

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Arbeitsbereich Molekularbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke

Experimentelle Grundlagen zur Identifizierung und Charakterisierung von IGF-Bindungsprotein-1-Kinasen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sylvia Bier

aus Dresden

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 24.09.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Braulke

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H.-J. Seitz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. ZIELSETZUNG.....	6
2. EINLEITUNG.....	7
2.1. Das IGF-System.....	7
2.2. IGF I und IGF II.....	8
2.3. IGF-Rezeptoren	9
2.4. IGF-Bindungsproteine (IGFBPs).....	10
2.4.1. Mechanismen zur Freisetzung von IGFs	12
2.4.2. IGF-Bindungsprotein-1	13
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1. Material.....	16
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.2. Geräte	17
3.1.3. Radioaktive Substanzen.....	17
3.1.4. Zelllinien.....	17
3.1.5. Zellkulturlösungen.....	17
3.1.6. Antikörper.....	18
3.2. Zellbiologische Methoden.....	18
3.2.1. Kultivierung von Zelllinien	18
3.2.2. Konditionierung von Zellen.....	18
3.2.3. Trypsinieren von Zellen.....	19
3.2.4. Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	19
3.2.5. [¹²⁵ J]-ASB-Endozytose	19
3.2.6. Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵ S]-Methionin	20
3.3. Proteinchemische Methoden	21
3.3.1. Ethanol-Fällung von sezernierten Proteinen.....	21
3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	21
3.3.3. Native PAGE.....	22
3.3.4. Tris-/Tricin-SDS-PAGE	23
3.3.5. Elektrontransfer von Proteinen auf Nitrozellulose	23
3.3.6. Westernblot.....	24
3.3.7. Ligandblot.....	24
3.3.8. Immunpräzipitation	25
3.3.9. Imprägnierung von Polyacrylamidgelen für die Fluorografie	25
3.3.10. Entfernung von Liganden unter sauren Pufferbedingungen	25
4. ERGEBNISSE	27
4.1. Nachweis phosphorylierter und nicht-phosphorylierter IGFBP-1 Formen	27
4.2. Experimenteller Ansatz zur Identifizierung der IGFBP-1-Kinase	29
4.2.1. Strategie der Komplementationsklonierung	29
4.2.2. Sensitivität verschiedener Nachweisverfahren phosphorylierter hIGFBP-1 Formen	31
4.2.2.1. IGFBP-1 Westernblot	31
4.2.2.2. Immunpräzipitation von phosphoryliertem IGFBP-1	32
4.2.2.3. Nachweis phosphorylierter Formen des IGFBP-1 durch Pulse-Chase-Markierung	34

4.3. Ausschluss von IGFBP-1-Kinasen an der Zelloberfläche.....	36
5. DISKUSSION.....	40
5.1. Etablierung von Bedingungen zur Komplementationsklonierung der IGFBP-1-Kinase	40
5.2. Intrazelluläre Lokalisation der IGFBP-1-Kinase in HepG2-Zellen	43
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	45
7. LITERATURVERZEICHNIS	46
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	53
9. ANHANG	55

1. Zielsetzung

Experimentelle Grundlagen zur Identifizierung und Charakterisierung von IGFBP-1-Kinasen

Die mitogenen und metabolischen Wirkungen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF I und II werden von sechs hochaffinen IGF-Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6) reguliert, die die Verfügbarkeit der IGFs für die Wechselwirkung mit ihren Rezeptoren bestimmen. Durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von IGFBP-1, katalysiert durch spezifische Kinasen bzw. Phosphatasen, wird die Affinität des Bindungsproteins zu den Wachstumsfaktoren verändert, was nach Dephosphorylierung zur Freisetzung der IGFs führt. Die Identität der IGFBP-1-Kinasen und -Phosphatasen ist unbekannt. Vorarbeiten zeigten, dass offensichtlich Nager-Zellen (wie z.B. BHK-Zellen) die spezifische Kinase zur Phosphorylierung von humanem IGFBP-1 fehlt (Scharf et al., 2004).

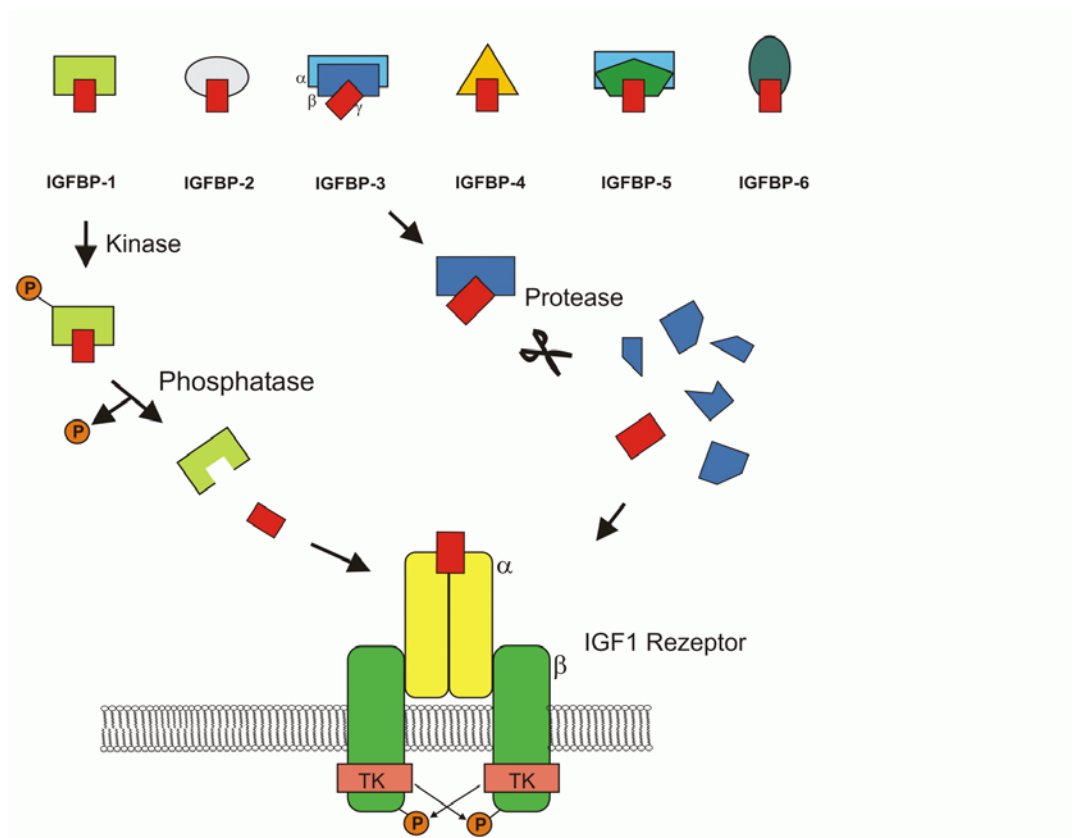
Initiales Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von Bedingungen, die die Identifizierung der IGFBP-1-Kinase mittels Komplementationsklonierung und deren Charakterisierung ermöglichen sollte. Dazu sollten zunächst die relevanten Methoden zur Identifizierung phosphorylierter IGFBP-1 Formen im Kulturmedium von IGFBP-1 überexprimierenden BHK-Zellen erarbeitet werden. Anschließend sollten BHK-Zellen, die das humane IGFBP-1 in nicht-phosphorylierter Form stabil überexprimieren, mit einer humanen Leber-cDNA-Bank transfiziert werden.

Die Expression der humanen IGFBP-1-Kinase in BHK-Zellen sollte zur Sekretion von phosphoryliertem IGFBP-1 führen. Aufgrund der Transfektions- und Selektionsstrategie sollte die Identifizierung und Klonierung der IGFBP-1 cDNA möglich sein, der sich die zellbiologische Charakterisierung der Kinase anschließen sollte.

2. Einleitung

2.1. Das IGF-System

Die Hauptkomponenten des IGF („Insulin-like growth“-)Systems sind die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF I und IGF II), deren Bindungsproteine (IGFBPs), IGF- und Insulin-Rezeptoren sowie IGFBP-spezifische, modifizierende Enzyme (Kinasen, Phosphatasen, Proteasen) (Abb. 1). Die einzelnen Komponenten haben wichtige Funktionen bei der Wachstumsregulation und Zelldifferenzierung (Pozo et al., 2005; Cohen, 2006; Holly und Perks, 2005).



■ IGF I / II

Abb. 1: Komponenten des IGF-Systems und ihre Wechselwirkungen

Die Hauptkomponenten des IGF-Systems sind die Wachstumsfaktoren IGF I und IGF II, sechs Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6), IGFBP-1-Kinasen, -Phosphatasen und -Proteasen sowie der Tyrosinkinase (TK)-haltige IGF I-Rezeptor. IGFBP-3 und -5 können zusammen mit IGFs und der „acid labile subunit“ (ALS) einen tertiären Komplex (α , β , γ) in der Zirkulation bilden.

2.2. IGF I und IGF II

IGF I wurde zunächst als Sulfatierungsfaktor identifiziert, der für die Sulfatierung von Chondroitinsulfat in Knorpelgewebe erforderlich war (Salmon, et al., 1957). Da diese Substanz als Vermittler der Wirkungen des hypophysären Wachstumshormons, damals auch Somatotropin genannt, agierte, wurde sie später als Somatomedin bezeichnet (Daughaday et al., 1972). Dieser Name wurde ersetzt durch die Bezeichnung „Insulin-Like Growth Factor I“ als sich durch Sequenzierung und biophysikalische Analysen herausstellte, dass IGF I und IGF II in bezug auf Struktur und Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu Proinsulin aufwiesen (Rinderknecht und Humbel, 1978). Zudem war IGF I in der Lage, die Glucoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen zu stimulieren. Trotz Homologie zum Proinsulin und teilweise ähnlicher Funktion wird die Wirkung von IGF I nicht durch Insulinantikörper antagonisiert (Zapf und Froesch, 1986), was auf die Existenz von spezifischen Rezeptoren hindeutete.

IGF I und IGF II sind einzelkettige Polypeptide, die aus 70 bzw. 67 Aminosäuren bestehen. Sie besitzen eine molare Masse von 7,6 bzw. 7,4 kDa und bestehen aus einer A- und einer B-Kette, die durch ein C-Peptid miteinander verbunden sind (Humbel, 1990). Hauptsyntheseort der IGFs ist die Leber. Die Regulation der Expression und Synthese von IGF I wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus kontrolliert. IGF I inhibiert die Freisetzung des im Hypophysen-Vorderlappen synthetisierten Wachstumshormons (GH), das wiederum zur Sekretionshemmung des GH-Releasing-Hormons im Hypothalamus führt. Neben der Leber synthetisieren aber auch Zellen anderer Organe und Tumorzellen IGFs, die daher in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin und Lymphe zu finden sind. Beim Menschen liegt die Serumkonzentration von IGF I bei 200 bis 300 ng/ml und ist damit niedriger als die von IGF II (500 bis 700 ng/ml). Der IGF I-Spiegel ist im Gegensatz zum IGF II-Spiegel stark altersabhängig, er steigt bis zur Pubertät an und nimmt danach kontinuierlich ab (Clemmons und Van Wyk, 1984). Die IGF-Wirkungen *in vitro* umfassen unter anderem die kurzfristige Stimulation anaboler Stoffwechselfvorgänge (DNA- und RNA-Synthese, Aminosäure- und Glucoseaufnahme, Protein- und Kohlenhydrat-Synthese, Glykogenaufbau) sowie Langzeiteffekte wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Firth und Baxter, 2002). IGFs wirken außerdem anti-apoptotisch (Butt et al., 1999; Resincoff und Baserga, 1998). *In vivo* vermitteln die IGFs vor allem die wachstumsstimulierende Wirkung von GH auf Gewebe und Organe (Isaksson, 2004).

IGF I-Rezeptor-knock-out Experimente zeigten jedoch, dass die GH-Wirkung *in vivo* auch über IGF I-unabhängige Signalwirkung vermittelt werden kann (LeRoith, 2000).

2.3. IGF-Rezeptoren

IGFs können spezifisch an drei Oberflächenrezeptoren binden; an den IGF I-, den IGF II- und den Insulin-Rezeptor. Es wird angenommen, dass die biologischen Effekte von IGF I und IGF II vor allem über den IGF I-Rezeptor vermittelt werden (LeRoith et al., 1995). Der IGF I- und der Insulin-Rezeptor gehören beide zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren und sind strukturell sehr ähnlich. Es handelt sich um integrale, heterotetramere Glykoproteinkomplexe, die aus $\alpha_2\beta_2$ -Untereinheiten bestehen. (Jones und Clemmons, 1995). Nach Ligandenbindung an die α -Untereinheit wird die Signaltransduktion durch Aktivierung der Tyrosinkinase-Domänen in der cytoplasmatischen Domäne der β -Untereinheit eingeleitet, die zur spezifischen Transphosphorylierung von Tyrosinresten in der β -Untereinheit führt. In der weiteren Abfolge werden verschiedene cytosolische Proteine wie Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS), „SH2-domain containing transforming proteins“ (Shc) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase) phosphoryliert (Chitnis et al., 2008). Durch IRS wird die Verbindung zwischen dem aktivierten Rezeptor und den Zielproteinen der weiteren Signalkaskade hergestellt. Bisher sind vier Mitglieder der IRS-Familie identifiziert worden. Die Funktion des IRS-1 ist bisher am besten untersucht. Es interagiert über spezifische Erkennungssequenzen, wie z.B. die YMXM-Sequenz (Y=Tyrosin, M=Methionin, X=beliebiger Rest), mit verschiedenen Proteinen, die „src homology“ 2 und 3 (SH2/SH3)-Domänen besitzen. Proteine, die SH2- Domänen enthalten, sind z.B. die p85 Untereinheit der PI-3-Kinase, Grb-2 („growth factor receptor bound protein“), Crk und Nck (Karas et al. 2001). Weitere Schritte in der IGF-Signalkette sind die Aktivierung der PI-3-Kinase unter Bildung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP₃) (Liu et al., 2001) sowie die Stimulation des Ras-abhängigen „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinase-Weges über einen Komplex von IRS-1 oder Shc mit Grb-2 und Sos, der zur Transkription verschiedener Gene führt (Chitnis et al., 2008). Der IGF I-Rezeptor hat die höchste Affinität zu IGF I (K_D : 0,2 bis 1 nM), die 100- bis 1000-fach höher als für Insulin und 2- bis 15-fach höher als für IGF II ist (Jones und Clemmons, 1995). In Zellen, die keine IGF I-Rezeptoren besitzen

(Hepatozyten, Fibroblasten von IGF I-Rezeptor knock-out Mäusen), erfolgt die Wirkung der IGFs über den Insulin-Rezeptor (Hartmann et al., 1992; Louvi et al., 1997). Über den Insulin-Rezeptor werden außerdem ca. 30 % der wachstumsfördernden Effekte des IGF II während der Embryonalentwicklung vermittelt (Louvi et al., 1997).

Der IGF II-Rezeptor ist ein einzelkettiges, integrales Membranglykoprotein, das identisch mit dem 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6P-Rezeptor) ist (Braulke, 1999). Der M6P-Rezeptor vermittelt den Transport und die Sortierung lysosomaler Enzyme. Der extrazelluläre Anteil des M6P-Rezeptors setzt sich aus einer repetitiven Struktur von 15 homologen Domänen zusammen, die unter anderem neben zwei Bindungsstellen für M6P-haltige Liganden in Domäne 3 und 9, eine Bindungsstelle für IGF II in Domäne 11 aufweisen (Schmidt et al., 1995). Der IGF II/M6P-Rezeptor weist eine hohe Affinität für IGF II auf (K_D : 1 nM) (Nissley, 1991) und bindet IGF I mit einer ca. 500-fach geringeren Affinität, während Insulin nicht an den Rezeptor bindet. Die Bedeutung des IGF II/M6P-Rezeptors in der Signaltransduktion wird kontrovers diskutiert, er spielt jedoch eine essentielle Rolle in der Regulation des extrazellulären IGF II-Spiegels, indem er das IGF II über den Endocytoseweg dem Abbau im Lysosom zuführt (Firth und Baxter, 2002).

2.4. IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)

Die IGFBPs bilden eine Familie von sechs homologen Bindungsproteinen (IGFBP-1 bis -6) mit molaren Massen zwischen 24 und 45 kDa, die eine höhere Affinität zu den IGFs (K_D : ca. 0,1 nM) als der IGF I-Rezeptor aufweisen (Hwa et al., 1999). Im Blutkreislauf, im extrazellulären Raum und im Gewebe sind IGFs nur in geringer Menge in freier Form vorhanden, da sie zu mehr als 95 % an verschiedene Mitglieder der IGFBP-Familie gebunden sind. Dadurch erhöhen sich z.B. die Halblebenszeiten zirkulierender IGFs von einigen Minuten auf 12 bis 15 Stunden (Jones und Clemmons, 1995). Die IGFBPs fungieren nicht nur als Transportmoleküle sondern wirken auch modulierend auf die biologischen Effekte der IGFs. Durch Bindung bzw. Freisetzung der IGFs aus den IGFBP-Bindungskomplexen über verschiedene Mechanismen, wie Phosphorylierung, Proteolyse oder Bindung an die extrazelluläre Matrix, können die mitogenen und metabolischen Effekte der IGFs durch IGFBPs reguliert werden (Clemmons et al., 1995). Die meisten IGFBPs zeigen eine vergleichbare Affinität für

IGF I und IGF II mit Ausnahme von IGFBP-6, das eine deutlich höhere Affinität für IGF II aufweist (Baxter, 2000). Die Struktur der IGFBPs ist gekennzeichnet durch eine globuläre, konservierte N- und eine C-terminale Domäne, die durch einen nicht-konservierten, variablen und IGFBP-spezifischen Bereich von 55 bis 95 Aminosäuren verbunden sind (Hwa et al., 1999). In der N-terminalen Domäne sind 10 (IGFBP-6), 12 (IGFBP-1, -2, -3 und -5) bzw. 14 (IGFBP-4) und in der C-terminalen Domäne 6 konservierte Cystein-Reste enthalten, die innerhalb der Domänen in Disulfidbrücken eingebunden sind (Abb. 2). Da N- und C-terminale IGFBP-Fragmente IGFs mit deutlich geringerer Affinität binden als intakte IGFBPs, nimmt man an, dass beide Domänen für die Ausbildung der hochaffinen Bindungsstelle notwendig sind (Firth und Baxter, 2002).

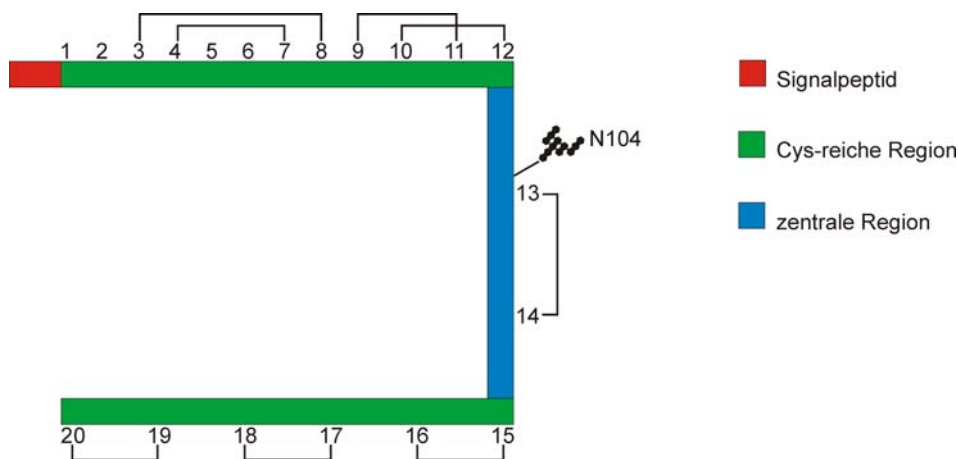


Abb. 2: Schematische Darstellung der IGFBPs (am Beispiel von IGFBP-4)

Die Struktur der IGFBPs ist gekennzeichnet durch eine globuläre, konservierte N- und eine C-terminale Domäne (grün), die durch einen nicht-konservierten, variablen und IGFBP-spezifischen Bereich von 55 bis 95 Aminosäuren verbunden sind (blau). Bei IGFBP-4 sind in der N-terminalen Domäne 14 und in der C-terminalen Domäne 6 konservierte Cystein-Reste enthalten, die innerhalb der Domänen in Disulfidbrücken eingebunden sind. Das Signalpeptid ist rot dargestellt. IGFBP-4 ist an der Position N104 glykosyliert.

Die mittleren, variablen Domänen der IGFBPs können posttranslational durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Proteolyse modifiziert werden. IGFBP-1, -5 und -6 besitzen *O*-glykosidisch verknüpfte Zuckerreste, IGFBP-3 und -4 hingegen enthalten drei bzw. eine *N*-Glykosylierungsstelle (Firth und Baxter, 2002) (Abb.2). Während die Oligosaccharidketten die Affinität der IGFBPs zu IGFs nicht beeinträchtigen, schützen Zuckerketten IGFBP-6 vor Proteolyse oder verhindern die Bindung von glykosylierten IGFBP-3 und -6 an glykosaminoglykan-haltige Moleküle an der Zelloberfläche (Firth und Baxter, 2002). In der mittleren Domäne aller IGFBPs befinden sich zudem Spaltstellen für IGFBP-Proteasen. Bei IGFBP-3, -5 und -6 sind im C-Terminus noch

Heparin-Bindungsdomänen bekannt, die zumindest bei IGFBP-3 und -5 an der Bindung an Heparansulfat-haltige Proteoglykane der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Hwa et al., 1999). Die Bindung von IGFBP-5 an Heparansulfate erniedrigt die Affinität zu den IGFs um das 7- bis 12-fache und schützt gleichzeitig vor Proteolyse des Bindungsproteins. Man vermutet, dass durch die Bindung der IGFBP/IGF-Komplexe an extrazelluläre Matrix-Proteoglykane die Wechselwirkung der IGFs zu ihren Rezeptoren erleichtert und somit deren Effekte verstärkt werden (Parker et al., 1998). IGFBP-1 und -2 besitzen innerhalb der C-terminalen Domäne sogenannte RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenzen, die an Integrine binden können (Jones et al., 1993). Alle sechs Bindungsproteine liegen nur in geringen Mengen in der Zirkulation in freier Form vor, sondern bilden entweder binäre Komplexe von 40 bis 50 kDa mit IGFs oder ternäre 150 kDa Komplexe mit IGFBP-3/IGFBP-5, der „acid labile subunit“ ALS und IGFs (Jones et al., 1993; Clemmons et al., 1995). Schließlich sind für IGFBP-3 und IGFBP-5 auch höher molekulare Komplexe von ca. > 440 kDa in der Zirkulation nachweisbar, die verschiedene Proteine wie Transferrin, Plasminogen oder IGFBP-3-Proteasen enthalten (Oesterreicher et al., 2005). Es wird angenommen, dass einige der binären Komplexe, z.B. IGFBP-1/IGF I, das vaskuläre Endothel durchqueren können, um die IGFs aus der Zirkulation zu den Zielzellen zu transportieren (Young et al., 1992).

2.4.1. Mechanismen zur Freisetzung von IGFs

Die Proteolyse der IGFBPs wird als Hauptmechanismus zur Freisetzung der IGFs aus den IGF/IGFBP-Komplexen angesehen. Die Affinität der gebildeten Fragmente zu den IGFs sinkt und erhöht die Verfügbarkeit der IGFs für die IGF-Rezeptoren (Maile und Holly, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Proteasen IGFBPs *in vitro* spalten können. Um die physiologische Bedeutung dieser Proteasen nachzuweisen, müssen *in vitro* erzeugte definierte Fragmente in Größe und benutzten Spaltstellen mit *in vivo* isolierten Fragmenten übereinstimmen. Die IGFBP-Proteasen lassen sich in drei Gruppen einteilen: Serinproteasen, Metalloproteasen und saure lysosomale Cathepsine (Bunn und Fowlkes, 2003). *In vivo* scheinen das „pregnancy-associated plasma protein A“ (PAPPA) und Mitglieder der „a disintegrine and metalloproteinases“ (ADAM-Familie) eine spezifische Rolle bei der Proteolyse von IGFBPs zu spielen (Kübler et al., 1998; Boldt und Conover, 2007; Kveiborg et al., 2008; Laursen et al., 2001).

Ein weiterer Mechanismus zur Freisetzung von IGFs aus IGFBP-Komplexen ist die Phosphorylierung von IGFBPs. Fünf der sechs IGFBPs (IGFBP-1, -2, -3, -5 und -6) werden posttranslational durch Serin-Phosphorylierung in der mittleren Domäne modifiziert (Coverley und Baxter, 1997; Shalamanova et al., 2008).

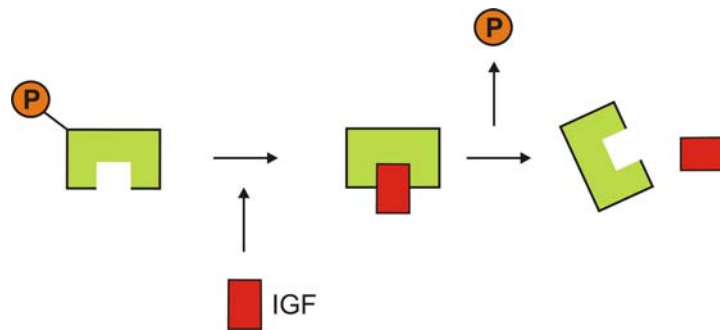


Abb. 3: Phosphorylierung und Dephosphorylierung von IGFBP-1

Die Phosphorylierung erhöht die Affinität von IGF I für IGFBP-1 und hemmt dadurch die Interaktion von IGF I mit dem IGF I-Rezeptor.

Für IGFBP-1 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung die Affinität zu IGF I etwa sechsfach erhöht (Jones et al., 1993), was zur Hemmung der IGF I-Wirkung über den IGF I-Rezeptor führt (Abb. 3), während nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 die Wirkung von IGF I potenziert. Die Kinasen und Phosphatasen, die für die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der IGFBPs verantwortlich sind, sind unbekannt.

2.4.2. IGF-Bindungsprotein-1

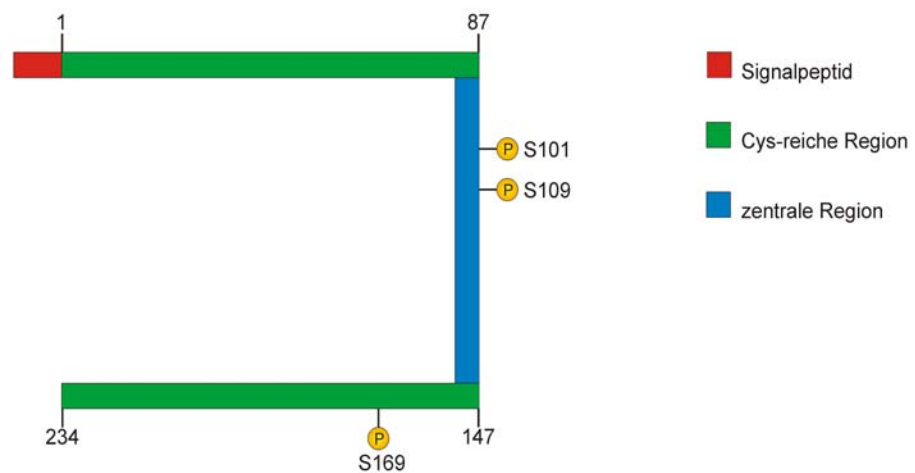
IGFBP-1 wird von verschiedenen Geweben synthetisiert. Die Hauptproduktionsorte sind Leber (Hepatozyten), Niere und Dezidua (Scharf et al., 1996; Irwin et al., 2001; Hise et al., 2001; Rutkute und Nikolova-Karakashian, 2007). Der IGFBP-1-Spiegel im Serum unterliegt tageszeitlichen Schwankungen und wird durch den Ernährungszustand, durch Hormone (Glucagon, Cortison, Insulin) und Zytokine beeinflusst. Bei unkontrolliertem Diabetes mellitus, im Hunger oder anderen katabolischen Zuständen sind die IGFBP-1-Spiegel 10-fach auf etwa 50-100 µg/l erhöht (Lee et al., 1993).

IGFBP-1 ist ein GH-unabhängiges Protein, das für die plazentale Entwicklung wichtig ist, und dessen Expression während früher Phasen der Leberschädigung und anschließender Reparaturvorgänge stark erhöht ist (Crossey et al., 2002; Lee et al., 1994). IGFBP-1 potenziert die Sensitivität von hepatischen Stellat-Zellen (HSC) für

mitogenes IGF I (Scharf et al., 2004). Weiterhin wird IGFBP-1 kontinuierlich von HepG2-Hepatomazellen sezerniert. Das aus Amnionflüssigkeit isolierte IGFBP-1 ist maternalen Ursprungs und tritt in zwei Formen auf: phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 (Coverley und Baxter, 1997; Crossey et al., 2002).

Die Struktur des IGFBP-1 ist gekennzeichnet durch eine globuläre, konservierte N- und eine C-terminale Domäne, die durch einen nicht-konservierten, variablen und IGFBP-spezifischen Bereich verbunden sind. An den Positionen S101, S109 und S169 sind die Serinphosphorylierungsstellen lokalisiert (Abb. 4).

(A)



(B)

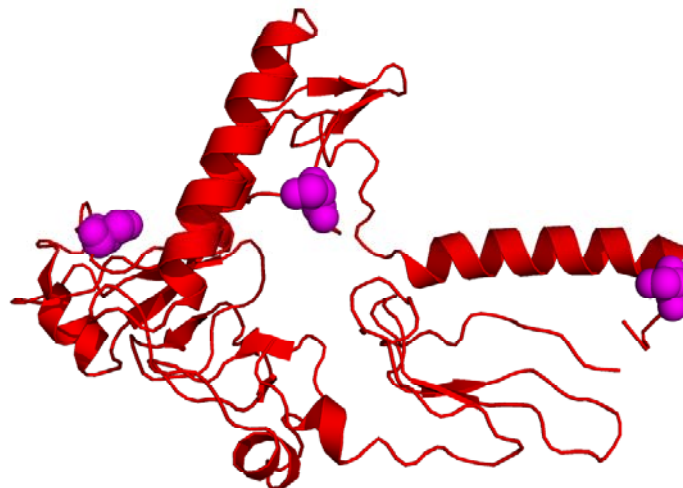


Abb. 4: Struktur des IGFBP-1

A) Schematische Darstellung des Aufbaus von IGFBP-1 und Lokalisation der Serin-Phosphorylierungsstellen. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das reife IGFBP-1 nach Abspaltung des Signalpeptides (rot) von 25 Aminosäuren.

B) 3 D-Struktur des IGFBP-1 mit Signalsequenz. Die Lokalisation der drei Serinphosphorylierungsstellen (violett) ist angegeben (A. Dickmanns, Göttingen).

Das Ausschalten des *Igfbp-1*-Gens bei der Maus verändert nicht den Phänotyp gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die Mäuse weisen keine embryonale Letalität oder signifikante Entwicklungsdefizite auf. Erwachsene *Igfbp-1*^{-/-} Mäuse sind fertil. Außerdem wurden keine Unterschiede im Blutglucose- oder Seruminsulin-Spiegel nach Glucosebelastungstest beobachtet (Leu et al., 2003).

Es wurden auch verschiedene transgene Mauslinien erzeugt, die humanes IGFBP-1 unter der Kontrolle verschiedener Promotoren entweder ubiquitär (Dai et al., 1994) oder in Leberzellen (Gay et al., 1997) exprimieren. Die Tiere unterschieden sich durch Wachstumsretardierung, durch die Rate prä- und postnataler Mortalität und durch Beeinträchtigung der Fertilität weiblicher Mäuse. Die Sequestrierung von IGFs durch überexprimiertes IGFBP-1 kann aber nur partiell die beobachteten Veränderungen erklären.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, analyserein verwendet.

Acrylamid 30 %/Bisacrylamid 0,8 %	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (bovine serum albumin)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mannose-6-Phosphat Barium-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mannose-6-Phosphat Dinatrium-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>n</i> -Octyl- β -D-glucopyranoside	Calbiochem, Schwalbach
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyphenylenoxid (PPO)	Merck, Darmstadt
Protein-A-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rainbowmarker	Amersham, Freiburg
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

3.1.2. Geräte

Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen, Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefel Scientific Instruments, USA
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Hoefel Scientific Instruments, USA
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Gammastrahlenszähler, 1470 Wizard	Wallac, Finnland
Geltrockner Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	News Brunswick Sc., USA
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Nalgene ^R Cryo 1 °C Freezing Container	Nagane, Rochester, USA
Phasenkontrastmikroskop Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Sterilbank HS 12	Heraeus, Osterode
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
Zentrifugen:	
Minifuge GL	Heraeus, Osterode
Eppendorf Kühlzentrifuge Modell 5417	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, USA

3.1.3. Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin, 1000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ J]-Natriumjodid, 100 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.4. Zelllinien

- BHK-Zellen (baby hamster kidney)
- BHK-Zellen stabil mit cDNA für humanes IGFBP-1 (BHK-BP1)
- HepG2-Zellen (humane hepatogene Zelllinie)
- MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney)

3.1.5. Zellkulturlösungen

„Dulbeccos Modified Eagle Medium“ (DMEM), DMEM ohne Methionin, PBS („Phosphate Buffered Saline“) für die Zellkultur, Trypsin/EDTA-Lösung, Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) wurden von der Firma GIBCO/BRL, Eggenstein, bezogen. Fötale Kälberserum (FKS) wurde von der Firma PAA, Österreich geliefert. Hitzeinaktiviertes und dialysiertes FKS wurde im Labor der Kinderklinik-Biochemie

präpariert: dazu wurde FKS für 2 Stunden bei 56 °C hitzeinaktiviert und anschließend gegen 10 mM PBS dialysiert (Ausschlußporengröße 14 kDa).

3.1.6. Antikörper

Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Horseradish-Peroxidase (HRP)-konjugiert

Dianova, Hamburg

Polyklonales Antiserum gegen humanes IGFBP-1 aus Kaninchen

UBI, USA

Biotinyliertes IGF I (bIGF I)

GroPep Ltd., Australien

Biotinyliertes IGF II (bIGF II)

GroPep Ltd., Australien

Des(1-3)IGF-I

GroPep Ltd., Australien

Des(1-6)IGF-II

GroPep Ltd., Australien

Streptavidin-HRP

Pierce, USA

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von Zelllinien

BHK-, BHK-BP1-, HepG2- und MDCK-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2. Konditionierung von Zellen

Um konditioniertes Medium zu gewinnen, wurden Zellen, die in 25-cm²-Flaschen konfluent gewachsen waren, mit 5 ml DMEM, 1 % Pen/Strep und 0,05 % BSA (DMEM/BSA) bei 37 °C kultiviert. Nach unterschiedlichen Zeiten (24, 48, 72 h) wurden die Medien abgenommen und für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für Experimente eingesetzt.

3.2.3. Trypsinieren von Zellen

Kultivierte Zellen wurden mit PBS gespült und mit Trypsin (1 ml Trypsin pro 25-cm²-Flasche) für 2-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsin wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium inaktiviert, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Experimente wurden BHK- oder HepG2-Zellen in einer Dichte von $2,5-3 \times 10^5$ in 35-mm-Zellkulturplatten ausgesät. Die Zellen wurden für 2-3 Tage kultiviert, bis sie für Experimente eingesetzt wurden.

3.2.4. Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zur Konservierung wurden konfluent gewachsene Zellen trypsinieren, in FKS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 1000 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen aus 25-cm²-Flaschen in ca. 3 ml Einfriermedium (10 % DMSO und 10 % FKS in DMEM) aufgenommen, über Nacht bei -80 °C in Einfrierröhrchen in einem „Nalgene^R Cryo 1 °C Freezing Container“ eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Revitalisierung wurde ein Einfrierröhrchen für ca. 1 Minute bei Raumtemperatur angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde in 5 ml kaltem DMEM (mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strep) aufgenommen und anschließend 5 Minuten bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.2.5. [¹²⁵I]-ASB-Endozytose

Rekombinante humane Arylsulfatase B (ASB) stand als [¹²⁵I]-markiertes Protein zur Verfügung. HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 2,5 bis 3×10^5 Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale ausgesät und für 2 bis 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für 1 Stunde in DMEM/BSA vorinkubiert. Danach wurden den Zellen [¹²⁵I]-ASB für weitere 3 Stunden in An- bzw. Abwesenheit des kompetitiven Inhibitors Mannose-6-Phosphat (M6P) (10 mM) zur Aufnahme angeboten. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf Eis 5 x mit kaltem PBS gewaschen

und oberflächengebundene ASB durch zwei Waschschrte mit M6P (2 mM) für 5 Minuten bei 4 °C entfernt. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS abgeschabt, sedimentiert und solubilisiert. Die zellassoziierte Radioaktivität wurde im Gammastrahlzähler gemessen und die Proben unter nicht-reduzierten Bedingungen durch SDS-PAGE und Autoradiografie analysiert.

3.2.6. Metabolische Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium		Methionin-freies DMEM
	1 %	Glutamin
	1 %	FKS (hitzeinaktiviert, dialysiert)
Pulse-Medium		Methionin-freies DMEM
	1 %	Glutamin
	1 %	FKS (hitzeinaktiviert, dialysiert)
		[³⁵ S]-Methionin (60 µCi/700 µl)
Chase-Medium		Methionin-freies DMEM
	1 %	Glutamin
	1 %	FKS (hitzeinaktiviert, dialysiert)
		Methionin (250 µg/ml)
Lysispuffer		PBS
	1 %	<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranoside
		Proteinase-Inhibitor-Cocktail

HepG2-Zellen wurden in einer Dichte von 2,5-3 x 10⁵ in 35-mm-Zellkulturplatten ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Die Zellen wurden 3 x mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei 37 °C mit 2 ml Methionin-freiem Hungermedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37 °C mit 700 µl [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium (60 µCi) metabolisch markiert („Pulse“). Die Zellen einer Platte wurden danach mit eiskaltem PBS (3 x mit 2 ml) gewaschen und direkt in 700 µl Lysispuffer abgeschabt. Parallel wurden Platten nach dem Pulse mit 700 µl nicht radioaktivem Medium für verschieden lange Zeiten bei 37 °C inkubiert („Chase“). Danach wurden die Chase-Medien abgenommen und gegebenenfalls eingefroren. Die Zellen wurden in 700 µl Lysispuffer abgeschabt. Zellextrakte und Medien wurden dann für die Immunpräzipitation von IGFBP-1 verwendet.

3.3. Proteinchemische Methoden

3.3.1. Ethanol-Fällung von sezernierten Proteinen

Probenpuffer (2 x) für SDS-PAGE	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	20 %	Glycerin
	0,012 %	Bromphenolblau
Probenpuffer (2 x) für Nativ-PAGE	250 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	20 %	Glycerin
	0,012 %	Bromphenolblau

Aus 300 µl konditioniertem Medium wurden Proteine durch Zusatz von 700 µl eiskaltem absoluten Ethanol während einer Inkubation für 3 Stunden bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden anschließend für 15 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die präzipitierten Proteine bei Raumtemperatur getrocknet. Die präzipitierten Proteine wurden nun in Probenpuffer (2 x) aufgenommen, 1:1 mit ddH₂O verdünnt und dann bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Überstände zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) oder Nativ-PAGE eingesetzt.

3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid
Trispuffer (Trenngel)	1,5 M	Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 %	SDS
Trispuffer (Sammelgel)	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 %	SDS
APS-Lösung	10 %	APS, rekristallisiert
TEMED		
Anodenpuffer	192 mM	Glycin
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,6
Kathodenpuffer	192 mM	Glycin
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,6
	0,1 %	SDS
	0,001 %	Bromphenolblau

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hier wurde die SDS-PAGE in modifizierter Form nach Laemmli (1970) angewendet, wobei zusätzlich ein diskontinuierliches Puffersystem zur besseren Auftrennung der Proteinbanden eingesetzt wird. Das Gel besteht aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid; 0,12 % Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,33 % APS; 1 % TEMED) und dem eigentlichen Trenngel (5-15 % Acrylamid; 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,08 % TEMED). Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (180 x 140 mm) gegossen, die durch 1,5 mm dicke Abstandshalter getrennt und durch Einspannen in eine geeignete Gießvorrichtung seitlich und unten gut abgedichtet waren. Nach Überschichten mit ddH₂O erfolgte die Polymerisation des Geles für mindestens 20 Minuten. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und ein Probenkamm eingesteckt. Nach erneuter 20-minütiger Polymerisation wurden die im Probenpuffer solubilisierten Proben aufgetragen und vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte zwischen 10 und 15 %. Die Auftrennung erfolgte in einer mit Anodenpuffer gefüllten Kammer bei Raumtemperatur und 50 mA/Gel für ca. 3 Stunden.

3.3.3. Native PAGE

Im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach Ladung und Größe des Proteins. Somit wird die Darstellung von Proteinen möglich, die sich bei gleichem Molekulargewicht nur in einer Eigenladung voneinander unterscheiden. Die native PAGE wird besonders dann eingesetzt, wenn multimere Proteine oder Proteinkomplexe im Gel detektiert werden bzw. um Proteine aufzutrennen, die sich mit anderen Elektrophoreseverfahren nicht trennen lassen, wie phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Varianten desselben Proteins. Um die aufzutrennenden Proteine gefaltet zu halten, müssen die Puffer an die Erfordernisse der Proteine angepasst werden. Dieses Verfahren unterscheidet sich von der SDS-PAGE dadurch, dass bei sämtlichen Reagenzien SDS durch ddH₂O ersetzt wird und anstatt des Kathodenpuffers Anodenpuffer verwendet wird.

3.3.4. Tris-/Tricin-SDS-PAGE

Acrylamidlösung	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid
Trispuffer (Trenngel)	3 M 0,3 %	Tris-HCl, pH 8,45 SDS
Trispuffer (Sammelgel)	3 M 0,3 %	Tris-HCl, pH 8,45 SDS
Glycerol		
APS - Lösung	10 %	APS, rekristallisiert
TEMED		
Anodenpuffer	0,2 M	Tris-HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer	0,1 M 0,1 M 0,1 %	Tris-Base Tricin SDS

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE mit Hilfe von Tricin wurde erstmals von Schägger und Jagow (1987) beschrieben. Durch den Einsatz von Tricin bei der Elektrophorese wird eine bessere Auflösung bei der Trennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa erzielt. Auch dieses Gel besteht aus Sammelgel (4 % Acrylamid; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,45; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED) und einem Trenngel (10 % Acrylamid; 0,75 M Tris-HCl, pH 8,45; 1 % Glycerol; 0,16 % APS; 0,03 % TEMED) Die Tris-/Tricin-SDS-PAGE unterscheidet sich vom Tris-Glycin- bzw. Tris-HCl-System durch die Verwendung eines einzigen Gelpuffers mit pH 8,45 und Tricin im Austausch gegen Glycin im Kathoden- bzw. Anodenpuffer.

3.3.5. Elektrontransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Transferpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Für den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden Trenngel und Nitrozellulose zwischen drei Lagen transferpuffergetränkten Whatman 3 MM Papiere gelegt. Der Elektrotransfer der Proteinen erfolgte in einer großen, mit Transferpuffer gefüllten, Nassblott-Kammer für 90 Minuten bei 900 mA und 4 °C.

Bei Nativgelen wurden Nitrozellulosemembran und Gel vor dem Transfer für 20 Minuten in Transferpuffer eingelegt.

3.3.6. Westernblot

Blockpuffer	10 mM 0,05 % 5 %	PBS Tween-20 fettfreies Milchpulver
Waschlösung	10 mM 0,05 %	PBS Tween-20
ECL-Reagenz		
Lösung 1	250 mM 90 mM 1 M	Luminol p-Cumarsäure Tris/HCl pH 8,5 ddH ₂ O
Lösung 2	30 % 1 M	H ₂ O ₂ Tris/HCl pH 8,5 ddH ₂ O

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen aus dem SDS-Gel auf Nitrozellulosemembranen geht auf Towbin et al. (1979) zurück.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran für 25 Minuten in Blockpuffer inkubiert. Die Inkubation mit anti IGFBP-1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockpuffer erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde die Nitrozellulosemembran 1 x 15 Minuten und 3 x 5 Minuten mit Waschlösung gewaschen und mit dem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG 1:10.000 in Blockpuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL) auf Kodak X-OMAT AR Filmen.

3.3.7. Ligandblot

Bei einem Ligandblot wird das nachzuweisende Protein, anders als beim Westernblot, nicht mit einem Antikörper, sondern mit einem bestimmten Liganden des Proteins detektiert. Dabei wurde die Nitrozellulose nach dem Elektrotransfer der Proteine zunächst für 25 Minuten in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit biotinyliertem IGF II (1:1000 in Blocklösung) bei

Raumtemperatur. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 1 x 15 Minuten und 3 x 5 Minuten gewaschen und mit Streptavidin-HRP (1:5000 in Blocklösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Nitrozellulose erfolgte der Nachweis der Proteine ebenfalls durch ECL und Belichtung.

3.3.8. Immunpräzipitation

Die Zellextrakte (700 µl) wurden mit 700 µl ddH₂O und die Chase-Medien mit 700 µl Lysispuffer gemischt. Nach Zugabe von 80 µl Protein-A-Agarose-Suspension (in Lysispuffer gewaschen, 1:1 in Lysispuffer verdünnt) und 1 µl Präimmunserum aus Kaninchen je Ansatz wurden die Proben für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad präinkubiert. Danach wurden die Agarosebeads kurz anzentrifugiert, die Überstände abgenommen und mit 2 µl des spezifischen Antikörpers (anti IGFBP-1) bei 4 °C für 6 Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 80 µl Protein-A-Agarose je Probe und einer Inkubation von 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad wurden die Protein-A-Agarose-Antigen-Komplexe abzentrifugiert, gewaschen und in 110 µl Probenpuffer 5 Minuten gekocht. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Überstände durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

3.3.9. Imprägnierung von Polyacrylamidgelen für die Fluorografie

Um [³⁵S]-markierte Proteine nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Gele nach dem Protokoll von Bonner und Laskey (1974) mit PPO (Diphenyloxazol in DMSO) imprägniert. Anschließend wurden die Gele zwischen zwei Celluphan-Folien getrocknet, und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorografie auf Kodak X-OMAT AR Filmen detektiert.

3.3.10. Entfernung von Liganden unter sauren Pufferbedingungen

Um eventuell an die Oberfläche gebundenes IGFBP-1, dessen Phosphorylierungszustand unklar ist, zu entfernen, wurden die Zellen in einem Puffer mit saurem pH (< 3) bei 4 °C inkubiert .

Waschpuffer I (pH 2,5): 0,15 M NaCl, 50 mM Glycin, 0,1 % BSA

Waschpuffer II (pH 2,8): 0,2 M Essigsäure, 0,5 M NaCl

Nach Konditionierung wurden die Medien von HepG2-Zellen abgenommen und zur EtOH-Fällung eingesetzt. Die Zellen wurden 3 x in PBS gewaschen und danach mit Waschlösung I oder II für 5 Minuten inkubiert. 0,5 ml der jeweiligen Waschlösung wurden zur EtOH-Fällung eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis phosphorylierter und nicht-phosphorylierter IGFBP-1 Formen

Um phosphorylierte und nicht-phosphorylierte IGFBP-1 Formen voneinander unterscheiden zu können, wurden verschiedene Elektrophoreseverfahren mit anschließendem Westernblot für humanes (h) IGFBP-1 miteinander verglichen.

Bei den unterschiedlichen Methoden wurden jeweils verschieden lang konditionierte Medien (24, 48, 72 Stunden) von BHK-Zellen, von hIGFBP-1 überexprimierenden BHK-Zellen (BHK-BP1) sowie von der menschlichen Hepatomazelllinie HepG2 eingesetzt.

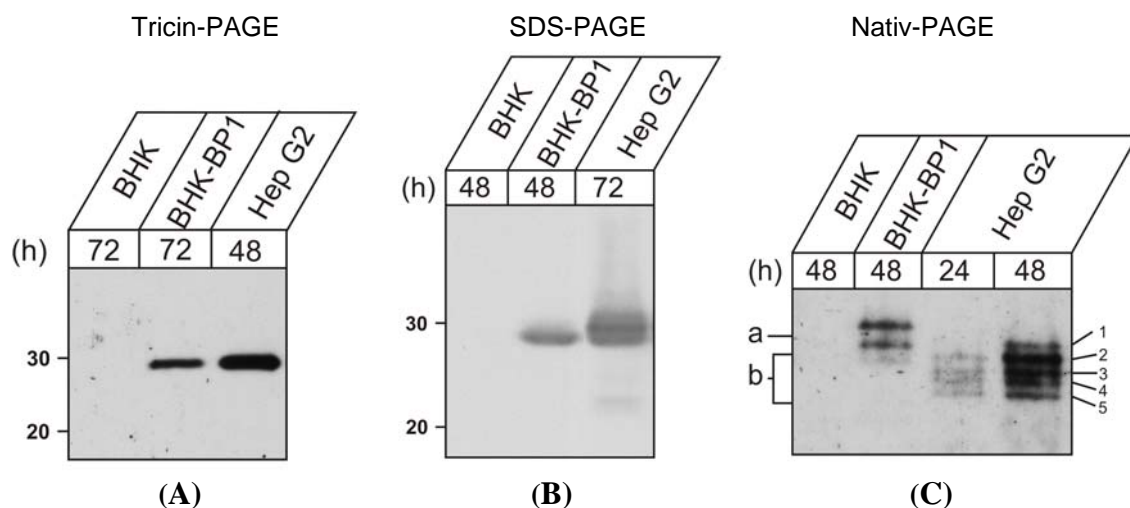


Abbildung 5: Identifizierung phosphorylierter und nicht-phosphorylierter IGFBP-1 Formen

Aliquots von Medien wurden für 24 bis 72 Stunden (h) konditioniert und mittels Tricin-PAGE (A), SDS-PAGE (B) und Nativ-PAGE (C) aufgetrennt und durch IGFBP-1 Westernblot analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtstandardproteine (in kDa) sind gekennzeichnet (A, B). In C kommen nicht-phosphorylierte (a) und phosphorylierte (b, 1-5) IGFBP-1 Formen zur Darstellung.

Bei Verwendung einer Tricin-PAGE ist die Darstellung des 29 kDa hIGFBP-1 im Westernblot möglich, jedoch nicht die Identifikation verschiedener phosphorylierter Formen (Abb. 5A). In nicht-transfizierten BHK-Zellen ist hIGFBP-1 erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Der Vergleich von hIGFBP-1 überexprimierenden BHK-Zellen und HepG2-Zellen zeigt, dass von der Hepatomazelllinie mehr IGFBP-1 synthetisiert und sezerniert wird (Abb. 5A).

Bei Anwendung der herkömmlichen SDS-PAGE ist wieder hIGFBP-1 als scharfe 29 kDa Bande in Medien von BHK-BP1-Zellen nachweisbar, während eine 29-31 kDa

hIGFBP-1 Bande in Medien von HepG2-Zellen detektiert wurde. Die breitere, unschärfere Bande bei Medien von HepG2-Zellen deutet auf posttranslationale Modifikation hin (Abb. 5B).

In der Nativ-PAGE erfolgt eine Proteinauftrennung nach ihrer Eigenladung, im Gegensatz zur SDS-PAGE, bei der nur eine Auftrennung nach Proteingröße erfolgen kann. Wie zu erwarten war, können bei Auftrennung von IGFBP-1 aus Medien von HepG2-Zellen in der Nativ-PAGE fünf verschiedene phosphorylierte Formen dargestellt werden. In Medien von BHK-BP1-Zellen waren dagegen nur zwei IGFBP-1 immunreaktive Banden mit einer geringeren elektrophoretischen Mobilität erkennbar (Abb. 5C). Somit ist die Nativ-PAGE geeignet, phosphorylierte IGFBP-1 Moleküle von unphosphorylierten zu unterscheiden.

Zum Vergleich mit dem Westernblot wurde ein Ligandblot mit biotinyliertem (b) IGF-II durchgeführt (Abb. 6A, C). Während der IGFBP-1 Westernblot eindeutig zeigt, dass nur in Medien von BHK-BP1- und HepG2-Zellen IGFBP-1 sezerniert wurde (Abb. 6B), ist nur die nicht-phosphorylierte IGFBP-1 Form in Medien von BHK-BP1-Zellen in der Lage, bIGF-II zu binden. Auch Medien von Zellen, die humanes IGFBP-3 überexprimieren, zeigen wenig Bindungsfähigkeit (Abb. 6A)

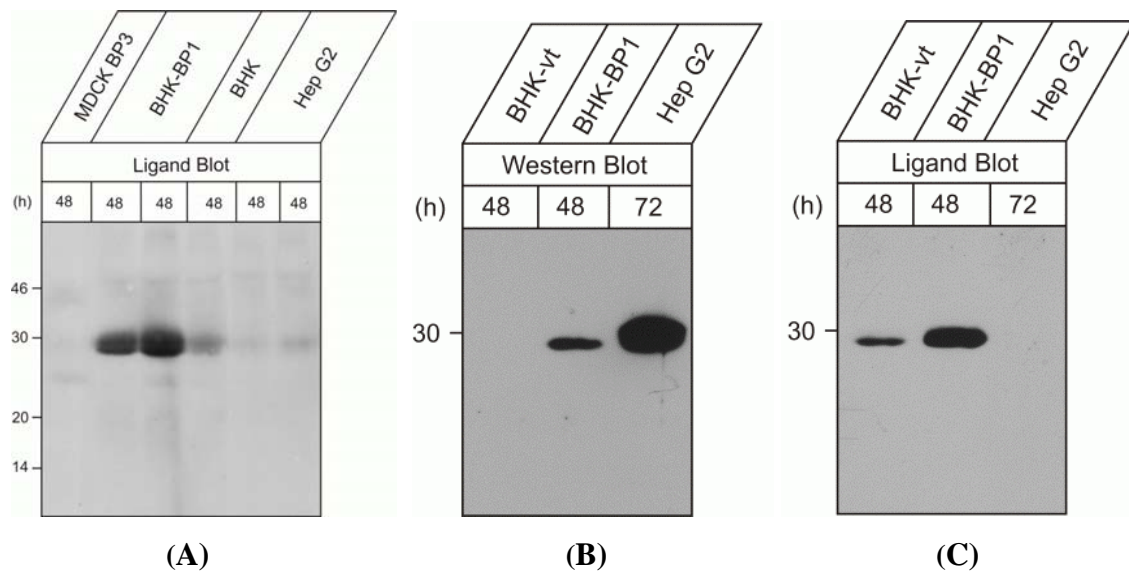


Abbildung 6: Vergleich von IGFBP-1 Westernblot mit bIGF-II Ligandblot

A) Aliquots der Medien von verschiedenen kultivierten Zellen (IGFBP-3 überexprimierende MDCK-Zellen=MDCK-BP3, IGFBP-1 überexprimierende BHK-Zellen=BHK-BP1, HepG2-Zellen) wurden für 48 Stunden konditioniert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch IGF-II Ligandblot analysiert. B, C) Aliquots der Medien von verschiedenen kultivierten Zellen (vektortransfizierte BHK-Zellen=BHK-vt, BHK-BP1-Zellen, HepG2-Zellen) wurden für 48 Stunden und 72 Stunden konditioniert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot (B) bzw. durch IGF-II Ligandblot (C) analysiert.

Die Resultate deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung des IGFBP-1 in HepG2-Zellen die Bindung von bIGF-II verhindert. In Medien von vektortransfizierten BHK-Zellen ist ein 29 kDa Polypeptid nachweisbar, dass nicht mit anti IGFBP-1 Antikörpern reagiert, aber IGF-II bindet (Abb. 6B, C).

4.2. Experimenteller Ansatz zur Identifizierung der IGFBP-1-Kinase

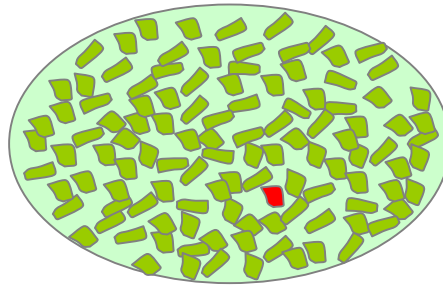
4.2.1. Strategie der Komplementationsklonierung

Um die Kinase zu identifizieren, die IGFBP-1 im sekretorischen Weg der Zelle phosphoryliert, sollte überprüft werden, ob eine Komplementationsklonierung sinnvoll ist. Dazu sollte die Transfektion einer humanen Leber-cDNA-Bank in BHK-BP1 überexprimierende BHK-Zellen, die humanes IGFBP-1 selbst nicht phosphorylieren können, erfolgen, mit dem Ziel, dass eine transfizierte cDNA, die in BHK-Zellen fehlende Kinase kodiert und durch den Nachweis von phosphoryliertem IGFBP-1 identifiziert werden kann (Abb. 7A). Die cDNA-Bank sollte anfänglich in 48 Pools geteilt werden, die je ca. 2500 Klone enthalten. Zwei Tage nach Transfektion sollten die Medien der 48 BHK-BP1-Pools nach Nativ-PAGE im IGFBP-1 Westernblot analysiert werden. Der cDNA-Pool mit dem sich eine positive Phosphorylierung nachweisen lässt, sollte erneut in 48 Pools zu jeweils 200 Klonen geteilt und neue BHK-BP1-Zellen transfiziert werden. Nach weiteren Poolverdünnungen sollten Einzelklone erhalten werden, die die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung der Kinase erlauben. Für diese Methode ist jedoch der Nachweis phosphorylierten IGFBP-1 in Medien notwendig, in denen gegebenenfalls nur eine einzelne Zelle komplementiert wurde (Abb. 7B).

(A)



(B)



- BHK-BP1 überexprimierende BHK-Zellen
- Einzelklon (transfiziert mit hIGFBP-1-Kinase cDNA)

Abb. 7: Schematische Darstellung der Komplementationsklonierungsstrategie zur Identifikation der hIGFBP-1 Kinase

A): Strategie der Komplementationsklonierung zur Identifikation und Klonierung der hIGFBP-1-Kinase
 B): Schematische Darstellung einer BHK-BP1-Zelle, die die humane IGFBP-1-Kinase exprimiert (rot)

4.2.2. Sensitivität verschiedener Nachweisverfahren phosphorylierter hIGFBP-1 Formen

4.2.2.1. IGFBP-1 Westernblot

Um die Sensitivität der zur Verfügung stehenden Methode zu testen, wurden zunächst in einer Verdünnungsreihe hIGFBP-1 überexprimierende BHK-Zellen mit nicht-transfizierten BHK-Zellen im Verhältnis 1:1, 1:4, 1:9, 1:24, 1:49, 1:99 gemischt (Abb. 8). Nach 72 Stunden Konditionierung wurden die Medien im IGFBP-1 Westernblot getestet. Eine IGFBP-1 immunreaktive Proteinbande war in den Medien bis zu einer Verdünnung von 1:4 nachweisbar.

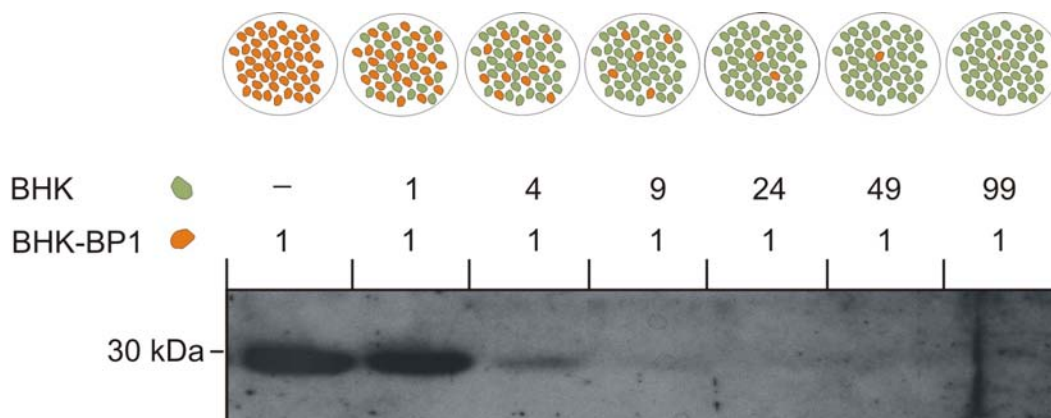


Abbildung 8: Vorversuch zur Komplementationsklonierung mit konditionierten Medien von BHK-BP1- und untransfizierten BHK-Zellen

Die Medien der Mischkulturen von BHK-BP1- und untransfizierten BHK-Zellen wurden für 72 Stunden konditioniert und nach Ethanol-Fällung im IGFBP-1 Westernblot durch SDS-PAGE analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich eine Komplementationsstrategie zur Identifizierung der IGFBP-1-Kinase mit diesem Nachweissystem nicht eignet.

Parallel sollte getestet werden, wie hoch die Empfindlichkeit zum Nachweis phosphorylierter IGFBP-1 Formen in Medien von partiell komplementierten BHK-BP1-Zellen ist. Dazu wurden Medien von HepG2-Zellen, die phosphoryliertes IGFBP-1 enthalten, mit Medien aus BHK-BP1-Zellen, die nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 enthalten, im Verhältnis 1:1, 1:4, 1:7, 1:10, 1:20, 1:40, 1:100 gemischt. Anschließend erfolgte der Nachweis von IGFBP-1 über eine Nativ-PAGE und IGFBP-1 Westernblot (Abb. 9). Dieser Versuch zeigt, dass nur bis zu einer 10-fachen Verdünnung der Medien phosphorylierte Formen von IGFBP-1 nachgewiesen werden können.

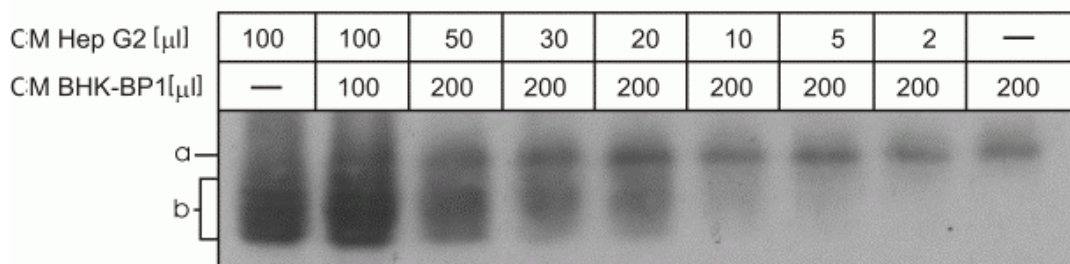


Abbildung 9: Mischexperiment mit konditionierten Medien von HepG2-Zellen und IGFBP-1 überexprimierenden BHK-Zellen

Die Medien von HepG2- und BHK-Zellen wurden für 72 Stunden konditioniert (CM), im angegebenen Verhältnis gemischt und nach Ethanol-Fällung durch Nativ-PAGE im IGFBP-1 Westernblot analysiert. Die Position nicht-phosphorylierter (a) und phosphorylierter (b) IGFBP-1 Formen sind angezeigt.

Auch dieses Experiment dokumentiert, dass der Nachweis einer einzelnen BHK-BP1-Zelle, die gegebenenfalls durch eine humane IGFBP-1-Kinase komplementiert wurde, durch Darstellung phosphorylierter IGFBP-1 Formen in 72 Stunden konditionierten Medien durch Westernblot nicht möglich sein wird.

4.2.2.2. Immunpräzipitation von phosphoryliertem IGFBP-1

Um die Sensitivität des Nachweises phosphorylierter IGFBP-1 Formen zu erhöhen, sollten Bedingungen getestet werden, um IGFBP-1 immunpräzipitieren. Damit könnte z.B. nach metabolischer Markierung mit [35 S]-Methionin die Menge nachweisbarer sezernierter IGFBP-1 Formen wesentlich reduziert werden. Zuerst wurden nicht-radioaktive konditionierte Medien von HepG2-Zellen für Immunpräzipitationsversuche eingesetzt. Die Verwendung verschiedener Präzipitationpuffer mit und ohne Zugabe von SDS zeigt, dass bei einer nachfolgenden Nativ-PAGE die Darstellung der IGFBP-1

Formen deutlicher ist, wenn kein SDS im Präzipitationpuffer enthalten ist (Abb. 10). Die Menge immunpräzipitierten IGFBP-1 entspricht der aus gleichen Volumina der Medien mittels EtOH-Fällung präzipitierten IGFBP-1 (Abb. 10). Wenn immunpräzipitiertes IGFBP-1 durch SDS-PAGE aufgetrennt wurde, war die Intensität des nachweisbaren IGFBP-1 ähnlich (Abb. 10). Wenn Präimmunsereum eingesetzt wurde, konnte erwartungsgemäß kein IGFBP-1 präzipitiert werden.

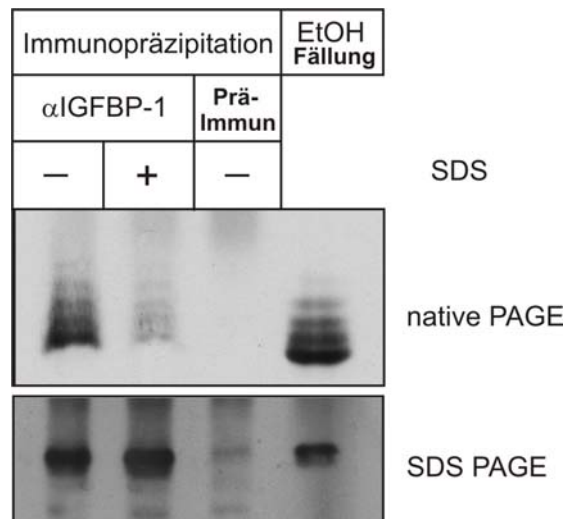


Abbildung 10: Immunpräzipitation von IGFBP-1 aus konditionierten Medien von HepG2-Zellen

Medien mit (+) und ohne (-) Zusatz von SDS (0,2 %) wurden mit Antikörpern (α) gegen hIGFBP-1 oder Präimmunsereum inkubiert und die Immunkomplexe durch native PAGE oder SDS-PAGE aufgetrennt und durch IGFBP-1 Westernblot dargestellt. Eine Ethanolfällung als etablierte Methode zum Nachweis von IGFBP-1 im Medium stellte sicher, dass IGFBP-1 im Medium enthalten war.

Im Weiteren wurden Variationen verschiedener Parameter zur Immunpräzipitation von IGFBP-1 getestet. Verschiedene Mengen konditionierter Medien aus HepG2-Zellen und BHK-BP1-Zellen wurden mit 1 bzw. 2 μ l anti IGFBP-1 Serum inkubiert, um die zu präzipitierende Menge des vorhandenen IGFBP-1 in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Antiserums zu testen. Als Kontrolle für die Menge an immunpräzipitierten IGFBP-1 diente die EtOH-Fällung aller Proteine aus 0,2 bzw. 0,3 ml konditioniertem Medium (Abb. 11).

Die Ergebnisse zeigen, dass 1 μ l anti IGFBP-1 Serum ausreicht, um die Gesamtmenge an IGFBP-1 aus 0,2 ml Medien von HepG2-Zellen, das für 72 Stunden konditioniert wurde, zu präzipitieren (Abb. 11, Bahn 1, 2). Aus Medien von BHK-BP1-Zellen, die weniger IGFBP-1 pro Zeit sezernieren, kann 1 μ l anti IGFBP-1 Serum IGFBP-1 aus bis zu 1 ml konditionierten Mediums komplett präzipitieren (Abb. 11, Bahn 5-9). Für die Präzipitation von IGFBP-1 aus konditionierten Medien mit Volumina größer als 1 ml

sind mehr als 1 µl anti IGFBP-1 Serum notwendig (Abb. 11, Bahn 10). Wenn Präimmunserum eingesetzt wurde, konnte kein IGFBP-1 präzipitiert werden (Abb. 11, Bahn 4). In der Bahn 3 ist IGFBP-1 dargestellt, das aus 0,3 ml von BHK-BP1 Medien durch Ethanol fällbar war.

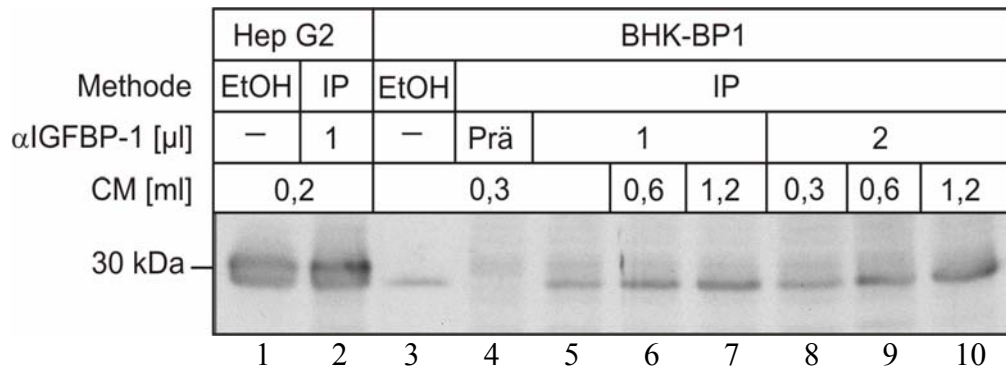


Abbildung 11: Immunpräzipitation von IGFBP-1 aus konditionierten Medien von HepG2-Zellen und BHK-BP1-Zellen

Aus Medien von HepG2-Zellen und BHK-BP1-Zellen wurde IGFBP-1 immunpräzipitiert (IP) in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Mediums (CM) sowie der Menge des eingesetzten anti (α) IGFBP-1 Serums und anschließender Nativ-PAGE und IGFBP-1 Westernblot-Analyse. Die EtOH-Fällung stellte sicher, dass die Medien IGFBP-1 enthielten.

4.2.2.3. Nachweis phosphorylierter Formen des IGFBP-1 durch Pulse-Chase-Markierung

Als weitere Methode zum sensitiven Nachweis phosphorylierter Formen des IGFBP-1 wurde eine metabolische Markierung von HepG2-Zellen mit [³⁵S]-Methionin mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt. Abbildung 12A zeigt, dass nach einer 10 minütigen Markierung der Zellen mit [³⁵S]-Methionin (Pulse) eine nicht-phosphorylierte Hauptbande im Nativgel nachweisbar war. Nach weiterer Inkubation der Zellen im radioaktivitätsfreien Medium (Chase) für 10 Minuten waren bereits alle 5 phosphorylierten IGFBP-1 Formen intrazellulär sichtbar. Die Intensität nicht phosphorylierter IGFBP-1 Formen nimmt mit fortschreitender Chase-Zeit ab. 20 Minuten nach Synthese sind die ersten Spuren phosphorylierter IGFBP-1 aus den Medien präzipitierbar. Eine Stunde nach Synthese ist die gesamte Menge des neusynthetisierten IGFBP-1 sezerniert worden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Phosphorylierung von IGFBP-1 unmittelbar nach Synthese bzw. sofort und während der Synthese des Polypeptids co-translational im sekretorischen Weg der Zelle erfolgt (Abb. 12A).

Um zu kontrollieren, ob durch Immunpräzipitation quantitativ IGFBP-1 gefällt werden kann, wurde aus konditionierten Medien von HepG2-Zellen die Menge an IGFBP-1, die durch Ethanol-fällung präzipitiert werden kann, mit der Menge an IGFBP-1, die durch Immunpräzipitation gewonnen wird, im Westernblot verglichen. Wie in Abbildung 12B zu sehen ist, sind die Mengen und Formen von IGFBP-1, die durch Immunpräzipitation darstellbar sind, vergleichbar mit denen durch Ethanol-fällung präzipitierten IGFBP-1. Die Deutlichkeit der Darstellung phosphorylierter [³⁵S]-markierter IGFBP-1 Formen, besonders intrazellulär und im Verlauf der Zeit nach Synthese, ist jedoch nur nach radioaktiver Markierung und Immunpräzipitation zu erreichen (Abb. 12A). Weitere Versuche mit veränderten Pulse- und Chasezeiten sollten dieses Ergebnis bestätigen.

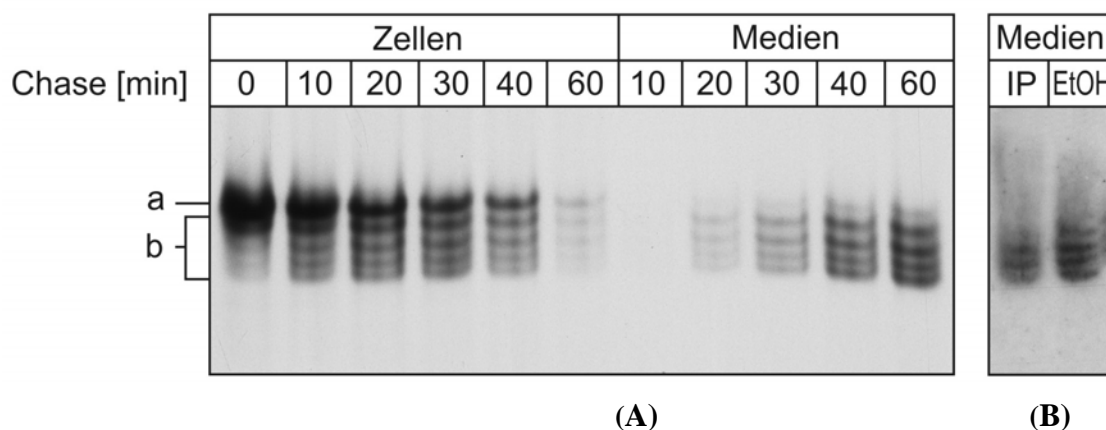


Abbildung 12: Pulse/Chase von HepG2-Zellen mit anschließender Immunpräzipitation und Kontrollmedium

A) Eine metabolische Markierung von HepG2-Zellen mit [³⁵S]-Methionin (Pulse) mit anschließender Inkubation der Zellen im radioaktivitätsfreien Medium (Chase) wurde durchgeführt. Danach wurden die nicht-phosphorylierten (a) bzw. die phosphorylierten (b) IGFBP-1 Formen durch Nativ-PAGE aufgetrennt und durch Fluorografie sichtbar gemacht. B) Als Kontrolle, ob IGFBP-1 quantitativ durch Immunpräzipitation dargestellt werden kann, wurde die IGFBP-1 Ausbeute aus Medien von HepG2-Zellen mit der mittels EtOH-Fällung erhaltenen Menge und Formen von IGFBP-1 nach Nativ-PAGE im Westernblot verglichen.

In einem anderen Versuch wurde wieder eine Pulse/Chase-Markierung durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Markierung von HepG2-Zellen mit [³⁵S]-Methionin (Pulse) wurden die Zellen im radioaktivitätsfreien Medium (Chase) unterschiedlich lang weiter inkubiert und anschließend immunpräzipitiert.

Die Auftrennung von IGFBP-1 erfolgte nun zum einen durch Nativ-PAGE und zum anderen durch SDS-PAGE. Bei diesem Experiment werden vorangegangene Ergebnisse bestätigt; die Darstellung einzelner phosphorylierter IGFBP-1 Formen ist auch bei radioaktiver Markierung der HepG2-Zellen mit [³⁵S]-Methionin nur über Nativ-Gele möglich (Abb. 13).

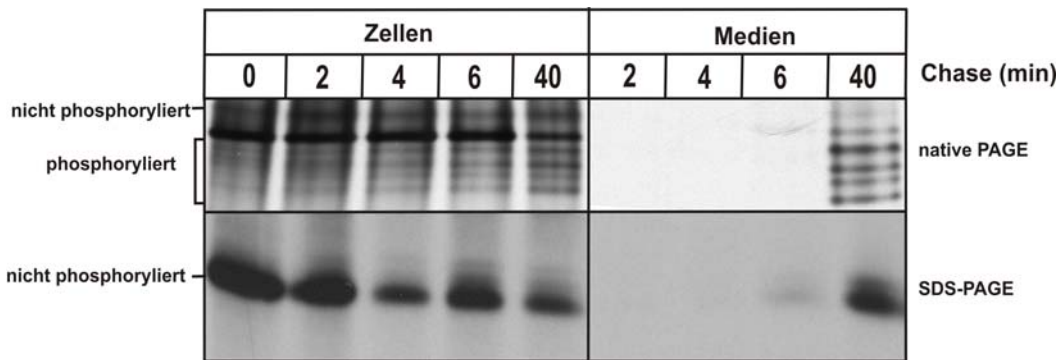


Abbildung 13: Analyse von neusynthetisierten ^{35}S -IGFBP-1 mittels Nativ-PAGE und SDS-PAGE
 HepG-Zellen wurden für 10 Minuten mit ^{35}S -Methionin markiert (Pulse) und anschließend für 2-40 Minuten mit nicht-radioaktiven Medien inkubiert (Chase). Danach wurde hIGFBP-1 aus Zellextrakten und Chase-Medien immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden geteilt und entweder durch Nativ- oder SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorografie sichtbar gemacht.

4.3. Ausschluss von IGFBP-1-Kinasen an der Zelloberfläche

Das menschliche Genom kodiert für 518 Kinasen, ca. 70 davon gehören zur Familie der sogenannten Serin/Threonin-AGC-Kinasen (Manning et al., 2002), deren gemeinsames Merkmal eine hochkonservierte katalytische Ser/Thr-Domäne ist. AGC-Kinasen benötigen die Phosphorylierung ihres Ser/Thr-Restes für ihre Aktivierung. AGC-Kinasen sind in die Transduktion hormoneller und mitogener Signale involviert und beeinflussen ein großes Spektrum zellulärer Funktionen, darunter Zellproliferation und -differenzierung. Zu den AGC-Kinasen gehören neben der Proteinkinase B, der p70 ribosomalen S6 Kinase, der p90 ribosomalen S6 Kinase, der Mitogen- und Stress-regulierten Kinase und der Proteinkinase C-verwandten Kinase auch die Proteinkinasen A, G und C von denen sich der Name der Familie ableitet (Parker und Parkinson, 2001; Frödin et al., 2002).

In der Literatur ist keine identifizierte Kinase beschrieben, die luminal lösliche Proteine im sekretorischen Weg phosphoryliert.

Um auszuschließen, dass an der Zelloberfläche lokalisierte Kinasen an der Phosphorylierung von IGFBP-1 beteiligt sind, wurden Bedingungen getestet, ob IGFBP-1 an die Zelloberfläche von HepG2-Zellen binden kann. Dazu sollte eventuell an die Oberflächliche gebundenes IGFBP-1, das phosphoryliert oder unphosphoryliert sein kann, durch Behandlung der Zellen in einem Puffer mit saurem pH (< 3) bei 4 °C abgelöst werden (Abb. 14).

Die Analyse phosphorylierter, intrazellulärer Formen (resistent gegen Waschung mit sauren Puffern) im Vergleich mit der Gesamtheit der IGFBP-1 Formen sollte dann zeigen, ob ein Teil des IGFBP-1 an der Zelloberfläche lokalisiert, und ob sich eventuell dessen Phosphorylierungsgrad von dem des intrazellulären IGFBP-1 unterscheidet.

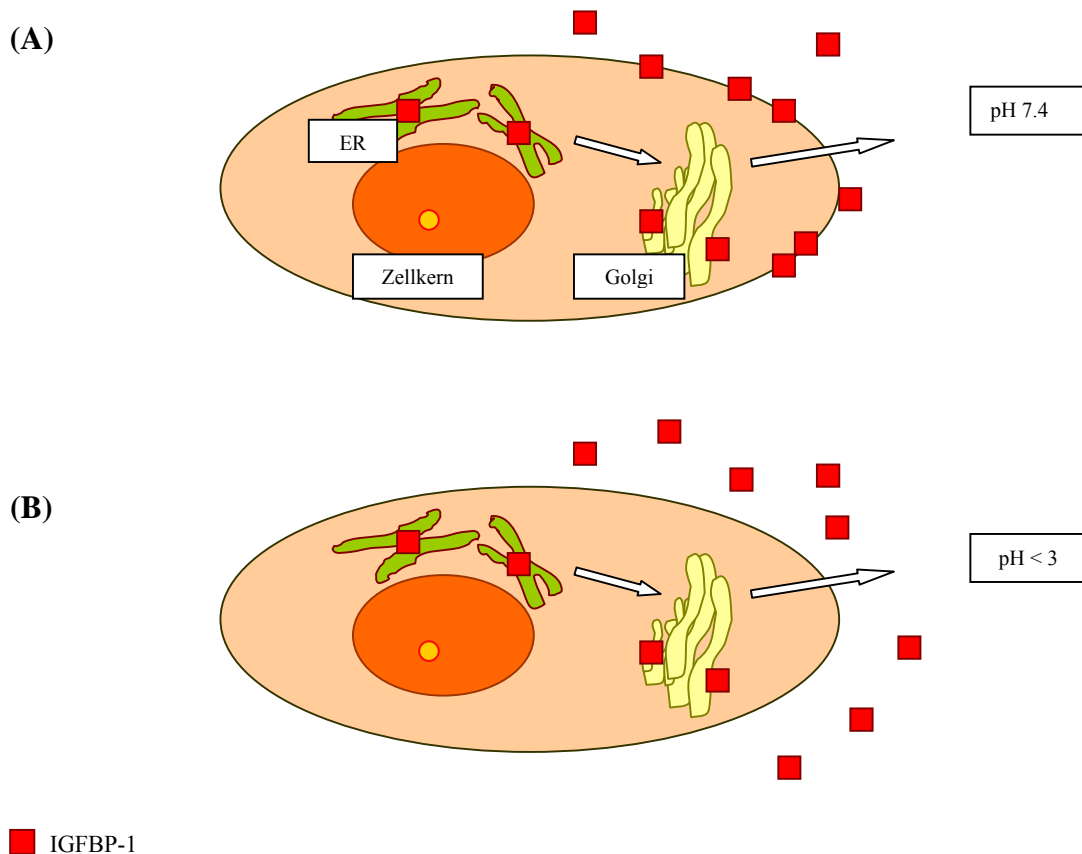


Abbildung 14: Schematische Darstellung der möglichen Verteilung von IGFBP-1 in HepG2-Zellen

A) Neusynthetisiertes IGFBP-1 befindet sich intrazellulär im ER und Golgi-Apparat und möglicherweise an die Zelloberfläche gebunden (resistent gegen Puffer mit neutralem pH-Wert) und im Medium.

B) Unter experimentellen Bedingungen nach der Behandlung von HepG2-Zellen mit Puffern mit einem saurem pH-Wert oder Trypsin bei 4 °C sollte oberflächengebundenes IGFBP-1 abgelöst werden und im Puffer erscheinen. Die Menge des zellassoziierten IGFBP-1 (intrazelluläres IGFBP-1, das resistent gegen Puffer mit niedrigem pH-Wert ist) sollte sich dadurch verringern gegenüber Bedingung A.

Zur Kontrolle, dass die Ablösung von der Zelloberflächliche gebundenes Protein durch Waschen mit sauren Puffern funktioniert, wurde folgendes Experiment durchgeführt. HepG2-Zellen werden auf 4 °C abgekühlt, gefolgt von einer 2 Stunden Inkubation mit [¹²⁵I]-Arylsulfatase B (ASB). Dieser Ligand des M6P-Rezeptors bindet unter dieser Bedingung nur an Rezeptoren, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Wenn jetzt die Zellen komplett lysiert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert werden, ist die [¹²⁵I]-markierte Doppelbande, die die Vorläuferform der ASB darstellt, sichtbar (Abb. 15, Bahn 1). Der Zusatz eines molaren Überschusses an M6P (5 mM) während der Inkubationsphase inhibiert komplett die Bindung von [¹²⁵I]-ASB an die Zellen (Abb. 15,

Bahn 2). Nach der Bindung von [125 I]-ASB, werden die Zellen direkt einer Behandlung mit Puffern mit einem saurem pH-Wert (Waschpuffer I oder II) oder einer Trypsinbehandlung bei 4 °C unterzogen (Abb. 15, Bahn 3 und 4). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass unter diesen Bedingungen [125 I]-ASB komplett von der Oberfläche abgelöst wird.

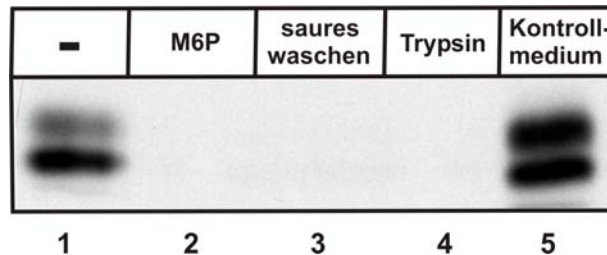


Abb. 15: Kontrolleexperiment zur Effektivität der Inkubation bei erniedrigtem pH-Wert

Nach der Inkubation von HepG2-Zellen mit [125 I]-ASB bei 4 °C in Anwesenheit von 5 mM M6P (Bahn 2) und Abwesenheit des Inhibitors (Bahn 1) wurden die Zellen solubilisiert oder mit einem Puffer mit saurem pH (< 3) behandelt (Bahn 3) oder einer Trypsinbehandlung unterzogen (Bahn 4) bevor die Zellen solubilisiert und analysiert wurden. Ein Aliquot des [125 I]-ASB Inkubationsmediums (6600 cpm) diente als Kontrolle (Bahn 5).

Im folgenden Versuch wurden 24 Stunden konditionierte HepG2-Zellen eingesetzt, um eventuell an die Oberfläche gebundenes IGFBP-1, dessen Phosphorylierungszustand unklar ist, von der Oberfläche zu entfernen. Dazu wurden die Zellen einer Behandlung mit zwei verschiedenen Waschpufferlösungen (I, II) mit saurem pH (< 3) bei 4 °C bzw. einer Behandlung mit Trypsin unterzogen. Die Zellen wurden 3 x in PBS gewaschen und danach mit Waschpuffer I oder II für 5 Minuten inkubiert oder mit Trypsin behandelt. Anschließend wurden die jeweiligen Waschpufferlösungen sowie die abgeschabten Zellen zur EtOH-Fällung eingesetzt.

Abbildung 16, Bahn 3 und 4 zeigen das Ergebnis nach saurer Pufferbehandlung mit Waschpuffer I bei 4 °C. In der sauren Pufferfraktion ist kein IGFBP-1 nachweisbar. Auch in einer weiteren sauren Pufferfraktion mit Waschpuffer II (Abb. 16, Bahn 5, 6) tritt kein IGFBP-1 in die Pufferlösung über. Nach Trypsinbehandlung der Zellen ist IGFBP-1 immer noch nachweisbar (Abb. 16, Bahn 7). Bahn 2 stellt die Zellen ohne Pufferbehandlung nach EtOH-Fällung dar und representiert somit die Gesamtheit des IGFBP-1 durch Westernblot in HepG2-Zellen. Eine EtOH-Fällung vom konditionierten Medium diente zur Kontrolle, ob im Medium überhaupt IGFBP-1 nachweisbar war (Abb. 16, Bahn 1).

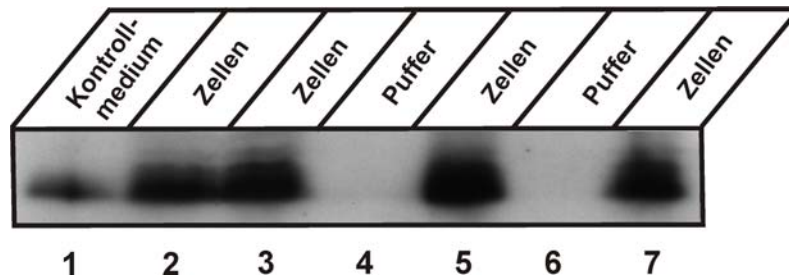


Abbildung 16: Westernblot-Analyse von HepG2-Zellen nach Behandlung mit sauren Waschpuffern oder Trypsin zum Ausschluss von IGFBP-1-Kinasen an der Zelloberfläche

24 Stunden konditionierte HepG2-Zellen wurden einer Behandlung mit sauren Waschpuffern (I, II) (Bahn 3-6) bzw. einer Behandlung mit Trypsin (Bahn 7) bei 4 °C unterzogen. Bahn 2 stellt die Zellen ohne Pufferbehandlung nach EtOH-Fällung dar. Eine EtOH-Fällung vom konditionierten Medium stellt sicher, dass im konditionierten Medium IGFBP-1 enthalten war. Die Auftrennung von IGFBP-1 erfolgte durch SDS-PAGE mit anschließendem IGFBP-1 Westernblot.

Die Experimente zeigen, dass IGFBP-1 intrazellulär lokalisiert ist und geschützt vor experimentellen Ansätzen, die an der Zelloberfläche gebundene bzw. assoziierte Proteine entfernen. Die Möglichkeit, dass IGFBP-1 vor der Freisetzung in das Kulturmedium von HepG2-Zellen durch an der Oberfläche gebundene IGFBP-1-Kinasen modifiziert wird, kann ausgeschlossen werden.

5. Diskussion

Identifizierung und Charakterisierung von IGFBP-1-Kinasen

5.1. Etablierung von Bedingungen zur Komplementationsklonierung der IGFBP-1-Kinase

Posttranslationale Modifikationen wie z.B. die Phosphorylierung, sind bedeutend für die Regulation der Wirkung von IGFBPs für IGF-stimuliertes Zellwachstum und Proliferation. So hemmt phosphoryliertes IGFBP-1 während nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 die biologische Aktivität von IGF I potenziert, was auf eine 6-fach höhere Bindungsaffinität des phosphorylierten IGFBP-1 für IGF I zurückzuführen ist (Jones et al., 1991). Für fünf der sechs IGFBPs (IGFBP-1, -2, -3, -5, -6) sind phosphorylierte Isoformen bekannt (Jones et al., 1991; Jones et al., 1992; Hoeck und Mukku, 1994; Graham et al., 2007; Shalamanova et al., 2008). Bei den phosphorylierten Aminosäuren handelt es sich um Serinreste, die in der zentralen, nicht-konservierten Domäne lokalisiert sind. Die Phosphorylierungsstellen für IGFBP-1, -2, -3 und -5 sind identifiziert worden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Serinphosphorylierungsstellen und potentielle Kinasen

	Phosphorylierte Serinreste	potentielle Kinase	Referenz
IGFBP-1	Ser ¹⁰¹ , Ser ¹¹⁹ , Ser ¹⁶⁹	CK1/ CK2*	Jones et al.,1993
IGFBP-2	Ser ¹⁰⁶		Graham, 2007
IGFBP-3	Ser ¹¹¹ , Ser ¹¹³	CK2* DNA-abhängige PK**	Hoeck, 1994 Schedlich, 2003
IGFBP-5	Ser ⁹⁶ , Ser ²⁴⁸	CK2*	Graham, 2007

*CK2 Konsensussequenz: S/T-XX-D/E; ** PK: Proteinkinase

Die identifizierten Phospho-Serin-Reste lagen ausschließlich in Konsensussequenzen für Caseinkinase-2 (CK2)-ähnliche Proteinkinasen (Coverley et al., 1997), was auch in einigen Fällen durch *in vitro* Untersuchungen mit gereinigten/rekombinanten IGFbps, CK2 und [³²P]-ATP bestätigt wurde. So können Ser¹¹⁹ und Ser¹⁶⁹ von IGFBP-1 durch CK2 *in vitro* phosphoryliert werden, während die Kinase, die Ser¹⁰¹ phosphoryliert, noch unbekannt ist (Jones et al., 1993; Frost et al., 1991). Im IGFBP-5 können aber weder Ser⁹⁶, das in einer CK2 Konsensussequenz liegt, noch Ser²⁴⁸ durch CK2 *in vitro* phosphoryliert werden (Graham et al., 2007).

Prinzipiell erscheinen die cytoplasmatisch lokalisierte Proteinkinase CK2, aber auch die *in vitro* phosphorylierenden PKA und PKC (Mishra und Murphy, 2003) als *in vivo* IGFBP-Kinasen unwahrscheinlich, weil die neusynthetisierten IGFbps im sekretorischen Weg zwischen ER, Golgi und der Plasmamembran vesikulär transportiert werden, und die entsprechenden IGFBP-Kinasen luminal zu erwarten sind. Bis zum heutigen Tag ist keine der IGFBP-Kinasen identifiziert und kloniert worden. Es gibt einen Bericht über die Charakterisierung der IGFBP-1-Kinase im Detergenzextrakt von HepG2-Zellen (Ankrapp et al., 1996). Eine partielle Anreicherung der Kinase erfolgte über Anionen-Austausch-Chromatographie und Gelfiltration und führte zu zwei kinasehaltigen Fraktionen von ca. 150 kDa und 50 kDa, die unterschiedliche Inhibitionsprofile gegenüber Heparin und Isoquinolin-Sulfonamid CK1-7 aufweisen und zur Caseinkinasefamilie zu zählen sind. Duncan et al. (2000) gelang die 80.000-fache Anreicherung einer Golgi-Caseinkinase (GCK), bei der es sich um ein nicht-integrales 40 kDa Polypeptid handeln soll, das Serin in der Konsensussequenz SXD oder SXSp im Chromogranin B, Progastrin, Osteopontin u. a. phosphoryliert.

Initiales Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von Bedingungen, die die Identifizierung und Klonierung der IGFBP-1-Kinase mit Hilfe einer Komplementationsstrategie ermöglichen sollte. Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass humanes IGFBP-1, das in BHK-Zellen stabil exprimiert, nicht phosphoryliert wird, weil den Nagerzellen offensichtlich die entsprechende IGFBP-1-Kinase fehlt (Scharf et al., 2004). Diese BHK-BP1-Zellen sollten nun mit mehr als 10.000 cDNAs aus einer humanen Leberbibliothek transfiziert werden, in der Hoffnung, dass auch die IGFBP-1-Kinase cDNA in der Bibliothek vorhanden ist und erfolgreich in einer Zelle exprimiert werden kann, und damit die Phosphorylierung von humanem IGFBP-1 komplementiert. Diese einzelne BHK-BP1-Zelle sollte dann phosphoryliertes IGFBP-1 sezernieren. Voraussetzung für die nachfolgende Selektion der kinasehaltigen

Zellklone bzw. der Identifizierung der IGFBP-1-Kinase cDNA ist ein sensitives Nachweissystem für sehr kleine Mengen phosphorylierten IGFBP-1 gegenüber der Mehrzahl an Zellen, die nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 sezernieren. Die Komplementationsstrategie wurde u. a. erfolgreich bei der Identifizierung von Fucosetransportern im Golgi-Apparat angewendet (Lübke et al., 2001).

Zunächst wurden in dieser Arbeit Bedingungen etabliert, die den Nachweis von phosphoryliertem IGFBP-1 gegenüber nicht-phosphoryliertem IGFBP-1 ermöglichen. Weder durch SDS-PAGE noch Tricin-PAGE konnten Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität von nicht-phosphoryliertem IGFBP-1 (aus Medien von BHK-Zellen) gegenüber phosphoryliertem IGFBP-1 (aus Medien von HepG2-Zellen) nachgewiesen werden (Abb. 5). Dies gelang erst nach Nativ-PAGE, mit der im anschließenden Westernblot für IGFBP-1 aus HepG2-Medien fünf phosphorylierte Isoformen detektierbar waren. Dieses Ergebnis ist eine Bestätigung der Daten von Jones et al. (1991). Der parallel durchgeführte Ligandblot mit biotinyliertem IGF-II bestätigt zudem, dass phosphoryliertes IGFBP-1 (aus HepG2-Medien) kein IGF I binden kann, während nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 IGF I hochspezifisch bindet (Abb. 6). Mischexperimente von nicht-transfizierten BHK-Zellen mit BHK-BP1-Zellen (Abb. 8), als auch von Medien aus BHK-BP1- und HepG2-Zellen (Abb. 9) zeigten aber, dass die Sensitivität des Westernblots nicht ausreichen wird, um phosphoryliertes IGFBP-1 von nicht-phosphoryliertem IGFBP-1 zu unterscheiden, wie es nach einem erfolgreichen Komplementationsereignis zu erwarten wäre.

Um die Empfindlichkeit des Nachweises von phosphorylierten IGFBP-1 Formen zu erhöhen, sollte IGFBP-1 aus Medien von [³⁵S]-Methionin markierten Zellen immunopräzipitiert werden. Dazu wurden BHK-BP1- oder HepG2-Zellen mit [³⁵S]-Methionin-haltigen Medien für 10 Minuten inkubiert (Pulse) und nach Austausch des radioaktiven Mediums gegen nicht-radioaktives Medium für unterschiedlich lange Zeiten (20-60 Minuten) weiter inkubiert (Chase). Während alle neusynthetisierten Proteine in der Pulse-Phase [³⁵S]-Methionin in ihre Polypeptidkette einbauen, wird nach der Immunpräzipitation selektiv nur das IGFBP-1 betrachtet. Für den Nachweis von IGFBP-1 mittels Westernblot im Medium von HepG2-Zellen mussten die Medien bis zu 72 Stunden konditioniert werden. Dagegen reicht eine 10-minütige [³⁵S]-Methioninmarkierung und Immunpräzipitation aus, um phosphorylierte und nicht-phosphorylierte IGFBP-1 Formen zu detektieren (Abb. 12).

Wenn man berücksichtigt, dass sich der fluorografische Nachweis von [³⁵S]-markiertem IGFBP-1 durch Verlängerung der Expositionszeit der Röntgenfilme linear steigern lässt, ergibt sich eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von IGFBP-1 durch Immunpräzipitation gegenüber dem Westernblot um das 500 bis 1000-fache.

Während der hier gewählten 10-minütigen Pulse-Zeit, befinden sich neusynthetisierte Proteine noch im endoplasmatischen Retikulum, wo die Faltung, gegebenenfalls Glykosylierung oder proteolytische Prozessierungsschritte stattfinden. Die ersten [³⁵S]-markierten IGFBP-1 Formen sind nach 10 Minuten Chase-Zeit im Medium nachweisbar (Abb. 12 und 13). Das bedeutet, dass die Pulse-Zeit auf 20 Minuten verdoppelt werden könnte und sich dadurch auch die Empfindlichkeit zum IGFBP-1 Nachweis um den Faktor 2 steigern ließe.

Damit sind Bedingungen etabliert worden, die für den Nachweis einer erfolgreichen Komplementationsklonierung der IGFBP-1-Kinase Voraussetzung sind: BHK-BP1-Zellen werden zwei Tage nach Transfektion mit einem cDNA-Pool aus der Leberbibliothek für 20 Minuten mit [³⁵S]-Methionin (100 µCi/ml) markiert und nach 2-maligem Waschen der Zellen für weitere 60 Minuten mit nicht-radioaktiven Medium inkubiert. Danach erfolgt die Immunpräzipitation von hIGFBP-1 aus dem Medium, Auftrennung durch Nativ-PAGE und Darstellung durch Fluorografie oder durch Phosphoimaging.

Möglicherweise ließe sich der Nachweis einer erfolgreichen Komplementation mit hIGFBP-1-Kinase weiter steigern, wenn die Chase-Medien zuerst noch über eine Anionenaustausch-Matrix gegeben werden und die gebundenen (phosphorylierten) Proteine erst nach Elution zur Immunpräzipitation eingesetzt werden.

5.2. Intrazelluläre Lokalisation der IGFBP-1-Kinase in HepG2-Zellen

Die Pulse/Chase-Experimente (4.2.2.3.) mit HepG2-Zellen und die nachfolgende Immunpräzipitation haben nicht nur die Sensivität des Nachweises von phosphorylierten IGFBP-1 Formen erhöht, sondern haben entscheidene Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation der IGFBP-1-Kinase geliefert. Bereits 4-10 Minuten nach Synthese des IGFBP-1 (10 Minuten Pulse), konnten die ersten hochphosphorylierten IGFBP-1 Formen in Extrakten von [³⁵S]-markierten HepG2-Zellen detektiert werden (Abb. 12, 13).

Üblicherweise haben neusynthetisierte Proteine innerhalb von 10 Minuten bei 37 °C den Golgi-Apparat noch nicht erreicht (Lemanski et al., 1985; Braulke et al., 1988). Das lässt vermuten, dass die IGFBP-1-Kinase im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und unmittelbar nach der Synthese oder sogar co-translational IGFBP-1 phosphoryliert. Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass IGFBP-1 direkt nach Synthese zum cis-Golgi Netzwerk transportiert und dort phosphoryliert wird. Eine Lokalisation der IGFBP-1-Kinase an der Oberfläche der HepG2-Zellen, was eine Assoziation von IGFBP-1 mit der Zelloberfläche bedeuten würde, konnte ausgeschlossen werden (Abb. 14-16). Bereits nach 20 Minuten Chase-Zeit waren die ersten IGFBP-1-Formen, die sich zu mehr als 95 % aus phosphorylierten Formen zusammensetzen, im Medium zu finden. 40-60 Minuten nach Synthese waren alle IGFBP-1 Formen im Medium detektierbar, während zellassoziiert kein IGFBP-1 mehr nachweisbar war. In diesem Zusammenhang ist es aber erstaunlich, dass sich die Sekretion von IGFBP-1, das innerhalb von 10 Minuten [³⁵S]-markiert wurde, über 40 Minuten verteilt (Abb. 12). Weshalb sich der Transport einer kleinen Population von neusynthetisierten IGFBP-1 Molekülen durch den sekretorischen Weg nicht synchron vollzieht, bleibt unklar.

6. Zusammenfassung

Die Phosphorylierung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor Bindungsprotein-1 (IGFBP-1), wird durch eine spezifische Serin-Kinase katalysiert. Dadurch verändert sich die Affinität des Bindungsproteins zu den Wachstumsfaktoren IGF I und II, was zur Freisetzung der IGFs führt und die Verfügbarkeit der IGFs für die Wechselwirkung mit ihren Rezeptoren beeinflusst. Bis heute ist die Identität der IGFBP-1-Kinase unbekannt.

Ziel der Arbeit war es, Bedingungen zum hoch-sensitiven Nachweis von phosphorylierten IGFBP-1 Formen zu etablieren, um eine Komplementationklonierung der IGFBP-1-Kinase durchführen zu können. Als Zellsystem für die geplante Komplementationklonierung dienten Hamsternieren-Zellen, die stabil humanes IGFBP-1 exprimieren und sezernieren (BHK-BP1), das aber nicht phosphoryliert ist. Als Zellsystem, das phosphoryliertes IGFBP-1 sezerniert, diente die humane Hepatomazelllinie HepG2.

Folgende Bedingungen wurden etabliert:

1. Zum Nachweis phosphorylierter IGFBP-1 Formen ist die Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot das System der Wahl.
2. Das Westernblot-Verfahren ist jedoch nicht ausreichend empfindlich, um z.B. phosphoryliertes IGFBP-1 aus einer komplementierten Zelle zu identifizieren unter 30.000 BHK-BP1-Zellen, die nicht-phosphoryliertes IGFBP-1 sezernieren.
3. Die Immunpräzipitation von IGFBP-1 aus [³⁵S]-Methionin markierten HepG2-Zellen (10 Minuten Pulse und 2 bis 60 Minuten Chase) mit anschließender Nativ-PAGE und Fluorografie ergab eine 500- bis 1000-fache Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweises von phosphoryliertem IGFBP-1 gegenüber dem Westernblot-Verfahren und sollte, gekoppelt mit einer Ein-Schritt-Ionenaustausch-Chromatographie, das geeignete Nachweisverfahren für eine erfolgreiche Komplementationsklonierung der IGFBP-1-Kinase sein.

Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass die Phosphorylierung von IGFBP-1 kurz nach der Synthese, wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum, stattfindet. Der intrazelluläre Transport und Sekretion von neusynthetisiertem, phosphoryliertem IGFBP-1 verläuft nicht synchron.

7. Literaturverzeichnis

Ankrapp, D.P.; Jones, J.I.; Clemmons, D.R. (1996)

Characterization of insulin-like growth factor binding protein-1 kinases from human hepatoma cells

J. Cell. Biochem. **60**, 387-399

Baxter, R.C. (2000)

Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities

Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. **278**, 967-976

Boldt, H.B.; Conover, C.A. (2007)

Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): A local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGF-BPs

Growth Hormone & IGF Research **17**, 10-18

Bonner, W.M.; Laskey, R.A.I. (1974)

A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels

Eur. J. Biochem. **46**, 83-88

Bunn, R.C.; Fowlkes, J.L. (2003)

Insulin-like growth factor binding protein proteolysis

Trends Endocrinol. Metab. **14**, 176-181

Butt, A.J.; Firth S.M.; Baxter, R.C. (1999)

The IGF axis and programmed cell death

Immunol. Cell. Biol. **77**, 256-262

Braulke, T.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1988)

Low temperature blocks transport and sorting of Cathepsin D in Fibroblasts

Biol. Chem. Hoppe Seyler **369**, 441-449

Braulke, T. (1999)

Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein

Horm. Metab. Res. **31**, 242-246

Chitnis, M.M.; Yuen, J.S.P.; Protheroe, A.S.; Pollak, M.; Macaulay, V.M. (2008)

The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway

Clin. Cancer Res. **14**, 6364-6370

Clemmons, D.R.; van Wyk, J.J. (1984)

Factors controlling blood concentration of somatomedin C

Clin. Endocrinol. Metab. **13**, 113-143

Clemmons, D.R.; Busby, W.H.; Nam, T.J.; Clarke, J.B.; Jones, J.I.; Ankrapp, D.K. (1995)

Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions

Prog. Growth Factor Res. **6**, 357-366

Cohen, P. (2006)

Overview of the IGF-I System
Horm. Res. **65**, 3-8

Coverley, J.A.; Baxter, R.C. (1997)

Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins
Mol. Cell. Endocrinol. **128**, 1-5

Crossey, P.A.; Pillai, C.; Miell, J.P. (2002)

Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice
J. Clin. Invest. **110**, 411-418

Daughaday, W.H.; Hall, K.; Raben, M.S.; Salmon, W.D. Jr.; van den Brande, J.L.; van Wyk, J.J. (1972)

Somatomedin: proposed designation for sulphation factor
Nature **235**, 107

Duncan, J.S.; Wilkinson, M.C.; Burgoyne, R.D. (2000)

Purification of Golgi casein kinase from bovine milk
J. Biochem. **350**, 463-468

Firth, S. M.; Baxter, R.C. (2002)

Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins
Endocrine Rev. **23**, 824-854

Frödin, M.; Antal, T.L.; Dümmler, B.A.; Jensen, C.J.; Deak, M.; Gammeltoft, S.; Biondi, R.M. (2002)

A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation
EMBO J. **21**, 5396-5407

Frost, V.J.; Macaulay, V.M.; Wass, J.A.; Holly, J.M. (1993)

Proteolytic modification of insulin-like growth factor-binding proteins: comparison of conditioned media from human cell lines, circulating proteases and characterized enzymes
J. Endocrinol. **138**, 545-554

Gay, E.; Seurin, D.; Babajko, S.; Doublier, S.; Cazillis, M.; Binoux, M. (1997)

Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth
Endocrinology **138**, 2937-2947

Graham, M.E.; Kilby, D.M.; Firth, S.M.; Robinson, P.J.; Baxter, R.C. (2007)

The in vivo phosphorylation and glycosylation of human insulin-like growth factor binding protein-5
Mol. Cell. Proteomics **6**, 1392-1405

Hartmann, H.; Meyer-Alber, A.; Braulke, T. (1992)

Metabolic actions of insulin-like growth factor II in cultured adult rat hepatocytes are not mediated through the insulin-like growth factor II receptor
Diabetologia **35**, 216-223

Hise, M.K.; Salmanullah, M.; Tannenbaum G.S.; Rohan, R.M. (2001)

mRNA Expression of the IGF System in the kidney of the hypersomatotropic Rat
Nephron **88**, 360-367

Hwa, V.; Oh, Y.; Rosenfeld, R.G. (1999)

The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily
Endocrinol. Rev. **20**, 761-787

Holly, J.; Perks, C. (2006)

The role of insulin-like growth factor binding proteins
Neuroendocrinology **83**, 154-160

Hoeck, W. G.; Mukku, V.R. (1994)

Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein-3.
J. Cell. Biochem. **56**, 262-273

Humbel, R.E. (1990)

Insulin-like growth factors I and II
Eur. J. Biochem. **190**, 445-462

Irwin, J.C.; Suen, L.-F.; Faessen, G.H.; Popovici, R.M.; Giudice, L.C. (2001)

Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua: trophoblast interface during human implantation
J. Clin. Endocrinol. Metab. **86**, 2060-2064

Isaksson, O. (2004)

GH, IGF-I and growth
J. Pediatr. Endocrinol. Metab. **17**, 1321-1326

Jones, J.I.; D'Ercole, A.J.; Camacho-Hubner, C.; Clemmons, D.R. (1991)

Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 7481-7485

Jones, J.I.; Gockerman, A.; Busby, W.; Wrigth, G.; Clemmons, D.R. (1993)

Insulin-like growth factor binding protein I 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

Jones, J.I.; Clemmons, D.R. (1995)

Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions
Endocr. Rev. **16**, 3-34

- Karas, M.; Koval, A.P.; Zick, Y.; LeRoith, D. (2001)**
The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of insulin receptor substrate-4 and Crk-II.
Endocrinology **142**, 1835-1840
- Koistinen, R.; Angervo, M.; Leinonen, P.; Hakala, T.; Sepälä, M. (1993)**
Phosphorylation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human amniotic fluid and decidua from early to late pregnancy
Clin. Chim. Acta. **215**, 189-199
- Kübler, B.; Cowell, S.; Zapf, J.; Braulke T. (1998)**
Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins by a novel 50-kilodalton metalloproteinase in human pregnancy serum
Endocrinology **139**, 1556-1563
- Kveiborg, M.; Albrechtsen, R.; Couchman, J.R.; Wewer, U.M. (2008)**
Cellular roles of ADAM12 in health and disease
J. Biochem. Cell. Biol. **40**, 1685-1702
- Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**, 680-685
- Laursen, L.S.; Overgaard, M.T.; Søe, R.; Boldt, H.B.; Sottrup-Jensen, L.; Giudice, L.C.; Conover, C.A.; Oxvig, C. (2001)**
Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A
FEBS Lett. **504**, 36-40
- Lawrence, J.B.; Oxvig, C.; Overgaard, M.T.; Sottrup-Jensen, L.; Gleich, G.J.; Hays, L.G.; Yates, J.R. 3rd; Conover, C.A. (1999)**
The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 3149-3153
- Lee, P.D.; Conover, C.A.; Powell, D.R. (1993)**
Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **204**, 4-29
- Lee, J.; Greenbaum, L.; Haber, B.A.; Nagle, D.; Lee, V.; Miles, V.; Mohn, K.L.; Buncan, M.; Taub, R.E. (1994)**
Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration
Hepatology **19**, 656-665
- Lemanski, L.F.; Paulson, D.J.; Hill, C.S.; Davis, L.A.; Riles, L.C.; Lim, S.S. (1985)**
Immunoelectron microscopic localization of alpha-actinin on Lowicryl-embedded thinsectioned tissues
J. Histochem. Cytochem. **33**, 515-522

- LeRoith, D.; Baserga, R.; Helman, L.; Roberts, Ch.T. Jr. (1995)**
Insulin-like Growth Factors and cancer
Annals Internat. Med. **1**, 54-59
- LeRoith, D.; Butler, A.A. (1999)**
Insulin-like growth factors in pediatric health and disease
J. Clin. Endocrinol. Metab. **84**, 4355-4361
- LeRoith, D. (2000)**
Regulation of proliferation and apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor
Growth Horm. IGF Res. **10**, 12-13
- Leu, J.I.; Crissey, Mary, A.S.; Craig, L.E.; Taub, R. (2003)**
Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP β and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation
Mol. Cell. Biol. **23**, 1251-1259
- Liu, W.; Liu, Y.; Lowe, W.L., Jr. (2001)**
The role of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells
Endocrinology **142**, 1710-1719
- Louvi, A.; Accili, D.; Efstratiadis, A. (1997)**
Growth-Promoting Interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development
Dev. Biol. **189**, 33-48
- Lübke, T.; Marquardt, T.; Etzioni, A.; Hartmann, E.; von Figura, K.; Körner, C. (2001)**
Complementation cloning identifies CDG-IIc, a new type of congenital disorders of glycosylation, as a GDP-fucose transporter deficiency
Nat. Genet. **28**, 73-76
- Maile, L.A.; Holly, J.M.P. (1999)**
Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteolysis: occurrence, identification, role and regulation
Growth Horm. IGF Res. **9**, 85-95
- Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. (2002)**
The protein kinase complement of the human genome
Science **298**, 1912-1934
- Mishra, S.; Murphy, L.J. (2003)**
Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 by breast cancer cell membranes enhances IGF-I binding
Endocrinology **9**, 4042-4050
- Oesterreicher, S.; Blum, W. F.; Schmidt, B.; Braulke, T.; Kübler, B. (2005)**
Interaction of Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) with multiple plasma proteins
J. Biol. Chem. **280**, 9994-10000

Parker, P. J.; Parkinson, S. J. (2001)

AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C
Biochem. Soc. Transactions **29**, 860-863

Parker, A.; Rees, C.; Clarke, J.B.; Busby, W.; Clemmons, D.R. (1998)

Binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins to smooth-muscle cell extracellular matrix is a major determinant of cellular response to IGF-I
Mol. Biol. Cell. **9**, 2383-2392

Pozo, J.; Martos-Moreno, G.A.; Barrios, V.; Argente, J. (2005)

The IGF system in childhood: physical and clinical implications
J. Endocrinol. Invest. **28**, 38-42

Resnicoff, M.; Baserga, R. (1998)

The role of the insulin-like growth factor I receptor in transformation and apoptosis
Ann. N. Y. Acad. Sci. **842**, 76-81

Rinderknecht, E.; Humbel, R.E. (1978)

The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin
J. Biol. Chem. **253**, 2769-2776

Rutkute, K.; Nikolova-Karakashian, M.N. (2007)

Regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 expression during aging
Biochem. Biophys. Res. Commun. **361**, 263-269

Salmon, W.D.; Daughaday, W.H. (1957)

A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro
J. Lab. Clin. Med. **49**, 825-836

Schägger, H.; von Jagow G. (1987)

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa
Anal. Biochem. **166**, 368-379

Scharf, J.-G.; Ramadori, R.; Braulke, T. (1996)

Synthesis of insulinlike growth factor binding proteins and of the acid-labile subunit in primary cultures of rat hepatocytes, of Kupffer cells, and in cocultures: regulation by insulin, insulin-like growth factor, and growth hormone
Hepatology **23**, 818-827

Scharf, J.G.; Dombrowski, F.; Novosyadlyy, R.; Eisenbach, C.; Demori, I.; Kübler, B.; Braulke, T. (2004)

Insulin-like growth factor binding protein-1 is highly induced during acute carbon tetrachloride liver injury and potentiates the IGF-I-stimulated activation of rat hepatic stellate cells
Endocrinology **145**, 3463-3472

Schmidt, B.; Kiecke-Siensen, C.; Waheed, A.; Braulke, T.; von Figura, K. (1995)

Localization of insulin-like growth factor II binding site to amino acids 1508-1566 in repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor
J. Biol. Chem. **270**, 14975-14982

Shalamanova, L.; Kübler, B.; Storch, S.; Scharf, J.G.; Braulke, T. (2008)

Multiple post-translational modifications of mouse insulin-like growth factor binding protein-6 expressed in epithelial Madin-Darby canine kidney cells
Mol. Cell. Endocrinol. **295**, 18-23

Shi, Z.; Xu, W.; Loechel, F.; Wewer, U.M.; Murphy, L.J. (2000)

ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3
J. Biol. Chem. **275**, 18574-18580

Skolnik, E.Y.; Li, N.; Lee, C.H. (1993)

The functions of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways
Science **260**, 1953-1955

Towbin, H.; Staehelin, J.; Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354

Young, S.C.J.; Miles, M.V.; Clemmons, D.R. (1992)

Determination of the pharmacokinetic profiles of insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 in rats
Endocrinology **131**, 1867-1873

Zapf, J.; Froesch, E.R. (1986)

Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role
Horm. Res. **24**, 121-130

8. Abkürzungsverzeichnis

Neben den hier aufgeführten Abkürzungen wurden die gängigen chemischen Formeln und SI-Einheiten verwendet. Alle englischen und lateinischen Abkürzungen und Wörter, deren Übersetzung nicht gebräuchlich ist, sind in Anführungszeichen bzw. kursiv dargestellt.

ASB	Arylsulfatase B
ADAM	“ <u>a</u> <u>d</u> isintegrin and <u>m</u> etalloprotease”
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHK	”baby hamster kidney”
BP	Bindungsprotein
BSA	”bovine serum albumin”
cDNA	copy-DNA
cpm	”counts per minute”
DMEM	”Dulbeccos Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	”enhanced chemiluminescence”
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	fötales Kälberserum
GH	“growth hormone”
GHRH	”growth hormone releasing hormone”
HepG2	humane hepatogene Zelllinie
HRP	” <u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase”
IGF	“Insulin-like growth factor “
kDa	kilo Dalton
LB	Ligandblot
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MDCK	”Madin-Darby canine kidney”
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> e <u>l</u> elektrophorese
PAPPA	” <u>p</u> regnancy- <u>a</u> ssociated <u>p</u> lasma <u>p</u> rotein <u>A</u> ”
PPO	Polyphenylenoxid
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline

Abkürzungsverzeichnis

rpm	rounds <u>per</u> <u>minute</u>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

9. Anhang

Danksagung

Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas, für seine Unterstützung sowie seinen Optimismus danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Bernd Kübler, der mich mit viel Zeit und Geduld bei dem experimentellen Teil dieser Arbeit begleitet hat.

Danke Sandra, Inke und Annika für Eure Unterstützung.

Lebenslauf

Geburtsdatum	06.06.1973
Geburtsort	Dresden
Schulbildung	1990 Mittlere Reife Polytechnische Oberschule Hermsdorf/Erzgebirge 1995 Fachhochschulreife Berufliche Schulen des Kreises Steinburg, Itzehoe 2000 Abitur Wirtschaftsgymnasium Kieler Strasse, Hamburg
Ausbildung	1990-1994 Fachschul Ausbildung zur Erzieherin Berufliches Schulzentrum Gesundheit und Sozialwesen Dresden 2000-2007 Hochschulstudium Zahnmedizin Universität Hamburg
Berufstätigkeit	08/94-07/95 Erzieherin Begegnungsstätte Wellenkamp, Itzehoe 09/95-01/97 Erzieherin Jugendhaus Krückaupark, Elmshorn 02/97-07/98 Erzieherin Kindertagesstätte Sude West, Itzehoe 02/08-10/08 Assistenz Zahnärztin Zahnarztpraxis im Mercado, Dr. Dasthgibi, Hamburg Altona seit Nov. 2008 Assistenz Zahnärztin Zahnarztpraxis, Dr. Kornitzky, Geesthacht
Sonstiges	09/06 OP-Extraktionskurs Henriettenstiftung Hannover Prof. Dr. Dr. Gerke 07/07 Kurs Ästhetisch-funktionelle Restaurationen Universität Hamburg PD Dr. M. Oliver Ahlers 09/08 Praktische Übungen mit Nano- und Siloran Compositen 3M Espe Prof. Dr. Claus-Peter Ernst 10/08 Implantation für Einsteiger MKG am Jungfernstieg Dr. Dr. Jochen Körholz und Olaf Korth seit März 2006 Doktorarbeit am Universitätsklinikum Eppendorf, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Arbeitsbereich Molekularbiologie bei Prof. Dr. rer. nat. T. Bräulke Titel: „Experimentelle Grundlagen zur Identifizierung und Charakterisierung von IGF-Bindungsprotein-1-Kinasen“

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.