D, SAFE S** [1997] Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Molecular Endocrinology* **11**, 1569-1580
- PRATT SE, POLLAK MN** [1993] Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Research* **53**, 5193-5198
- PRICE WA, MOATS-STAAATS BM, STILES AD** [1995] Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates IGFBP-3 and IGFBP-4 by multiple mechanisms in A549 human adenocarcinoma cell. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **13**, 466-476
- PRIVES C, HALL PA** [1999] The p53 pathway. *Journal of Pathology* **187**, 112–126
- QIN X, MORALES S, LEE KW, BOONYARATANAKORNKIT V, BAYLINK DJ, MOHAN S, STRONG DD** [1997] Structural and functional analysis of the 5'-flanking region of the human insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-4 gene. *Biochim Biophys Acta* **1350**, 136-140
- QIN C, SINGH P, SAFE S** [1999] Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology* **140**, 2501-2508
- QIN X, STRONG DD, BAYLINK JD, MOHAN S** [1998] Structure-Function Analysis of the Human Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 23509–23516
- RAJAGOPALAN H, NOWAK MA, VOGELSTEIN B, LENGAUER C** [2003] The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature Reviews in Cancer* **3**, 695–701
- RAJAH R, LEE KW, COHEN P** [2002] Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth and Differentiation* **13**:163-171.
- RAJAH R, VALENTINIS B, COHEN P** [1997] Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 12181-12188
- RAJARAM S, BAYLINK DJ, MOHAN S** [1997] Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine Reviews* **18**, 801-31

- REYNOLDS A, LEAKE D, BOESE Q, SCARINGE S, MARSHALL WS, KHOROVA A [] A rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnology* **22**, 326-330
- RICORT JM, BINOUX M [2002] Insulin-like growth factor-binding protein-3 activates a phosphotyrosine phosphatase. Effects on the insulin-like growth factor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19448-19454
- RININSLAND F, JOHNSON TR, CHERNICKY CL, SCHULZE E, BURFEIND P, ILAN J [1997] Suppression of insulin-like growth factor type I receptor by a triple-helix strategy inhibits IGF-1 transcription and tumorigenic potential of rat C6 glioblastoma cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 5854-5859
- RUAN W, CATANESE V, WIECZOREK R, FELDMAN M, KLEINBERG DL [1995] Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* **136**, 1296-1302
- RUGGERI BA, HUANG L, WOOD M, CHENG JQ, TESTA JR [1998] Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis* **21**, 81-86
- RUSSO G, ZEGAR C, GIORDANO A [2003] Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene* **22**, 6497-6507
- SACHDEV D, YEE D [2001] The IGF system and breast cancer. *Endocrine Related Cancer* **8**, 197-209
- SANDHU MS, DUNGER DB, GIOVANNUCCI EL [2002] Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **94**, 972-80
- SAN ROMAN GA, MAGOFFIN DA [1992] Insulin-like growth factor binding proteins in healthy ant atretic follicles during normal menstrual cycles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **76**, 625-632
- SAVILLE B, WORMKE M, WANG F, NGUYEN T, ENMARK E, KUIPER G, GUSTAFSSON J-A, SAFE S [2000] Ligand-, cell- and estrogen receptor subtype ( $\alpha/\beta$ )-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5379-5387
- SCHARF JG, SCHMIDT-SANDTE W, PAHERNIK SA, RAMADORI G, BRAULKE T, HARTMANN H [1998] Characterisation of insulin-like growth factor axis in human hepatoma cell line (PLC). *Carcinogenesis* **19**, 2121-2128
- SCHERNHAMMER ES, HANKINSON SE, HUNTER DJ, BLOUIN MJ, POLLAK MN [2003] Polymorphic variation at the -202 locus in IGFBP3: influence on serum levels of insulin-like growth factors, interaction with plasma retinol and vitamin d and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* **107**, 60-64
- SCHEURLE D, DEYOUNG MP, BINNINGER DM, PAGE H, JAHANZEB M, NARAYANAN R [2000] Cancer gene discovery using digital differential display. *Cancer Research* **60**, 4037-4043
- SCHILTZ PM, MOHAN S, BAYLINK DJ [1993] Insulin-like growth factor binding protein-4 inhibits both basal and IGF-mediated chick pelvic cartilage growth in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**, 391-396
- SCHROPE K, PORTER W, SAFE S [1995] Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on insulin-like growth factor-binding protein 4 in MCF7 and T47D human breast cancer cells. *Organohalogen Compounds* **25**, 235-238
- SCULLY R, LIVINGSTON DM [2000] In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**, 429-432
- SELL C, BASERGA R, RUBIN R [1995] Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I-receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Research* **55**, 303-306
- SELL C, DUMENIL G, DEVEAUD C, MIURA M, COPPOLA D, DEANGELIS T, RUBIN R, EFSTRATIADIS A, BASERGA R [1994] Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Molecular Cell Biology* **14**, 3604-3612

SELL C, RUBINI M, RUBIN R, LIU J-P, EFSTRATIADIS A, BASERGA R [1993] Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11217-11221

SETO-YOUNG D, ZAJAC J, LIU H-C, ROSENWAKS Z, PORETSKY L [2003] The role of mitogen-activated protein kinase in insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling cascades for progesterone and IGF-binding protein-1 production in human granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 3385-3391

SHAYESTEH L, LU Y, KUO WL, BALDOCCHI R, GODFREY T, COLLINS C, PINLEL D, POWELL B, MILLS GB, GRAJ JW [1999] PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *National Genetics* **21**, 99-102

SHEIKH MS, SHAO ZM, HUSSAIN A, CHEN JC, ROBERTS JR CT, LEROITH D, FONTANA JA [1993] Retinoic acid and estrogen modulation of insulin-like growth factor binding protein-4 gene expression and the estrogen receptor status of human breast carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **193**, 1232-1238

SHERR CJ [2000] Cancer cell cycles revisited. *Cancer Research* **60**, 3689-3695

SHILOH Y, KASTAN MB [2001] ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Advanced Cancer Research* **83**, 209-254

SHIMASAKI S; UCHIYAMA F; SHIMONAKA M; LING N [1990] Molecular cloning of the cDNAs encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein from rat and human. *Molecular Endocrinology* **4**, 1451-1458.

SIMSTEIN R, BUROW M, PARKER A, WELDON C, BECKMAN B [2003] Apoptosis, chemoresistance and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 995-1003

SINGH P, DAI B, DHRUVA B, WIDEN SG [1994] Episomal expression of sense and antisense insuli-like growth factor (IGF)-binding protein-4 complementary DNA alters the mitogenic response of a human colon cancer cell line (HAT-29) by mechanisms that are independent of and dependent upon IGF-I. *Cancer Research* **54**, 6563-6570

SINGLETON JR, DIXIT VM, FELDMAN EL [1996] Type I insulin-like growth factor receptor activation regulates apoptotic proteins. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31791-31794

SIWANOWICZ I, POPOWICZ GM, WISNIEWSKA M, HUBER R, KUENKELE K-P, LANG K, ENGH RA, HOLAK TA [2005] Structural basis for the regulation of insulin-like growth factors by IGF binding proteins. *Structure* **13**, 155-167

SKOLNIK EY, LEE CH, BATZER A [1993] The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 ineracts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO Journal* **12**, 1929-1936

SLEDGE GW, MILLER KD [2003] Exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer. *European Journal of Cancer* **39**, 1668-75

SOULEZ M, PARKER MG [2001] Identification of novel oestrogen receptor target genes in human ZR75-1 breast cancer cells by expression profiling. *Journal of Molecular Endocrinology* **27**, 259-274

ST CROIX B, KERBEL RS [1997] Cell adhesion and drug resistance in cancer. *Current Opinion in Oncology* **9**, 549-556

STEWART AJ, JOHNSON MD, MAY FE, WESTLEY BR [1990] Role of insulin-like growth factors and the type-I insulin-like growth factor receptor in the estrogen-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 21172-21178

STEWART CE, ROTWEIN P [1996] Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiology Reviews* **76**, 1005-1026

STEWART CE, ROTWEIN P [1996] Insulin-like growth factor-II is an autocrine survival factor for differentiating byoblasts. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 330-338

- STORY M, KODYM R** [1998] Signal transduction during apoptosis: Implications for cancer therapy. *Frontiers in Biosciences* **3**, d357-d375
- SUN F, ELGIN S** [1999] Putting boundaries on silence. *Cell* **99**, 459-462
- SUN G, PORTER W, SAFE S** [1998] Estrogen induced retinoic acid receptor  $\alpha$ 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. *Molecular Endocrinology* **12**, 882-890
- SUZUKI J, KAZIRO Y, KOIDE H** [1998] Synergistic action of R-Ras and IGF-I on Bcl-xL expression and caspase-3 inhibition in BaF3 cells: R-Ras and IGF-I control distinct anti-apoptotic kinase pathways. *FEBS Letters* **437**, 112-116
- TAKEICHI M** [1991] Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451-1455
- TANAKA Y, KOBAYASHI H, SUZUKI M, HIRASHIMA Y, KANAYAMA N, TERAO T** [2004] Genetic downregulation of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) by bikunin reduces IGF-I-independent Akt and ERK1/2 activation and subsequently reduces ovarian cancer cell growth, invasion and metastasis. *International Journal of Cancer* **109**, 336-347
- TAYLOR SI, DONS RF, HERNANDEZ E, ROTH J, GORDEN P** [1982] Insulin-resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Annual of Internistic Medicine* **97**, 851-855
- TASHIRO H, KATABUCHI H, BEGUM M, LI X, NITTA M, OHTAKE H, OKAMURA H** [2003] Roles of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor in anchorage-dependent and -independent growth in human ovarian surface epithelial cell lines. *Cancer Science* **94**, 953-959
- THORSEN T, LAHOOTI H, RASMUSSEN M, AAKVAAG A** [1992] Oestradiol treatment increases the sensitivity of MCF-7 cells for the growth stimulatory effect of IGF-I. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 537-540
- TONIN P; EHRENBORG E; LENOIR G; FEUNTEUN J; LYNCH H; MORGAN K; ZAZZI H; VIVIER A; POLLAK M; HUYNH H; LUTTMAN H; LARSSON C; NAROD S** [1993] The human insulin-like growth factor-binding protein 4 gene maps to chromosome region 17q12-q21.1 and is close to the gene for hereditary breast-ovarian cancer. *Genomics* **18**, 414-417
- TUDOR G, AGUILERA A, HALVERSON DO, LIANG ND, SAUSVILLE EA** [2000] Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-23, and Bcl-xL protein levels. *Cell Death and Differentiation* **7**, 574-586
- TURKER M, BESTOR TH** [1997] Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutational Research* **386**, 119-130
- UI M, SHIMONAKA M, SHIMASAKI S, LING N** [1989] An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulating hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **125**, 912-916
- VALENTINIS B, BHALA A, DEANGELIS T, BASERGA R, COHEN P** [1995] The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I-receptor gene. *Molecular Endocrinology* **9**, 363-367
- VALENTINIS B, MORRIONE A, PERUZZI F, PRISCO M, REISS K, BASERGA R** [1999] Anti-apoptotic signalling of the IGF-I-receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* **18**, 1827-1836
- VOGELSTEIN B, KINZLER K** [2004] Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* **10**, 789-799
- WAJED SA, LAIRD PW, DEMEESTER TR** [2001] DNA-Methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery* **234**, 10-20

- WANG DY, FULTHORPE R, LISS SN, EDWARDS EA [2004] Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene. *Molecular Endocrinology* **18**, 402-411
- WANG F, HOIVIK D, POLLENZ R, SAFE S [1998] Functional and physical interactions between the estrogen receptor-Sp1 and the nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Research* **26**, 3044-3052
- WANG J, NIU W, NIKIFOROV Y, NAITO S, CHERNAUSEK S, WITTE D, LEROITH D, STRAUCH A, FAGIN JA [1997] Targeted overexpression of IGF-I evokes distinct patterns of organ remodeling in smooth muscle cell tissue beds of transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 1425-1439
- WANG J, NIU W, WITTE DP, CHERNAUSEK SD, NIKIFOROV YE, CLEMENS TL, SHARIFI B, STRAUCH AR, FAGIN JA [1998] Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle alpha-actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia 1. *Endocrinology* **39**, 2605-2614
- WANG L, MA W, MARKOVICH R, LEE W-L, WANG PH [1998] Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signalling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* **139**, 1354-1360
- WANG LH [2004] Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mount Sinai Journal of Medicine* **71**, 361-367
- WARRENFELTZ S, PAVLIK S, DATTA S, KRAEMER ET, BENIGNO B, McDONALD JM [2004] Gene expression profiling of epithelial ovarian tumours correlated with malignant potential. *Molecular Cancer* **3**, 27-43
- WEBB, LOPEZ GN, UHT RM, KUSHNER PJ [1995] Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* **9**; 443-456
- WERHEIM I, TANGIRJ, MUTO MG, WELCH WR, BERKOWITZ RS, CHEN WY, MOK SC [1996] Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* **16**, 2147-2153
- WERNER H, KARNIELI E, RAUSCHER FJ, LEROTH D [1998] Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**, 8318-8323
- WETTERAU LA, MOORE MG, LEE KW, SHIM ML, COHEN P [1999] Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Molecular Genetics and Metabolism* **68**, 161-181
- WILLIAMS AC, COLLARD TJ, PERKS CM [2000] Increased p53-dependent apoptosis by the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 in human colonic adenoma derived cells. *Cancer Research* **60**, 22-27
- WIZNEROWICZ M, TRONO D [2003] Conditional suppression of cellular genes: lentivirus-mediated drug-inducible RNA interference. *Journal of Virology* **77**, 8957-8961
- WRIGHT RJ, HOLLY JMP, GALEA R, BRINCAT M, MASON HD [2002] Insulin-Like Growth Factor (IGF) independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis *Biology of Reproduction* **67**, 776-781
- XIE W, DUAN R, SAFE S [1999] Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor-Sp1 interactions. *Endocrinology* **140**, 219-227
- XIE Y, SKYTTING B, NILSSON G, BRODIN B, LARSSON O [1999] Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype. *Cancer Research* **59**, 3588-3591
- YI HK, HWANG PH, YANG DH, KANG CW, LEE DY [2001] Expression of the insulin-like growth factors (IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *European Journal of Cancer* **37**, 2257-2263
- YIN DL, PU L, PEI G [1998] Antisense oligonucleotide to insulin-like growth factor II induces apoptosis in human ovarian cancer AO cell line. *Cellular Research* **8**, 159-165

**YU H, ROHAN T** [2000] Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute* 92:1472-89

**YUAN ZQ, FELDMAN RI, WANG G, MA X, JIANG C, COPPOLA D, NICOSIA SV; CHENG JQ** [2000] Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19, 2324-2330

**YUAN ZQ, SUN M, FELDMAN RI, SUSSMAN GE, COPPOLA D, NICOSIA SV, CHENG JQ** [2003] AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: Implication of AKT2 in chemoresistance. *Journal of Biological Chemistry*

**ZAZZI H; NIKOSHKOV A; HALL K; LUTTMAN H** [1998] Structure and transcription regulation of the human insulin-like growth factor binding protein 4 gene (IGFBP4). *Genomics* 49, 401-410

**ZBOROVSKAYA I, GASPARIAN A, KARSELADZE A, ELCHEVA I, TROFIMOVA E, DRIOUCH K, TRASSARD M, TATOSYAN A, LIDEREAU R** [1999] Somatic genetic alterations (LOH) in benign, borderline and invasive ovarian tumours: intertumoral molecular heterogeneity. *International Journal of Cancer* 82, 822-826

**ZHOU R, DIEHL D, HOEFELICH A, LAHM H, WOLF E J** [2003] IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *Endocrinology* 178, 177-93.

**ZHOU R, FLASWINKEL H, SCHNEIDER MR, LAHM H, HOEFELICH A, WANKE R, WOLF E** [2004] Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice. *Journal of Molecular Endocrinology* 32, 349-364



**9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

µM	Mikromolar (µmol/l)
A	Adenin
Abb.	Abbildung
A.L.F.	„Automated Laser Fluorescent DNA Sequencer“
APS	Amoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren (amino acids)
APS	Ammonium Peroxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cd	Codon
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG	island Zytosin paart Guanin-Insel (Cytosin pairs Guanin)
dATP	desoxyadenintriphosphat
dCTP	desoxycytosintriphosphat
del	Deletion
dGTP	desoxyguanintriphosphat
d. h.	das heißt
DHPLC	„denaturing high performance liquid chromatography
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
ds	Doppelstrang
dTTP	desoxythymintriphosphat
E	Östrogen
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECM	extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere
ER	Östrogenrezeptor
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls h Stunde
Hepes	(N-2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IGFBP-rPs	IGFBP-related proteins
IGFBPs	IGF-Bindungsproteine (IGF binding proteins)
IGF-I, II	Insulin-like growth factor-I bzw. II
IGF-IR	IGF-Rezeptor Typ I

IR	Insulinrezeptor
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LOH	Verlust des zweiten Alles (loss of heterozygosity)
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
MaCa	Mammakarzinom
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
mRNA	messenger RNA
MTT	(3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5, diphenyl tetrazolium bromid
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
<i>P</i>	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAPP-A	Schwangerschaft-assoziiertes-Plasmaprotein-A
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PIC	„percentage of informative cases“
Q	Allelverhältnis
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SNP	„single nucleotid polymorphism“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TEAA	Tetraethylammoniumacetat
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorben U Unit
U	Unit
UV	Ultra-Violett
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo, 4-chloro, 3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## 10. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.G. Bender für die Möglichkeit, im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Universität Düsseldorf arbeiten zu können. Herrn Prof. Dr. P Dall danke ich für die Betreuung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich für die Vertretung meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf und die Übernahme des Ko-Rferates.

Herrn Dr. D. Niederacher danke ich für die Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie für die vielen hilfreichen Ratschläge bei kleinen und großen wissenschaftlichen Problemen.

Ein großes Dankeschön an Frau Dr. Beate Betz für ihre Einführung in die Methodik der DHPLC-Analysen, für Ihre Hilfe bei der Planung der Klonierungsstrategien, für die Durchführung der viralen Transfektionen. und für die stetige Bereitschaft ihr molekularbiologisches Wissen weiterzugeben.

Prof. H. Hahnenberg von der Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf danke ich für die Bereitstellung der viralen Expressionsplasmide. Prof. Schulze-Osthoff vom Institut für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf danke ich für die Zusammenarbeit und die wissenschaftlichen Ratschläge im Rahmen der Apoptose-Analysen und für die Bereitstellung der Maus-Fibroblaten-Zelllinie und diverser Antikörper. Mein besonderer dank gilt Frau Dr. Ute Schulz für Ihre große Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen, der Kristallviolett-Assays und der Western-Blots und der anschließenden Interpretation der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Dagmar Hohmann für Ihre Hilfe bei der Zellkultur und den Klonierungsarbeiten sowie viele nützliche Tipps bei der Durchführung der zellulären Assays. Torsten Heimerzheim danke ich für seine Einführung in die „Geheimnisse“ der Western-Blot-Technik und seine Geduld beim Lösen selbst trivialer Computer-Probleme.

Allen weiteren Laborkollegen und -kolleginnen danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und die netten Kaffepausen, in denen man von dem alltäglichen Forscherfrust entspannen konnte. Danke für die freundschaftliche Unterstützung, die oft über das Laborleben hinausging, und die gegenseitige Motivation. Es war eine schöne Zeit mit Euch!

Vor allem aber bin ich meiner Familie für ihre Unterstützung in jeglicher Form zutiefst dankbar. Meinem Freund danke ich, dass ich mich jederzeit auf ihn verlassen konnte und dass er geduldig auch meine „Schlechte-Laune“-Tage, wenn es im Labor wieder mal nicht klappte, mit Gelassenheit ertragen hat.

DANKE.....



**11. ERKLÄRUNG**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne erlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

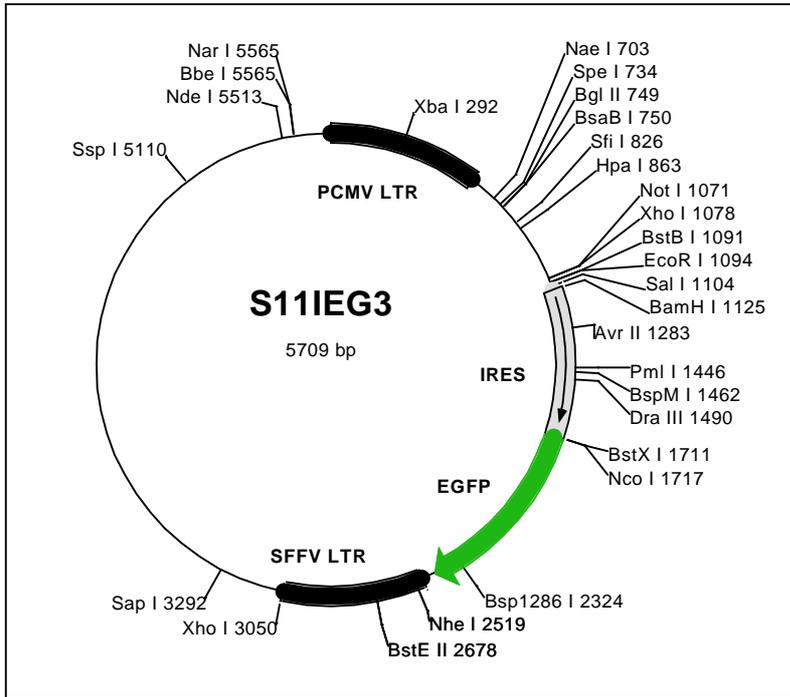
Düsseldorf, den 03.02.2006

Malgorzata Czystowska



**12. ANHANG**

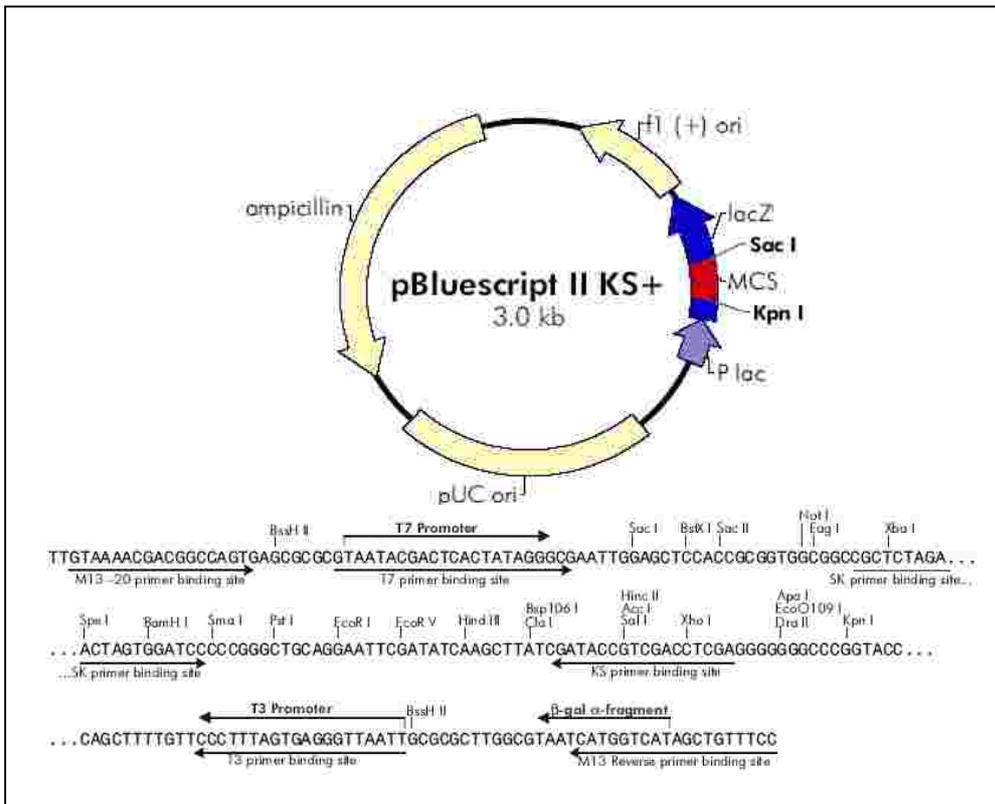
**12.1 Plasmide:**



**Retrovirales Expressionsplasmid S11IEG3 für das IGFBP-4-Protein.**

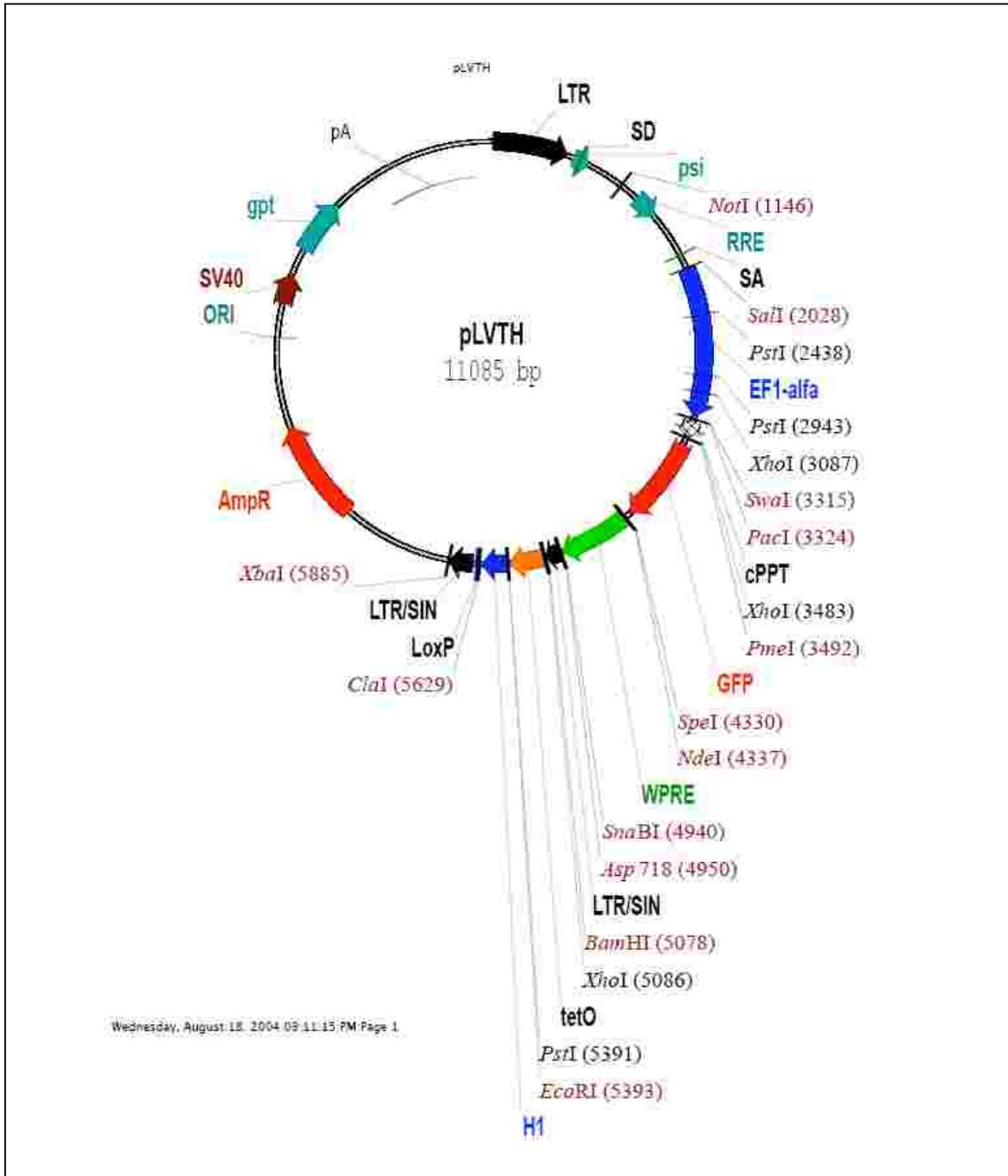
Das Plasmid basiert auf dem *E.coli*-Klonierungsvektor pBR322 und wurde freundlicherweise von Prof. H. Hahnenberg zur Verfügung gestellt.

LTR: long terminal repeat; IRES: internal ribosome entry site; EGFP: green fluorescent protein



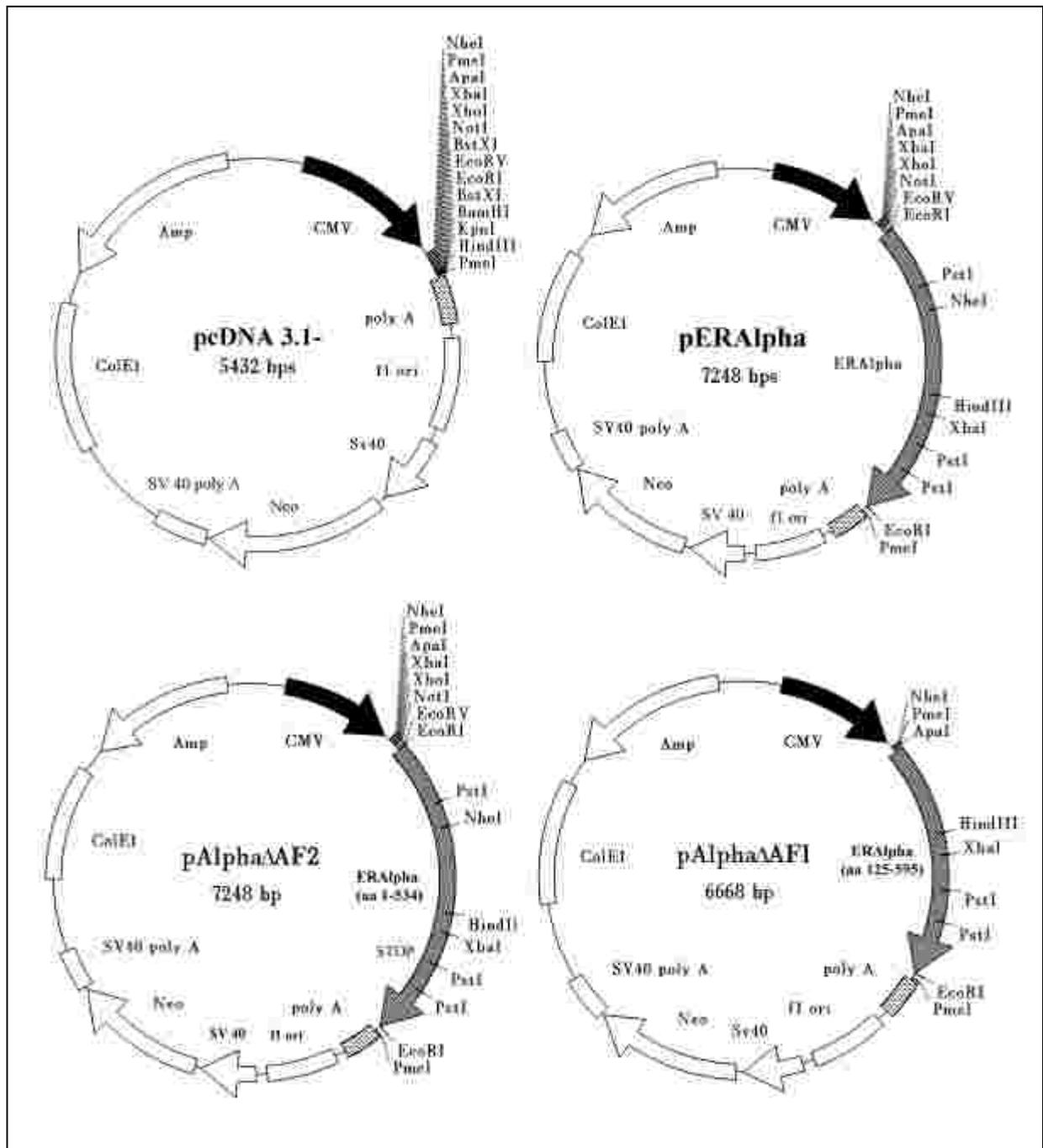
**pBluescript® II KS+-Phagemid-Vektor (Stratagene)**

ampicillin: Ampicillin-Resistenz open reading frame; f1 (+) ori: Replikationsursprung von Einzelstrang-DNA (ssDNA); lacZ: kodierende Sequenz für das  $\beta$ -Galactosidase- $\alpha$ -Fragment; MCS: multiple cloning site; P lac: promoter für das lacZ-Gen; pUC: pUC-replikationsursprung; unten: Sequenz (598-826) der multiple cloning site-Region



**Lentiviraler Expressionsvektor pLV-TH**

AmpR: Ampicillin-Resistenz; H1: H1-Promotor; GFP: green fluoreszent protein



### Expressionsplasmide für den Estrogenrezeptor ER $\alpha$

SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp:  $\beta$ -lactamase; CoIE1: CoIE1 Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; CMV: CMV-Promotor; Neo: Neomycin-Resistenz; ERAlpha: humaner Estrogen-Rezeptor alpha

## 12.2 Klinische Daten der untersuchten Mamma- und Ovarial-Karzinome:

Die Tumorgroße (T) wird unterschieden nach:

- T 0 = Tumorgroße ist unbekannt
- T 1 = Primärtumor kleiner als 2 cm
- T 2 = Primärtumor 2 – 5 cm groß
- T 3 = Primärtumor größer als 5 cm
- T 4 = Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut.

Der Lymphknotenstatus (N) wird klassifiziert in:

- N 0 = Befall der regionären Lymphknoten unbekannt
- N 1 = keine regionären Metastasen
- N 2 = Metastasen in regionären Lymphknoten nachweisbar

Fernmetastasen (M) werden unterschieden nach:

- M 0 = klinischer Nachweis von Tochtergeschwülsten unbekannt
- M 1 = kein klinischer Nachweis von Tochtergeschwülsten
- M 2 = Fernmetastasen sind nachweisbar

Der Differenzierungsgrad (Grading) (G) des Tumors wird unterschieden nach:

- G 0 = Differenzierungsgrad unbekannt
- G 1 = gut differenziert
- G 2 = mäßig differenziert
- G 3 = schlecht differenziert

Hormonrezeptorstatus:

- PgR = Progesteronrezeptor
- ER = Östrogenrezeptor

Tumor-nr.	Alter <50Jahre >50Jahre	Tumor- größe (T)	Lymphknoten- Status (N)	Fern- metastasen (M)	Grading	ER-Status	PgR-Status	relative CRYAB- Expression (Ratio N/T)
3	< 50 J.	T3	N2	M2	G2	negativ	negativ	0,54
236	< 50 J.	T3	N0	M2	G3	unbekannt	unbekannt	0,12
240	< 50 J.	T2	N2	M1	G2	positiv	positiv	0,05
251	< 50 J.	T2	N0	M2	G2	negativ	negativ	0,01
254	> 50 J.	T3	N2	M0	G3	unbekannt	unbekannt	7,35
263	> 50 J.	T3	N2	M0	unbekannt	positiv	positiv	0,05
266	> 50 J.	T0	N2	M1	unbekannt	positiv	positiv	0,16
268	> 50 J.	T2	N2	M0	G2	positiv	positiv	0,02
286	unbekannt	T0	N0	M0	unbekannt	unbekannt	unbekannt	0,1
303	> 50 J.	T1	N1	M0	unbekannt	positiv	positiv	0,09
335	> 50 J.	T3	N1	Mx	G2	unbekannt	unbekannt	unbekannt
349	< 50 J.	T4	N1	Mx	G2	unbekannt	negativ	0,1
352	< 50 J.	T2	N1	M1	G2	positiv	positiv	0,01
355	> 50 J.	T2	N2	M0	G3	positiv	positiv	0,02
368	> 50 J.	T3	N2	M2	G3	negativ	negativ	1,46
381	> 50 J.	T1	N0	Mx	G2	unbekannt	positiv	unbekannt
382	> 50 J.	T2	N0	Mx	G3	unbekannt	positiv	0,06
402	unbekannt	/	/	/	/	/	/	0,04
413	> 50 J.	T2	N0	M0	G2	/	/	0,56
420	unbekannt	T1	N0	M0	G3	/	/	2
422	unbekannt	/	/	/	/	negativ	negativ	0,86
430	unbekannt	T4	N0	M0	/	unbekannt	negativ	0,61
437	unbekannt	T1	N0	Mx	G2	positiv	positiv	0,04
446	> 50 J.	T2	N1	Mx	G2	negativ	negativ	0,03
447	unbekannt	/	/	/	/	/	/	0,01
451	unbekannt	/	/	/	/	positiv	unbekannt	unbekannt
453	unbekannt	/	/	/	/	unbekannt	negativ	0,09
496	unbekannt	T2	N1	Mx	G3	negativ	positiv	0,19
501	> 50 J.	T1	Nx	Mx	G2	negativ	positiv	0,13
504	unbekannt	T2	Nx	Mx	G2	positiv	positiv	1,23
510	> 50 J.	T2	Nx	Mx	G2	unbekannt	unbekannt	4,91

x = nicht beurteilbar

Tabelle I : Expressionsanalyse von CRYAB: klinische Daten der untersuchten Mamma-Karzinome

Labornr.	Alter	Primär-Tumor ja/nein?	Tumorgröße (T)	Lymphknoten-Status (N)	Fern-metastasen (M)	Grading (G)	relative IGFBP-4-Expression	IGFBP-4-LOH	IGFBP-4-Methylierung	relative Rab5C-Expression
1 T	55 J.	nein						LOH		
4 T								n.i.		
5 T								LOH		
6 T	69 J.	ja	T3	N1	M0	G1	0,17		nein	
8 T	83 J.	ja	T3	Nx	Mx		22,80	LOH	nein	2,93
7 T / 10 T	52 J.	??		N1			0,37	LOH (10T)		3,68
9 T	56 J.	ja	T3	N1	Mx	G3	3,65	LOH	nein	4,25
11 T	18 J.	ja	T2	N1	Mx		10,95	n.i.	nein	3,15
12 T	59 J.	nein					2,36	LOH	nein	5,08
13 T	49 J.	ja				G3	16,85		nein	4,71
14 T	45 J.	nein						o	ja	
15 T	52 J.	nein		Nx			21,63	o	nein	5,07
16 T	46 J.	ja	T4	N1		G3	21,54	n.i.		1,36
17 T	54 J.	ja	T3	N1	Mx	G3	15,13			2,85
18 T	57 J.	ja		N0		G2	24,66	n.i.		3,65
19 T	52 J.	/					20,82	o	nein	1,73
20 T	69 J.	ja	T3	Nx	Mx				nein	5,63
21 T	65 J.						35,90	o		4,38
22 T	47 J.	nein	T4	N1		G2	0,70		ja	3,11
23 T	53 J.	nein					1,54	LOH	nein	0,08
24 T	58 J.	nein					17,81			0,94
25 T	53 J.	nein					23,80			0,7
26 T	71 J.	ja	T2	N1	Mx		1,93			0,93
28 T	51 J.									
31 T	73 J.	ja					16,31			
32 T	83 J.						27,94			0,14
33 T	70 J.	ja					19,60			3,69
34 T	20 J.	??					30,44		ja	5,05
35 T	19 J.	/					1,00			2,64
36 T	58 J.	??					1,16			4,58
37 T	46 J.									
39 T	56 J.						4,58	n.i.		13,5
41 T	24 J.	??					unb	LOH		0,48
42 T	63 J.						0,84	o		1,24
45 N	67 J.						31,84	LOH		0,17
46 N	48 J.							n.i.		
50 T	70 J.	ja	T3	Nx	Mx		9,60			
51 T	70 J.						28,46			2,74
54 T	63 J.						26,38	n.i.		0,45
56 T	59 J.	nein					9,85	LOH		1,66
58 T	76 J.	/	T4				unb	o		1,87
59 T	42 J.						14,71			
62 T	56 J.	nein					16,64	LOH		2,59
63 T	45 J.	ja	T3			G2	32,57	LOH		0,63
64 T	20 J.						0,96	LOH		
65 T	58 J.	ja					12,73			1,12
68 T / 69 T	60 J./70 J.	ja		N1			0,82/ 0,43			1,39 (69T)
70 T	63 J.	ja					17,50	LOH		1,82
71 T	72 J.	ja		N1			22,85	o		2,41
73 T	61 J.						16,66	n.i.		2,79
74 T	48 J.	ja					9,22			0,78
75 T	62 J.							LOH		
76 T	62 J.	nein		N0			23,54			0,15
81 T	60 J.	nein					24,56	o		0,38
83 T	62 J.	ja					4,47	o		0,3
88 T	59 J.						10,93			

Tabelle IIa : Expressionsanalyse von Rab5C/Genanalyse von IGFBP-4: klinische Daten der untersuchten Ovarial-Karzinome (LOH = Allelverlust; o = kein LOH; n.i.= nicht informativ).

Laborno.	Alter	Primär-Tumor ja/nein?	Tumorgröße (T)	Lymphknoten- Status (N)	Fern-metastasen (M)	Grading (G)	relative IGFBP-4- Expression	IGFBP-4- LOH	IGFBP-4- Methylierung	relative Rab5C- Expression
90 T	51 J.	ja		N1			0,28		nein	
92 T	36 J.	nein					17,13	o		2,01
93 T	52 J.	nein		Nx			1,46	LOH	nein	1,98
96 T	57 J.	ja		N0			2,08			
141 T	65 J.						0,24	?		
101T	56 J.	ja		Nx			0,56	LOH	ja	2,42
104 T	35 J.	??					0,27	n.i.	nein	0,92
108 T	79 J.						5,47	n.i.		0,31
110 T	60 J.						1,42	?		1,02
112 T	48 J.	ja	T3	N1			1,63	LOH	ja	51,95
117 T	22 J.	ja		N0			0,47	o	nein	2,54
118 T	62 J.	ja	T3	Nx		G2	0,00	LOH	ja	2,05
119 T	57 J.	/					2,06	o		
121 T	66 J.						41,44			
123 T	51 J.	/					1,56	o		
124 T	65 J.	/					4,51	LOH		28,27
127 T	84 J.	/					5,03	n.i.		1,59
130 T	66 J.	ja					6,88	LOH		1,05
131 T	44 J.						0,76	n.i.	nein	0,44
134 T	43 J.						21,62	o		1,19
137 T	42 J.						1,83	LOH	nein	24,82
138 T	55 J.						1,72	LOH	ja	3,78
142 T	44 J.	nein					3,80	LOH	ja	0,5
143 T	49 J.						0,50	o	nein	1,44
Z1								o		
Z4								LOH		
Z6								LOH		

Tabelle IIb : Expressionsanalyse von Rab5C/Genanalyse von IGFBP-4: klinische Daten der untersuchten Ovarial-Karzinome –Fortsetzung (LOH = Allelverlust; o = kein LOH; n.i.= nicht informativ).

## 13. LEBENSLAUF

### Persönliche Daten:

Name: Czystowska  
Vorname: Malgorzata  
Geburtsdatum: 18. 01 1975  
Geburtsort: Grójec, Polen  
Staatsangehörigkeit: polnisch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

09/1982 - 07/1987 Grundschule in Düsseldorf (1. und 2. Klasse)  
Grundschule in Warschau (bis 6. Klasse)  
09/1987 - 07/1992 Bundesgymnasium in Wien (6. bis 8. Schulstufe)  
Gymnasium in Warschau (9. bis 10. Schulstufe)  
09/1992 – 06/1995 Helmholtz-Gymnasium in Hilden  
Abschluss Abitur

### Hochschulausbildung:

1995-2001 Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
Studienschwerpunkte: Molekularbiologie, Parasitologie, Genetik  
02/2000-04/2001 Diplomarbeit am Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und  
Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
Thema: „Zur Funktion des heptahelikalen Transmembranrezeptors  
HC110-R aus dem parasitischen Nematoden *Haemonchus contortus*“

### Promotion:

11/2001-12/2005 Promotionsarbeit  
Thema: " Molekulare Charakterisierung tumor-assoziiierter  
Kandidatengene in gynäkologischen Tumoren."  
Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf