

**Identifizierung und Charakterisierung von neuen
Proteinen, die mit den humanen Insulin-ähnlichen
Wachstumsfaktoren (IGF) und IGF-Bindungsproteinen
interagieren**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium

vorgelegt von
Sandra Oesterreicher
aus Hamburg

beim Fachbereich Biologie
der
Universität Hamburg

Hamburg 2004

Gutachter: Prof. Dr. T. Braulke
Prof. Dr. H.-P. Mühlbach

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	IGF-I und IGF-II	1
1.2	IGF-Rezeptoren	2
1.3	IGF-Bindungsproteine (IGFBPs).....	4
1.3.1	Allgemeine Struktur der IGFBPs	5
1.3.2	Posttranslationale Modifikationen der IGFBPs	6
1.3.3	IGFBP-3	6
1.4	IGFBP-3-bindende Proteine.....	7
1.5	IGFBP-Proteasen	8
1.6	IGF-unabhängige Wirkungen von IGFBPs und IGFBP-Fragmenten	10
2	Zielsetzung.....	12
3	Material und Methoden.....	13
3.1	Material	13
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	13
3.1.2	Radioaktive Substanzen	13
3.1.3	Geräte.....	13
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	14
3.1.5	Kits.....	14
3.1.6	Plasmide, DNA und DNA-Standards.....	15
3.1.7	Primer.....	15
3.1.8	Enzyme und Nukleotide.....	15
3.1.9	Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards	15
3.1.10	Humanes Serum	16
3.1.11	Bakterienstamm	16
3.1.12	Zelllinien	17
3.1.13	Puffer, Medien und Lösungen.....	17
3.1.14	Antikörper	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	18
3.2.1.1	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	18
3.2.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	18
3.2.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	18
3.2.1.4	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	19
3.2.1.5	Anlegen einer Glycerinkultur.....	19
3.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	19
3.2.1.7	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	20
3.2.1.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	20
3.2.1.9	Polymerase-Kettenreaktion.....	20
3.2.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	21
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	21
3.2.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	21
3.2.2.2	Trypsinierung von Zellen.....	22
3.2.2.3	Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen	22
3.2.2.4	Transiente und stabile Transfektion von MDCK-Zellen	22
3.2.2.5	[³ H]-Thymidin Einbau	23
3.2.2.6	α-[1- ¹⁴ C]-Methylaminoisobuttersäure-Assay	23
3.2.3	Biochemische Methoden.....	24
3.2.3.1	Messung der β-Hexosaminidase-Aktivität.....	24
3.2.3.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
3.2.3.3	Ethanol-Fällung von Proteinen	24
3.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.2.3.5	Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese	25
3.2.3.6	Färbung von Proteinen	26

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.7	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	26
3.2.3.8	Westernblot Analyse	26
3.2.3.9	Ligandblot mit biotinyliertem IGF-II (bIGF-II)	27
3.2.3.10	Iodierung von Proteinen	27
3.2.3.11	[¹²⁵ I]-IGFBP-3 Overlayblot	28
3.2.3.12	Quervernetzung von Proteinen	28
3.2.3.13	Proteolyse von [¹²⁵ I]-IGFBPs	28
3.2.3.14	[¹²⁵ I]-IGFBP-3-Substratzymographie	29
3.2.3.15	Gelfiltration	29
3.2.3.16	ConA Sepharose-Säule	29
3.2.3.17	Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektrometrie	30
4	Ergebnisse	32
4.1	IGF-bindende Proteine im Plasma	32
4.2	BIAcore Bindungsstudien	37
4.3	IGFBP Proteaseaktivität im IGF-II Eluat	39
4.4	IGFBP Proteaseaktivität im Schwangerenserum	43
4.5	Multiple Serum- und IGFBP-3-bindende Proteine in der Pool I-Fraktion	46
4.6	Aufreinigungsverfahren für Pool I-Proteine	48
4.7	Expression von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen	49
4.7.1	Transiente Expression von Transferrin	49
4.7.2	Stabile Expression von IGFBP-3	50
4.7.3	Stabile Expression von Transferrin und IGFBP-3	50
4.8	Sortierung von Transferrin und IGFBP-3 in polarisierten MDCK-Zellen	51
4.9	Biologische Wirkung von Transferrin und IGFBP-3 auf MDCK-Zellen	53
4.9.1	Regulation der Proliferation	53
4.9.2	Regulation der Aminosäure-Aufnahme	54
5	Diskussion	58
5.1	Identifizierung von IGF/IGFBP-bindenden Plasmaproteinen	58
5.1.1	Plasminogen und Transferrin	59
5.1.2	Charakterisierung einer IGFBP-3 Protease	60
5.1.3	Antithrombin III, Präkallikrein und der lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	61
5.2	Multiple IGF-bindende Komplexe im Plasma	62
5.3	Untersuchungen an humanem Schwangerenserum	66
5.4	Funktionelle und physiologische Relevanz des IGF-bindenden Komplexes	69
5.4.1	Polare Sekretion von IGFBP-3 und Transferrin	73
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Abkürzungsverzeichnis	92
9	Anhang	94

1 EINLEITUNG

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II) stimulieren Wachstum, Differenzierung und Überleben der verschiedensten Zelltypen als endokrine, parakrine und autokrine Faktoren. Sie üben außerdem Insulin-ähnliche, metabolische Effekte unter Wechselwirkung mit spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren aus. Die Wechselwirkung der IGFs mit den Rezeptoren wird von spezifischen Bindungsproteinen (IGFBPs) reguliert. Die hochaffine Bindung der IGFs an die IGFBPs wird hauptsächlich durch Proteolyse der Bindungsproteine wieder aufgehoben. Die IGFs, die IGFBPs sowie die IGF-Rezeptoren und die IGFBP-Proteasen sind die Hauptkomponenten des IGF-Systems. Neben diesen Komponenten interagieren eine Reihe von weiteren Proteinen mit den IGFs und IGFBPs und tragen somit zur zell- und gewebespezifischen Feinregulation der IGF-Wirkung bei.

1.1 IGF-I und IGF-II

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II sind einzelkettige Polypeptide, die aus 70 bzw. 67 Aminosäuren bestehen und Strukturhomologie zum Proinsulin aufweisen. 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), welches wiederum zur Sekretionshemmung des GH-Releasing-Hormons (GHRH) im Hypothalamus führt. Neben der Leber synthetisieren aber auch Zellen anderer Organe und Tumoren IGFs, die daher in den verschiedensten Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin, Lymphe, etc. zu finden sind. Beim Menschen liegt die Serumkonzentration von IGF-II bei 500 bis 700 ng/ml und ist damit höher als die von IGF-I (200 bis 300 ng/ml). Der Spiegel für IGF-I ist im Gegensatz zum IGF-II-Spiegel stark altersabhängig. Er steigt bis zur Pubertät an und nimmt dann mit zunehmendem Alter ab (Bennet et al., 1984; Clemmons und Van Wyk, 1984; Daughaday et al., 1981).

Die IGF-Wirkungen *in vitro* umfassen unter anderem die kurzfristige Stimulation anaboler Stoffwechselwege (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; Resnicoff und Baserga, 1998). *In vivo* vermitteln die IGFs vor allem die Wirkung von GH auf Gewebe und Organe. IGF-I-Rezeptor-knock-out Experimente zeigten jedoch, daß die GH-Wirkung auch über andere Signalwege IGF-unabhängig vermittelt werden kann (LeRoith, 2000).

1.2 IGF-Rezeptoren

IGFs können spezifisch an drei zelluläre Oberflächenrezeptoren binden: an den IGF-I-, den IGF-II- und den Insulin-Rezeptor (Abb. 1). Die biologischen Effekte der IGFs werden vor allem über den IGF-I-Rezeptor vermittelt (LeRoith et al., 1995). Der IGF-I und der Insulin-Rezeptor gehören zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie sind transmembrane, heterotetramere Glykoproteine, die aus $\alpha_2\beta_2$ -Untereinheiten bestehen. Sie weisen beim Menschen etwa 50 bis 60 % Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz auf (Jones und Clemmons, 1995). Die IGF-bindende Domäne des IGF-I-Rezeptors befindet sich in der Cystein-reichen α -Untereinheit. Nach Bindung des Liganden wird die Signaltransduktion durch Aktivierung einer Tyrosinkinase in der intrazellulären Region der β -Untereinheit eingeleitet. Die β -Untereinheit wird an spezifischen Tyrosinresten trans-autophosphoryliert, was einerseits zur Phosphorylierung cytosolischer Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS) und andererseits zur Phosphorylierung vom „SH2-domain containing transforming protein“ (Shc) und der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3 Kinase) führt. Die Familie der IRS stellt die Verbindung zwischen dem aktiven Rezeptor und den Zielproteinen der weiteren Signalkaskade dar. Es sind bisher vier Mitglieder der IRS-Familie identifiziert worden. Die Funktion von IRS-1 ist bisher am besten untersucht. Es interagiert über spezifische Erkennungssequenzen, wie z.B. die YMXM-Sequenz (Y=Tyrosin, M=Methionin, X steht für einen beliebigen Rest), mit verschiedensten Proteinen, die „src homology“ 2 und 3 (SH2/SH3)-Domänen besitzen. Proteine, die SH 2-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 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 (Skolnik et al., 1993).

Der IGF-I-Rezeptor zeigt die höchste Affinität für IGF-I (K_D 0,2 bis 1 nM) und bindet Insulin mit 100- bis 1000-fach und IGF-II mit 2- bis 15-fach geringerer Affinität (Jones und Clemmons, 1995).

In Zellen, die keinen IGF-I-Rezeptor besitzen (Hepatocyten, Fibroblasten von IGF-I-Rezeptor knock-out Mäusen), wird die Wirkung der IGFs über den Insulin-Rezeptor vermittelt (Hartmann et al., 1992; Louvi et al., 1997). Der Insulin-Rezeptor ist außerdem für ca. 30 % der wachstumsfördernden Effekte des IGF-II während der Embryonalentwicklung verantwortlich (Louvi et al., 1997).

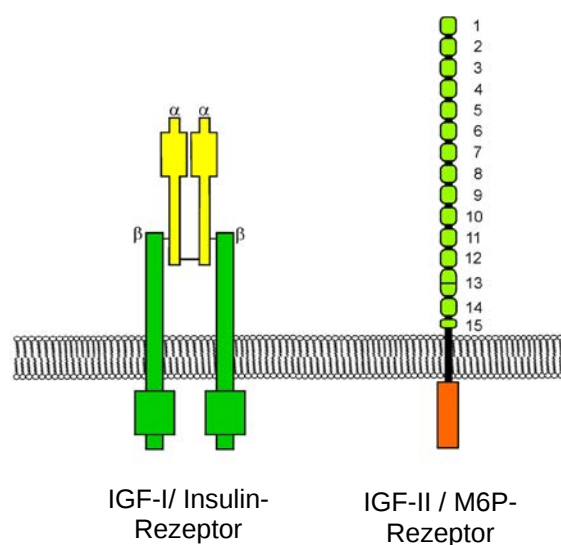


Abb. 1: Schematische Darstellung des IGF-I-, Insulin- und IGF-II/M6P-Rezeptors. Der IGF-I- und der Insulin-Rezeptor gehören zur Klasse der Tyrosinkinase-Rezeptoren, die aus $\alpha_2\beta_2$ -Untereinheiten bestehen. Der IGF-II/M6P-Rezeptor ist ein einzelkettiges Glykoprotein, mit einem aus 15 Domänen bestehenden extrazellulären Anteil.

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 M6PR vermittelt den Transport und die Sortierung lysosomaler Enzyme (Braulke, 1996). Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors besteht aus einer repetitiven Struktur 15 homologer Domänen, die unter anderem neben zwei Bindungsstellen für Mannose-6-Phosphat-haltige Liganden in Domäne 3 und 9 eine Bindungsstelle für IGF-II in Domäne 11 enthalten (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. Insulin bindet nicht an den Rezeptor. Die Rolle des IGF-II/M6P-Rezeptors in der Signaltransduktion wird kontrovers diskutiert (Braulke, 1999), er spielt aber 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).

1.3 IGF-Bindungsproteine (IGFBPs)

IGFs sind im Blutkreislauf, im extrazellulären Raum und im Gewebe nur in geringer Menge in freier Form vorhanden, sondern zu > 95% an IGF-Bindungsproteine gebunden. Die Familie der IGFBPs umfaßt sechs homologe Polypeptide (IGFBP-1 bis -6; Abb. 2) 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).

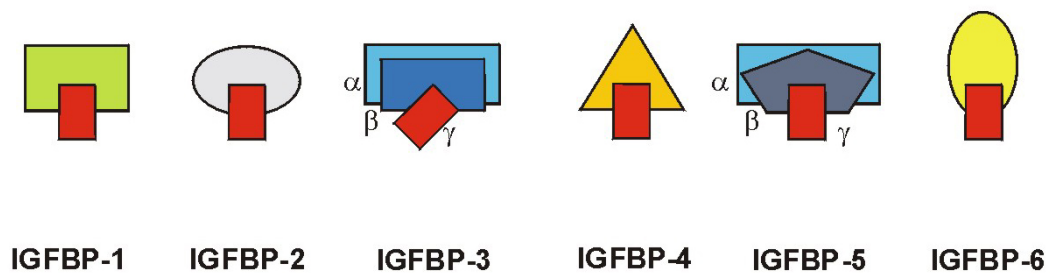


Abb. 2: Schematische Darstellung der 6 homologen IGF-Bindungsproteine (IGFBP). Das IGF-Molekül ist als rotes Rechteck dargestellt. Die Bindungsproteine 3 und 5 (IGFBP-3/-5) liegen in einem ternären Komplex mit der säure-labilen Untereinheit ALS vor, hier mit dem Buchstaben α gekennzeichnet.

Die IGFBPs fungieren nicht nur als Transportmoleküle, die die Halbwertszeit zirkulierender IGFs erhöhen, sondern wirken auch modulierend auf die biologischen Effekte der IGFs. Durch Bindung bzw. durch Freisetzung der IGFs aus den IGFBP-Bindungskomplexen über verschiedene Mechanismen, wie Proteolyse (siehe 1.5), Phosphorylierung oder Bindung der IGFBPs an die extrazelluläre Matrix (ECM), 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-2 und IGFBP-6, die eine deutlich höhere Affinität für IGF-II aufweisen (Baxter, 2000).

Die IGFBPs sind Cystein-reiche Proteine (16-20 Cysteinreste) mit einer starken Homologie in ihrer Primärstruktur. Die Cysteinreste befinden sich in den globulären, konservierten N- und C-terminalen Domänen der IGFBPs, die durch eine nicht-konservierte, innerhalb der IGFBPs stark variierende zentrale Region voneinander getrennt sind. Die Bindungsstelle für IGFs ist in der N-terminalen (Kalus et al., 1998; Qin et al., 1998) und C-terminalen Domäne (für IGFBP-1, -2, -3 und -5) lokalisiert. Da N- bzw. C-terminale IGFBP-Fragmente IGFs mit ≤ 10 -fach geringerer Affinität binden können als die entsprechenden intakten IGFBPs (Forbes et al., 1998; Zeslawski et al., 2001; Hwa et

al., 1999; Ständker et al., 2000), wird die Existenz einer aus beiden Domänen gebildeten IGF-Bindungstasche vermutet (Firth und Baxter, 2002).

In den letzten Jahren wurde eine neue Familie von Cystein-reichen Proteinen identifiziert, die aus mindestens neun Mitgliedern unbekannter Funktion besteht und strukturelle Ähnlichkeiten zu den IGFBPs aufweisen. Sie werden als IGFBP-verwandte Proteine (IGFBP-rPs) bezeichnet. Die N-terminale Domäne der IGFBP-rPs ist homolog zu den IGFBPs. Sie unterscheiden sich aber in ihrer zentralen und C-terminalen Domäne. Vier dieser Proteine binden IGFs, wenn auch mit einer 100-fach geringeren Affinität als die IGFBPs. Für IGFBP-rP1 und IGFBP-rP3 konnte gezeigt werden, daß sie Insulin mit gleicher Affinität wie IGFs binden können (Hwa et al., 1999).

1.3.1 Allgemeine Struktur der IGFBPs

Die N-terminale Domäne der IGFBPs umfaßt 80-93 Aminosäuren und ist zu 58% bei allen IGFBPs identisch. Sie wird durch sechs Disulfidbrücken stabilisiert. IGFBP-6 besitzt als Ausnahme nur fünf Disulfidbrücken. Die zentrale Region der IGFBPs besteht aus 55 bis 95 Aminosäuren und kann durch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung (Cheung et al., 1991; Firth und Baxter, 1999), Phosphorylierung (Coverley und Baxter, 1997) oder proteolytische Spaltung (Conover et al., 1995; Imai et al., 1997) verändert werden. Die C-terminale Domäne der IGFBPs besitzt 34% Homologie innerhalb der Familie der humanen IGFBPs. Die drei vorkommenden Disulfidbrücken beinhalten alle sechs Cysteinreste mit einem konservierten Muster von 1-2, 3-4 und 5-6 (Forbes et al., 1998; Ständker et al., 2000). Innerhalb der C-terminalen Domäne von IGFBP-3, -5 und -6 ist ein Heparin-Bindungsmotiv zu finden: XBBBXXBX, wobei B für eine basische Aminosäure (Arg, Lys, His) und X für einen beliebigen Rest steht. Für IGFBP-3 und -5 ist bekannt, daß das Heparin-Bindungsmotiv für die Bindung der IGFBPs an die „acid labile subunit“ (ALS, siehe Abschnitt 1.3.3) und an die Zelloberfläche und/oder die Extrazellulärmatrix (ECM) verantwortlich ist (Booth et al., 1996; Fowlkes et al., 1997). Die Heparinbindungsdomäne ist auch für die Bindung von IGFBP-3 und IGFBP-5 an Transferrin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und andere Proteine verantwortlich (Weinzimer et al., 2001; Nam et al., 1997). Außerdem beinhaltet die Heparinbindungsdomäne einen Teil einer Kernlokalisierungssequenz, die mit Transkriptionsfaktoren interagieren soll (Jaques et al., 1997; Schedlich et al., 2000). IGFBP-1 und -2 besitzen innerhalb der C-terminalen Domäne sogenannte RGD-Sequenzen (Arg-Gly-Asp), die an Integrine binden können (Binkert et al., 1989; Jones et al., 1993).

1.3.2 Posttranslationale Modifikationen der IGFBPs

Während IGFBP-3 und -4 drei bzw. eine N-Glykosylierungsstelle besitzen, enthalten IGFBP-1, -5 und -6 O-glykosidisch verknüpfte Zuckerreste (Firth und Baxter, 2002). Die Fähigkeit IGFs mit hoher Affinität zu binden, scheint durch die Glykosylierung jedoch nicht beeinflusst zu sein. Es konnte eine verschlechterte Bindung an Glykosaminoglykane der Zelloberfläche bei IGFBP-3 und -6 festgestellt werden, wenn diese glykosyliert sind (Firth und Baxter, 1999; Marinaro et al., 2000). Beim IGFBP-6 ist die O-Glykosylierung für die Resistenz gegenüber der proteolytischen Spaltung verantwortlich (Neumann et al., 1998).

Drei der sechs IGFBPs (IGFBP-1, -3 und -5) können posttranslational durch Phosphorylierung an Serinresten in der zentralen Domäne modifiziert werden (Coverley und Baxter, 1997). Für humanes IGFBP-1 konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung die Affinität zu IGF-I etwa 6-fach erhöht und somit hemmend auf IGF-I stimulierten Prozesse wirkt, wie z.B. die Regeneration nach akuter Leberschädigung (Scharf et al., 2004), während nicht phosphoryliertes IGFBP-1 die Wirkung von IGF-I potenziert (Baxter, 2000).

1.3.3 IGFBP-3

IGFBP-3 ist das am häufigsten vorkommende IGFBP in der Zirkulation. Mindestens 75% der IGFs werden in Form eines ternären, 150 kDa-Komplexes, der aus IGF-I oder IGF-II, IGFBP-3 und der ALS besteht, transportiert. Die ALS ist ein leucinreiches Glykoprotein von ca. 85 kDa. Die Heparinbindungsdomäne des IGFBP-3 ist dabei essentiell für die Bindung an ALS (Baxter und Firth, 1995; Hashimoto et al., 1997). IGFBP-3 besitzt drei N-Glykosylierungsstellen: Asn⁸⁹, Asn¹⁰⁹ und Asn¹⁷². Die ersten beiden Asn-Reste werden immer benutzt und tragen jeweils 4 bzw. 4,5 kDa zur apparenten molekularen Masse bei, während der dritte Asn-Rest eine 5 kDa Kohlenhydratkette tragen kann. Daraus leitet sich die charakteristische 43-45 kDa Doppelbande von IGFBP-3 ab (Firth und Baxter, 1999).

Der ternäre 150 kDa-Komplex verlängert die Halbwertszeit der IGFs in der Zirkulation von ca. 20 min auf 16 h und verhindert die Filtration der IGFs aus dem vaskulären Kompartiment über die Niere. Er stellt somit ein zirkulierendes Reservoir der IGFs dar (Baxter et al., 1989). Auch IGFBP-5 bildet ternäre Komplexe, wobei die Anlagerung der ALS über IGFBP-3-homologe Sequenzen im C-Terminus von IGFBP-5 erfolgt (Twigg und Baxter, 1998). Etwa 90% des IGFBP-3 und 55% des IGFBP-5 zirkulieren in Form der

ternären Komplexe (Baxter et al., 2002). In der Zirkulation liegen alle sechs Bindungsproteine in geringen Mengen auch in freier Form oder in binären Komplexen von 40 bis 50 kDa mit IGFs vor. Es wird angenommen, daß die IGFBPs so schnell das vaskuläre Endothel durchqueren können, um die IGFs aus der Zirkulation zu den Zielzellen transportieren zu können (Guler et al., 1989; Lewitt et al., 1994; Young et al., 1992). Während der Schwangerschaft unterliegt IGFBP-3 einer proteolytischen Spaltung, wobei die entstehenden Fragmente trotzdem im 150 kDa ternären Komplex gebunden sind (Lee und Rechler, 1996; Suikkari und Baxter, 1992).

IGFBP-3 wird nicht nur in nicht-parenchymalen Zellen der Leber, sondern auch in verschiedenen anderen Geweben synthetisiert und an die Extrazellulärflüssigkeit abgegeben. Die Bindung von IGFBP-3 an Heparansulfate der ECM erniedrigt die Affinität zu IGF und schützt gleichzeitig vor Proteolyse des Bindungsproteins. Es wird angenommen, daß durch die Bindung der IGFBP-IGF-Komplexe an Proteoglykane der ECM die Wechselwirkung der IGFs zu ihren Rezeptoren erleichtert und deren Effekte verstärkt werden (Parker et al., 1998). Aufgrund der hohen Affinität der IGFBPs führte eine Co-Inkubation von IGFBP-3 mit IGF-I in verschiedensten Zellkultur-Systemen erwartungsgemäß zu einer Hemmung der IGF-vermittelten Effekte, da IGF durch Bindung an IGFBP-3 dem Rezeptor entzogen wird (Firth und Baxter, 2002).

1.4 IGFBP-3-bindende Proteine

In den letzten Jahren sind verschiedene Proteine identifiziert worden, die an IGFBP-3 binden können. Neben der ALS (Baxter und Martin, 1989) und Heparin (Booth et al., 1995) gehören dazu auch Glykosaminoglykane und Proteoglykane (Booth et al., 1995; Fowlkes und Serra, 1996; Smith et al., 1994), sowie Fibrinogen und Fibrin (Campbell et al., 1999), Fibronectin (Gui und Murphy, 2001) und Plasminogen (Campbell et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das Serumprotein Transferrin in Abhängigkeit von der Eisensättigung über die Heparinbindungsdomäne an IGFBP-3 binden kann (Weinzimer et al., 2001). Transferrin bindet auch IGFs mit niedriger Affinität und erhöht in Anwesenheit von IGFBP-3 die Affinität des Komplexes aus Transferrin und IGFBP-3 an IGF-II (Storch et al., 2001). Das verwandte eisenbindende Protein Lactoferrin ist ebenfalls in der Lage an IGFBP-3 zu binden (Baumrucker und Erondur, 2000).

Kürzlich konnte für das Serum- und ECM-Protein Vitronectin gezeigt werden, daß es IGF und IGFBPs binden kann (Upton et al., 1999). Dabei interagiert IGF-II direkt mit Vitronectin, während IGF-I nur indirekt über IGFBP-4, -5 oder nicht-glykosyliertem

IGFBP-3 an Vitronectin binden kann (Krickler et al., 2003). Es wird diskutiert, daß die IGF-IGFBP-Vitronectin-Komplexe bei Wundheilungsprozessen von Bedeutung sind (Hyde et al., 2004).

Als weitere Proteine mit IGFBP-bindenden Eigenschaften sind Typ I α Collagen, der TGF- β Typ V-Rezeptor und das latente TGF- β Bindungsprotein-I beschrieben worden (Leal et al., 1997; Liu et al., 2003; Xu et al., 1998).

Als IGFBP-5-Interaktionsproteine sind neben der ALS der Plasminogenaktivator-Inhibitor-1, Glykosaminoglykane, Osteopontin und Thrombospondin nachgewiesen worden (Arai et al., 1996; Nam et al., 1997; Nam et al., 2000; Twigg und Baxter, 1998).

1.5 IGFBP-Proteasen

Die Proteolyse der IGFBPs wird als Hauptmechanismus zur Freisetzung der IGFs von den IGF/IGFBP-Komplexen angesehen. Die Affinität der gebildeten Fragmente zu den IGFs sinkt und erhöht die Verfügbarkeit der IGFs für die IGF-Rezeptoren. 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 benutzte Spaltstellen mit den *in vivo* isolierten Fragmenten übereinstimmen. Die IGFBP-Proteasen lassen sich in drei Gruppen einteilen: Serinproteasen, Metalloproteasen und saure lysosomale Cathepsine.

Kallikrein-ähnliche Serinproteasen, wie α -Kallikrein, das Prostata-spezifische Antigen (PSA) oder der Nervenwachstumsfaktor- γ , spalten IGFBP-3 *in vitro* (Cohen et al., 1992; Rajah et al., 1996). Kürzlich konnte der Komplementfaktor C1s als spezifische IGFBP-5-Protease identifiziert werden (Busby et al., 2000). Eine andere Serinprotease ist Plasmin, die neben Fibrin auch IGFBP-1, -3, und -5 spalten kann (Booth et al., 1996; Campbell und Andress, 1997; Campbell et al., 1992). Zusätzlich ist Plasmin an der Aktivierung von Matrixmetalloproteasen, wie MMP-3, -7, -9, -12 und -13 beteiligt (Collen, 2001). Die Serin-Serumprotease Thrombin kann IGFBP-3 und IGFBP-5 *in vitro* spalten (Booth et al., 1996; Campbell et al., 1992; Durham et al., 1999).

Aus der diversen Gruppe der Metalloproteasen sind Mitglieder der Metzincin-Superfamilie, wie z.B. Matrixmetallo- (MMPs) und Reprolysinproteasen, als IGFBP-Proteasen beschrieben worden (Conover, 2000). So wurde MMP-3 als IGFBP-3-spaltende Protease *in vitro*, in humanen Hautfibroblasten und im Ratten Schwangerenserum nachgewiesen (Wu et al., 1999; Fowlkes et al., 1994a; Fowlkes et al., 1994b), während MMP-1 IGFBP-2 und IGFBP-3 als Substrate spaltet (Rajah et al., 1999). Kürzlich konnte

gezeigt werden, daß MMP-3 und MMP-9 in der Lage sind, IGFBP-1 zu degradieren (Coppock et al., 2004). Martin et al. (1999) zeigten in einem murinen Lebertumormodel, daß der spezifische MMP-1-Inhibitor TIMP-1 („tissue inhibitor of metalloproteinase 1“) die IGFBP-3 Proteolyse hemmt.

Zur Reprolysin-Familie gehören die „a disintegrin and metalloproteases“ (ADAMs). Diese Zink-abhängigen Metalloproteasen bestehen aus einer Pro-, einer Metalloprotease-, einer Disintegrin- und einer Cystein-reichen Domäne. Zusätzlich besitzen membranverankerte ADAMs eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne (Loechel et al., 1998). Eine partiell gereinigte IGFBP-3, -4 und -5 Protease aus Schwangerenserum wies charakteristische Eigenschaften der ADAMs Familie auf (Kübler et al., 1998). Später wurde ADAM 12-S durch „two-hybrid“ Analyse in der Hefe als Bindungsprotein von IGFBP-3 identifiziert (Shi et al., 2000), und es ist als rekombinantes Protein in der Lage IGFBP-3 und -5 zu spalten (Loechel et al., 2000). Die Zink-abhängige Metalloprotease „pregnancy-associated plasma protein A“ (PAPP-A) ist identisch mit der IGF-II stimulierbaren IGFBP-4 Protease im Medium von humanen Fibroblasten (Lawrence et al., 1999). Außerdem ist PAPP-A die vorherrschende IGFBP-4 Protease im Schwangerenserum (Byun et al., 2001).

Schließlich werden Cathepsine, wie die sauren lysosomalen Cystein- und Aspartyl-Proteasen Cathepsin L, B und D, als potentielle IGFBP-Proteasen diskutiert. Es sind aber auch nicht-lysosomale Proteasen mit neutralem pH-Optimum wie Cathepsin G nachgewiesen worden (Gibson und Cohen, 1999). Cathepsine sind der Lage verschiedene IGFBPs zu degradieren. Cathepsin D z.B. spaltet IGFBP-1 bis -5, aber nicht IGFBP-6 (Claussen et al., 1997; Conover und De Leon, 1994). Die physiologische Bedeutung der IGFBP-Proteolyse durch Cathepsine zur Regulation der extrazellulären IGFBP-Spiegel bzw. der IGF-Freisetzung aus Komplexen ist unklar, vielmehr wird der intrazelluläre Abbau der IGFBPs durch Cathepsine diskutiert (Zwad et al., 2002).

Erhöhte IGFBP-Proteaseaktivität ist nicht nur im Schwangerenserum, sondern z.B. auch im Serum von Patienten mit fehlendem GH-Rezeptor, bei Diabetes mellitus, nach Operationen, Traumata oder bei Krebspatienten nachgewiesen (Fielder et al., 1992; Bang et al., 1994; Davenport et al., 1992; Frost et al., 1993).

1.6 IGF-unabhängige Wirkungen von IGFBPs und IGFBP-Fragmenten

Als IGF-unabhängige Wirkungen der IGFBPs oder deren Fragmente werden biologische Funktionen definiert, die in Abwesenheit von IGFs (IGF-unabhängig) oder in Anwesenheit von IGFs ohne Rezeptoraktivierung (IGF-Rezeptor-unabhängig) beobachtet werden und über andere Signalwege vermittelt werden.

Als eine der ersten Befunde von IGF-unabhängigen Wirkungen von intakten IGFBPs wurden die Effekte von IGFBP-1 auf Zellmotilität und Adhäsion beschrieben. Wahrscheinlich werden diese Effekte über die Integrinbindungsdomäne des IGFBP-1 und deren Interaktion mit dem $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin vermittelt (Jones et al., 1993). Scharf et al. (2004) zeigten, daß IGFBP-1 die IGF-I-stimulierte Aktivierung und Proliferation von Ratten Leberzellen potenziert. Eine Integrin-vermittelte, IGF-unabhängige Wirkung von IGFBP-2 wird ebenfalls diskutiert (Schütt et al., 2004).

Als IGF-unabhängige Wirkung von intaktem IGFBP-3 wurde die Wachstumshemmung von IGFBP-3 transfizierten Mausfibroblasten nachgewiesen (Cohen et al., 1993). Andere Arbeiten zeigten z.B. die Förderung der Wachstumshemmung in Brustkrebszellen (Oh, 1998) oder die Induktion von Apoptose in Lungenfibroblasten (Besnard et al., 2001). Aufgrund dieser und ähnlicher Arbeiten wird die Rolle eines IGFBP-3 Rezeptors, wie z.B. der TGF- β Typ V-Rezeptor diskutiert (Leal et al., 1997). Liu et al. (2000) konnten zeigen, daß IGFBP-3 in der „two-hybrid“ Analyse über eine direkte Bindung mit dem nukleären Retinoid X-Rezeptor- α (RXR) interagiert und so die apoptotischen Effekte des IGFBP-3 vermittelt werden. Die molekularen Mechanismen eines Kerntransportes von IGFBP-3 und -5, die eine Kernlokalisierungssequenz besitzen, werden allerdings kontrovers diskutiert (Schedlich et al., 2000).

Verschiedene Studien zeigten, daß definierte IGFBP-Fragmente, die eine geringe oder keine Affinität zu IGF besitzen, IGF-unabhängige Wirkungen vermitteln. Zum Beispiel hemmte das Plasmin-generierte 16 kDa Fragment von IGFBP-3 (IGFBP-3¹⁻⁹⁷) das IGF-stimulierte Wachstum embryonaler Hühnerfibroblasten und die Autophosphorylierung des Insulin-Rezeptors (Lalou et al., 1996; Vorwerk et al., 1998). Booth et al. (1999) beschrieben, daß das 16 kDa IGFBP-3 Fragment die Aufnahme von Glucose in Endothelzellen stimuliert. Die Isolierung von natürlich vorkommenden Fragmenten von IGFBP-2, -3, -4 und -5 aus humanem Hämofiltrat, die Identifizierung der proteolytischen Spaltstellen und Bindungseigenschaften an IGFs, verdeutlichen die physiologische

Bedeutung der IGFBP-Proteolyse (Kübler et al., 2002; Ständker et al., 2000; Ständker et al., 2003; Ständker et al., 1998). Kiepe et al. (2001) zeigten, daß Fragmente von IGFBP-4 und -5 im Serum von Kindern mit chronischem Nierenversagen vorkommen und die Wirkung von IGF-I in Chondrocyten modulieren.

2 ZIELSETZUNG

Untersuchungen der letzten Jahre lassen vermuten, daß neben den IGFs, ihren Rezeptoren, den IGFBPs sowie den IGFBP-Proteasen, neue IGF- und IGFBP-bindende Proteine eine weitere Ebene bei der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung im IGF-System bilden. So wurden verschiedene Plasmaproteine identifiziert, die spezifisch mit IGFBP-3 interagieren und dessen Bindungseigenschaften für IGF beeinflussen können.

Zunächst zeigten Gelfiltration und andere Reinigungsverfahren von Schwangerenserum, daß sowohl IGFBP-3 als auch niedermolekulare IGFBP-Proteasen (ca. 50 kDa) in einem höhermolekularen Komplex vorhanden sind.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Identifizierung von Proteinen in einem höhermolekularen Komplex aus humanem Plasma, die an IGF-II als auch an IGFBP-3 binden können. Die Interaktion von potentiellen und identifizierten Bindungsproteinen sollte durch die Bestimmung kinetischer Bindungsparameter und Verfahren, wie Quervernetzung und Overlayblot, näher untersucht werden. Die funktionelle und physiologische Relevanz und Wirkung einiger Komponenten des IGF-II-bindenden Komplexes sollte in biologischen Systemen verifiziert werden.

Ein zweiter Schwerpunkt der Arbeit war die Charakterisierung von Proteasen in humanem Plasma und im Serum schwangerer Frauen. Im Schwangerenserum liegt eine veränderte Regulation des IGF-Systems vor. Maßgeblich ist eine hohe proteolytische Aktivität gegenüber den IGFBPs. Bisher sind nur einige IGFBP-Proteasen biochemisch charakterisiert und identifiziert worden. Dazu sollten in dieser Arbeit Inhibitorprofile der potentiellen Proteasen erstellt und andere Verfahren, wie z.B. die Substratzymographie, zur Charakterisierung verwendet werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Pharmacia, BioRad, GIBCO/BRL, Merck, Pierce, Roche, Roth, Serva oder Sigma bezogen. Alle Reagenzien wurden analysenrein verwendet.

3.1.2 Radioaktive Substanzen

[¹²⁵ I]-Natriumiodid, trägerfrei in NaOH-Lösung pH 7-11, 100 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
α-[1- ¹⁴ C]-Methylaminoisobuttersäure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[methyl ³ H]-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
[¹²⁵ I]-IGF-II	zur Verfügung gestellt von Dr. Scharf, Universität Göttingen

3.1.3 Geräte

ABI-Sequenator 337	Perkin Elmer, USA
Äkta Prime	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Analysenwaagen Typ AC 100	Mettler Waagen, Giessen
Analysenwaagen Typ BP 2100S	Sartorius, Göttingen
β-Szintillationszähler, LS 1800	Beckmann Coulter, Krefeld
BIAcore 3000	BIAcore AB, Schweden
Blot-System, Transphor Typ SE 600	Hoefer Scientific Instruments, USA
Brutschrank Innova 4230	New Brunswick Scientific, Nürtingen
DNA-Sequenzierer Typ	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient	
Elektrophoresekammern für Polyacrylamidgele	Hoefer Scientific Instruments, USA
Elektrophoresekammern für Agarosegele	BioRad, München
Filmentwicklungsmaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
Modell Curix 60	
Gammastrahlenszähler, 1470 Wizard™	Wallac, Finnland
Geltrockner, Modell Gel Air Dryer	BioRad Herkules, USA
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Modell G25	New Brunswick Sc., USA
Magnetrührer Ika-Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen
Phasenkontrastmikroskop, Modell ID 03	Zeiss, Oberkochen

Netzgerät EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pH-Meter Knick 647	Schütt, Göttingen
Photometer, Model RS 232 C	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank HS 12	Heraeus, Osterode
Sterilfilter Minisart NML	Sartorius AG, Göttingen
Stickstoff-Einfriertank Typ Arpege 55	Air Liquide, Frankreich
UV-Handlampe (312 nm und 254 nm)	Bachofer, Reutlingen
Vakuum Konzentrator	Vacuubrand, Wertheim
Model Speed Vac SPD 111V	
<u>Zentrifugen:</u>	
Minifuge GL	Heraeus, Osterode
Eppendorf Kühlzentrifuge, Modell 5417	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC 5C PLUS	Kendro Laboratory Products, USA
<u>Rotoren für die Minifuge:</u>	
F-45-30-11	Heraeus, Osterode
F-45-24-11	Heraeus, Osterode
<u>Rotoren für die Sorvall-Zentrifugen:</u>	
SS-34	Eppendorf, Hamburg
SLA-3000	Eppendorf, Hamburg

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

24-well Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturflaschen 25 und 75 cm ²	Greiner, Nürtingen
Gewebekulturschalen, 100/20 mm	Greiner, Nürtingen
Glasfaserrundfilter GF 103	Schleicher und Schüll, Dassel
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Nitrocellulose Blotting Membrane 0,2 µm	BioRad, München
PD-10 Fertigsäulen, Sephadex G-25, 9 ml	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Transwell Polycarbonat-Filter, 24mm	Corning Costar Corp., USA
Röntgenfilme, XAR-5	Kodak, Stuttgart
Chromatographie-Leersäule	Mobitec, Göttingen
Verstärkerfolien, Cronex Lightning Plus	Dupont, Dreieich
Whatman GB002-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
<u>Zentrifugenbecher:</u>	
SS-34 Polypropylen	Nalgene, München
JA-10 Polypropylen	Nalgene, München

3.1.5 Kits

QIA Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIA Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Gelextraction	Qiagen, Hilden

3.1.6 Plasmide, DNA und DNA-Standards

DNA-Ladder	GIBCO/BRL, Eggenstein
pcDNA6/V5-His	Invitrogen, Leek, Niederlande
pGK hygromycin	Mortensen et al. (1991)
pIRES 2-EGFP	Clontech Lab. Inc., USA
IGFBP-3 cDNA in pSelect	zur Verfügung gestellt von Dr. Firth, Kolling Institute of Medical Research, Australien
Transferrin cDNA in pKT 218	zur Verfügung gestellt von Dr. Storch, Kinderklinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

Die Transferrin cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen Bgl II und Sal II in den pIRES 2-EGFP-Vektor subkloniert. Die IGFBP-3 cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen BamH I und Hind III in den pcDNA6/V5-His Vektor subkloniert.

3.1.7 Primer

Trf1 for:	MWG-Biotech AG, Ebersberg
5'GAAGATCTTCAAGATGAGGCTCGCCGTGGGAG 3'	
Trf698rev:	MWG-Biotech AG, Ebersberg
5'CCGCTCGAGCGGTAAGGTCTACGGAAAGTGACAG 3'	
Seq-Trf496: 5'CTGTGACTTACCTGAGCCACG 3'	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Seq-Trf1491: 5'CAATAAGATCAACCACTGCAG 3'	MWG-Biotech AG, Ebersberg
CMVfor: 5'CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'	MWG-Biotech AG, Ebersberg

3.1.8 Enzyme und Nukleotide

dNTP-Set, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Pfu-Turbo</i> TM -Polymerase	Stratagene, USA
Plasmin	Sigma, Deisenhofen
Plasminogen	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs, Bad Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

3.1.9 Proteine, Protease-Inhibitoren und Proteinstandards

α -2-Antiplasmin	Haematologic Tech. Inc., USA
1,10-Phenanthrolin	Sigma, Deisenhofen

2D-SDS-PAGE-Standard	BioRad, München
Antithrombin-III	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
bIGF-II (mono-biotinyliert)	GroPep, Australien
holo-Transferrin	Sigma, Deisenhofen
IEF-Standard	BioRad, München
IGF-I	GroPep, Australien
IGF-II	zur Verfügung gestellt von Dr. Zapf, Zürich, Schweiz
Präkallikrein	zur Verfügung gestellt von Dr. Müller- Esterl, Frankfurt
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma, Deisenhofen
Rainbow™-coloured Protein-Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
rhIGFBP-2	UBI, USA
rhIGFBP-3 (nicht-glykosyliert)	zur Verfügung gestellt von Dr. Sommer, Celtrix, Santa Clara, CA, USA
rhIGFBP-3 (glykosyliert)	R&D Systems, Inc., USA
rhIGFBP-4	zur Verfügung gestellt von Dr. Zapf, Zürich, Schweiz
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
TAPI	Immunex Corporation, USA

3.1.10 Humanes Serum

Aufgereinigte Cohn Fraktion IV aus humanem Plasma wurde von Dr. Blum, Eli Lilly, Bad Homburg zur Verfügung gestellt.

Humanes Schwangerenserum (15.-40. Woche) wurde über Ammoniumsulfatfällung (30 und 45%) angereichert und anschließend mittels Gelfiltration (S-400) aufgetrennt. Es wurden zwei Proteinfraktionen mit molaren Massen von 600 kDa (Pool I) und 50-100 kDa (Pool II) gebildet, in denen Proteaseaktivität gegenüber IGFBP-3, -4 und -5 detektiert wurde (Kübler et al., 1998). Pool I wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

3.1.11 Bakterienstamm

<i>Escherichia coli</i> DH5α	Genotyp: F'/endA1, hsdR17(r _K ⁻ ,mK ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (NaI ^r), relA1, D(lacZYA-argF) _{U169} , (j80lacZDM15)
---------------------------------	--

3.1.12 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz
MDCK	Madin-Darby Nierenzellen aus dem Hund	
MDCK-IGFBP-3	Madin-Darby Nierenzellen aus dem Hund, stabil transfiziert mit der cDNA des humanen IGFBP-3	Dr. Kübler, Kinderklinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
MDCK-IGFBP-3/Transferrin	Madin-Darby Nierenzellen aus dem Hund, stabil transfiziert mit der cDNA des humanen IGFBP-3 und humanen Transferrins	

3.1.13 Puffer, Medien und Lösungen

Medien zur Aufzucht von Bakterien

Die verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Medien für die Aufzucht von Bakterien wurden gemäß den Instruktionen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000), Harvard Medical School, angesetzt.

Zellkulturlösungen

Dulbeccos (DMEM)	GIBCO/BRL, Eggenstein
Optimem-1	GIBCO/BRL, Eggenstein
Lipofectamin 2000	GIBCO/BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	GIBCO/BRL, Eggenstein
PBS für Zellkultur	GIBCO/BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10.000 U)	Seromed/Biochrom, Berlin
Blasticidin	GIBCO/BRL, Eggenstein
Hygromycin B	GIBCO/BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	GIBCO/BRL, Eggenstein

3.1.14 Antikörper

Primärantikörper

Antigen	Spezies	Referenz/Firma	Verdünnung
			WB
Humanes ADAM12-S	K	Dr. Wewer, Dänemark	1:500
Humanes Antithrombin-III	K	Dako, Dänemark	1:1.000
Humanes IGFBP-3	K	UBI, USA	1:1.000
Humanes IGFBP-5	K	UBI, USA	1:1.000
Humaner IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor	K	Körner et al. (1995)	1:500

Humanes Plasminogen	K	Dako, Dänemark	1:100
Humanes Präkallikrein	K	zur Verfügung gestellt von Dr. Müller-Esterl, Frankfurt	1:250
Humanes Transferrin	K	Dako, Dänemark	1:5.000

K: Kaninchen, WB: Westernblot

Sekundärantikörper

Ziege α Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt; Dianova, Hamburg	1:10.000 im WB
Streptavidin-Antikörper, HRP-gekoppelt; Dianova, Hamburg	1:10.000 im Lb

WB: Westernblot, Lb: Ligandblot

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die NaAc-Konzentration auf 0,3 M eingestellt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte 20 min bei -70°C oder über Nacht bei -20°C . Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min und bei 14.000 rpm gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

3.2.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm in einer UV-Küvette gegen A. bidest. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA und 31 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotiden.

3.2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Für Restriktionsspaltungen wurden die vom Hersteller des Enzyms empfohlenen Reaktionsbedingungen in einem Gesamtvolumen von 20 μl beachtet.

3.2.1.4 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Chemokompetente DH5 α -E. coli-Bakterien (100 μ l) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Vektor oder einem Teil des Ligationsansatzes gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und einer weiteren Inkubation für 2 min auf Eis wurden 0,4 ml LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt. Ein Teil des Transformationsansatzes wurde auf eine LB-Agarplatte, die 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit je einer Kolonie wurden 5 ml LB-Medium (inkl. 50 μ g/ml Kanamycin) angeimpft. Diese Vorkultur wurde für die Präparation der Plasmide und zum Anlegen von Glycerinkulturen verwendet.

3.2.1.5 Anlegen einer Glycerinkultur

Vorkulturen mit einer OD₆₀₀ größer als 1 wurden mit 0,25 Volumen 80%igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus einer Glycerinkultur kann direkt eine Bakterienkultur angeimpft werden, aus der dann die Plasmid-DNA isoliert wird.

3.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Puffer P1	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	10 mM	EDTA
Puffer P2	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
Puffer P3	3 M	NaAc pH 4,8

Zur Isolierung kleiner DNA-Mengen wurde das Verfahren nach Birnboim und Doly (1979) angewendet.

Drei ml LB-Medium (inkl. 100 μ g/ml Ampicillin) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 0,3 ml Puffer P1 resuspendiert, durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P2 aufgeschlossen und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,3 ml Puffer P3 renaturiert. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 14.000 rpm sedimentiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 0,66 ml 2-Propanol bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 μ l A. bidest. aufgenommen.

Alternativ zum Verfahren nach Birnboim und Doly (1979) wurde DNA mit Hilfe des Qiaprep Spin Mini Plasmid Kits und des Plasmid Midi Kits gewonnen, wobei das Protokoll des Herstellers befolgt wurde. Die isolierte DNA wurde in Wasser gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.1.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden 1-2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die erforderliche Agarosemenge wurde in TAE-Puffer im Mikrowellenherd aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$). Die Proben wurden mit Ficoll-Marker (0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol; 15 % Ficoll) versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 3-4 V/cm durchgeführt. Durch das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Bande sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf einem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

3.2.1.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des Qiaquick Spin Gelextraction Kits nach Anweisung des Herstellers aus der Agarose extrahiert. Gleichzeitig wurde hierbei die DNA konzentriert.

3.2.1.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Methode, um definierte DNA-Fragmente mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (*Taq*) zu amplifizieren (Saiki et al., 1988).

Die PCR basiert auf drei Schritten, die für jede DNA-Synthese nötig sind:

- Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in Einzelstränge
- Bindung von Oligonukleotid-Primern an beide Einzelstränge (Annealing)
- Synthese der DNA ausgehend von den gebundenen Primern (Extension)

Durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase können mehrere Zyklen dieser Schritte durchlaufen werden, da dieses Enzym auch die extremen Denaturierungstemperaturen von $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohne Aktivitätsverlust übersteht. Das gewünschte Fragment wird exponentiell amplifiziert, da neu synthetisierte DNA-Fragmente im nächsten Zyklus als Template verwendet werden. Faktoren, die den Erfolg der PCR beeinflussen können, sind die

Auswahl und Konzentration der Oligonukleotid-Primer, die Qualität des Templates, die Pufferbedingungen sowie die Zeiten und Temperaturen der Zyklusschritte.

Als Template wurde DNA verwendet, die mittels der DNA-Präparations-Kits der Firma Qiagen isoliert worden war. Das dNTP-Set wurde auf 10 mM je Nukleotid verdünnt. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Thermocycler.

DNA-Template	Primer 3' und 5' (10 pmol/μl)	DNTP (10 mM je Nukleotid)	10 x PCR-Puffer	Taq- Polymerase (5U/μl)	ad H ₂ O
50 ng	je 1 μl	1 μl	5 μl	1 μl	50 μl

Bei jeder PCR wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Es wurde jeweils eine Probe ohne DNA-Template und eine ohne Oligonukleotid-Primer angesetzt.

3.2.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde im zentralen Servicelabor des Universitätskrankenhauses Eppendorf durchgeführt. Es wurde die Taq-Cycle-Sequencing Methode angewandt, die auf der Methode nach (Sanger et al., 1977) beruht. Statt radioaktiv markierter wurden jedoch Fluorochrom-gekoppelte Didesoxy-Nukleotide (Premix von Applied Biosystems) eingesetzt. Die Sequenzierreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

DNA	Premix	Primer	ad H ₂ O
1 μg	8 μl	15 pmol	20 μl

Es wurden 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durchgeführt, wobei folgendes Protokoll befolgt wurde:

Denaturierung	Annealing	Extension
10'' 96 °C	5'' 50 °C	4' 60 °C

Nach Abschluß der Reaktion wurde die Probe auf 4 °C abgekühlt.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Immortalisierte Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2.2 Trypsinierung von Zellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um Trypsininhibitoren aus dem FKS zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin (0,05 % w/v)/EDTA (0,02 % w/v) pro 25 cm²-Flasche für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit einer Pipette vereinzelt und in der gewünschten Dichte ausgesät.

3.2.2.3 Gefrierkonservierung und Revitalisierung von Zellen

Einfriermedium 10 %DMSO / 20 % FKS / 1 % Penicillin / Streptomycin in DMEM

Zur Konservierung wurden in einer 25 cm²-Flasche konfluent gewachsene Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 5 min bei 1.000 x g in der Labofuge sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf Einfrierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst bei –80 °C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Revitalisierung wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank genommen, zunächst für ca. 1 min bei RT angewärmt und anschließend im Ethanolbad bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 3,5 ml kaltes Medium (4 °C) überführt und in der Labofuge 5 min bei 1.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.2.2.4 Transiente und stabile Transfektion von MDCK-Zellen

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von 1×10^4 Zellen auf 35 mm Gewebeschalen ausgesät. Optimem-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) wurde mit 4 µg DNA auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Parallel wurden unter gleichen Bedingungen 4 µl Lipofectamin 2000 mit Optimem ebenfalls auf ein Endvolumen von 200 µl eingestellt. Die beiden Ansätze wurden gemischt und 20 min bei RT inkubiert, bevor sie auf die Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden in Antibiotika-freiem DMEM/FKS für ca. 6-8 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ inkubiert. Für eine transiente Transfektion wurden die Zellen anschließend 24-72 h in

Penicillin/Streptomycin-haltigem DMEM/0,05% BSA inkubiert. Anschließend wurde das so konditionierte Medium gesammelt und die Zellen verworfen.

Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen nach einer 24 h Inkubation mit Antibiotika-freiem Medium in einem Selektionsmedium in 100/20 mm-Gewebekulturschalen inkubiert. Das Selektionsmedium (DMEM/FKS/Pen/Strep) enthielt das Antibiotikum der jeweiligen Resistenzgene von der zu transfizierenden Plasmid-DNA. Nicht-transfizierte Zellen starben ab und es konnten Einzelklone isoliert werden, die in 24-well-Platten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen auf Gewebekulturflaschen gesät und in DMEM/0,05% BSA + Antibiotika inkubiert. Das so konditionierte Medium wurde gesammelt.

3.2.2.5 $[^3\text{H}]$ -Thymidin Einbau

Die Proliferation von Zellen kann durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins in die DNA nachgewiesen werden. Dazu wurden MDCK Zellen (130.000 Zellen/35mm Platte) in 1 ml DMEM mit 1% FKS ausgesät und 9 h bei 37°C inkubiert. Anschließend hungerten die Zellen in 1 ml DMEM (0,1% BSA) in An- und Abwesenheit von 50 nM IGF-I für 14 h. Es folgte die Zugabe von 1 μCi $[^3\text{H}]$ -Thymidins pro Platte für weitere 4 h. Das radioaktive Medium wurde anschließend entfernt und die Zellen dreimal mit 10 mM PBS gewaschen. Nach Trypsinierung wurden die Zellen in eiskalter Trichloressigsäure (10%) suspendiert und auf Glasfaserrundfilter GF 103 (Schleicher und Schuell) transferriert. Die Filter wurden je 5 mal mit Trichloressigsäure (5%) und Ethanol gewaschen und die präzipitierte Radioaktivität in einem β -Szintillationszähler bestimmt.

3.2.2.6 α -[1- ^{14}C]-Methylaminoisobuttersäure-Assay

Die Aminosäure-Aufnahme von Zellen konnte mit Hilfe eines α -[1- ^{14}C]-Methylaminoisobuttersäure-Assays nach (Hammer et al., 2004) untersucht werden. Dabei wird Zellen nach Vorinkubation in Aminosäure-freiem Medium das radioaktiv markierte, nicht metabolisierbare Aminosäure-Analogon α -[1- ^{14}C]-Methylaminoisobuttersäure zur Aufnahme angeboten. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wird die aufgenommene Radioaktivität im β -Szintillationszähler bestimmt. Als Stimulanz wurde IGF-I (50 nM) eingesetzt.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität

Substratpuffer	10 mM	para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
	100 mM	Natrium-Citrat pH 4,6
	0,04 %	NaN ₃
	0,2 %	BSA

Stop-Puffer 0,4 M Glycin/NaOH pH 4,6

Pro Ansatz wurden zwischen 5-20 μ l der zu messenden Probe eingesetzt und mit A. dest. auf ein Volumen von 50 μ l gebracht. Nach dem Zufügen von 50 μ l Substratpuffer folgte eine Inkubation von 30 bis 60 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Stop-Puffer beendet und die optische Dichte bei 405 nm gemessen. Zur Quantifizierung der β -Hexosaminidase-Aktivität wurde der molare Extinktionskoeffizient von 18500 berücksichtigt.

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden in Doppelbestimmungen nach dem Protokoll von Bradford (1976) gemessen.

3.2.3.3 Ethanol-Fällung von Proteinen

Proteine wurden aus 300 μ l konditioniertem Medium durch Zusatz von eiskaltem Ethanol in einer Endkonzentration von 70% für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei 14 000 rpm zentrifugiert und die präzipitierten Proteine bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden nach ihrer molekularen Masse durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in modifizierter Form nach Laemmli, 1970 in einem diskontinuierlichen Puffersystem getrennt. Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele variierte von 8-15 %. Die Auftrennung erfolgte bei RT und 50 mA/Gel für ca.3 h.

3.2.3.5 Zwei-dimensionale-Gelelektrophorese

Die zwei-dimensionale (2D)-Gelelektrophorese trennt Proteine in der ersten Dimension aufgrund ihres isoelektrischen Punktes (pI) in einem immobilisierten pH-Gradienten auf. Danach erfolgt die Separation der zuvor mit SDS beladenen Proteine aufgrund ihrer molekularen Masse durch SDS-PAGE (zweite Dimension).

Rehydrierungspuffer	8 M	Harnstoff
	2 %	Chaps
	0,5 %	IPG-Puffer pH 3-10 (Amersham Pharmacia)
10 x Auftragspuffer	5 %	IPG-Puffer pH 3-10 (Amersham Pharmacia)
	20 %	Chaps
Äquilibrierungspuffer	50 mM	Tris/HCl pH 8,8
	6 M	Harnstoff
	30 %	Glycerin
	2 %	SDS

Die getrockneten Streifen mit dem immobilisierten pH-Gradienten (pH 3-10; 11 cm, Amersham Pharmacia) für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden über 15 h in 200 µl Rehydrierungspuffer inkubiert. Die zu trennenden Proteine wurden mit 48 mg Harnstoff und 10 µl Auftragspuffer in einem Gesamtvolumen von 100 µl gelöst und durch „cup-loading“ auf die IEF-Streifen aufgetragen. Die pH-Streifen waren jederzeit mit Cover Fluid überschichtet, um das Ausfallen des Harnstoffs zu verhindern. In einer Multiphore II-Kammer wurden die Proteine im IEF-Streifen durch Applikation von 20kVh in drei Stufen (1 Vh bei 300 V, 2800 Vh bei 3500 V und 17,2 kVh bei 3500 V) getrennt. Nach der IEF wurden die Proteine im IEF-Streifen 15 min in Äquilibrierungspuffer mit SDS beladen und somit für die zweite Dimension, der Auftrennung nach Masse, vorbereitet. Der Gelstreifen wurde dazu auf ein 12,5% SDS-PAGE-Gel gelegt.

3.2.3.6 Färbung von Proteinen

Anfärbung mit Coomassie-Blue

Die Anfärbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blue (0,05 %) wurde gemäß den Anleitungen der „Current Protocols in Molecular Biology“ (2000), Harvard Medical School durchgeführt.

Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in Gelen erfolgte nach dem Protokoll von Nesterenko et al. (1994).

3.2.3.7 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen erfolgte durch MS-MALDI-TOF. Die Proteine wurden mit Coomassie oder Silber angefärbt und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Analyse erfolgte durch das Biomedicum, Helsinki, Finnland unter Verwendung des Bruker Daltonics Autoflex Massenspektrometers (Bruker Daltonics, Bremen). Für die Suche des Proteins wurden die Datenbanken NCBI nr, Swiss prot und MSDB benutzt.

3.2.3.8 Westernblot Analyse

Transferpuffer 1	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 %	Methanol

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Der Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran geht auf Towbin et al. (1979) zurück. Der Elektrotransfer von Proteinen aus 1 mm dicken Gelen erfolgte in einer großen Naßblott-Kammer (TE62X TransphorII, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) für 90 min bei 900 mA und 4° C, bei 0,75 mm dicken Minigelen bei 400 mA für 1 h in einer Minikammer (SE 200, Hoefer).

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (10 mM PBS/ 5 % Milchpulver/ 0,05 % Tween-20) inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte für 1 h bei RT. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 5 min mit Waschpuffer (10 mM PBS/ 0,05 % Tween-20) gewaschen und für 1 h bei RT mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem

Waschen erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, IL, USA).

3.2.3.9 Ligandblot mit biotinyliertem IGF-II (bIGF-II)

Bei einem Ligandblot wird das nachzuweisende Protein, anders als beim Westernblot, nicht mit einem Antikörper, sondern mit einem bestimmten Liganden des Proteins detektiert. Auch hier wurde die Nitrocellulose nach dem Elektrotransfer der Proteine zunächst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C in Blocklösung (10 mM PBS/ 1 % BSA/ 0,05 % Tween-20) inkubiert, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation mit biotinyliertem IGF-II (1:7500 in Blocklösung) bei RT. Anschließend wurde die Nitrocellulose für 1 x 15 min und 4 x 5 min gewaschen und mit Streptavidin-HRP (1:10000 in Blocklösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Nitrocellulose erfolgte der Nachweis ebenfalls durch „enhanced chemoluminescence“ (ECL; SuperSignal, Pierce Rockford, USA).

3.2.3.10 Iodierung von Proteinen

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde die Methode nach Parker und Strominger (1983) angewendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Oxidation von Na[¹²⁵I] in Gegenwart von Proteinmolekülen, in deren Tyrosinreste [¹²⁵I] eingebaut wird.

Elutionspuffer	0,1 %	KI
	0,05 %	BSA in 10 mM PBS pH 7,4
Boratpuffer	20 mM	Borat pH 8,0
Iodierungsansatz	1 µg	Protein
	100 µCi	Na[¹²⁵ I]

Vor Iodierungsbeginn wurde eine 9 ml PD-10 Fertigsäule mit Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit 30 ml Elutionspuffer äquilibriert. Der Iodierungsansatz wurde in 60 µl Boratpuffer für 2 min auf Eis inkubiert und dann in ein mit Iodogen beschichtetes Röhrchen (Pierce Rockford, USA) überführt. Dieses wurde 8 min auf Eis rotiert, und die Reaktion wurde durch Überführung des Ansatzes in ein unbeschichtetes Röhrchen gestoppt. Das Iodogenröhrchen wurde mit 140 µl Boratpuffer nachgespült und das Volumen des Ansatzes durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer auf 500 µl erhöht. Der Reaktionsansatz wurde auf die PD-10 Fertigsäule zur Entfernung des nicht umgesetzten Na-[¹²⁵I] aufgetragen und in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Von den 10 Fraktionen wurde je

1 µl im Gammastrahlenzähler gemessen. Fraktionen, die iodiertes Protein enthielten, wurden gepoolt und bei 4 °C gelagert.

3.2.3.11 [¹²⁵I]-IGFBP-3 Overlayblot

Bei einem Overlayblot verwendet man ähnlich wie beim Ligandblot einen radioaktiv markierten Liganden des zu detektierenden Proteins. Die Proteine, die zuvor durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulosemembran transferiert wurden, wurden durch ihre spezifische Bindung an [¹²⁵I]-IGFBP-3 detektiert. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran in Blockpuffer (10 mM PBS/ 1% BSA/ 0,1 % Tween-20) über Nacht bei 4 °C und anschließend 2 h bei RT mit [¹²⁵I]-IGFBP-3 (100.000 cpm/ml) in Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulosemembran 4 x 10 min mit Waschpuffer (10 mM PBS/ 0,1 % Tween-20) gewaschen, getrocknet und durch Autoradiographie analysiert.

3.2.3.12 Quervernetzung von Proteinen

Um die spezifische Bindung eines Proteins mit einem bestimmten Liganden nachzuweisen, können die beiden Bindungspartner durch eine Quervernetzung kovalent gebunden werden. Dabei wurde [¹²⁵I]-IGF-II als Ligand (ca. 150.000 cpm) mit Plasminogenproben in 10 mM PBS für 1 h vorinkubiert. Nach Zugabe des Quervernetzers Disuccinimidylsuberat (DSS, Pierce, 0.5 mM) wurde die Probe für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend nach Beendigung der Reaktion solubilisiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie ausgewertet.

3.2.3.13 Proteolyse von [¹²⁵I]-IGFBPs

Der Nachweis von IGFBP-Proteaseaktivität erfolgte durch Inkubation einer zu untersuchenden Probe mit radioaktiv markierten IGFBPs bei 37°C. Die proteolytische Aktivität wird über die Bildung von Abbaufragmenten und über die Abnahme des intakten IGFBPs nachgewiesen. Die Proben wurden in TNC-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5mM CaCl₂) mit ca. 20.000 cpm [¹²⁵I]-IGFBP bei 37°C für 16 h inkubiert. Zur Klassifizierung und Charakterisierung der Protease in einer Probe wurden Inhibitoren zum Inkubationsansatz hinzugegeben. Nach Zugabe von nicht-reduzierendem Probenpuffer wurden die Ansätze für 5 min bei 95°C gekocht, über ein 15% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

3.2.3.14 [¹²⁵I]-IGFBP-3-Substratzymographie

Probenpuffer (3x)	0,25 M	Tris/HCl pH 6,8
	10 %	SDS
	4 %	Saccharose

Bei der Zymographie wird das radioaktiv markierte Substrat proteolytisch aktiver Proteine in ein SDS-Gel einpolymerisiert. Nach der Elektrophorese wird das Gel gewaschen, um SDS-Moleküle zu entfernen. Dadurch nehmen die Proteine wieder ihre native Struktur an und können ihre proteolytische Wirkung im Gel entfalten. Nach einer Inkubation kann die Aktivität durch Negativ-Autoradiographie sichtbar gemacht werden und somit das Molekulargewicht der Protease bestimmt werden (Heussen und Dowdle, 1980).

In die Acrylamidlösung eines 10% SDS-Gels wurden ca. 500.000 cpm [¹²⁵I]-IGFBP-3 einpolymerisiert (Fowlkes et al., 1994b; Parker et al., 1995; Thraikill et al., 1995). Vor dem Auftrag der Proben wurde am Gel eine Spannung von 80 V für 15 min angelegt, um freies [¹²⁵I] zu entfernen. Die Proben wurden im Probenpuffer ohne Kochen auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 2 x 20 min in TX-100 (2,5 %) und 1 x 20 min in A. bidest gewaschen und in TNC-Puffer (siehe 3.2.3.13) für 16 h bei 37°C inkubiert, getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

3.2.3.15 Gelfiltration

Zur weiteren Auftrennung des Schwangerenserums wurde die Pool I-Fraktion auf eine Gelfiltrationssäule (Sephacryl S-300 HR, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgetragen.

Bettvolumen:	120 ml
Auftragspuffer.	50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 4 mM CaCl ₂
Elutionspuffer.	50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150mM NaCl, 4 mM CaCl ₂
Flußrate:	0,4 ml/min

Die Aufreinigung erfolgte an einer Äkta Prime-Anlage, der Auftrag über eine 2 ml Probenschleife. Die Elutionsfraktionen hatten ein Volumen von 2 ml, die Proteinkonzentration wurde kontinuierlich über ein Durchflußphotometer bei OD₂₈₀ bestimmt und mittels eines Schreibers aufgezeichnet.

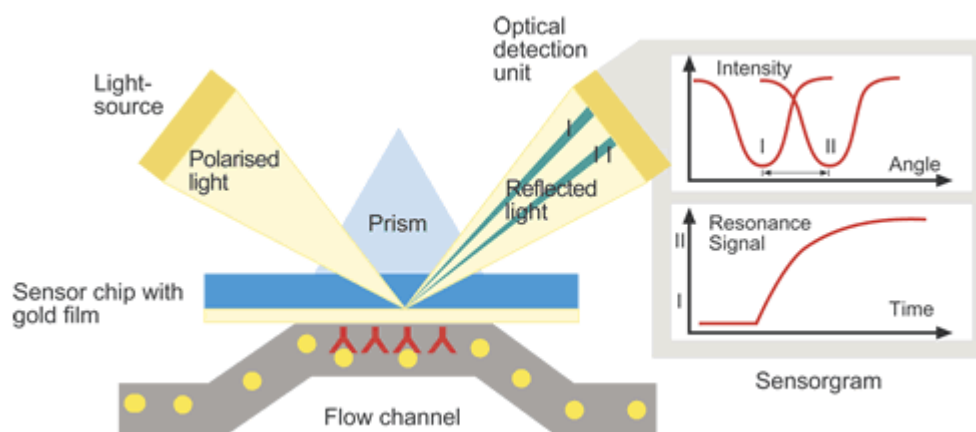
3.2.3.16 ConA Sepharose-Säule

Zur Abtrennung glykosylierter Proteine wurde die Pool I-Fraktion auf eine Concanavalin A-(Con A)-Sepharose-Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml aufgegeben.

Nach Äquilibration der Säule mit Auftragspuffer (10 mM PBS) wurden die Proben über Nacht auf dem Drehrad inkubiert, ungebundenes Material abgenommen und die Säule mit Auftragspuffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte mit 0,1 M, 0,2 M und 0,5 M α -Methylmannopyranosid-Puffer.

3.2.3.17 Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektrometrie

Der Biosensor BIAcore 3000 (BIAcore AB, Schweden) verwendet das optische Phänomen der Oberflächenplasmon-Resonanz (SPR) um Interaktionen zwischen Biomolekülen zu untersuchen. Die Detektion beruht auf Veränderungen in der Massenkonzentration von Makromolekülen auf der Oberfläche eines Sensorchips, was zu einer Ablenkung eines Lichtstrahls führt. Das Ausmaß der Ablenkung hängt unter anderem vom Refraktionsindex des Mediums ab, welches auf die Oberfläche des Sensorchips trifft. Der Refraktionsindex korreliert wiederum mit der Konzentration von gelösten Molekülen im Medium, die sich durch Interaktion der zu untersuchenden Biomoleküle verändert. Eines der zu untersuchenden Biomoleküle, der Ligand, wird auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert. Das andere Biomolekül, der Analyt, wird in einem kontinuierlichen Fluß über die Sensoroberfläche geleitet. Die Auswertung der Messungen erfolgt in Form eines Sensorgramms, in welchem die Veränderungen des Resonanzwinkels des reflektierten Lichts gegen die Zeit aufgetragen ist. Die Veränderung des Resonanzwinkels wird durch Resonanzeinheiten (RU) dargestellt. Eine Veränderung um 1000 RU korrespondiert mit einer Zunahme der Oberflächenkonzentration auf dem Sensorchip um ca. 1 ng/mm².



Quelle: Biacore 2004

Abb. 3: Schematische Darstellung des BIAcore Gerätes.

Alle Materialien und Lösungen wurden von BIAcore AB, Schweden bezogen. Der Sensorchip (CM5) besteht aus einem Glasträger, der mit einem Goldfilm (Dicke: 50 nm)

beschichtet ist. An diesen Goldfilm ist eine Dextran-Oberflächenmatrix kovalent gebunden. Die Aktivierung des Sensorchips erfolgte über N-hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethyl-amino-propyl)-carbodiimid (EDC). Die Kopplung der Liganden erfolgte in einem Immobilisierungspuffer (10 mM Na-Acetat, pH 5,0) bei einer Ligandenkonzentration von 50 µg/ml und einem Fluß von 5 µl/min bis zu ca. 500 gemessenen RUs auf dem Sensorchip. Die Deaktivierung des Sensorchips erfolgte durch Zugabe von 1 M Ethanolaminhydrochlorid, pH 8,5. Die Analyten wurden in HBS-P-Puffer (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005%, Polysorbate 20 (v/v), entgast, filtriert) gelöst. Die Messungen erfolgten mit einer Flußrate von 10 µl/min und einem Einspritzvolumen von 75 µl. Die Analyten wurden in folgenden Konzentrationen gemessen: 50, 70, 90, 125, 200, 350 nM. Der Sensorchip wurde nach jeder Messung 3 x 1 min mit Triton X-100, 0,1%ig regeneriert.

Die Berechnung der Assoziations- (k_a), Dissoziations- (k_d) und Gleichgewichtskonstanten (K_D) erfolgte mit der BIAEvaluation® Software.

4 ERGEBNISSE

4.1 IGF-bindende Proteine im Plasma

Cohn Fraktion IV aus humanem Plasma wird zur Präparation von IGFBP-3 mittels IGF-II Affinitätschromatographie nach einem Standardverfahren verwendet (Blum et al., 1990). Gebundene Proteine wurden mit Hilfe eines Triethylammoniumpuffers eluiert. Das Eluat der IGF-II-Säule wurde von Dr. Blum, Eli Lilly, Bad Homburg zur Verfügung gestellt und auf weitere IGF-bindende Proteine untersucht. Dazu wurde das Eluat mittels reversed phase-hochauflösender Flüssigkeits-Chromatographie (high performance liquid chromatography, RP-HPLC) über eine C18-Säule weiter aufgereinigt. Gebundene Polypeptide wurden mit einem ansteigenden Acetonitril (ACN)-Gradienten eluiert (Gesamtanzahl der Fraktionen: 72) und die Fraktionen auf [125 I]-IGF-I Bindungskapazität und IGFBP-3 Immunoreaktivität (über einen „radio immunosorbent assay“, RIA) getestet.

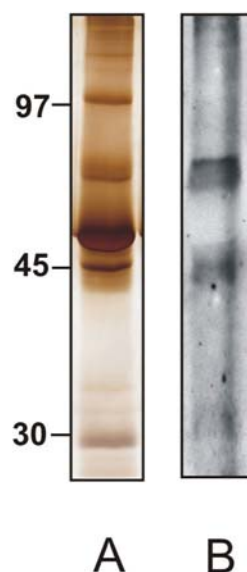


Abb. 4: Analyse einer Plasmaproteinfraktion, die von einer IGF-II Affinitätssäule eluierte. Cohn Fraktion IV wurde mittels IGF-II Affinitätschromatographie aufgetrennt und gebundene Proteine durch SDS-PAGE (10% Acrylamid), (A) Silberfärbung und (B) bIGF-II Ligandblot analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtstandardmarker sind gekennzeichnet.

Das Eluat der IGF-II Affinitätschromatographiesäule wurde zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Es konnten fünf prominente Proteinbanden mit molekularen Massen von 100, 70, 64, 45 und 29/30 kDa (Abb. 4A) nachgewiesen werden. bIGF-II Ligandblotting belegt die Existenz von IGF-II

bindenden Proteinen im Eluat mit molaren Masse von 70, 45, 43 und 30 kDa (Abb. 4B). Das Elutionsprofil der Plasmaproteinfraktion von der RP-HPLC ist in Abb. 5A dargestellt. Gebundene Polypeptide eluierten mit ansteigendem Acetonitril-Gradienten. Die Fraktionen 42 bis 45, die bei einer ACN Konzentration von 22,5% eluierten, beinhalten den Hauptanteil des immunoreaktiven IGFBP-3 (in Abb. 5A als grau unterlegte Fraktionen dargestellt).

Die Analyse der proteinhaltigen Fraktionen 36 bis 57 nach SDS-PAGE (10% Acrylamid) und Silberfärbung ergab vier distinkte Proteinbanden: Ein Polypeptide mit einer Masse von ca. 30 kDa in den Fraktionen 36/37 eluierte mit einer ACN Konzentration von 19,3% (Abb. 5B, Nr. 1), eine Proteindoppelbande von 43/45 kDa in Fraktion 46 (24% Acetonitril, Abb. 5B, Nr. 2), eine Proteinbande bei 92 kDa in den Fraktionen 50–53 (27% Acetonitril, Abb. 5B, Nr. 4) und eine Bande bei 70 kDa in den Fraktionen 53 – 57 (30% Acetonitril, Abb. 5B, Nr. 3). Es ist hierbei unklar, ob das 100 kDa Protein aus der Eluatfraktion (Abb. 4A) während der RP-HPLC Aufreinigung teilweise zum 92 kDa Protein (Abb. 5B, Nr. 4) prozessiert oder ob sich die elektrophoretische Mobilität des 100 kDa Proteins nach der Lösung in ACN verändert.

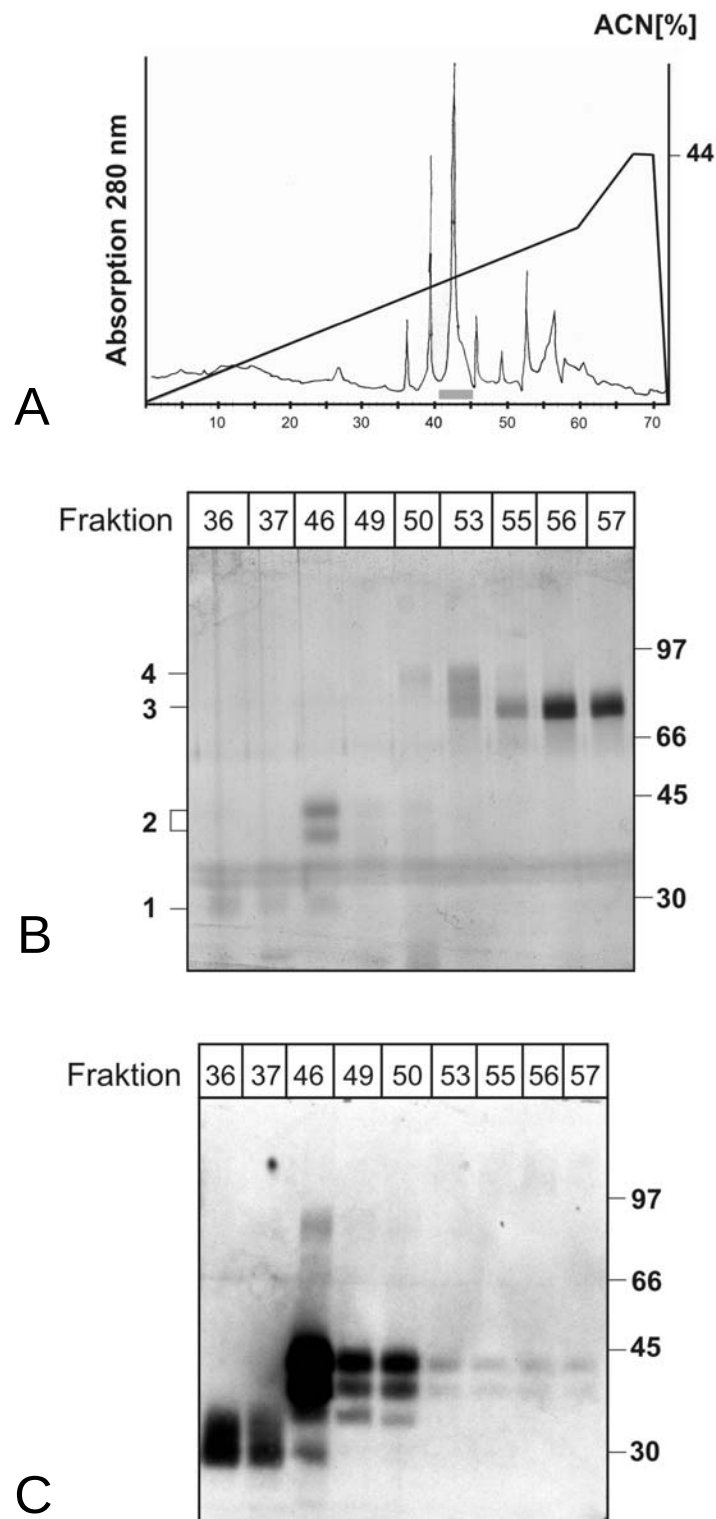


Abb. 5: Identifizierung von Proteinen, die von einer IGF-II Affinitätssäule eluierten. A Die gebundenen Proteine von der IGF-II Affinitätssäule wurden über eine C18 RP-HPLC-Säule weiter aufgetrennt und mit einem ansteigendem ACN Gradienten in 72 Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden auf das Vorkommen von IGFBP-3 getestet, welches sich hauptsächlich in den Fraktionen 42-45 (grauer Kasten) findet. Aliquots der RP-HPLC Fraktionen (ca. 0,5 µg Protein) wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid), Silberfärbung (B) und bIGF-II Ligandblot (C) analysiert. Die Positionen der Molekulargewichtstandardproteine sind gekennzeichnet. Die Proteinbanden sind von 1-4 nummeriert.

Die silbergefärbten Proteinbanden 1-4 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und über Massenspektrometrie identifiziert (siehe 3.2.3.7). Die Proteine 1, 2 und 3 (Abb. 5B) sind als IGFBP-5, IGFBP-3 und Transferrin identifiziert worden (Tabelle 1). Die erhaltenen Massen für das 92 kDa Protein (Nummer 4) konnten keinem spezifischen Protein zugeordnet werden.

Tabelle 1: Massenanalyse der silbergefärbten Proteine aus den HPLC-Fraktionen.

Nummer	Bestimmte Masse (M)	Peptidsequenz	Aminosäure	Peptid
1	915.542	IISAPEMR	177-184	IGFBP-5
	928.425	ASPRMVPR	205-212	
	931.545	IISAPEMR	177-184	
	1089.497	QESEQGPCR	185-193	
	1106.580	AVYLPNCDR	213-221	
	1104.599	HMEASLQKLK	195-204	
	1200.600	HMEASLQKLK	195-204	
	1254.695	FVGGAENTAHPR	165-176	
	1356.720	RHMEASLQHLK	194-204	
	1641.937	QDEEKPLHALHGR	84-97	
2	864.569	FHPLHSK	65-71	IGFBP-3
	944.616	FLNVLSPR	225-232	
	1010.465	ETEGYPCR	207-214	
	1038.520	GVHIPNCDK	234-242	
	1070.472	GFCWCVDK	260-267	
	1166.577	GVHIPNCDKK	234-243	
	1166.577	RETEYGPCR	206-214	
	1166.577	ETEGYPCRR	207-215	
	1223.633	YGQPLPGYTTK	268-278	
3	1322.792	DSAHGFLKVPPR	316-327	Transferrin
	1628.902	EDPQTFYYAVAVVK	108-121	
	1880.922	ADRDQYELLCLDNTR	237-251	
	2170.042	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	144-162	

Im nächsten Schritt wurden die Fraktionen 36-57 mittels bIGF-II Ligandblot analysiert. Es konnten IGF-bindende Polypeptide mit einer molekularen Masse von 30/33 kDa, 34 und 43/45 kDa in den Fraktionen 36/37 und 46 bis 50 detektiert werden (Abb. 5C). Die 43/45 kDa Proteindoppelbande ist typisch für IGFBP-3. Dieses Ergebnis konnte durch anschließende Westernblot Analysen bestätigt werden (Abb. 6). Bei dem 34 kDa Protein in den Fraktionen 46 bis 50, sowie bei dem 29 kDa Protein in Fraktion 46, handelt es sich vermutlich um proteolytische Spaltprodukte des IGFBP-3. Bei der gewählten ECL

Expositionszeit von 1 min für die Entwicklung des Ligandblots zeigen das 92 kDa und das 70 kDa Polypeptid keine IGF-Bindung. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Proteine entweder nur eine sehr geringe Affinität zu IGF-II besitzen oder über Interaktion mit IGFBPs oder anderen IGF-bindenden Proteinen an die IGF-II Affinitätssäule gebunden haben.

Um die Ergebnisse der Massenanalyse zu bestätigen, wurden Westernblot Experimente durchgeführt, die in Abb. 6 dargestellt sind. Die Fraktion 36 enthält ein ca. 32 kDa IGFBP-5 immunreaktives Polypeptid, dessen elektrophoretische Mobilität etwas langsamer ist als die des aufgereinigten IGFBP-5-Standards. Die immunreaktive Proteindoppelbande in Fraktion 42 konnte als IGFBP-3 identifiziert werden. Der Westernblot zeigt, dass in dieser Fraktion ebenfalls das natürlich vorkommende 29 kDa Fragment des IGFBP-3 enthalten ist. Das 70 kDa Protein konnte als Transferrin bestätigt werden. Da in der Literatur bekannt ist, daß sowohl IGFBP-3 als auch IGFBP-5 an Plasminogen (molekulare Masse von ca. 92-97 kDa) binden können (Campbell und Andress, 1997; Campbell et al., 1998), wurde die Fraktion 53 auf Plasminogen Immunoreaktivität getestet. Die Fraktion enthält ein 92 kDa Plasminogen-immunreaktives Polypeptid, das eine leicht höhere molekulare Masse aufweist als der aufgereinigte Plasminogenstandard (Abb. 6).

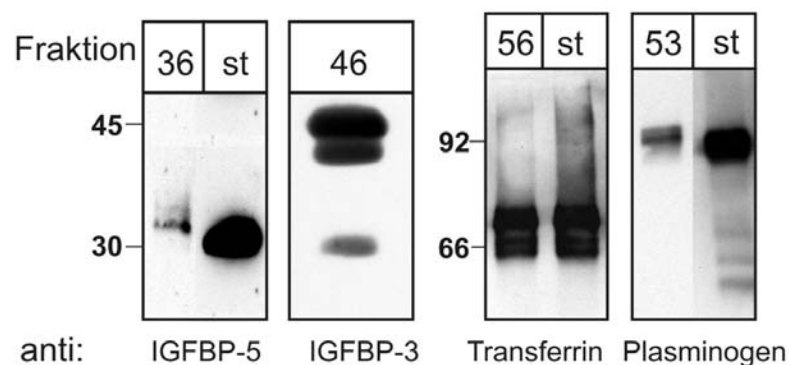


Abb. 6: Westernblot Analyse ausgesuchter HPLC Fraktionen. Aliquots der Fraktionen 36, 46, 56 und 53 wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen IGFBP-5, IGFBP-3, Transferrin und Plasminogen getestet. Als Proteinstandard (st) wurden rekombinantes humanes IGFBP-5 (200 ng), Transferrin (100 ng) und Plasminogen (50 ng) aufgetragen. Die Positionen der Molekulargewichtstandardproteine sind gekennzeichnet.

Zusätzlich wurden weitere Westernblot Analysen des Eluates der IGF-II Affinitätssäule durchgeführt, von denen aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu erwarten war, daß die entsprechenden Proteine an IGF-II oder über IGFBP-3 an die Säule binden könnten (Durham et al., 1999; Nissley et al., 1991). Es zeigte sich, daß neben IGFBP-3 und -5

Antithrombin - III, Präkallikrein und der lösliche ca. 175 kDa IGF-II/M6P-Rezeptor an die IGF-II Matrix binden konnten (Abb. 7).

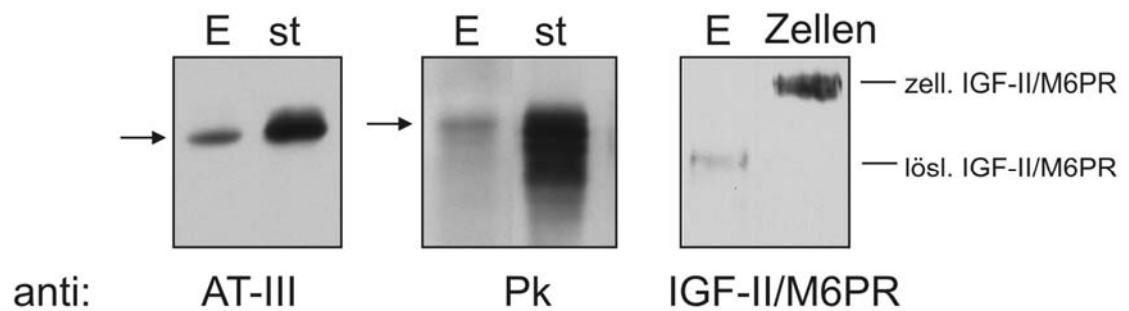


Abb. 7: Westernblot Analyse der Eluatfraktion der IGF-II Affinitätssäule. Aliquots der Eluat Fraktion der IGF-II Affinitätssäule (E) wurden auf das Vorkommen von Antithrombin-III (AT-III), Präkallikrein (Pk) und auf den löslichen IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (lösl. IGF-II/M6PR) getestet. Als Proteinstandard (st) wurden 0,5 µg rekombinantes AT-III und 0,5 µg Pk und ein Extrakt von HeLa-Zellen, die den intakten zellulären integralen 300 kDa IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (zell. IGF-II/M6PR) enthalten, verwendet.

4.2 BIAcore Bindungsstudien

Aus den vorherigen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Proteine Transferrin und Plasminogen, die in den HPLC Fraktionen identifiziert werden konnten, nicht oder nur gering an IGF-II binden. Dennoch eluierten sie von der IGF-II Matrix.

Um die Affinitäten von Plasminogen und Transferrin für die Bindung an IGF-II und IGFBP-3, als das am häufigsten im Serum vorliegende IGFBP, zu bestimmen, wurden Bindungsstudien mit Hilfe der Oberflächenplasmon-Resonanz-Spektrometrie durchgeführt. Es wurden die Gleichgewichtskonstante K_D , sowie die Assoziations- und Dissoziationskonstanten k_a und k_d bestimmt. Dazu wurden jeweils IGF-II und IGFBP-3 als Liganden auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert und Transferrin, Plasminogen, IGFBP-3 und Mischungen der Proteine als Analyten in Lösung über die Liganden gegeben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Bindung von IGFBP-3, Plasminogen und Transferrin an IGF-II und IGFBP-3.

immobilisierter Ligand Analyt	IGF-II			IGFBP-3		
	K_D nM	ka $\times 10^3$ 1/Ms	kd $\times 10^{-3}$ 1/s	K_D nM	ka $\times 10^3$ 1/Ms	kd $\times 10^{-3}$ 1/s
IGFBP-3 ^a	3.6	390	1.5	-	-	-
Plasminogen ^b	5.0	220	1.1	1.3	990	1.3
Plasminogen + IGFBP-3	5.6	180	1.0	-	-	-
Transferrin ^c	976.0	2	2.1	70.0	46	3.2
Plasminogen + Transferrin	37.0	88	3.2	1.0	2900	2.9
Plasminogen + Transferrin + IGFBP-3	31.0	66	2.0	-	-	-

^a nicht-glycosyliertes humanes rekombinantes Protein

^{b,c} humanes rekombinantes Protein

Die Bindung von Transferrin an die IGF-II Sensorchipoberfläche erfolgte mit geringer Affinität ($K_D = 976$ nM). Unter den gleichen Bedingungen zeigt Plasminogen hingegen eine hohe Affinität zu IGF-II mit einer K_D von 5,0 nM, welche sich mit der hochaffinen Bindung von IGFBP-3 an IGF-II vergleichen lässt ($K_D = 3,6$ nM). Bei einer Kombination von Plasminogen und IGFBP-3 lässt sich keine Veränderung in der K_D feststellen. Die Affinität von Plasminogen zu IGF-II in Kombination mit Transferrin war im Vergleich zu Plasminogen allein um das ca. 7-fache erniedrigt ($K_D = 37$ nM). Dies ist auf eine verminderte Assoziationsrate (88 statt 220×10^3 1/Ms) zurückzuführen. Bei einer Kombination von IGFBP-3 mit Plasminogen und Transferrin konnte kein weiterer Effekt auf die IGF-II Bindung der Proteine festgestellt werden ($K_D = 31$ nM).

Wenn IGFBP-3 auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert war, konnte eine hohe Bindungsaffinität von Plasminogen ($K_D = 1,3$ nM) gemessen werden. Die Affinität ist ungefähr 54-fach stärker als die Bindung von Transferrin an IGFBP-3 ($K_D = 70$ nM). Die Kombination von Transferrin und Plasminogen resultierte in einer Bindungskonstante, die vergleichbar ist mit der K_D von Plasminogen allein (1,0 bzw. 1,3 nM). Die Bindungskonstante von Transferrin und Plasminogen ist auch eindeutig höher als die Bindungskonstante von Transferrin allein (1,0 bzw. 70 nM). Der starke Anstieg der Assoziationskonstante des Proteingemisches aus Plasminogen und Transferrin im Vergleich zu den einzelnen Proteinen (2900×10^3 1/Ms gegenüber 990×10^3 1/Ms für Plasminogen und 46×10^3 1/Ms für Transferrin) deutet eher auf einen modulatorischen Effekt einer der Proteinkomponenten hin als auf eine preferentielle Bindung von Plasminogen an IGFBP-3.

Um die Bindung von Plasminogen an IGF-II zu verifizieren, wurden Ligandblot und Quervernetzungsexperimente mit [125 I]-IGF-II durchgeführt. Im bIGF-II-Ligandblot behielt Plasminogen seine IGF-II bindende Fähigkeit bei (Abb. 8A). In Lösung und bei Anwesenheit des „crosslinkers“ DSS konnte Plasminogen an [125 I]-IGF-II quervernetzt werden (Abb. 8B). Nach densitometrischer Auswertung der Banden konnte gezeigt werden, daß das [125 I]-IGF-II mit einem 7-fachen Überschuß an nicht-markiertem IGF-II um ca. 76% und mit IGF-I um etwa 32% verdrängt werden konnte. Die Bindung von Plasminogen an IGF-II ist daher spezifisch.

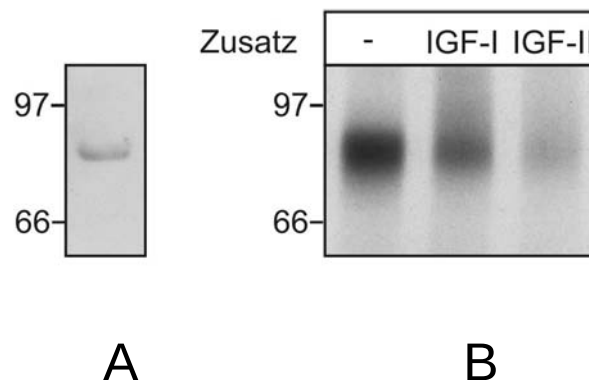


Abb. 8: IGF-II Bindung an Plasminogen. A Aufgereinigtes Plasminogen (1 μ g) wurde durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und durch bIGF-II Ligandblot analysiert. B Quervernetzung von Plasminogen (1 μ g) mit [125 I]-IGF-II (ca. 100.000 cpm) durch DSS (0.5 mM) in An- und Abwesenheit von unmarkiertem IGF-I oder IGF-II (3 μ M). Anschließend folgte eine Auftrennung des Reaktionsgemisches durch SDS-PAGE (8% Acrylamid) und Autoradiographie.

4.3 IGFBP Proteaseaktivität im IGF-II Eluat

Um zu überprüfen, ob IGFBP Proteasen über die IGF-II-Affinitätschromatographiesäule koeluierten, wurde das Eluat auf proteolytische Aktivität gegenüber [125 I]-IGFBP-3 getestet. Dazu wurde nicht-glykosyliertes [125 I]-IGFBP-3 mit einer molaren Masse von 30 kDa mit ansteigenden Konzentrationen des Eluats (E1-E3) für 16 h bei 37°C inkubiert, das Reaktionsgemisch durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Fragmentierung durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 9). Mit ansteigender Konzentration des Eluats nimmt die Menge an intaktem [125 I]-IGFBP-3 ab und die Menge der [125 I]-IGFBP-3 Fragmente nimmt zu. Bei der Spaltung entstehen hauptsächlich Fragmente von 14 und 21 kDa.

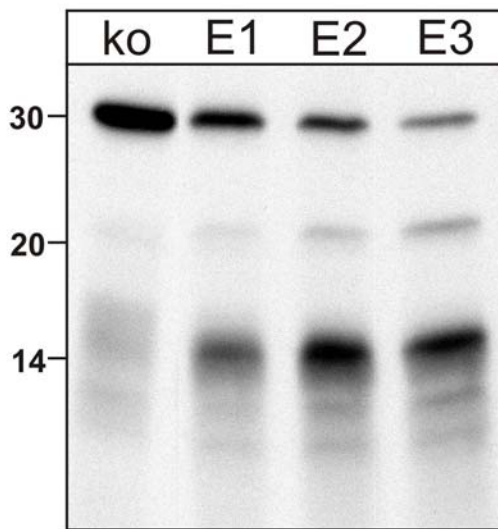


Abb. 9: IGFBP-3 Proteaseaktivität im Eluat der IGF-II Affinitätssäule. Ansteigende Mengen der eluierten Proteinfraction (E1= 0,1 µl; E2=0,5 µl; E3=1,0 µl) wurden mit [125 I] IGFBP-3 (20.000 cpm) für 16 h bei 37° C inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE (15% Acrylamid) und Autoradiographie ausgewertet. Als Kontrolle (ko) wurde [125 I] IGFBP-3 in proteasefreiem Puffer unter identischen Bedingungen inkubiert.

Die IGFBP-3 Proteaseaktivität war auch nach der Aufreinigung des Eluats durch die RP-HPLC nachweisbar. Die höchste IGFBP-3 proteolytische Aktivität war in der Fraktion 53 detektierbar (Abb. 10), die zur Bildung von Fragmenten der Größen 21, 17 und hauptsächlich 14 kDa führte.

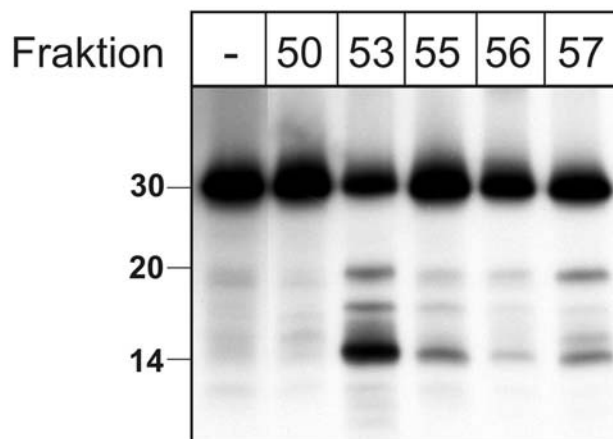


Abb. 10: Analyse der [125 I]-IGFBP-3 Proteaseaktivität nach RP-HPLC. Aliquots der RP-HPLC Fraktionen (hier gezeigt für Fraktionen 50-57) wurden mit [125 I]-IGFBP-3 (20.000 cpm) für 16 h bei 37° C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (15% Acrylamid) und Autoradiographie analysiert. Als Kontrolle (-) wurde [125 I]-IGFBP-3 in proteasefreiem Puffer unter identischen Bedingungen inkubiert.

Die Fraktion 53 enthielt ebenfalls proteolytische Aktivität gegenüber [125 I]-IGFBP-2 als Substrat, nicht aber gegenüber [125 I]-IGFBP-4 (nicht gezeigt).

Um die IGFBP-3 Protease in der Fraktion 53 genauer zu charakterisieren, wurden die Effekte verschiedener Protease-Inhibitoren getestet.

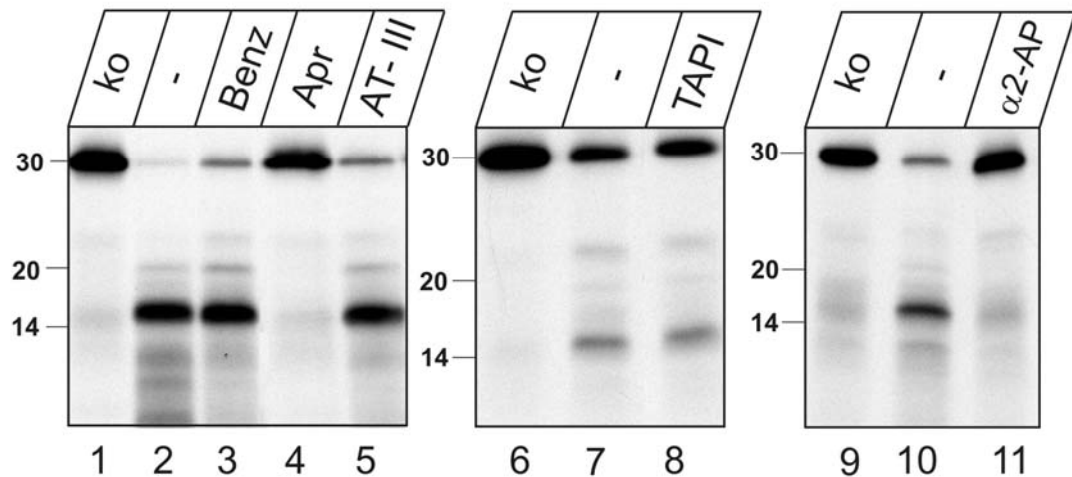


Abb. 11: Effekte von Proteaseinhibitoren auf die IGFBP-3 Proteaseaktivität in der RP-HPLC Fraktion 53. Aliquots der RP-HPLC Fraktion 53 wurden mit [125 I]-IGFBP-3 (20.000 cpm) für 16 h bei 37° C inkubiert. Als Kontrolle (ko) wurde [125 I]-IGFBP-3 in Abwesenheit der Fraktion mit Puffer inkubiert (Bahn 1, 6 und 9). Die Proben wurden in Anwesenheit (Bahn 3-5, 8 und 11) und Abwesenheit (-; Bahn 2, 7 und 10) der Proteaseinhibitoren Benzamidin (Benz, 1 mM), Aprotinin (Apr, 1,5 μ M) und Antithrombin-III (AT-III, 10 μ g/ml), TAPI (0,5 mM) oder α -2-Antiplasmin (α 2-AP, 5 μ g/ml) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE (15% Acrylamid) aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht.

Wie aus der Abbildung 11 hervorgeht, kann die proteolytische Aktivität der Fraktion 53 gegenüber IGFBP-3 fast komplett (nach densitometrischer Auswertung des noch intakten [125 I]-IGFBP-3 zu 90%) mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin (1,5 μ M, Bahn 4) gehemmt werden. Der Serinproteaseinhibitor Benzamidin (1 mM, Bahn 3) zeigt dagegen nur eine schwache Hemmung (ca. 20%). Ebenso zeigte der spezifische, natürlich vorkommende Serinproteaseinhibitor Antithrombin-III (10 μ g/ml, Bahn 5) nur einen geringen Einfluß auf die proteolytische Aktivität der Fraktion 53 (ca. 24% Hemmung). Ein anderer natürlich in der Zirkulation vorkommender Serinproteaseinhibitor α -2-Antiplasmin (5 μ g/ml, Bahn 11) zeigte allerdings auch bei geringer Konzentration eine nahezu komplette Hemmung der Proteaseaktivität. Die Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin (2 mM, nicht dargestellt) und TAPI (0,5 mM, Bahn 8) hatten keinen Einfluß auf die proteolytische Degradation des [125 I]-IGFBP-3.

In einem anderen Versuchsansatz wurden die RP-HPLC Fraktionen durch [125 I]-IGFBP-3 Substratzymographie analysiert (siehe 3.2.3.14). Es läßt sich die ungefähre Masse der Protease ableiten. Die höchste Proteaseaktivität war in der Fraktion 53 zu finden, assoziiert mit einem Protein von einer ungefähren Masse von 92 kDa (Abb. 12A). Zugabe von Serinproteaseinhibitor Aprotinin während der Inkubationszeit des Gels hemmte die

Proteaseaktivität vollständig, während eine Mischung aus Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin und EDTA keinen Einfluß auf die [125 I]-IGFBP-3 Proteolyse hatte.

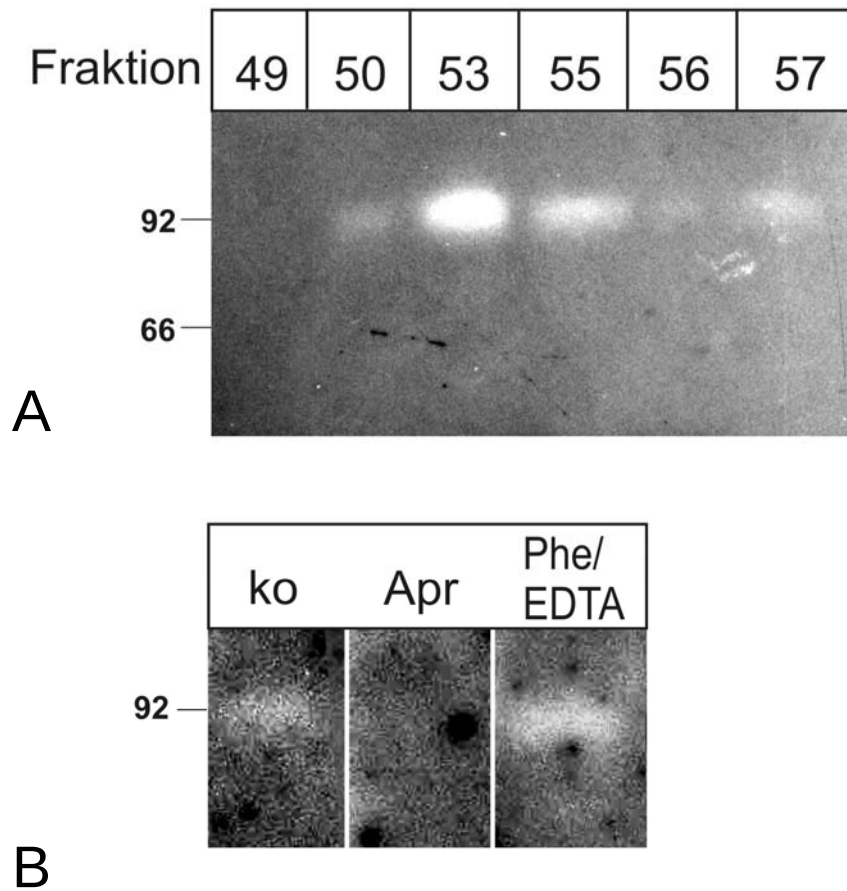


Abb. 12: Aufreinigung einer 92 kDa Aprotinin-sensitiven IGFBP-3 Protease. A Aliquots der RP-HPLC Fraktionen wurden durch [125 I]-IGFBP-3 Substratzymographie analysiert. Die relative Migration der molekularen Markerproteine ist angegeben. B Das [125 I]-IGFBP-3 Zymographie-Gel wurde in der Anwesenheit von Aprotinin (Apr, 1,5 μ M) und 1,10-Phenanthrolin (Phe, 2 mM) / EDTA (2 mM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle (ko) wurde dem Puffer während der Inkubationszeit des Gels keine Inhibitoren zugesetzt.

4.4 IGFBP Proteaseaktivität im Schwangerenserum

Eine erhöhte Proteolyse von IGFBP-3 wurde erstmals im Serum schwangerer Frauen nachgewiesen (Giudice et al., 1990; Hossenlopp et al., 1990). Ab der 6. Schwangerschaftswoche können IGFBP-3 Fragmente von 17-22 kDa nachgewiesen werden. Die Affinität der IGFBP-Fragmente für die IGFs ist stark reduziert, was das Wachstum des plazentalen und fetalen Gewebes fördert (Hossenlopp et al., 1990).

Vorarbeiten von Kübler et al. (1998) mit Inhibitor- und Fraktionierungsexperimenten von Schwangerenserum zeigten, daß sich die IGFBP-3 Protease aktivieren, sowohl durch Serin- als auch Metalloproteaseinhibitoren hemmen und zu zwei unterschiedlichen Proteinpools zuordnen ließ: eine IGFBP-3 Protease von ca. 50-68 kDa der Disintegrin- und Metalloproteasefamilie und eine IGFBP-3 Protease, die in einen höhermolekularen zirkulierenden Komplex (> 600 kDa) integriert ist (Kübler et al., 1998; Shi et al., 2000; Bang und Fielder, 1997; Maile et al., 1998).

Die hochmolekulare Pool I-Fraktion (600 kDa, Kübler et al., 1998) wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Die Proteinkonzentration des Pool I betrug ca. 150 mg/ml. Die Proteaseaktivität gegenüber nicht-glykosyliertem [125 I]-IGFBP-3 ist abhängig von der Inkubationszeit und der Menge an eingesetzter Pool I-Fraktion (Abb. 13). Unter den verwendeten Bedingungen führen 1 µl des Pool I zu einer vollständigen Proteolyse von intaktem [125 I]-IGFBP-3 in 8-16 Stunden.

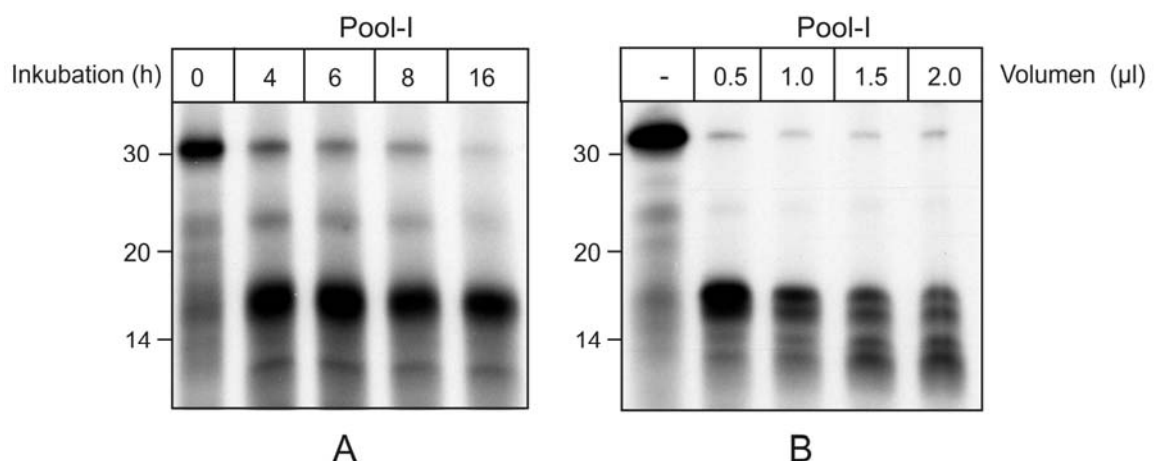


Abb. 13: Pool I-Fraktion aus Schwangerenserum enthält IGFBP-3 Proteaseaktivität. A Aliquots von Pool I (0,1 µl) wurden mit nicht-glykosyliertem [125 I]-IGFBP-3 (ca. 20.000 cpm) für 4, 6, 8 und 16 h bei 37°C inkubiert. B [125 I]-IGFBP-3 wurde mit den angegebenen Mengen des Pool I für 16 h inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE (15% Acrylamid) aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Als Kontrolle (-) wurde [125 I]-IGFBP-3 in proteasefreiem Puffer unter identischen Bedingungen inkubiert.

Nach der Inkubation von glykosyliertem IGFBP-3 mit ansteigender Menge der Pool I-Fraktion, gelelektrophoretischer Auftrennung der Ansätze über SDS-PAGE und Nachweis von IGFBP-3 durch Westernblot-Analyse, war ein 21 kDa immunoreaktives Fragment sichtbar. Möglicherweise sind intermediäre glykosylierte Abbauprodukte durch Westernblot Analyse nicht detektierbar.

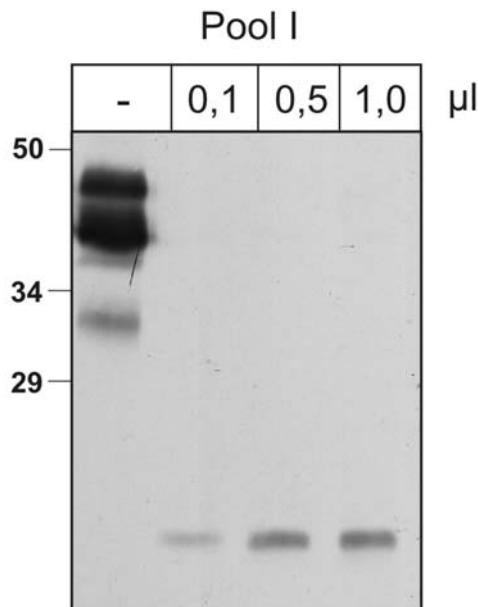


Abb. 14: Pool I zeigt Proteaseaktivität gegenüber glykosyliertem IGFBP-3. Aliquots von Pool I (0,1, 0,5, 1,0 µl) wurden mit je 125 ng glykosyliertem IGFBP-3 für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden über SDS-PAGE (15% Acrylamid) aufgetrennt und durch Westernblot mit α -IGFBP-3 Antikörpern ausgewertet. Als Kontrolle (-) wurde glykosyliertes IGFBP-3 in proteasefreiem Puffer unter identischen Bedingungen inkubiert.

Die IGFBP-3 Proteaseaktivität in der Pool I-Fraktion kann nahezu komplett (ca. 90% nach densitometrischer Auswertung des noch intakten [125 I]-IGFBP-3) von den Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin / EDTA (Abb. 15, Bahn 3) oder TAPI (Abb. 15, Bahn 5) gehemmt werden. Der Serinproteaseinhibitor Aprotinin (Abb. 15, Bahn 4) hatte keinen Effekt auf die Degradation des [125 I]-IGFBP-3. Zusätzlich wurden noch andere Serinproteaseinhibitoren sowie Aspartyl- und Cysteinproteaseinhibitoren getestet, die jedoch keinen Effekt auf die [125 I]-IGFBP-3 Proteolyse hatten (nicht gezeigt).

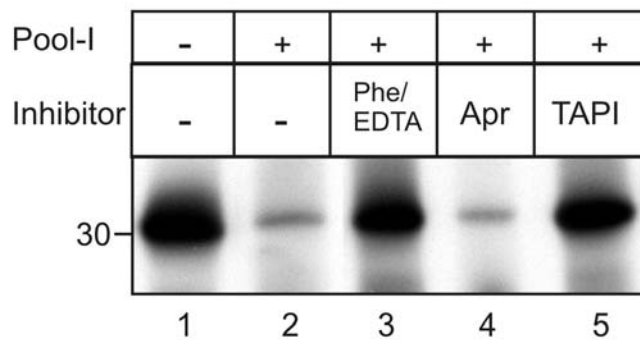


Abb. 15: Effekte von Proteaseinhibitoren auf die IGFBP-3 Proteaseaktivität in Pool I. Aliquots von Pool I (0,1 µl) wurden mit [¹²⁵I]-IGFBP-3 (ca. 20.000 cpm) für 16 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle (-) wurde [¹²⁵I]-IGFBP-3 in proteasefreiem Puffer inkubiert (Bahn 1). Die Pool I-Fraktion wurde in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren (Bahn 2) und in Anwesenheit von 1,10-Phenanthrolin (Phe, 2 mM) / EDTA (2 mM) (Bahn 3), Aprotinin (Apr, 1,5 µM, Bahn 4) oder TAPI (0,5 mM, Bahn 5) inkubiert.

Eine [¹²⁵I]-IGFBP-3 Substratzymographie mit Fraktionen der Pool I-Fraktion zeigt, zwei unterschiedliche Aktivitätsbanden mit ungefähren Massen von 100 kDa und 50 kDa (Abb. 16A). Eine Mischung der Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin und EDTA hemmt nur die 50 kDa Proteaseaktivität (Abb. 16C). Die aktive 100 kDa Proteinbande läßt sich dagegen nicht hemmen. Der Serinproteaseinhibitor Aprotinin zeigt weder einen Effekt auf die Aktivität der 100 kDa noch auf die 50 kDa IGFBP-3 Protease (Abb. 16B).

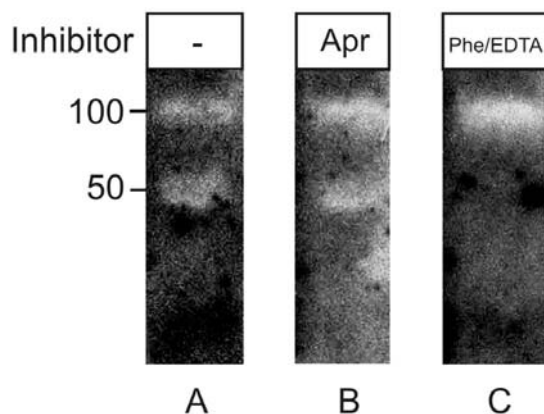


Abb. 16: Die Pool I-Fraktion enthält zwei IGFBP-3 Proteasen. Aliquots von Pool I (0,5 µl) wurden durch [¹²⁵I]-IGFBP-3 Substratzymographie analysiert. Das Gel wurde in Abwesenheit (A) und Anwesenheit von Aprotinin (B, Apr, 1,5 µM) oder 1,10-Phenanthrolin (C, Phe, 2 mM) / EDTA (2 mM) für 16 h bei 37°C inkubiert. Die relative Migration der molekularen Markerproteine ist angegeben.

Da Kübler et al. (1998) eine 50 kDa IGFBP-3 Protease der Pool II-Fraktion aus Schwangerenserum als Disintegrin- und Metalloprotease charakterisierten, wurde eine Westenblot Analyse mit der Pool I-Fraktion mit Antikörpern gegen die konservierte cysteinreiche Domäne der sezernierten löslichen ADAM 12-S durchgeführt (Abb. 17). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen läßt sich eine größer als 220 kDa ADAM 12-S

immunoreaktive Proteinbande, sowie eine schwache ca. 50 kDa Bande nachweisen. Unter reduzierenden Bedingungen ist nur noch die 50 kDa Proteinbande sichtbar.

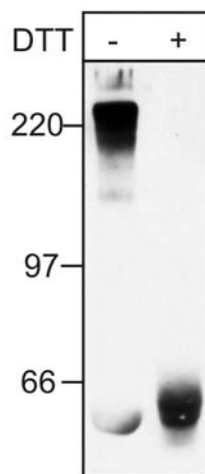
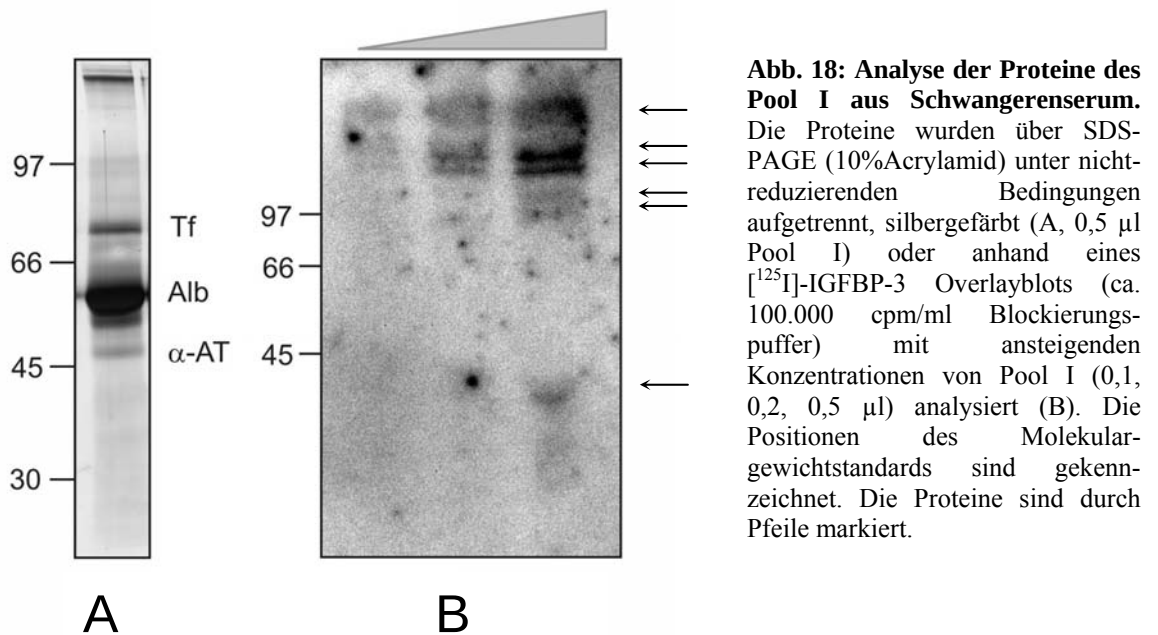


Abb. 17: ADAM 12-S Westernblot Analyse der Pool I-Fraktion. Aliquots von Pool I (0,5 µl) wurden über SDS-PAGE (8% Acrylamid) aufgetrennt und durch Westernblot mit Antikörpern gegen die cysteinreiche Domäne von ADAM 12-S unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht.

4.5 Multiple Serum- und IGFBP-3-bindende Proteine in der Pool I-Fraktion

Die Proteine des IGFBP-Proteasehaltigen, hochmolekularen Pool I des Schwangerenserums (600 kDa) wurden durch Overlay und Westernblot Analysen näher untersucht. Zunächst wurde ein Aliquot des Pool I über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Es lassen sich fünf prominente Proteinbanden mit ungefähren molekularen Massen von 100/95, 70, 60, 55 und 46 kDa detektieren (Abb. 18A), die offensichtlich mit einem in unterschiedlicher Stöchiometrie vorliegendem Komplex von der Gelfiltrationssäule koeluierten. Abbildung 18B zeigt einen [¹²⁵I]-IGFBP-3 Overlayblot (siehe 3.2.3.11), mit dessen Hilfe die molekulare Masse von potentiellen Bindungspartnern des IGFBP-3 im Pool I identifiziert werden können. Es konnten sechs IGFBP-3 bindende Proteinbanden mit den molekularen Massen von ca. 220, 150/145, 100/95 und 40 kDa nachgewiesen werden, die nicht als prominente Proteinbanden im Silbergel sichtbar sind.



Zur Identifikation der silbergefärbten Proteine in Pool I wurden Massenanalysen durchgeführt. Das 70 kDa Protein (Abb. 18A) konnte als Transferrin identifiziert werden. Bei der stark angefärbten Proteinbande bei etwa 60 kDa in Abb. 18A handelt es sich um Albumin (Alb). Über Massenanalyse von Aliquots des Pool I konnten weitere Plasmaproteine identifiziert werden, wie α -Antitrypsin (Abb. 18A, 46 kDa, α -AT) und Apolipoprotein E (hier nicht dargestellt, 34 kDa). Aufgrund der Ergebnisse der Massen- und der Westernblot Analysen der RP-HPLC Fraktionen von der IGF bindenden Plasma Cohn Fraktion IV (siehe 4.1) wurde die Pool I-Fraktion des Schwangerenserums auf die Präsenz von Transferrin, Plasminogen, Antithrombin III und vom löslichen IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor im Westernblot getestet (Abb.19). Im Gegensatz zur Plasma Cohn Fraktion IV liegt eine deutlich größere Menge (27-fach erhöht) an IGF-II/M6P-Rezeptor in der Pool I-Fraktion vor. Die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität von Transferrin und Antithrombin III im Vergleich mit den jeweiligen rekombinanten Standardproteinen könnte durch einen zu hohen Proteinauftrag bzw. durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen im Schwangerenserum zu erklären sein.

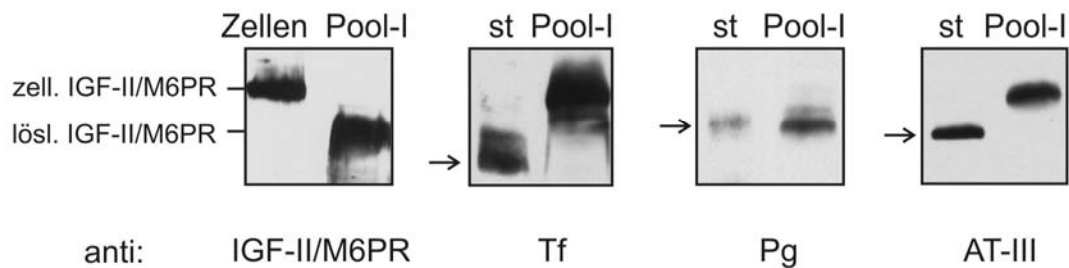


Abb. 19: Westernblot Analyse der Pool I-Fraktion. Proteine der Pool I-Fraktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (10% Acrylamid) und über Westernblot auf das Vorkommen des löslichen IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (lösl. IGF-II/M6PR), Transferrin (Tf), Plasminogen (Pg) und Antithrombin-III (AT-III) untersucht. Rekombinantes humanes Transferrin (200 ng), Plasminogen (200 ng) und 200 ng Antithrombin-III wurden als Standard (st) verwendet. Ein Extrakt von HeLa-Zellen, die den intakten zellulären integralen IGF-II/M6P-Rezeptor (zell. IGF-II/M6PR) exprimierten, wurde als Positivkontrolle benutzt.

Über weitere Westernblots konnten zusätzlich der Komplementfaktor C3 und die schwangerschaftsspezifische Metalloprotease PAPP-A im Pool I nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

4.6 Aufreinigungsverfahren für Pool I-bindende Proteine

Um die Proteine der Pool I-Fraktion weiter zu charakterisieren, wurden verschiedene Methoden wie Gelfiltration über eine Sephacryl S-300 HR Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, siehe 3.2.3.15), 2-dimensionale-Gelelektrophorese (siehe 3.2.3.5) und Affinitäts-chromatographie (Concanavalin A-Säule, siehe 3.2.3.16) verwendet (nicht gezeigt). Die Methoden erwiesen sich als ungeeignet, da keine weitere Aufreinigung der Proteine der Pool I-Fraktion gegenüber dem Ausgangsmaterial zu erreichen war. Weitere Reinigungsmethoden wären unter anderem die Abtrennung des hohen Anteils an Serumalbumin über RP-HPLC oder die Aufreinigung über eine IGF-Affinitätschromatographie-Säule.

4.7 Expression von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen

Um die physiologische Relevanz des IGF/IGFBP-3-bindenden Proteins Transferrin (Tf) bzw. des Proteinkomplexes aus Transferrin, IGFs und IGFBP-3 zu untersuchen, wurden verschiedene IGF-abhängige Prozesse in Madin-Darby Hundenierenzellen (MDCK-Zellen), die mit der cDNA für Transferrin oder IGFBP-3 und mit beiden in Kombination transfiziert wurden, gemessen.

4.7.1 Transiente Expression von Transferrin

MDCK-Zellen wurden transient mit der Transferrin cDNA (MDCK-Tf) im pIRES 2-EGFP Vektor oder dem leeren Vektor transfiziert und die Expression von Transferrin in Medien 24 und 48 h nach Transfektion durch Westernblot analysiert. Wie aus Abbildung 20 deutlich wird, ist bereits nach 24 h in den Medien der MDCK-Zellen Transferrin nachzuweisen. Die Bande ist breiter und besitzt eine geringere elektrophoretische Mobilität als das gereinigte holo-Transferrin aus humanem Serum (st). Nach 48 h ist etwa 5% mehr Transferrin im Medium nachzuweisen als nach 24 h. Weder die nicht-transfizierten (WT) noch die Vektor transfizierten Zellen (Vektor) zeigten eine Transferrin Expression.

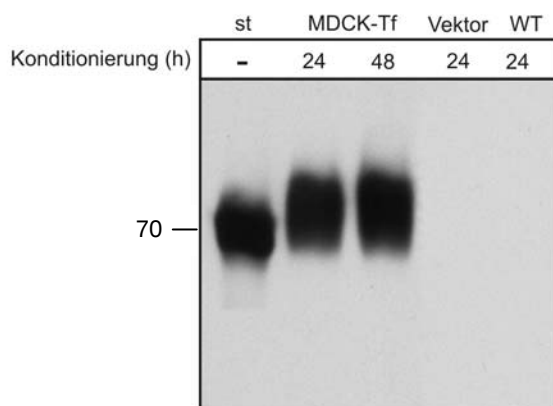


Abb. 20: Sekretion von Transferrin (Tf) von transient transfizierten MDCK-Zellen. Die ethanolgefällten Proteine aus Medien (300 µl) von Zellen, die für 24 und 48 h konditioniert wurden, wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen Transferrin analysiert. Gereinigtes Transferrin (300 ng) wurde als Kontrolle (st) eingesetzt. Nicht-transfizierte Zellen wurden mit WT, vektor-transfizierte Zellen mit Vektor gekennzeichnet.

4.7.2 Stabile Expression von IGFBP-3

MDCK-Zellen wurden stabil mit der IGFBP-3 cDNA (MDCK-IGFBP-3) im pcDNA 6/V5-His Vektor transfiziert und mit Medium, das 2 µg/ml Blasticidin enthielt, selektioniert. 24 nach Transfektion wurde in den Medien die Expression von IGFBP-3 durch Westernblot nachgewiesen (Abb. 21). Die Vektor transfizierten Zellen zeigten keine IGFBP-3 Expression, ebenso die nicht-transfizierten Zellen (nicht gezeigt).

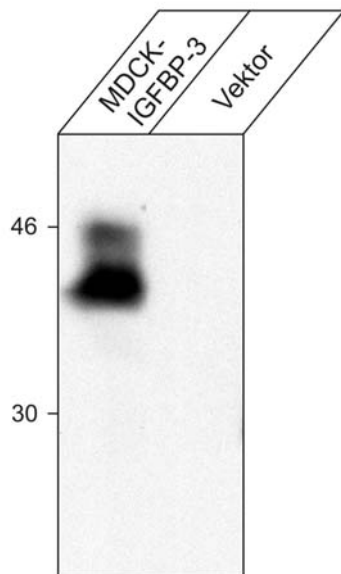


Abb. 21: Sekretion von IGFBP-3 in stabil transfizierten MDCK-Zellen. Die ethanolgefällten Proteine aus Medien (300 µl) von Zellen, die für 24 h konditioniert wurden, wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen IGFBP-3 analysiert. Vektor-transfizierte Zellen wurden mit Vektor gekennzeichnet.

4.7.3 Stabile Expression von Transferrin und IGFBP-3

Für die Coexpression von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen wurde die Transferrin cDNA unter Zugabe des Selektionsvektors pGK hygro in stabil IGFBP-3 exprimierende Zellen (MDCK-IGFBP-3) transfiziert. Die Selektion von stabilen, Transferrin überexprimierenden Zellklonen erfolgte mit einer Kombination aus Hygromycin B (500 µg/ml) und Blasticidin (2 µg/ml). Medien von 17 ausgesuchten Einzelklonen wurden anschließend im Westernblot auf die Expression von Transferrin und IGFBP-3 analysiert. Wie die Abbildung 22 zeigt, exprimieren die Klone jeweils nur Transferrin oder IGFBP-3. Es konnte kein Klon mit einer Coexpression von Transferrin und IGFBP-3 gefunden werden. Die Expression von Transferrin beträgt nach densitometrischem Vergleich mit dem Standard (300 ng Transferrin) bei Klon 1 etwa 1,1 µg/24h/mg Protein, bei Klon 5 3,8 µg, bei Klon 8 158 ng und bei Klon 9 750 ng/24h/mg Protein. Die Expression von IGFBP-3 beträgt nach densitometrischer Quantifizierung mit dem Standard (100 ng IGFBP-3) bei den Klonen 10, 11 und 12 380,

435, 540 ng/24h/mg Protein, bei Klon 14/15 490 und 420 ng/24h/mg Protein, bei Klon 13 780 ng/24h/mg Protein und bei den Klonen 16 und 17 315 bzw. 250 ng/24h/mg Protein. Die nachfolgenden Experimente wurden mit den Klonen durchgeführt, die entweder Transferrin (MDCK-Tf-5) bzw. IGFBP-3 (MDCK-IGFBP-3-13) am stärksten exprimierten.

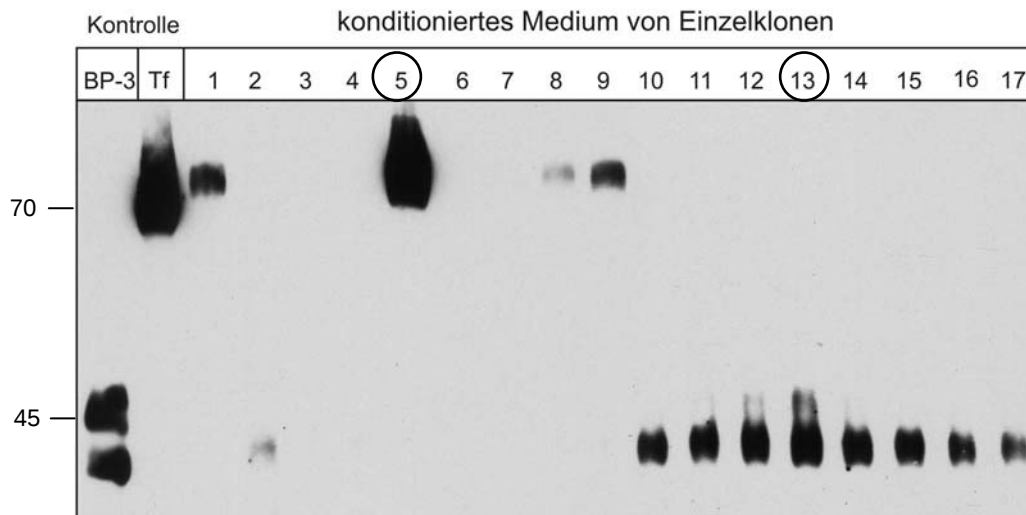


Abb. 22: Cotransfektion von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen. MDCK-IGFBP-3 Einzelklonen, die mit Transferrin cotransfiziert und mit Hygromycin B (500 µg/ml) und Blasticidin (2 µg/ml) selektioniert wurden, wurden für 24 h konditioniert. Die Proteine aus 300 µl Medium wurden ethanolgefällt, über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Die Membran wurde anschließend zwischen dem 66 und 45 kDa Markerprotein geschnitten und getrennt im Westernblot mit Antikörpern gegen Transferrin bzw. IGFBP-3 analysiert. Aufgereinigtes IGFBP-3 (100 ng) und gereinigtes Transferrin (300 ng) wurden als Kontrolle (BP-3/Tf) eingesetzt.

4.8 Sortierung von Transferrin und IGFBP-3 in polarisierten MDCK-Zellen

MDCK-Zellen, die auf Transwell Polycarbonat-Filtern (Corning Costar Corp., USA) wachsen, werden als Modellsysteme für polarisierten Proteintransport in Epithelzellen benutzt. Stabil transfizierte MDCK-Zellen, die Transferrin (MDCK-Tf-5) oder IGFBP-3 (MDCK-IGFBP-3-13) überexprimieren, wurden polar auf Filtern herangezogen und das konditionierte Medium von der apikalen und basolateralen Seite nach 24 und 48 h abgenommen. Die Medien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und durch Westernblot mit Antikörpern gegen Transferrin bzw. IGFBP-3 analysiert (Abb. 23).

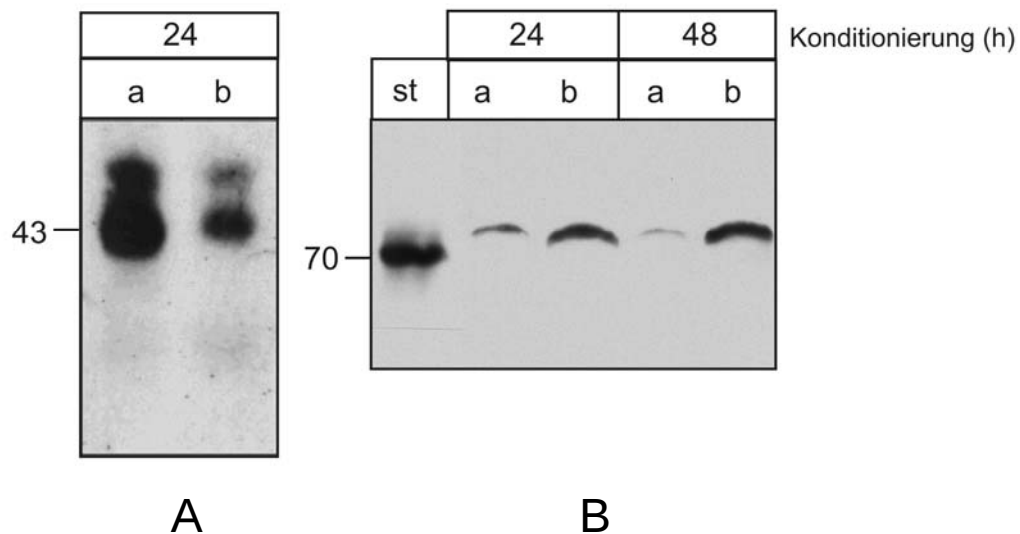


Abb. 23: Bevorzugt apikaler Transport von IGFBP-3 und basolateraler Transport von Transferrin in polarisierten MDCK-Zellen. Die ethanolgefällten Proteine aus 300 µl apikalem (a) und basolateralem (b) Medium von polarisiert gewachsenen MDCK-Tf-5 und MDCK-IGFBP-3-13 Zellen, die 24 h und 48 h konditioniert wurden, wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen IGFBP -3 (A) und Transferrin (B) analysiert. Gereinigtes Transferrin (300 ng) wurde als Kontrolle (st) eingesetzt.

Die densitometrische Auswertung des Westernblots (Abb. 23A) zeigt, daß nach 24 h Konditionierung von IGFBP-3 überexprimierenden MDCK-Zellen 68% des IGFBP-3 im apikalen Medium detektiert werden. Im konditionierten Medium von Transferrin überexprimierenden Zellen wird nach 24 h 75% und nach 48 h 93% des Transferrins im basolateralen Medium nachgewiesen (Abb. 23B). Um auszuschließen, daß Transferrin zunächst apikal sezerniert und nach Endocytose und Transcytose an der basolateralen Seite abgegeben wurde, wurden den Medien der MDCK-Zellen Ammoniumchlorid (10mM) zugesetzt, das die pH-abhängige Sortierung des Transferrins in Endosomen inhibiert (Ohkuma und Poole, 1978). Auch bei diesem Ansatz wurde das Transferrin zur basolateralen Seite transportiert (nicht gezeigt). Die Sortierung von Transferrin zur basolateralen Seite ist daher nicht pH-abhängig.

4.9 Biologische Wirkung von Transferrin und IGFBP-3 auf MDCK-Zellen

4.9.1 Regulation der Proliferation

Die Proliferation von Transferrin- und IGFBP-3-exprimierenden MDCK-Zellen wurde durch den Einbau von [^3H]-Thymidin in die DNA gemessen. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte MDCK Zellen, die entweder nicht oder mit IGF-I (50 nM) für 14 h stimuliert wurden. In Kontroll-MDCK-Zellen steigerte IGF-I die Proliferation der Zellen um das 4,4-fache (Abb. 24). Die Proliferationsrate von zwei verschiedenen Zellklonen (MDCK-Tf-9/-1), die Transferrin exprimierten, lag bei 66% bzw. 76% im Vergleich zu nicht-transfizierten MDCK-Zellen. Wenn die MDCK-Transferrin-9 und -1 Zellen mit IGF-I stimuliert wurden, ließ sich die Proliferation etwa 1,8- bzw. 1,2-fach steigern. Das entspricht einer Proliferationsrate von ca. 123% bzw. 89% in Bezug auf unbehandelte, nicht-transfizierte Zellen. Bei IGFBP-3 überexprimierenden Zellen lag die basale Proliferationsrate bei 83% im Vergleich zu nicht-transfizierten MDCK-Zellen, die durch Vorinkubation mit IGF-I nicht gesteigert werden konnte (Abb. 24).

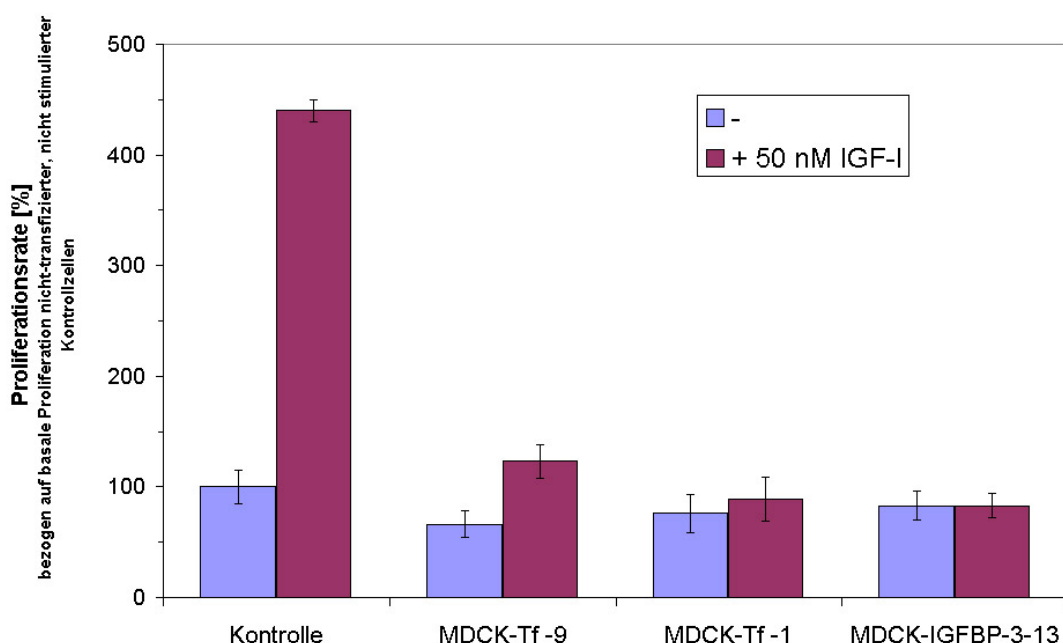


Abb. 24: Wirkung von IGF-I auf die Proliferation von Kontroll-, MDCK-Tf-9/-1 und MDCK-IGFBP-3-13-Zellen. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde der Einbau von [^3H]-Thymidin in die DNA gemessen. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 50 nM IGF-I für 14 h inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 1 μCi [^3H]-Thymidins pro Platte für 4 h. Anschließend wurde die aufgenommene Radioaktivität im β -Szintillationszähler bestimmt und die Proliferationsrate als Prozent (Mittelwert $\pm$ SD) der nicht-transfizierten MDCK-Kontrollzellen angegeben. Es wurden dreimal je drei parallele Ansätze durchgeführt (n=3).

4.9.2 Regulation der Aminosäure-Aufnahme

Um die Effekte von Transferrin und IGFBP-3 auf die Aminosäure-Aufnahme von MDCK-Zellen zu untersuchen, wurde ein α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure-Assay durchgeführt. Dabei wurde Transferrin- und IGFBP-3-exprimierenden MDCK-Zellen nach Vorinkubation in Aminosäure-freiem Medium, das radioaktiv markierte, nicht metabolisierbare Aminosäure-Analogon α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure zur Aufnahme angeboten. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurde die aufgenommene Radioaktivität im β -Szintillationszähler bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte MDCK Zellen. Vorinkubation von Haut-Fibroblasten mit IGF-I erhöht die zelluläre Aufnahme von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure (Hammer et al., 2004). Unter den hier verwendeten Bedingungen steigerte IGF-I (50 nM; 3 h) die Aufnahme von α -[1- 14 C]-Methyl-aminoisobuttersäure bei nicht-transfizierten MDCK-Zellen um das 1,7-fache (Abb. 25). Bei MDCK-Tf-5 und bei MDCK-IGFBP-3-13 Zellen lag die basale Aufnahmerate der α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure etwas geringer bei 70% bzw. 82% bezogen auf nicht-transfizierte MDCK-Zellen. Bei Zugabe von IGF-I ließ sich die Aminosäure-Aufnahme gegenüber der basalen Aufnahmerate um das 1,4- bzw. 1,2-fache steigern.

Von den Experimenten zur Aminosäureaufnahme wurden parallel Westernblot Analysen der konditionierten Medien der MDCK-Tf und MDCK-IGFBP-3 Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Expression von Transferrin und IGFBP-3 nach Stimulation mit 50 nM IGF-I für 3 h um das ca. 3,5-fache bzw. 3,6-fache erhöht ist (Mittelwert aus der densitometrischen Auswertung der immunoreaktiven Banden für jeden Ansatz, Abb. 26). Die β -Hexosaminidase-Aktivität in den Medien war nicht beeinflusst durch die Vorinkubation mit IGF-I (nicht gezeigt).

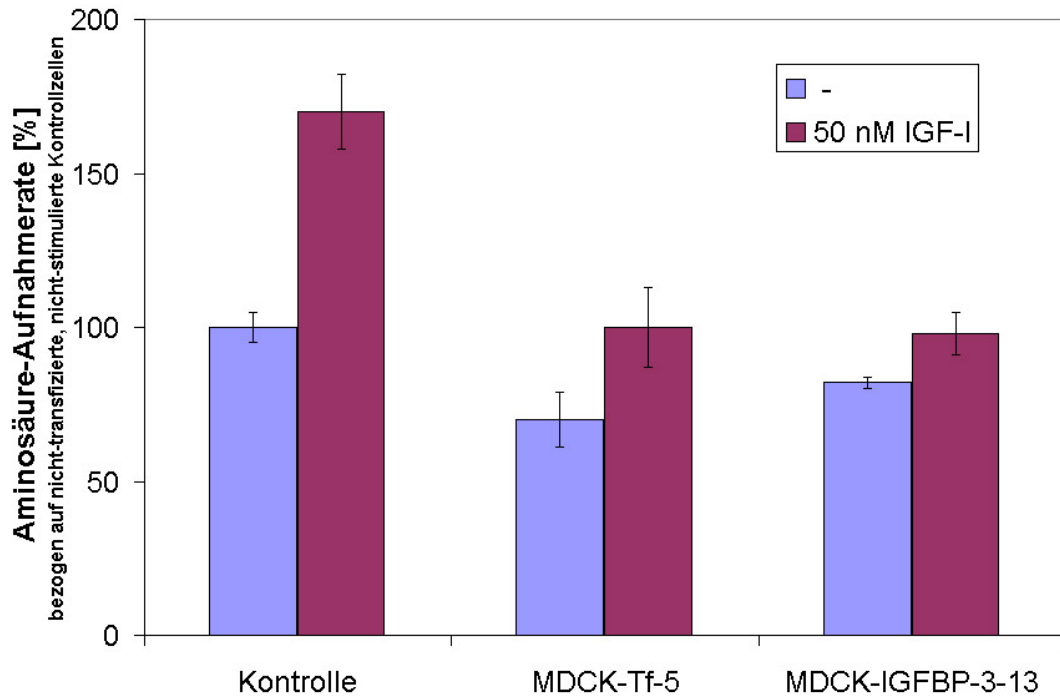


Abb. 25: Wirkung von IGF-I auf die Aminosäure-Aufnahme bei Kontroll-, MDCK-Tf-5 und MDCK-IGFBP-3-13-Zellen. Nicht-transfizierte MDCK Zellen, MDCK-Tf-5 und MDCK-IGFBP-3-13 Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 50 nM IGF-I für 3 h inkubiert. Nach Zugabe von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure wurde die zelluläre Aminosäure-Aufnahmerate nach 20 min gemessen. Die Aminosäure-Aufnahme wurde in Prozent bezogen auf nicht-transfizierte MDCK Kontrollzellen dargestellt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SD (n= 6) angegeben.

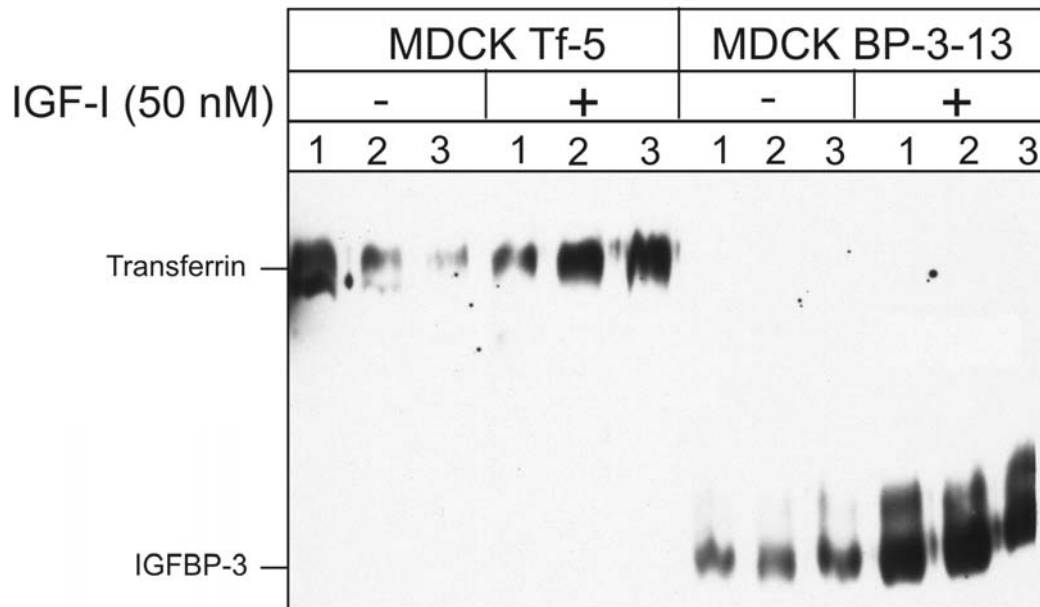


Abb. 26: Wirkung von IGF-I auf die Expression von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen. Die ethanolgefällten Proteine der Medien aus Abb. 25 wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen Transferrin und IGFBP-3 analysiert.

Im folgenden Experiment (Abb. 27) wurden der Einfluß von exogenem, rekombinantem Transferrin und Plasminogen getrennt auf die Aminosäure-Aufnahme in nicht-transfizierten MDCK-Zellen in An- und Abwesenheit von IGF-I untersucht. Die Proteine wurden entweder für 3 h oder für 24 h zum Medium zugefügt. Anschließend wurde ein α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure-Assay durchgeführt. Unter den hier verwendeten Bedingungen steigerte IGF-I (50 nM; 3 h) die Aufnahme von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure bei nicht-transfizierten MDCK-Zellen um das 2,2-fache. Die Aminosäure-Aufnahme bei 3 h Inkubation mit Transferrin (50 μ g/ml) und Plasminogen (25 μ g/ml) zusammen mit IGF-I war bei den nicht-transfizierten MDCK-Zellen leicht erniedrigt (1,8- bzw. 1,7-fache Stimulation) im Vergleich mit der Stimulation mit IGF-I allein. Bei einer 24 h Inkubation mit Transferrin und Plasminogen ließ sich nur eine geringe (1,2-fach) bzw. keine Stimulation der Aminosäure-Aufnahme durch IGF-I im Vergleich mit der Kontrolle feststellen.

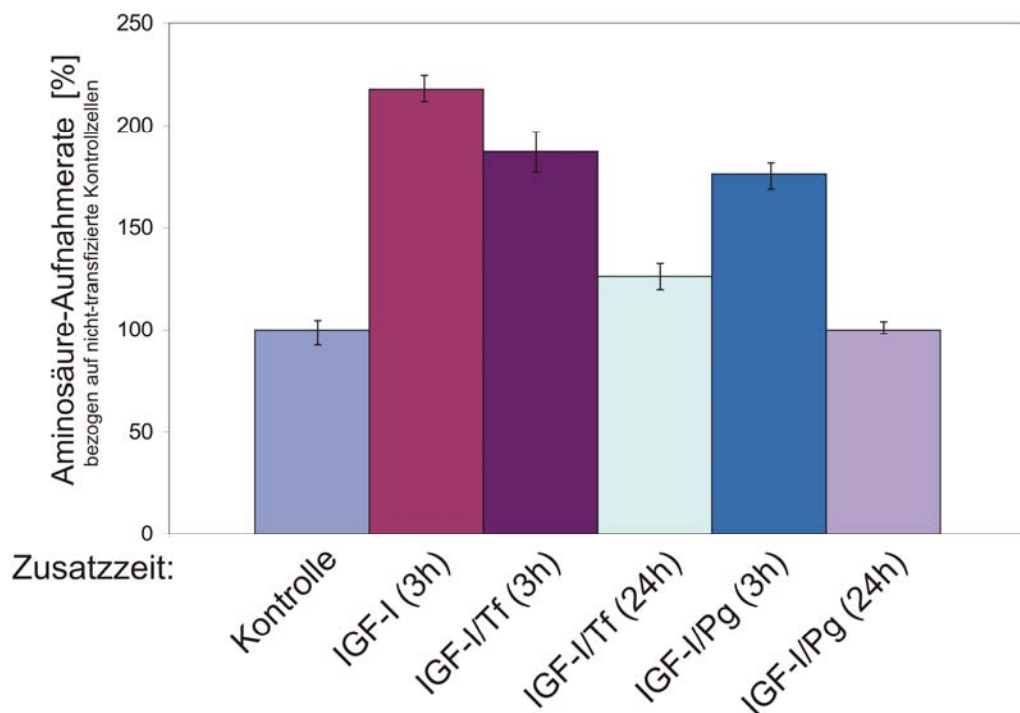


Abb. 27: Wirkung von IGF-I, Transferrin und Plasminogen auf die AS-Aufnahme von nicht-transfizierten MDCK-Zellen. Nicht-transfizierte MDCK-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 50 nM IGF-I, rekombinantem Transferrin (50 μ g/ml) und Plasminogen (25 μ g/ml) für entweder 3 h oder 24 h inkubiert. Nach Zugabe von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure wurde die zelluläre Aminosäure-Aufnahmerate nach 20 min gemessen. Die Aminosäure-Aufnahme wurde in Prozent bezogen auf nicht-transfizierte MDCK Kontrollzellen dargestellt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SD (n= 3) angegeben. Pg=Plasminogen; Tf=Transferrin.

Das Experiment aus Abbildung 27 wurde mit MDCK IGFBP-3-13 Zellen wiederholt (Abb. 28). Die Aminosäure-Aufnahme in Abwesenheit von IGF-I wurde mit der Kontrolle aus Abbildung 27 verglichen und lag daher bei ca. 70%. Es ließ sich keine Stimulation der Aminosäure-Aufnahme durch IGF-I nachweisen (Aminosäure-Aufnahmerate 68%). Bei Inkubation mit Transferrin (50 µg/ml) für 3 h und 24 h zusammen mit IGF-I war bei den MDCK IGFBP-3-13 Zellen eine leicht erhöhte Aminosäure-Aufnahmerate (1,6- bzw. 1,5-fach auf 113 bzw. 108%) zu verzeichnen. Bei 24 h Inkubation mit Plasminogen (25 µg/ml) und IGF-I ließ sich ebenfalls eine leichte Erhöhung der Aminosäure-Aufnahmerate (1,4-fach auf 99%) detektieren. Eine Inkubation mit Plasminogen und IGF-I für 3 h erniedrigte die Aminosäure-Aufnahme der MDCK IGFBP-3-13 Zellen auf 57%.

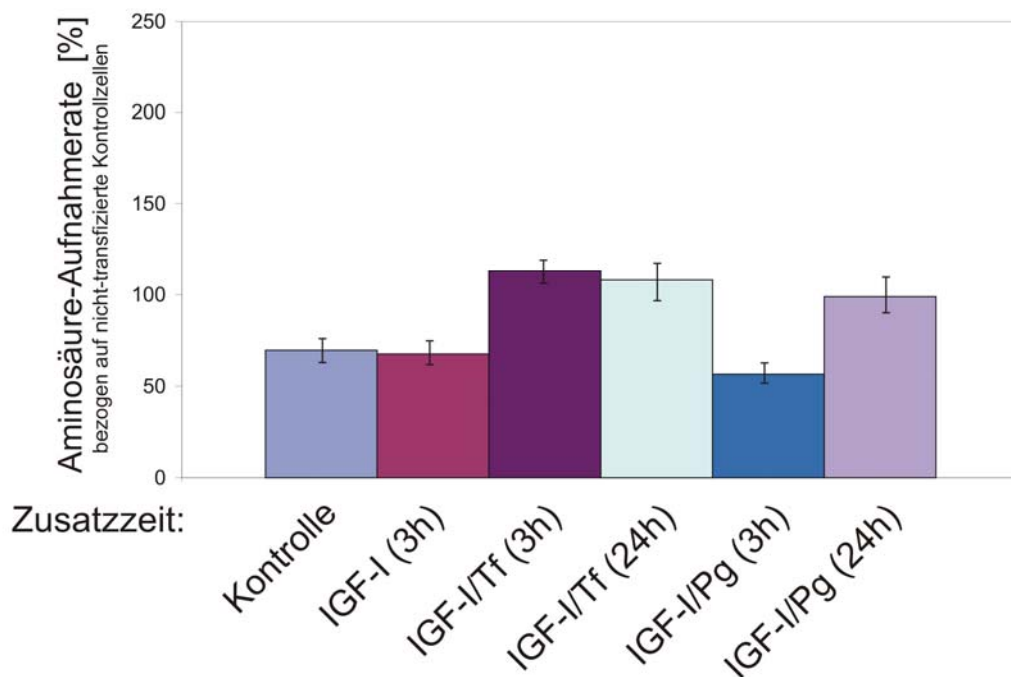


Abb. 28: Wirkung von IGF-I, Transferrin und Plasminogen auf die AS-Aufnahme von MDCK-IGFBP-3-13-Zellen. MDCK-IGFBP-3-13-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 50 nM IGF-I, rekombinantem Transferrin (50 µg/ml) und Plasminogen (25 µg/ml) für entweder 3 h oder 24 h inkubiert. Nach Zugabe von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure wurde die zelluläre Aminosäure-Aufnahmerate nach 20 min gemessen. Die Aminosäure-Aufnahme wurde in Prozent bezogen auf nicht-transfizierte MDCK Kontrollzellen dargestellt. Es sind Mittelwerte $\pm$ SD (n= 3) angegeben. Pg=Plasminogen; Tf=Transferrin.

5 DISKUSSION

5.1 Identifizierung von IGF/IGFBP-bindenden Plasma-proteinen

Neben den Hauptkomponenten des IGF-Systems, den IGFs, den IGFBPs sowie den IGF-Rezeptoren und den IGFBP-Proteasen, interagieren eine Reihe von weiteren Proteinen mit den IGFs und tragen somit zur zell- und gewebespezifischen Feinregulation der IGF Wirkung bei. Dazu gehören unter anderem die IGFBP-verwandten Proteine (IGFBP-rP) (Hwa et al., 1999), das Serumprotein Transferrin (Storch et al., 2001), Vitronectin (Upton et al., 1999) und der lösliche IGF-II/M6P-Rezeptor (Kiess et al., 1987; Xu et al., 1998).

In dieser Arbeit konnten mehrere direkte oder indirekte IGF-bindende Proteine aus humanem Plasma identifiziert werden. Als Ausgangsmaterial diente eine Cohn Fraktion IV, die über eine IGF-II-Affinitätssäule gegeben wurde. Bei der Cohn Fraktion IV handelt es sich um eine α - und β -Globuline enthaltende Plasmafraktion, die durch schonende Ethanol-Fällung in einem Standardverfahren zur Gewinnung therapeutischer Präparationen aufgereinigt wurde (Cohn et al., 1946). Es konnten neben den bekannten IGF-bindenden Proteinen IGFBP-3 und IGFBP-5 eine Serin-abhängige 92 kDa Protease und IGFBP-assoziiierende Proteine mit geringer Affinität für IGF-II oder die nicht an IGF-II banden, wie Präkallikrein (Durham et al., 1999) und Transferrin (Storch et al., 2001; Weinzierl et al., 2001) aufgereinigt werden. Für Plasminogen, ein weiteres IGFBP-3 bindendes Protein (Campbell et al., 1998), konnte gezeigt werden, daß es mit hoher Affinität an IGF-II bindet (K_D 5 nM). Diese Daten deuten an, daß die Interaktion von IGF, IGF-Bindungsproteinen und nicht-IGF-Bindungsproteinen bzw. IGFBP-assoziierten Proteinen zu einer Bildung von dimeren, trimeren oder höher molekularen Komplexen mit austauschbaren Komponenten führt. Diese zirkulierenden Komplexe sowie immobilisierte Interaktionspartner (z.B. Fibrinogen/Fibrin) schützen die IGFBPs möglicherweise nicht nur vor Proteolyse und verhindern damit den Verlust von freigesetzten IGFs über die glomeruläre Filtration, sondern könnten den zielgerichteten Transport der IGFs und/oder IGFBPs z.B. zu Fibrinogeninseln an Wundstellen (Campbell et al., 1999) unterstützen. Weiterhin wird diskutiert, daß IGFBP-assoziierte Proteine die IGF-abhängige Migration, Proliferation und Apoptose von extravaskulären Zellen modulieren könnten (Krickler et al., 2003; Weinzierl et al., 2001; Liu et al., 2003).

5.1.1 Plasminogen und Transferrin

Die vorliegenden Untersuchungen mit Hilfe der Oberflächenresonanz-Spektrometrie zeigten, daß immobilisiertes IGFBP-3 an Plasminogen mit einer hohen Affinität (K_D 1,3 nM) bindet, was die von Campbell et al. (1998) gefundenen Daten (K_D 1,43 nM, bestimmt über Verdrängungskinetik) bestätigt. Überraschenderweise bindet Plasminogen IGF-II mit einer ähnlich hohen Affinität (K_D 5 nM) wie IGFBP-3 an IGF-II bindet (K_D 3,6 nM). Die Fähigkeit von Plasminogen an IGF-II zu binden, wurde über bIGF-II Ligandblot und [125 I]-IGF-II Quervernetzungsexperimente bestätigt. Diese Bindung ist spezifisch für IGF-II, da ein 7-facher Überschuß an nicht-markiertem IGF-I den Tracer nur zu 32% aus seiner Bindung an Plasminogen verdrängen konnte (im Gegensatz zu 76% Verdrängung mit nicht-markiertem IGF-II). Daher kann aus den vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden, ob Plasminogen direkt an die IGF-II Matrix bindet oder indirekt über die Assoziation mit IGFBP-3. Neben Plasminogen gibt es auch andere Proteine, die die Fähigkeit besitzen an IGF-II und an IGFBPs zu binden. Das multifunktionale Plasma- und extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin bindet direkt an IGF-II und an mehrere IGFBPs, und über IGFBP-4, -5 oder nicht-glykosyliertes IGFBP-3 indirekt an IGF-I (Krickler et al., 2003). Als extrazelluläres Matrixprotein ist Vitronectin nachhaltig an diversen zellulären Prozessen, wie z.B. der Wundheilung beteiligt. Die IGF-IGFBP-Vitronectin Komplexe können diese Effekte noch verstärken (Hyde et al., 2004). Ob das Eluat der IGF-II Affinitätsmatrix auch das 70-75 kDa Vitronectin enthält, wurde nicht getestet.

Die BIAcore-Messungen ergaben außerdem, daß Transferrin mit einer geringen Affinität an IGF-II bindet (K_D 976 nM), was mit dem Ergebnis von Storch et al. (2001) übereinstimmt. Gleichzeitig assoziiert Transferrin mit einer mittleren Bindungskonstante von K_D 70 nM an IGFBP-3. In Gegenwart von Transferrin wird die Affinität von IGFBP-3 an die IGF-II-Oberfläche um das 5-fache gesteigert (Storch et al., 2001). Die vorliegenden Daten zeigten darüberhinaus, daß in Gegenwart von Transferrin die gemeinsame Bindungskonstante einer Mischung mit Plasminogen an IGF-II gegenüber Plasminogen allein um das 7-fache reduziert war. Die Interaktion von Plasminogen und IGFBP-3 mit IGF-II war im Vergleich mit der Interaktion von Plasminogen und Transferrin mit IGF-II nicht beeinflusst. Es läßt sich nun vermuten, daß Plasminogen eher indirekt über die Assoziation mit IGFBP-3 an die IGF-II Matrix bindet, da Transferrin auch im Eluat die Bindungsaffinität an IGF-II reduzieren könnte. Computergestützte Analysen der

Aminosäuresequenzen von Transferrin und Plasminogen ergaben keine signifikanten strukturellen Ähnlichkeiten der Proteine untereinander. Das bedeutet, daß zwei unterschiedliche Bindungsmotive in den Proteinen für die Bindung an IGF-II und/oder zwei unterschiedliche Bindungsstellen im IGF-II selber angenommen werden können. Die Reduktion der gemeinsamen Affinität von Transferrin und Plasminogen an IGF-II ist durch a) strukturelle Konformationsänderungen, b) sterische Beeinflussung der Moleküle untereinander oder c) durch eine Maskierung der Bindungsstelle am IGF-II durch eines der Moleküle erklärbar. Bei einer Kombination von Transferrin und Plasminogen resultierte eine Bindungskonstante zu IGFBP-3, die vergleichbar ist mit der K_D von Plasminogen an IGFBP-3 allein (1,0 bzw. 1,3 nM). Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, daß Transferrin und Plasminogen jeweils an die Heparinbindungsdomäne von IGFBP-3 binden (Weinzimer et al., 2001; Campbell et al., 1998) und daher das hochaffine Plasminogen mit Transferrin um die gleiche Bindungsstelle im IGFBP-3 konkurriert. Auffällig ist allerdings der starke Anstieg der Assoziationskonstanten des Proteingemisches aus Plasminogen und Transferrin im Vergleich zu den Assoziationskonstanten der einzelnen Proteine (2.900×10^3 1/Ms gegenüber 990×10^3 1/Ms für Plasminogen und 46×10^3 1/Ms für Transferrin). Dies deutet auf einen modulatorischen Effekt einer der Proteinkomponenten hin. Zur Zeit ist jedoch die physiologische Bedeutung der intermolekularen modulatorischen Effekte und die Bedeutung der Faktoren, die die Interaktionen von IGFs, IGFBPs und assoziierten Proteine in der Zirkulation regulieren, noch unklar und bleibt näher zu untersuchen.

5.1.2 Charakterisierung einer IGFBP-3 Protease

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Aufreinigung einer IGFBP Protease mit IGFBP-3 zusammen aus humanem Plasma beschrieben werden. Es zeigte sich, daß die Protease auch IGFBP-2, nicht aber IGFBP-4 spaltet. IGFBP-3 Substratzymographien weisen darauf hin, daß es sich um eine 92 kDa Protease handelt. Inhibitorstudien zeigten, daß die Protease Serin-abhängig ist und vollständig durch α -2-Antiplasmin inhibiert wird. Es könnte sich also um Plasmin oder um eine Plasmin-ähnliche Protease handeln. Plasmin ist an der Degradation von IGFBP-1, -3, -5 und Fibrin sowie an der Aktivierung von Matrixmetalloproteasen beteiligt (Campbell et al., 1992; Booth et al., 1996; Campbell und Andress, 1997; Collen, 2001). Andererseits sprechen Argumente gegen Plasmin als 92 kDa IGFBP-3 Protease. Zunächst zeigten Westernblot Analysen der proteolytisch aktivsten RP-HPLC Fraktion (Nr. 53) die Präsenz einer 97 kDa Plasminogen Form an. Es handelt

sich hier vermutlich um das proteolytisch inaktive Glu-Plasminogen. Im Westernblot konnte hingegen weder das 84-kDa Lys-Plasminogen noch die 60 kDa und 25 kDa schwere und leichte Kette von Plasmin nachgewiesen werden, die mit äquimolarer Menge an IGFBP-3 aus humanem Citratplasma koeluieren (Campbell et al., 1998). Dennoch kann man nicht ausschließen, daß geringe Mengen an aktiver IGFBP-3 Protease, die nicht durch Silberfärbung oder Immunoblot sichtbar gemacht werden konnten, ausreichen, das [¹²⁵I]-IGFBP-3 zu spalten. Ein weiteres Argument gegen Plasmin als IGFBP-3 Protease ist die Tatsache, daß die Konvertierung des inaktiven Plasminogens zum aktiven Plasmin die Anwesenheit von Fibrin bei Gewebsverletzungen erfordert (Dobrovolsky und Titaeva, 2002; Maile et al., 2000). Das macht eine sekundäre Aktivierung von Plasmin aus der inaktiven Plasminogenvorstufe, die mit IGFBP-3 aufgereinigt wurde, eher unwahrscheinlich. Hinzu kommt, daß nur kleine Mengen an immunoreaktiven IGFBP-3 Fragmenten im Eluat der IGF-II Matrix detektiert werden konnten. Es ist spekulativ, ob Inhibitoren mit der IGFBP-3 Protease koeluierten oder ob das IGFBP-3 vor Degradation im Serum geschützt ist (Maile et al., 2000; Maile et al., 1998). Die erste Vermutung wird durch die Detektion von Antithrombin III im Eluat unterstützt, was möglicherweise noch weitere natürliche Inhibitoren enthalten kann. Für den zweiten Punkt sprechen Daten der Arbeitsgruppe Holly (Maile et al., 2000; Maile et al., 1998), die zeigen, daß IGFBP-3 im Serum vor Proteolyse geschützt ist und daß dabei die Zugänglichkeit der C-terminalen Heparinbindungsdomäne des IGFBP-3 Voraussetzung für die Proteolyse oder die Bindung eines Inhibitors ist. Plasminogen, Transferrin und Präkallikrein, die alle mit IGFBP-3 zusammen aufgereinigt wurden, binden an diese Domäne (Campbell et al., 1998; Weinzierl et al., 2001; Durham et al., 1999) und sind somit potentiell in der Lage, IGFBP-3 vor Proteolyse zu schützen. Zusammengefaßt ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, ob die IGFBP Protease über eine Interaktion mit IGFBP-3, IGFBP-assoziierten Proteinen oder Inhibitor komplexen an die IGF-II Affinitätsmatrix bindet.

5.1.3 Antithrombin III, Präkallikrein und der lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor

Neben den klassischen IGFBPs konnte der lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, der mit hoher Affinität an IGF-II bindet (Causin et al., 1988; Kiess et al., 1987; Scott und Baxter, 1996; Xu et al., 1998), Antithrombin III und Präkallikrein im Eluat der IGF-II-Affinitätsmatrix mit Hilfe von Westernblot Analysen identifiziert werden. Antithrombin III

ist eine der wichtigsten Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) im Plasma, der die Blutgerinnungskaskade reguliert. Möglicherweise ist Antithrombin III auch ein Inhibitor der IGFBP-3 Protease *in vivo*, der die IGFBPs im zirkulierenden Komplex vor Proteolyse schützt. Die Inhibitorstudien der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings, daß Antithrombin III in Konzentrationen bis 10 µg/ml die Proteolyse von [¹²⁵I]-IGFBP-3 nur um ca. 25% hemmt. Plasma Präkallikrein ist das Zymogen der Serinprotease Kallikrein und wird durch den aktivierten Koagulationsfaktor XII gespalten. Im Plasma ist dabei die Bindung von Faktor XII an negativ geladene Oberflächen nötig. Präkallikrein zirkuliert nicht frei im Blut, sondern ist hauptsächlich an das hochmolekulare Kininogen („high molecular weight kininogen“, HMWK) gebunden (Durham et al., 1999). Obwohl IGFBP-3 mit einer 10-fach höheren Affinität an Präkallikrein bindet als HMWK (K_D 1,6 nM bzw. 17,0 nM, bestimmt über Verdrängungskinetik) und dieser Präkallikrein/IGFBP-3 Komplex in der Lage ist, IGF-I zu binden, ist es aufgrund der hohen Affinität (K_D 2,0 nM, Leong et al., 1992) und dem molaren Überschuß von ALS (1/3 Überschuß gegenüber IGFBP-3; Baxter, 1990) eher unwahrscheinlich, daß ein Komplex von Präkallikrein/IGFBP-3 zirkuliert.

5.2 Multiple IGF-bindende Komplexe im Plasma

In dieser Arbeit sind mehrere potentielle Interaktionspartner von IGF und IGFBP-3/IGFBP-5 identifiziert worden, zu denen auch eine 92 kDa IGFBP Protease und Antithrombin III gehören. Da nur für die IGFBPs, Plasminogen und den löslichen IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in der vorliegenden Arbeit bzw. durch andere Arbeitsgruppen eine hohe Bindungsaffinität für IGF-II nachgewiesen werden konnte, können Transferrin, die 92 kDa IGFBP Protease und Antithrombin III mit hoher Wahrscheinlichkeit nur indirekt durch Wechselwirkung mit den hochaffinen IGF-Bindungspartnern an die IGF-II-Affinitätsmatrix gebunden haben. Dabei sind neben dimeren und trimeren auch multimere Komplexe denkbar (Abb. 29). Die den jeweiligen postulierten Komplexen zugeordneten molaren Massen geben den niedrigst möglichen Wert an, da die Stöchiometrie der Einzelkomponenten in den Komplexen nicht bekannt ist.

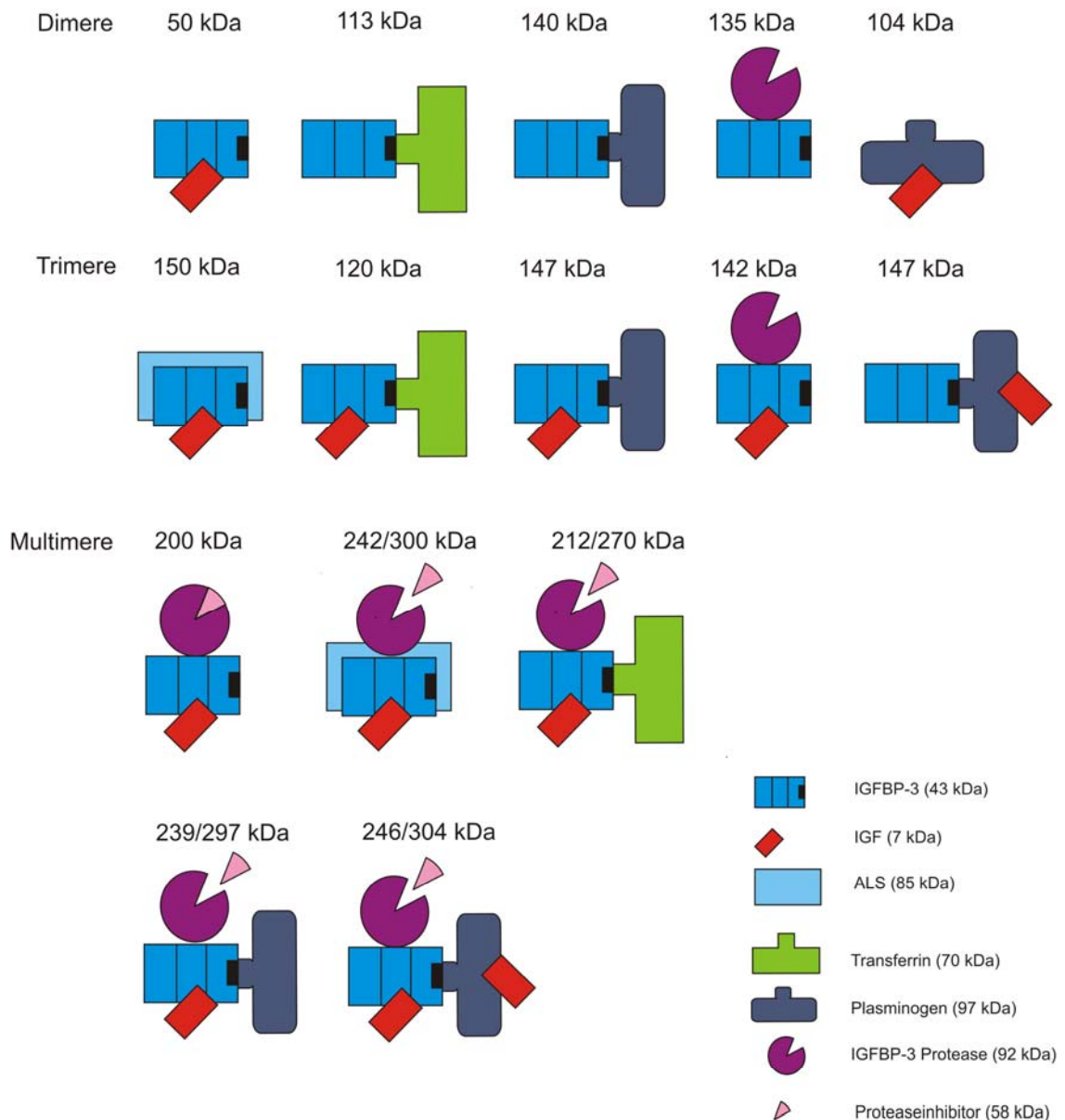


Abb. 29: Schematische Darstellung IGF-bindender Komplexe im Plasma. Berücksichtigt ist nur die Komplexbildung mit IGFBP-3. Die angegebenen molaren Massen der Komplexe geben den niedrigst möglichen Wert an, da die stöchiometrischen Verhältnisse unklar sind. Die Protease kann mit und ohne Inhibitor vorliegen, daher wurden bei den Multimeren zwei Werte für die potentielle molare Masse angegeben. Die Heparinbindungsdomäne in der C-terminalen, konservierten Region des IGFBP-3 ist als schwarzer Kasten gekennzeichnet, an den Transferrin und Plasminogen binden können.

In der ersten Zeile der Abb. 29 sind die möglichen dimeren Komplexe von IGFBP-3 mit IGF, Transferrin, Plasminogen und der 92 kDa-Protease dargestellt und der potentielle dimere Komplex von IGF und Plasminogen, der aufgrund der BIAcore Daten postuliert werden kann (K_D 5 nM). In der zweiten Zeile sind die potentiellen trimeren Komplexe von IGFBP-3 und IGF mit ALS, Transferrin, Plasminogen und der 92 kDa-Protease dargestellt, sowie die Bindung von IGF an Plasminogen, was wiederum an IGFBP-3 bindet. In der

dritten Zeile sind einige multimere Komplexe dargestellt, wobei die Protease mit und ohne Inhibitor vorliegen kann, daher sind immer zwei mögliche molare Massen angegeben. Das erste Bild zeigt einen quartären Komplex aus IGFBP-3-IGF mit der 92 kDa-Protease, an die der Proteaseinhibitor bindet. Der zweite multimere Komplex könnte aus dem 150 kDa IGFBP-3-IGF-ALS-Komplex mit der Protease plus/minus Proteaseinhibitor bestehen. Die anderen multimeren Komplexe setzen sich aus IGFBP-3-IGF, Protease plus/minus Inhibitor und entweder Transferrin oder Plasminogen zusammen, wobei in der letzten gezeigten Möglichkeit IGF sowohl an IGFBP-3 als auch an Plasminogen bindet.

Ob diese Komplexe sich auch *in vitro* rekonstituieren lassen bzw. ob einzelne dieser Komponenten in der Zirkulation *in vivo* vorliegen, ist bis auf die trimeren IGFBP-3/5-IGF-ALS-Komplexe unklar (Baxter et al., 1989; Twigg und Baxter, 1998). Die BIAcore Daten zusammen mit den Konzentrationen der IGFBP-assoziierten Proteine im Plasma (ALS 0,02 mg/ml (Baxter, 1990), Transferrin 2-4 mg/ml, Plasminogen 0,2 mg/ml (Dobrovolsky und Titaeva, 2002)) lassen jedoch vermuten, daß ein Transferrin-IGFBP-3-IGF-II-Komplex (ca. 120 kDa) und ein IGFBP-3-IGF-II-Plasminogen-Komplex (ca. 147 kDa) aufgrund verbesserter IGF Bindungskinetik (Storch et al., 2001) bzw. hoher Affinität zwischen den Einzelkomponenten (siehe Tabelle 2) als wahrscheinlich anzusehen ist.

Diese Komplexe könnten auch in der Fraktion der ALS-IGFBP-3-IGF-Komplexe (Abb. 30, peak A) koeluieren. Höher molekulare, multimere Komplexe, wie sie in Abb. 29 dargestellt sind, und multiple stöchiometrische Varianten scheinen nur in geringen Mengen *in vivo* vorzukommen, wie sich an den mit Pfeilen gekennzeichneten „Schultern“ der A-peaks erkennen läßt (Abb. 30).

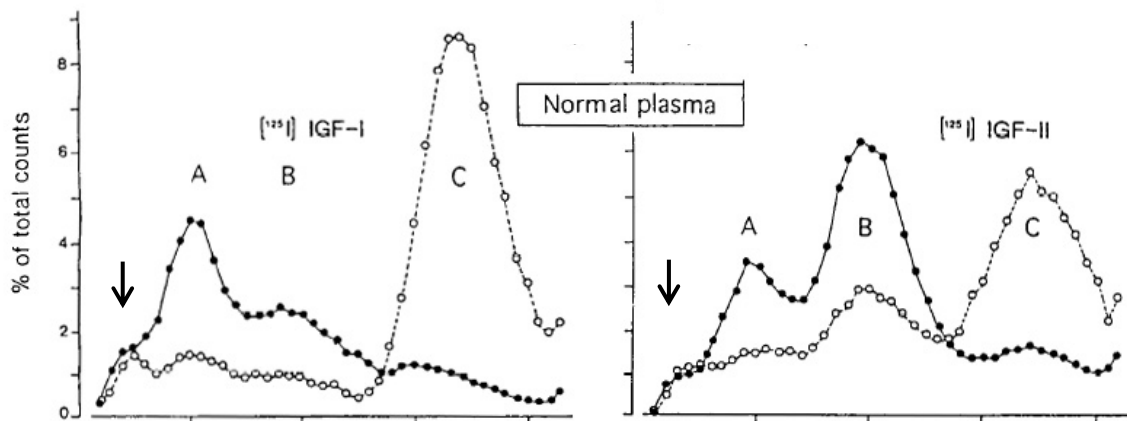


Abb.30: Gelfiltrationsprofile von $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I und $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II inkubiert mit humanem Plasma in An- (offene Kreise) und Abwesenheit (schwarze Kreise) von nicht-markiertem IGF-I/IGF-II. Die drei peaks A, B und C korrespondieren mit den Elutionsfraktionen von $[^{125}\text{I}]$ -IGF, das an IGFBP3 in einem ca. 150 kDa (A), einem ca. 40 kDa (B) Komplex gebunden oder als freies $[^{125}\text{I}]$ -IGF (C) vorkommt. Die Pfeile kennzeichnen Elutionsfraktionen von $[^{125}\text{I}]$ -IGF gebunden in einem > 150 kDa Komplex. Die Abbildung wurde aus Lassarre und Binoux (1994) entnommen.

Da die Proteine ALS, Plasminogen und Transferrin nachgewiesenermaßen über die Heparinbindungsdomäne an IGFBP-3 binden (Twigg und Baxter, 1998; Campbell et al., 1998; Weinzimmer et al., 2001), kann aus sterischen Gründen nur jeweils ein Protein in dem Komplex vorkommen. Denkbar wäre die Bindung dieser Proteine an eine andere Domäne des IGFBP-3, wofür es derzeit keine experimentellen Daten gibt. Die meisten der bisher *in vivo* und *in vitro* identifizierten Spaltstellen von IGFBPs befinden sich in der zentralen, nicht-konservierten Region (Conover et al., 1995; Imai et al., 1997). Daher ist anzunehmen, daß die IGFBP-Protease in diesem Bereich an das IGFBP (-3) bindet. Daß die IGFBP Protease einen dimeren Komplex mit IGFBP-3 eingeht, ist dagegen unwahrscheinlich; eher deuten alle Daten darauf hin, daß es einen trimeren bzw. quartären Komplex aus IGF-IGFBP-Protease bzw. IGF-IGFBP-Protease-Inhibitor gibt. Der Inhibitor muß aber nicht, wie aus den vorliegenden Daten abgeleitet wurde, Antithrombin III sein. Das Beispiel der IGFBP Protease PAPP-A zeigt, daß diese Protease nur nach der Aktivierung durch IGF-II in der Lage ist, IGFBP-4 zu spalten (Lawrence et al., 1999). Das läßt vermuten, daß die Protease entweder als intaktes Enzym mit IGFBP-3-IGF im trimeren Komplex vorliegt, der nach Bindung von IGF-II zum quartären aktiven IGF-Protease-IGFBP-IGF Komplex wird, oder IGFBP-IGF und die inaktive Protease liegen getrennt vor und erst nach Bindung von IGF-II an die Protease geht diese eine Bindung mit IGFBP-3 ein. Wie das Beispiel PAPP-A zeigt, könnte eventuell auch die hier detektierte 92 kDa IGFBP-3 Serinprotease direkt an die IGF-II-Affinitätsmatrix binden. Da von anderen

Arbeitsgruppen berichtet wurde, daß IGFBP-3 im Plasma vor Proteolyse geschützt ist, wofür die Bindung eines Inhibitors an die Heparinbindungsdomäne Voraussetzung ist (Maile et al., 2000; Maile et al., 1998), und die Protease vermutlich an die zentrale Region des IGFBP-3 bindet, ist auch die Existenz multimerer Komplexe im Plasma, bestehend aus IGFBP-3-IGF-Protease-Transferrin bzw. IGFBP-3-IGF-Protease-Plasminogen, denkbar (Abb. 29).

Zukünftige Arbeiten müssen durch Einbeziehung von IGFBP-3 Mutanten (z.B. Mutanten deren Heparinbindungsdomäne mutiert ist oder N- bzw. C-terminale IGFBP-3 Fragmente) in BIAcore Messungen zeigen, welche Domäne im IGFBP-3 bzw. im Plasminogen für die intermolekulare Wechselwirkung wichtig ist. Andererseits könnte der direkte Vergleich zwischen IGF-II und IGF-II-Mutanten (des1-6 IGF-II, das die Bindungsfähigkeit an IGFBPs verloren hat oder [Leu²⁷] IGF-II, das nicht mehr an den IGF-Rezeptor binden kann) zeigen, welche Regionen im IGF-II an Plasminogen binden.

5.3 Untersuchungen an humanem Schwangerenserum

Die Ergebnisse der Arbeiten zur Identifizierung neuer IGF/IGFBP-bindender Proteine wurden parallel mit Arbeiten an IGFBP-Protease-haltigen Fraktionen aus humanem Schwangerenserum ausgeführt. Proteine aus humanem Schwangerenserum (15.-40. Woche) wurden über Ammoniumsulfatfällung (30 und 45%) fraktioniert und konzentriert und anschließend mittels Gelfiltration (S-400) aufgetrennt (Kübler et al., 1998). Es wurden zwei Proteinfractionen mit molaren Massen von etwa 600 kDa (Pool I) und 50-100 kDa (Pool II) gebildet, in denen Proteaseaktivität gegenüber IGFBP-3, -4 und -5 detektiert wurde. In Pool II ließ sich eine ca. 50-68 kDa IGFBP Protease der Disintegrin- und Metalloproteasefamilie nachweisen (Kübler et al., 1998). Pool I wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Die Silberfärbung eines Aliquots von Pool I zeigte überraschend, daß nur Proteine mit molaren Massen von 100/95, 70, 60, 55 und 46 kDa nachweisbar waren. Diese Proteine bilden offensichtlich in unterschiedlicher Stöchiometrie den 600 kDa Komplex des Pool I. Über Westernblot Analyse konnten in der vorliegenden Arbeit Transferrin, Plasminogen, Antithrombin III und der lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor als Komponenten der Pool I-Fraktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Plasma Cohn Fraktion IV liegt eine deutlich größere Menge (27-fach erhöht) an IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in der Pool I-Fraktion vor. Der IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor spielt eine essentielle Rolle in der Regulation des extrazellulären IGF - II Spiegels, indem er das IGF-II über den Endocytoseweg dem Abbau im Lysosom zuführt

(Braulke, 1999). Eine Verminderung der Anzahl an Rezeptoren an der Plasmamembran durch Proteolyse (Clairmont und Czech, 1991) wäre daher während der Schwangerschaft sinnvoll. Der trunkierte lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor behält seine Fähigkeit Liganden zu binden bei und ist so in der Lage zusätzlich zu den IGFBPs die Wirkungen von IGF-II zu modulieren (Scott et al., 1996). Möglicherweise unterscheidet sich der lösliche IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor von den IGFBPs in der Bevorzugung bestimmter IGF-Formen zur Bindung (Valenzano et al., 1995). Weiterhin wurden Westernblot Analysen auf die Präsenz des Komplementfaktors C3 durchgeführt, da andere Arbeiten darauf hinweisen, daß Komplementfaktoren, wie C1s als spezifische IGFBP-5 Protease, eine Rolle im IGF-System spielen (Busby et al., 2000) und C3-Fragmente zusammen mit IGFBP-3 Fragmenten bei einer Aufreinigung von Plasma von Patienten mit akutem Nierenversagen gefunden wurden (Schebek-Fürstenberg et al., 2004). Es konnte ebenfalls die schwangerschaftsspezifische Metalloprotease PAPP-A über Westernblot Analyse detektiert werden. Es ist bekannt, daß der Komplementfaktor C3 und PAPP-A während der Schwangerschaft in einem hochmolekularen Komplex vorliegen. Dabei ist C3 eine Komponente eines 2:2:2 Heterohexamers mit Angiotensin und der Vorläuferform des eosinophilen „Major Basic Proteins“ (proMBP). PAPP-A bindet ebenfalls an das proMBP über Disulfidbrücken als 2:2 Heterotetramer mit einer ungefähren molekularen Masse von 400 kDa (Byun et al., 2001). Über Massenanalyse konnten zusätzlich Albumin, α -Antitrypsin und Apolipoprotein E in der PoolII-Fraktion identifiziert werden. Bei allen drei Proteinen handelt es sich um häufig vorkommende Plasmaproteine (Albumin 35-50 g/l, α -1-Antitrypsin 1,5-3,5 g/l, Apolipoprotein E 0,5 g/l). α -1-Antitrypsin ist wie Antithrombin III ein Serinproteaseinhibitor. Apolipoprotein E vermittelt die Bindung, die Internalisierung und den Abbau von Lipoproteinpartikeln. Die Proteinkonzentration der PoolII-Fraktion betrug 150 mg/ml und Albumin macht, wie auch die Silberfärbung zeigt, fast die Hälfte der Proteine aus. Diese hohe Konzentration an Albumin stellte für die weiteren Versuche eine Schwierigkeit dar, da das Albumin Proteinbanden überdeckte bzw. die elektrophoretische Mobilität der Proteine veränderte. Die eingesetzten Methoden zur Abtrennung der glykosylierten Proteine vom Albumin über Gelfiltration (S-300), 2-D-Gelelektrophorese oder Concanavalin A-Affinitätssäulen stellten sich als nicht geeignet heraus.

Über IGFBP-3 Overlayblot Analyse konnten insgesamt sechs IGFBP-3-bindende Proteine mit molekularen Massen von ca. 220, 150/145, 100/95 und 40 kDa in der PoolII-Fraktion nachgewiesen werden. Die Konzentration dieser Proteine war allerdings so gering, daß sie

nicht als prominente Proteinbanden im Silbergel sichtbar gemacht werden konnten. Eine eindeutige Identifikation über Massenanalyse konnte nicht erfolgen, allerdings sind Proteine wie Plasminogen (97 kDa) und das PAPP-A-Dimer (ca. 200 kDa) passende Kandidaten für die 100/95 und 220 kDa IGFBP-3-bindende Proteinbande. Beim 40 kDa Protein könnte es sich um IGFBP-3 handeln, dessen elektrophoretische Mobilität durch das Albumin verändert wurde und das mit dem [¹²⁵I]-IGFBP-3 dimerisiert. Die 150/145 kDa Proteinbande bleibt unbekannt.

In der Pool I-Fraktion des Schwangerenserums konnten weiterhin zwei IGFBP-3 Proteasen nachgewiesen werden. Substratzymographien deuten darauf hin, daß es sich um eine 100 kDa und um eine 50 kDa Protease handelt. Ein Proteaseassay mit glykosyliertem [¹²⁵I]-IGFBP-3 zeigte, daß die Pool-I Fraktion auch in geringsten Mengen das *in vivo* vorkommende glykosylierte IGFBP-3 komplett degradieren kann. Bei der 50 kDa Protease, die Metallionen-abhängig ist, handelt es sich nach Westernblot Analyse mit einem Antikörper, der gegen die konservierte Domäne der ADAM 12-S gerichtet ist, um eine Protease aus der Familie der ADAMs. Kübler et al. (1998) konnten ebenfalls eine 50 kDa Protease aus der Familie der ADAMs in der Pool-II Fraktion des Schwangerenserums identifizieren, die offensichtlich auch in der Pool I-Fraktion vertreten ist. Die Familie der Disintegrin- und Metalloproteasen beinhaltet derzeit ca. 34 Proteine (Seals und Courtneidge, 2003) mit einer charakteristischen konservierten Struktur bestehend aus einer Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cystein-reichen-, transmembran- und einer cytoplasmatischen Domäne (Loechel et al., 1998). Die ADAM 12 mRNA, die am stärksten in der Placenta exprimiert wird, durchläuft ein alternatives Splicing, was zur Synthese der sezernierten löslichen Form ADAM 12-S führt (Gilpin et al., 1998). ADAM 12-S wurde nur im Schwangerenserum nachgewiesen, wo sie hochstabil ist, und in Konzentrationen von 180 µg/l in der 8. Woche bis zu 12.000 µg/l gegen Ende der Schwangerschaft vorkommt (Laigaard et al., 2003). ADAM 12-S bindet IGFBP-3 (Shi et al., 2000) und besitzt proteolytische Aktivität gegenüber IGFBP-3 und in einem geringeren Maße gegenüber IGFBP-5. Vorliegende Inhibitorstudien zeigten, daß die 100 kDa IGFBP-3 Protease weder mit dem Serinproteaseinhibitor Aprotinin und den Metalloproteaseinhibitoren 1,10-Phenanthrolin/EDTA noch mit den hier verwendeten Aspartyl- und Cysteinproteaseinhibitoren hemmbar war. Die Identifizierung der 100 kDa Protease war mit den hier verwendeten protein-chemischen Methoden nicht ausführbar. Es ist denkbar, daß sich mehrere IGFBP-3 Proteasen ähnlicher Größe in der Gelelektrophorese überlagern und somit die Ergebnisse von Inhibitorstudien verfälschen

könnten. Vorstellbar ist auch eine gegenseitige Aktivierung oder Hemmung mehrerer IGFBP-3 Proteasen im Schwangerenserum. Bang und Fielder (1997) konnten in einem höhermolekularen zirkulierenden Komplex im Schwangerenserum eine 150 kDa und eine 70-90 kDa Fraktion detektieren, die proteolytische Aktivität gegenüber IGFBP-3 zeigten. Die Protease in der ≥ 150 kDa Fraktion konnte mit EDTA und Zink²⁺ gehemmt werden. Die Proteaseaktivität der 70-90 kDa Fraktion war mit Serinproteaseinhibitoren, wie Aprotinin und α -2-Antiplasmin, hemmbar und wurde als Plasminogen bzw. Plasmin identifiziert (Bang und Fielder, 1997). Maile et al. (1998) detektierten ebenfalls IGFBP-3 Proteaseaktivität in zwei Fraktionen aus Schwangerenserum, die mit Markerproteinen für 200 kDa und 60 kDa von einer Superose-12-Säule koeluierten. Aufgrund von Inhibitorstudien wurde eine Kombination aus mindestens einer Metalloprotease und einer Serinprotease in der 200 kDa Fraktion angenommen. Bei der IGFBP-3 Protease in der 60 kDa Fraktion könnte es sich vermutlich um ADAM 12-S handeln. Gegenwärtig bietet sich kein experimenteller Ansatz um die Identität der 100 kDa Protease aus Pool I des Schwangerenserums zu bestätigen.

5.4 Funktionelle und physiologische Relevanz des IGF-bindenden Komplexes

Ein Beispiel für die physiologische Relevanz von IGF- und IGFBP-bindenden Protein-Komplexen ist die Wirkung von Vitronectin auf Zellen. So fördert Vitronectin in einem dimeren Komplex mit IGF-II oder als ternärer Komplex mit IGF-I und IGFBPs die Proliferation, Migration und Zelladhäsion von Keratinocyten (Hyde et al., 2004) und die Steigerung der DNA-Synthese in glatten Muskelzellen (Nam et al., 2002).

Um die funktionelle und physiologische Relevanz der Wechselwirkung von IGFBP-3, Transferrin und IGF-II zu untersuchen, wurden MDCK-Zellen als Modellsystem benutzt. Es ist beschrieben worden, daß MDCK-Zellen den IGF-I und den IGF-II/M6P-Rezeptor, nicht aber den Insulin-Rezeptor exprimieren (Magee und Siddle, 1988; Prydz et al., 1990). Zusätzlich konnte IGF-II mRNA, aber keine IGF-I mRNA in MDCK-Zellen detektiert werden (Ernest et al., 1995). MDCK-Zellen wurden in dieser Arbeit stabil mit der cDNA von humanem IGFBP-3 und Transferrin transfiziert. Es konnten jedoch während der Selektion mit Blasticidin und Hygromycin keine Zellklone gefunden werden, die IGFBP-3 und Transferrin gleichzeitig exprimierten. Es wurde daher mit den jeweiligen einzelexprimierenden Klonen gearbeitet. Halbquantitative Westernblot Analysen zeigten, daß die verwendeten Klone etwa 780 ng IGFBP-3/24 h/mg Protein und 3,8 µg

Transferrin/24 h/mg Protein sezernierten. Das überexprimierte Transferrin weist eine leicht verzögerte elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE gegenüber aufgereinigtem humanem Transferrin auf, was wahrscheinlich auf ein verändertes Glykosylierungsmuster in MDCK-Zellen im Vergleich zu menschlichen Leberzellen schließen läßt. Die veränderte Glykosylierung erhöhte die molekulare Masse von Transferrin um ca. 5 kDa. Das stabil exprimierte IGFBP-3 zeigte ebenfalls eine Veränderung gegenüber der humanen Kontrolle in der Westernblot Analyse. Die dreifach glykosylierte 45 kDa Bande konnte bei keinem der Klone detektiert werden, was darauf hinweist, daß der Asn¹⁷²-Rest nicht glykosyliert zu sein scheint (Firth und Baxter, 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die stabile Überexpression von Transferrin oder IGFBP-3 einen Einfluß auf IGF-abhängige Zellproliferation und Aminosäure-Aufnahme von MDCK-Zellen hat. Die Zellproliferation von Transferrin- und IGFBP-3-exprimierenden MDCK-Zellen wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin in die DNA gemessen und mit nicht-transfizierten Zellen verglichen. Zunächst konnte beobachtet werden, daß sich die basale Proliferationsrate von Kontrollzellen bei Überexpression von Transferrin oder IGFBP-3 um 24% (Transferrin Klon 1) /34% (Klon 9) bzw. 17% für IGFBP-3 verringerte. Die Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den Transferrin Klonen 1 und 9 (76 bzw. 66% gegenüber 100% von Kontrollzellen), die beide ungefähr die gleiche Expressionsrate (ca. 1,1 µg bzw. 750 ng/24 h/mg Protein) aufweisen, sind zu vernachlässigen. Eine Erklärung für die erniedrigten basalen Proliferationsraten bietet die Möglichkeit, daß das im Überschuß im Medium vorliegenden IGFBP-3 und Transferrin die autokrine/parakrine Wirkung der IGFs durch Sequestrierung hemmt. Zusätzlich könnte Transferrin als IGFBP-3-assoziiertes Protein die IGF-unabhängigen Wirkungen von IGFBP-3 regulieren. Als IGF-unabhängige Wirkung von intaktem IGFBP-3 wurde z.B. die Wachstumshemmung von IGFBP-3 transfizierten Mausfibroblasten beschrieben (Cohen et al., 1993). Somit könnten bei Überexpression von Transferrin und IGFBP-3 möglicherweise additive Effekte IGF-unabhängiger Wirkungen auftreten (17 % Hemmung durch IGFBP-3 vs 34% Hemmung durch Transferrin und IGFBP-3). Andererseits sind die wachstumsfördernden Effekte des Transferrins auf zellulärer Ebene gut untersucht. Transferrin wird für die Zellbeweglichkeit, Differenzierung und Proliferation in vielen Zellkultursystemen benötigt (Aizenman und de Vellis, 1987; Briere et al., 1991; Hutchings und Sato, 1978). Bei Transferrin-Defizienz weisen Zellen eine erhöhte Apoptoserate auf (Muta und Krantz, 1995). In der vorliegenden Arbeit förderte die Sekretion von Transferrin die IGF-stimulierte Zellproliferation von MDCK-Zellen um das 1,8-fache gegenüber nicht-

transfizierten MDCK-Zellen. Dagegen konnte bei Expression von IGFBP-3 in MDCK-Zellen erwartungsgemäß keine Erhöhung der Proliferationsrate beobachtet werden. Aufgrund der geringen Bindungsaffinität für IGF-I (K_D 976 nM) wird sich die Anwesenheit von Transferrin nicht auf die Wechselwirkungen von IGF-I mit den IGF-I-Rezeptoren auswirken, während das sezernierte IGFBP-3 erwartungsgemäß das IGF-I sequestriert und stimulierende Effekte unterdrückt. Weiterhin wurden Experimente zum Einfluß von überexprimiertem Transferrin oder IGFBP-3 auf die IGF-abhängige Aminosäure-Aufnahme von MDCK-Zellen durchgeführt. Dabei wurde, stellvertretend für die Aminosäure-Aufnahme allgemein, die Aufnahme des nicht metabolisierbaren Aminosäure-Analogons α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure in MDCK-Zellen gemessen. Es konnte beobachtet werden, daß sich die basale Aminosäure-Aufnahmerate bei Überexpression von Transferrin oder IGFBP-3 um 30 bzw. 18% verringerte. Eine Erklärung bietet auch hier die Möglichkeit, daß das im Überschuß im Medium vorliegenden IGFBP-3 und Transferrin die autokrine/parakrine Wirkung der IGFs durch Sequestrierung hemmt, so daß nur eine geringe Steigerung (1,4-fach für Transferrin und 1,2-fach für IGFBP-3) der Aminosäure-Aufnahmerate erzielt werden konnte. Die Analyse von Medien, die für 24 h von Transferrin- bzw. IGFBP-3-überexprimierenden Zellen konditioniert und dann für 3 weitere Stunden in Anwesenheit von IGF-I inkubiert wurden, zeigte überraschenderweise eine Zunahme der Transferrin- bzw. IGFBP-3-Menge um das 3,5-fache bzw. 3,6-fache. Wenn jedoch von den gleichen Zellen anschließend die Aufnahme von α -[1- 14 C]-Methylaminoisobuttersäure gemessen wurde, war nur eine geringe IGF-abhängige Steigerung (1,4- bzw. 1,2-fach) der Aminosäure-Aufnahme meßbar. Ob die dreistündige Vorinkubation der Zellen mit IGF-I zu der hier gefundenen gesteigerten Transkription/Translation von Transferrin und IGFBP-3 führt, die sich so klar im Westernblot nachweisen ließ, ist zu bezweifeln. Die Transkription bzw. Translation müßte durch die Quantifizierung der mRNAs bzw. durch die Bestimmung der Syntheserate durch Immunpräzipitation bestimmt werden. Eher muß daher von einer kurzfristigen IGF-stimulierten Freisetzung von Transferrin aus intrazellulären Kompartimenten (z.B. Endosomen) bzw. von oberflächengebundenem IGFBP-3 ausgegangen werden (Martin et al., 1992).

Im einem anderen Ansatz wurde der Einfluß von exogenem Transferrin (50 μ g/ml) und Plasminogen (25 μ g/ml) getrennt auf die Aminosäure-Aufnahme in nicht-transfizierten MDCK-Zellen und MDCK-IGFBP-3-Zellen in Abhängigkeit von IGF-I untersucht. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurden für Proliferationsexperimente an CHO („Chinese

hamster ovary“-Zellen 10 µg/ml humanes Transferrin benutzt (Sunstrom et al., 2000). Die hier eingesetzten Konzentrationen von Transferrin wurden höher gewählt, da in Vorversuchen gezeigt wurde, daß Transferrin (50 µg/ml) die IGFBP-3 Synthese in IGF-II/M6P-Rezeptor-IGF-II-Doppelknockout-Fibroblasten maximal stimulierte (Bräulke, unveröffentlichte Resultate). Die Wirkungen von Transferrin und Plasminogen auf die Aminosäure-Aufnahme sind abhängig von der Vorinkubationszeit. Eine dreistündige Inkubation mit Transferrin bzw. Plasminogen führte zu einer leicht reduzierten IGF-I stimulierten Aminosäure-Aufnahmerate (180 bzw. 170% gegenüber 220% für stimulierte Kontrollzellen), die nach einer 24-stündigen Inkubation nahezu auf die Aminosäure-Aufnahmerate der nicht-stimulierten Kontrollzellen absank (126 bzw. 100%). Diese veränderte Aminosäure-Aufnahme könnte auf die Bindung von IGF-I durch Plasminogen (K_D für IGF-II 5 nM) zurückzuführen sein, die so die Bindung von IGF-I an den Rezeptor verhindert. Bei MDCK-IGFBP-3-Zellen ließ sich die Aminosäure-Aufnahmerate nach Zugabe von IGF-I erwartungsgemäß (siehe Abb. 28) nicht steigern. Die simultane Inkubation mit Transferrin und IGF-I für 3 und 24 Stunden erhöht die Aminosäure-Aufnahmerate auf 113 bzw. 108% gegenüber IGF-I-stimulierten Kontrollzellen. Aus der Analyse der BIAcore-Daten ließ sich erwarten, daß die gleichzeitige Präsenz von Transferrin und IGFBP-3 die Gesamtaffinität zu IGF-I verbessert (Storch et al., 2001), also zu einer noch stärker reduzierten oder zumindest unveränderten IGF-I stimulierten Aminosäure-Aufnahme führt. Die Konzentrationen von Transferrin (12 nM) und IGFBP-3 (6 nM) im Medium der MDCK-Zellen lassen sich allerdings nur begrenzt mit den eingesetzten Mengen an Transferrin und IGFBP-3 (je 50-350 nM) in der BIAcore-Analyse vergleichen. Bei einer dreistündigen Inkubation der MDCK-IGFBP-3-Zellen mit einer Kombination aus Plasminogen und IGF-I ließ sich eine Erniedrigung der Aminosäure-Aufnahme auf 57% beobachten, während eine 24-stündigen Inkubation ebenfalls zu einer leicht erhöhten Aminosäure-Aufnahmerate auf 99% (in Bezug auf 70% basale Aminosäure-Aufnahmerate der Kontrollzellen) führte. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Plasminogen zu IGFBP-3 (K_D 1,3 nM) könnte die Bindung von IGF-I an IGFBP-3 vermindert sein oder Plasminogen könnte anstelle des IGFBP-3 an IGF-I binden. Das erklärt allerdings nicht, daß bei einer kurzen Inkubation von 3 h eine Erniedrigung der Aminosäure-Aufnahme auf 57% auftritt. Der molekulare Mechanismus, wie das IGF-I aus der Bindung mit Plasminogen freigesetzt wird und an den IGF-I-Rezeptor binden kann, ist noch unbekannt und benötigt weitere Studien.

5.4.1 Polare Sekretion von IGFBP-3 und Transferrin

Epitheliale Zellen, wie Nierentubulus- oder Intestinalzellen, die eine Permeabilitätsbarriere zwischen zwei Kompartimenten des Körpers bilden, besitzen eine einzigartige strukturelle und funktionale Zellorganisation. Die Plasmamembran dieser Zellen ist durch „tight junctions“ voneinander in zwei distinkte Domänen, die als apikal und basolateral bezeichnet werden, getrennt. Die apikale Membran ist zum Lumen des jeweiligen Organs ausgerichtet, die basolaterale zur Basalmembran (Blutseite) oder zu Zellen des angrenzenden Gewebes. Die Domänen unterscheiden sich deutlich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung. Unterschiede in der Verteilung von Transmembranproteinen werden durch eine komplexe Maschinerie aufrechterhalten, die distinkte Signale für eine apikale bzw. basolaterale Sortierung benutzt (Mostov et al., 2000). Für lösliche Proteine sind die Sortierungsmechanismen in polarisiert gewachsenen Zellen noch weitgehend unklar. Modifikationen in den Zuckerketten spielen eine wichtige Rolle in der apikalen Sortierung sezernierter Proteine. Scheiffele et al. (1995) konnten demonstrieren, daß Ratten Wachstumshormon (rGH) in MDCK-Zellen nach der Einführung einer oder zwei N-Glykosylierungsstellen direkt zur apikalen Domäne transportiert wird. In der humanen Colon-Carcinoma-Zelllinie (HT29-D4) wurden IGFBP-2 und -4 zur basolateralen Seite, IGFBP-6 hingegen zur apikalen Plasmamembran transportiert (Remacle-Bonnet et al., 1995). Shalamanova et al. (2001) zeigten, daß von polar auf Filtern gewachsenen MDCK-Zellen die endogenen IGFBPs bevorzugt in das apikale Medium sezerniert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, daß IGFBP-3 zu 68% apikal transportiert wird. Transferrin wird hingegen basolateral sortiert (nach 48 h zu 95%). Die Zugabe von Ammoniumchlorid (10 mM) veränderte die Sortierung des Transferrins zur basolateralen Seite nicht, was für einen pH-unabhängigen Transport spricht. Es wird angenommen, daß die basolaterale Sortierung von neu synthetisierten Proteinen einen Standardweg der Exocytose darstellt, wohingegen die apikale Sortierung signalabhängig ist und im *trans*-Golgi-Netzwerk der MDCK-Zellen reguliert wird (Matter und Mellmann, 1994). Aufgrund von veränderter Glykosylierung ist es fraglich, ob die Sortierung von Transferrin und IGFBP-3 in MDCK-Zellen direkt mit anderen Zellsystemen verglichen werden kann.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Komplexität des IGF/IGFBP-Systems in kultivierten Zellsystemen. Anschließend müßten sich Experimente, die andere Aspekte wie den Einfluß von Transferrin und IGFBP-3 auf Zellmigration oder Adhäsion untersuchten.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Überexpression von anderen Komponenten des Komplexes wie Plasminogen oder eine Kombination von Proteinen wie z.B. Plasminogen und Transferrin in MDCK-Zellen und die Untersuchung der daraus resultierenden Effekte auf Zellproliferation und Aminosäure-Aufnahme. Andererseits ist zu diskutieren, ob Proteininteraktionen, die im Plasma stattfinden, generell auf ein Zellsystem mit ECM übertragbar sind. Es müßten sich daher Experimente zur Bindung von Plasminogen an Zelloberflächen anschließen. Schließlich müßte untersucht werden, ob oberflächengebundenes IGFBP-3 durch den Zusatz von Transferrin und/oder Plasminogen abgelöst oder stärker gebunden wird.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II) stimulieren Wachstum, Differenzierung und Überleben von verschiedenen Zelltypen über endokrine, parakrine und autokrine Mechanismen. Neben den Hauptkomponenten des IGF-Systems, den IGFs, den IGFBPs sowie den IGF-Rezeptoren und den IGFBP-Proteasen, interagieren eine Reihe von weiteren Proteinen mit IGFs und IGFBPs, was möglicherweise zur zell- und gewebespezifischen Feinregulation von IGF-Wirkungen beiträgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste biochemische und zellbiologische Methoden eingesetzt, um neue Proteine der IGF-Achse aus Plasmafraktionen und Serum zu identifizieren und zu charakterisieren, die mit humanen IGFs und IGFBPs interagieren.

- Mit Hilfe einer IGF-II Affinitätschromatographie wurden vier Proteine gereinigt und als IGFBP-3, IGFBP-5, Transferrin und Plasminogen identifiziert. Westernblot Analysen wiesen zusätzlich die Präsenz von Antithrombin III, Präkallikrein und von IGF-II/Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Formen im Eluat der Affinitätssäule nach.
- Zusätzlich zu den klassischen IGFBPs gehört Plasminogen zu der Familie der hochaffinen Bindungsproteine für IGF-II.
- BIAcore Analysen zeigten, daß Plasminogen auch mit einer hohen Affinität an IGFBP-3 bindet und potentiell mit anderen IGFBP-3-assoziierten Proteinen wie Transferrin an der Bildung von neuen dimeren, trimeren oder oligomeren IGF/IGFBP Komplexen beteiligt sein kann.
- Von der IGF-II Affinitätsmatrix wurde auch eine 92 kDa IGFBP-3 Protease eluiert. Ob die Protease direkt oder indirekt über IGFBP oder IGFBP-assoziierte Proteine an die IGF-II-Matrix bindet, ist unklar.
- IGFBP-Proteaseaktivität läßt sich im Schwangerenserum durch Gelfiltration in zwei Fraktionen auffinden, die eine molare Masse von 600 kDa (Pool I) und 50 kDa (Pool II) aufweisen. In Pool I konnte neben einer 50 kDa Protease aus der Familie der Disintegrin- und Metalloproteasen (ADAMs), die sich auch in Pool II fand, eine 100 kDa Protease charakterisiert werden, deren proteolytische Aktivität nicht mit Serin- und Metalloproteaseinhibitoren hemmbar war.

- Zellbiologische Arbeiten an Transferrin- und IGFBP-3-überexprimierenden MDCK-Zellen zeigten, daß die IGF-I-abhängige Zellproliferation und Aminosäure-Aufnahme im Vergleich mit nicht-transfizierten MDCK-Zellen vermindert war.
- In polarisiert wachsenden MDCK-Zellen wird IGFBP-3 bevorzugt apikal und Transferrin bevorzugt basolateral sortiert.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Existenz von Proteinen in der Zirkulation mit multiplen Funktionen (wie z.B. Fe³⁺-Transportmolekül Transferrin; proteolytische Vorstufenform Plasminogen; Integrinrezeptor interagierendes Vitronectin), die gleichzeitig durch die Bindung von IGF-II oder Assoziation mit IGFBP-3 oder beidem an der Bioverfügbarkeit von IGFs beteiligt sein können bzw. auf zellulärer Ebene physiologische Wirkungen der IGFs wie Stimulation der Proliferation bzw. Aminosäure-Aufnahme modulieren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aizenman Y, de Vellis J. 1987. Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 406:32-42.
- Arai T, Clarke JB, Parker A, Busby W, Nam T, Clemmons DR. 1996. Substitution of specific amino acids in insulin-like growth factor (IGF) binding protein 5 alters heparin binding and its change in affinity to IGF-I in response to heparin. *J Biol Chem* 269:6099-6106.
- Bang P, Brismar K, Rosenfeld R. 1994. Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in non-insulin dependent diabetes mellitus serum, with elevation of a 29 kDa glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130-150 kDa ternary complex. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1119-1127.
- Bang P, Fielder PJ. 1997. Human pregnancy serum contains at least two distinct proteolytic activities with the ability to degrade insulin-like growth factor binding protein-3. *Endocrinology* 138(9):3912-3917.
- Baumrucker CR, Erondue NE. 2000. Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:53-64.
- Baxter RC. 1990. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (α) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1347-1353.
- Baxter RC. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(6):E967-976.
- Baxter RC, Firth JD. 1995. Modulation of human IGF binding protein-3 activity by structural modifications. *Prog Growth Factor Res* 6:215-222.
- Baxter RC, Martin JL. 1989. Structure of the M_r 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6898-6902.
- Baxter RC, Martin JL, Beniac VA. 1989. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J Biol Chem* 264:11843-11848.

- Baxter RC, Meka S, Firth SM. 2002. Molecular distribution of IGF-binding protein-5 in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 87:271-276.
- Bennet AE, Wahner HW, Riggs BL, Hintz RL. 1984. Insulin-like growth factor I and II: aging and bone density in women. *J Clin Endocrinol Metab* 59:701-704.
- Besnard V, Corroyer S, Trugnan G, Chadelat K, Nabeyrat E, Cazals V, Clement A. 2001. Distinct patterns of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 expression in oxidant exposed lung epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1538(1):47-58.
- Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. 1989. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *Embo J* 8:2497-2502.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Gauggel E, Zeisel HJ, Bierich JR. 1990. A specific radioimmunoassay for the growth hormone (GH)-dependent somatomedin-binding protein: its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70(5):1292-1298.
- Booth BA, Boes M, Andress DL, Dake BL, Kiefer MC, Maack C, Linhardt RJ, Bar K, Caldwell EE, Weiler J. 1995. IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Regul* 5(1):1-17.
- Booth BA, Boes M, Bar RS. 1996. IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments. *Am J Physiol* 271(3 Pt 1):E465-470.
- Booth BA, Boes M, Dake BL, Bar RS. 1999. Isolation and characterization of plasmin-generated bioactive fragments of IGFBP-3. *Am J Physiol* 276(3 Pt 1):E450-454.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braulke T. 1996. Origin of lysosomal proteins. Lloyd JB, Mason RW, editors. New York: Plenum Press. 15-49 p.
- Braulke T. 1999. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm Metab Res* 31(2-3):242-246.

- Briere N, Ferrari J, Chailler P. 1991. Insulin and transferrin restore important cellular functions of human fetal kidney in serum-free organ culture. *Biochem Cell Biol* 69:256-262.
- Busby WH, Jr., Nam TJ, Moralez A, Smith C, Jennings M, Clemmons DR. 2000. The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium. *J Biol Chem* 275(48):37638-37644.
- Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. 1999. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 77(3):256-262.
- Byun D, Mohan S, Yoo M, Sexton C, Baylink DJ, Qin X. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 86(2):847-854.
- Campbell PG, Andress DL. 1997. Plasmin degradation of insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): regulation by IGFBP-5-(201-218). *Am J Physiol* 273(5 Pt 1):E996-1004.
- Campbell PG, Durham SK, Hayes JD, Suwanichkul A, Powell DR. 1999. Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin. *J Biol Chem* 274(42):30215-30221.
- Campbell PG, Durham SK, Suwanichkul A, Hayes JD, Powell DR. 1998. Plasminogen binds the heparin-binding domain of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Am J Physiol* 275:321-331.
- Campbell PG, Novak JF, Yanosick TB, McMaster JH. 1992. Involvement of the plasmin system in dissociation of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 130(3):1401-1412.
- Causin C, Waheed A, Braulke T, Junghans U, Maly P, Humbel RE, von Figura K. 1988. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II-binding proteins in human serum and urine. Their relationship to the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Biochem J* 252:795-799.
- Cheung PT, Smith EP, Shimasaki S, Ling N, Chernausk SD. 1991. Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B104 rat neuronal cell line: chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 129:1006-1015.

- Clairmont KB, Czech MP. 1991. Extracellular release as the major degradative pathway of the insulin-like growth-factor II/ mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 266:12131-12134.
- Claussen M, Kübler B, Wendland M, Neifer K, Schmidt B, Zapf J, Bräulke T. 1997. Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* 138(9):3797-3803.
- Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JJ, Ankrapp DK. 1995. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res* 6(2-4):357-366.
- Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1984. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clin Endocrinol Metab* 13(1):113-143.
- Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG. 1992. Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 75(4):1046-1053.
- Cohen P, Lamson G, Okajima T, Rosenfeld R. 1993. Transfection of the human IGFBP-3 gene into BALB/c fibroblasts - a model for the cellular functions of IGFBPs. *Growth Regul* 3:23-26.
- Cohn E, Strong L, Hughes W. 1946. Preparation and properties of serum plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 68:459-675.
- Collen D. 2001. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:1-9.
- Conover CA. 2000. In vitro studies of insulin-like growth factor I and bone. *Growth Horm IGF Res* 10 Suppl B:S107-110.
- Conover CA, De Leon DD. 1994. Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. *J Biol Chem* 269:7076-7080.
- Conover CA, Durham SK, Zapf J, Masiarz F, Kiefer M. 1995. Cleavage analysis of insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis and expression of protease-resistant IGF-binding protein-4 mutants. *J Biol Chem* 270:4395-4400.

- Coppock HA, White A, Aplin JD, Westwood M. 2004. Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyze insulin-like growth factor-binding protein-1. *Biol Reprod* 71(2):438-443.
- Coverley JA, Baxter RC. 1997. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 128(1-2):1-5.
- Daughaday WH, Trivedi B, Kapadia M. 1981. Measurement of insulin-like growth factor II by a specific radioreceptor assay in serum of normal individuals, patients with abnormal growth hormone secretion, and patients with tumor-associated hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 53(2):289-294.
- Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, Pemberton LB, Lyman B, Underwood LE, Clemmons DR. 1992. Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 75:590-595.
- Dobrovolsky AB, Titaeva EV. 2002. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry* 67:116-126.
- Durham SK, Suwanichkul A, Hayes JD, Herington AC, Powell DR, Campbell PG. 1999. The heparin binding domain of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 increases susceptibility of IGFBP-3 to proteolysis. *Horm Metab Res* 31:216-225.
- Ernest S, Coureau C, Escoubet B. 1995. Deprivation of phosphate increases IGF-II mRNA in MDCK cells but IGFs are not involved in phosphate transport adaptation to phosphate deprivation. *J Endocrinol* 145:325-331.
- Fielder PJ, Guevera-Aguirre J, Rosenbloom AL, Carlsson L, Hintz RL, Rosenfeld R. 1992. Expression of serum insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs) and growth hormone-binding protein (GHBP) in heterozygote relatives of Ecuadorian GH-receptor deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 74:743-750.
- Firth SM, Baxter RC. 1999. Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 160(3):379-387.
- Firth SM, Baxter RC. 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23(6):824-854.
- Forbes BE, Turner D, Hodge SJ, McNeil KA, Forsberg G, Wallace JC. 1998. Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *J Biol Chem* 273(8):4647-4652.

- Fowlkes J, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. 1994a. Matrixmetalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem* 269:25742-25746.
- Fowlkes JL, Serra DM. 1996. Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 275:18574-18580.
- Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thraikill KM. 1994b. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteases. *Endocrinology* 135:2810-2813.
- Fowlkes JL, Thraikill KM, George-Nascimento C, Rosenberg CK, Serra DM. 1997. Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 138(6):2280-2285.
- Frost VJ, Macaulay VM, Wass JA, Holly JM. 1993. Proteolytic modifications of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Comparison of conditioned media from human cell lines, circulating proteases and characterized enzymes. *J Endocrinol* 138:545-554.
- Gibson TL, Cohen P. 1999. Inflammation-related neutrophil proteases, cathepsin G and elastase, function as insulin-like growth factor binding protein proteases. *Growth Horm IGF Res* 9:241-253.
- Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. 1998. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 273(1):157-166.
- Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG. 1990. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71(4):806-816.
- Gui Y, Murphy LJ. 2001. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) binds to fibronectin (FN): demonstration of IGF-I/IGFBP-3/FN ternary complexes in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2104-2110.
- Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol* 121:753-758.

- Hammer E, Kutsche K, Haag F, Ullrich K, Sudbrak R, Willig RP, Braulke T, Kübler B. 2004. Mono-allelic expression of the IGF-I receptor does not effect IGF responses in human fibroblasts. *Eur J Endocrinol* 151:521-529.
- 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 receptor. *Diabetologia* 35:216-223.
- Hashimoto Y, Ono M, Fujiwara H, Higashihashi N, Yoshida M, Enjoh-Kimura T, Sakano K. 1997. Binding sites and binding properties of binary and ternary complexes of insulin-like growth factor II (IGF II), IGF binding protein-3, and acid-labile subunit. *J Biol Chem* 272:27936-27942.
- Heussen C, Dowdle EB. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activation in polyacrylamide gels containing copolymerized substrates. *Anal Biochem* 102:196-202.
- Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M. 1990. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71(4):797-805.
- Humbel RE. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190(3):445-462.
- Hutchings SE, Sato GH. 1978. Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:901-904.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20(6):761-787.
- Hyde C, Hollier B, Anderson A, Harkin D, Upton Z. 2004. Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-Binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration. *J Invest Dermatol* 122:1198-1206.
- Imai Y, Busby W, Smith C, Clarke JB, Garmong A, Horwitz GD, Rees C, Clemmons DR. 1997. Protease-resistant form of insulin-like growth factor-binding protein 5 is an inhibitor of insulin-like growth factor-I actions on porcine smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 100:2596-2605.
- Jagues G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K. 1997. Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* 138:1767-1770.
- Jones JJ, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16(1):3-34.

- Jones JI, Gockerman A, Busby W, Wright G, Clemmons DR. 1993. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10553-10557.
- Kalus W, Zweckstetter M, Renner C, Sanchez Y, Georgescu J, Grol M, Demuth D, Schumacher R, Dony C, Lang K, Holak TA. 1998. Structure of the IGF-binding domain of the insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5): implications for IGF and IGF-I receptor interactions. *Embo J* 17(22):6558-6572.
- Karas M, Koval AP, Zick Y, D. L. 2001. The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of receptor substrate-4 and crk-II. *Endocrinology* 142:1835-1840.
- Kiepe D, Andress DL, Mohan S, Ständker L, Ulinski T, Himmele R, Mehls O, Tönshoff B. 2001. Intact IGF-binding protein-4 and -5 and their respective fragments isolated from chronic renal failure serum differentially modulate IGF-I actions in cultured growth plate chondrocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:2400-2410.
- Kiess W, Greenstein LA, White RM, Lee L, Rechler MM, Nissley SP. 1987. Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(21):7720-7724.
- Körner C, Nürnberg B, Uhde M, Bräulke T. 1995. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. *J Biol Chem* 270:287-295.
- Kricker JA, Towne CL, Firth SM, Herington AC, Upton Z. 2003. Structural and functional evidence for the interaction of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins with vitronectin. *Endocrinology* 144(7):2807-2815.
- Kübler B, Cowell S, Zapf J, Bräulke T. 1998. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins by a novel 50-kilodalton metalloproteinase in human pregnancy serum. *Endocrinology* 139(4):1556-1563.
- Kübler B, Draeger C, John H, Andag U, Scharf J, Forssmann W, Bräulke T, Ständker L. 2002. Isolation and characterization of circulating fragments of the insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Lett* 518(1-3):124-128.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(259):680-685.
- Laigaard J, Sørensen T, Frøhlich C, Nørgaard Pedersen B, Christiansen M, Schiøtt K, Uldbjerg N, Albrechtsen R, Clausen HV, Ottesen B, Wewer UM. 2003. ADAM12: a novel first-trimester maternal serum marker for Down syndrome. *Prenat Diagn* 23:1086-1091.

- Lalou C, Lassarre C, Binoux M. 1996. A proteolytic fragment of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 that fails to bind IGFs inhibits the mitogenic effects of IGF-I and insulin. *Endocrinology* 137:3206-3212.
- Lassarre C, Binoux M. 1994. Insulin-like growth factor binding protein-3 is functionally altered in pregnancy plasma. *Endocrinology* 134:1254-1262.
- Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, Yates JR, Conover CA. 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.
- Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. 1997. The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J Biol Chem* 272:: 20572-20576.
- Lee CY, Rechler MM. 1996. Proteolysis of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in 150-kilodalton IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. *Endocrinology* 137:2051-2058.
- Leong SR, Baxter RC, Camerato T, Dai J, Wood WI. 1992. Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. *Mol Endocrinol* 6:870-876.
- LeRoith D. 2000. Regulation of proliferation and apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor. *Growth Horm IGF Res* 10(Suppl A):S12-13.
- LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. 1995. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16(2):143-163.
- Lewitt MS, Saunders H, Phuyal JL, Baxter RC. 1994. Complex formation by human insulin-like growth factor-binding protein-3 and human acid-labile subunit in growth hormone-deficient rats. 1994 134:2404-2409.
- Liu B, Weinzimer SA, Gibson TB, Mascarenhas D, Cohen P. 2003. Type Ia collagen is an IGFBP-3 binding protein. *Growth Horm IGF Res* 13:89-97.
- Liu W, Liu Y, Lowe WL. 2001. The role of phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein kinases in insulin-like growth factor-I-mediated effects in vascular endothelial cells. *Endocrinology* 142:1710-1719.
- Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, Kurie JM, Cohen P. 2000. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and

- retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem* 275:33607-33613.
- Loechel F, Fox JW, Murphy G, Albrechtsen R, Wewer UM. 2000. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem Biophys Res Commun* 278(3):511-515.
- Loechel F, Gilpin BJ, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. 1998. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem* 273(27):16993-16997.
- Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. 1997. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol* 189(1):33-48.
- Magee AI, Siddle K. 1988. Insulin and IGF-1 receptors contain covalently bound palmitic acid. *J Cell Biochem* 37:347-357.
- Maile LA, Whellams EJ, Holly JMP. 2000. Endogenous IGFBP-3 is protected from inducible IGFBP-3 protease activity in normal adult serum. *Growth Horm IGF Res* 10:71-77.
- Maile LA, Xu S, Cwyfan-Hughes SC, Fernihough JK, Pell JM, Holly JMP. 1998. Active and inhibitory components of the insulin-like growth factor binding protein-3 protease system in adult serum, interstitial, and synovial fluid. *Endocrinology* 139(12):4772-4781.
- Marinero JA, Neumann GM, Russo VC, Leeding KS, Bach LA. 2000. O-glycosylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-6 maintains high IGF-II binding affinity by decreasing binding to glycosaminoglycans and susceptibility to proteolysis. *Eur J Biochem* 267:5378-5386.
- Martin DC, Fowlkes J, Babic B, Khokha R. 1999. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J Cell Biol* 146:881-892.
- Martin JL, Ballesteros M, Baxter RC. 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-beta release IGF-binding protein-3 from human fibroblasts by different mechanisms. *Endocrinology* 131:1703-1710.
- Matter K, Mellmann I. 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cell. *Curr Opin Cell Biol* 6:545-554.
- Mortensen RM, Zubiaur M, E.J. N, Seidman JG. 1991. Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (α_{i2}) produced by gene targeting of both alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7036-7040.

- Mostov KE, Verges M, Altschuler Y. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 12(4):483-490.
- Muta K, Krantz SB. 1995. Inhibition of heme synthesis induces apoptosis in human erythroid progenitor cells. *J Cell Physiol* 163:38-50.
- Nam T, Moralez A, Clemmons DR. 2002. Vitronectin binding to IGF binding protein-5 (IGFBP-5) alters IGFBP-5 modulation of IGF-I action. *Endocrinology* 143(1):30-36.
- Nam TJ, Busby W, Clemmons DR. 1997. Insulin-like growth factor binding protein-5 binds plasminogen activator inhibitor-I. *Endocrinology* 138:2972-2978.
- Nam TJ, Busby WH, Rees C, Clemmons DR. 2000. Thrombospondin and osteopontin bind to insulin-like growth factor binding protein-5 leading to an alteration in IGF-I-stimulated cell growth. *Endocrinology* 141:1100-1106.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 28:239-242.
- Neumann GM, Marinaro JA, Bach LA. 1998. Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* 37:6572-6585.
- Nissley SP, Kiess W, Sklar MM. 1991. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor. LeRoith D, editor. Boca Raton: CRC Press. 111-150 p.
- Oh Y. 1998. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res Treat* 47:283-293.
- Ohkuma S, Poole B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3327-3331.
- Parker A, Gockerman A, Busby W, Clemmons DR. 1995. Properties of an insulin-like growth factor-binding protein-4 protease that is secreted by smooth muscle cells. *Endocrinology* 136:2470-2476.
- Parker A, Rees C, Clarke JB, Busby W, Clemmons DR. 1998. Binding of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins to smooth-muscle cell extracellular matrix is a major determinant of the cellular response to IGF-I. *Mol Biol Cell* 9:2383-2392.
- Parker KC, Strominger JL. 1983. Localization of the sites of iodination of human beta 2-microglobulin: quaternary structure implications for histocompatibility antigens. *Biochemistry* 22(5):1145-1153.

- Prydz K, Brandli AW, Bomsel M, Simons K. 1990. Surface distribution of the mannose 6-phosphate receptors in epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 265:12629-12635.
- Qin X, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. 1998. Structure-function analysis of the human insulin-like growth factor binding protein-4. *J Biol Chem* 273(36):23509-23516.
- Rajah R, Bhala A, Nunn SE, Peehl DM, Cohen P. 1996. 7S nerve growth factor is an insulin-like growth factor-binding protein protease. *Endocrinology* 137:2676-2682.
- Rajah R, Nachajon RV, Collins MH, Hakonarson H, Grunstein MM, Cohen P. 1999. Elevated levels of the IGF-binding protein protease MMP-1 in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:199-208.
- Remacle-Bonnet M, Garrouste F, el Atiq F, Marvaldi J, Pommier G. 1995. Cell polarity of the insulin-like growth factor system in human intestinal epithelial cells. Unique apical sorting of insulin-like growth factor binding protein-6 in differentiated human colon cancer cells. *J Clin Invest* 96:192-200.
- 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.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
- Scharf JG, 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*.
- Schebek-Fürstenberg V, Ständker L, Oppermann M, Müller-Wiefel DE, Hahn W, W.F. B, Braulke T, Kübler B. 2004. IGF-binding protein-3 fragments in plasma of a child with acute renal failure. *Pediatr Nephrol* Epub ahead of print.
- Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC. 2000. Nuclear import of insulin-like growth factor-binding protein-3 and -5 is mediated by the importin β subunit. *J Biol Chem* 275:23462-23470.
- Scheiffele P, Peranen J, Simons K. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378:96-98.

- Schmidt B, Kiecke-Siensen C, Waheed A, Braulke T, von Figura K. 1995. Localization of the 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(25):14975-14982.
- Schütt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW. 2004. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 32:859-868.
- Scott CD, Ballesteros M, Madrid JC, Baxter RC. 1996. Soluble IGF-II/M6P receptor blocks DNA synthesis in cultured hepatocytes. *Endocrinology* 137:873-878.
- Scott CD, Baxter RC. 1996. Regulation of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in hepatocytes from intact and regenerating rat liver. *Endocrinology* 137:3864-3870.
- Seals DF, Courtneidge SA. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.
- Shalamanova L, Kübler B, Scharf JG, Braulke T. 2001. MDCK cells secrete neutral proteases cleaving insulin-like growth factor-binding protein-2 to -6. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:1-9.
- Shi Z, Xu W, Loechel F, Wewer UM, Murphy LJ. 2000. ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem* 275(24):18574-18580.
- Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH. 1993. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to ras signaling pathways. *Science* 260:1953-1955.
- Smith EP, Lu L, Chernausk SD, Klein DJ. 1994. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) concentration in rat Sertoli cell-conditioned medium is regulated by a pathway involving association of IGFBP-3 with cell surface proteoglycans. *Endocrinology* 135:359-364.
- Ständker L, Braulke T, Mark S, Mostafavi H, Meyer M, Honing S, Gimenez-Gallego G, Forssmann WG. 2000. Partial IGF affinity of circulating N- and C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and the disulfide bonding pattern of the C-terminal IGFBP-4 domain. *Biochemistry* 39(17):5082-5088.
- Ständker L, Kübler B, Obendorf M, Braulke T, Forssmann WG, Mark S. 2003. In vivo processed fragments of IGF binding protein-2 copurified with bioactive IGF-II. *Biochem Biophys Res Commun* 304(4):708-713.

- Ständker L, Wobst P, Mark S, Forssmann WG. 1998. Isolation and characterization of circulating 13-kDa C-terminal fragments of human insulin-like growth factor binding protein-5. *FEBS Lett* 441(2):281-286.
- Storch S, Kübler B, Höning S, Ackmann M, Zapf J, Blum W, Bräulke T. 2001. Transferrin binds insulin-like growth factor and affects binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3. *FEBS Lett* 509:395-398.
- Suikkari AM, Baxter RC. 1992. Insulin-like growth factor binding protein-3 is functionally normal in pregnancy serum. *J Clin Endocrinol Metab* 74:177-183.
- Sunstrom N-AS, Gay RD, Wong DC, Kitchen NA, DeBoer L, Gray PP. 2000. Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of chine hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 16:698-702.
- Thraikill KM, Quarles P, Nagase H, Suzuki K, Serra DM, Fowlkes JL. 1995. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-5-degrading protease produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* 136:3527-3533.
- Towbin H, Staehelin T, 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.
- Twigg SM, Baxter RC. 1998. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273(11):6074-6079.
- Upton Z, Webb H, Hale K, Yandell CA, McMurtry JP, Francis GL, Ballard FJ. 1999. Identification of vitronectin as a novel insulin-like growth factor-II binding protein. *Endocrinology* 140(6):2928-2931.
- Valenzano KJ, Remmler J, Lobel P. 1995. Soluble insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor carries multiple high molecular weight forms of insulin-like growth factor II in fetal bovine serum. *J Biol Chem* 270:16441-16448.
- Vorwerk P, Yamanaka Y, Spagnoli A, Oh Y, Rosenfeld RG. 1998. Insulin and IGF binding by IGFBP-3 fragments derived from proteolysis, baculovirus expression and normal human urine. *J Clin Endocrinol Metab* 83(4):1392-1395.
- Weinzimer SA, Gibson TB, Collett-Solberg PF, Khare A, Liu B, Cohen P. 2001. Transferrin is an insulin-like growth factor-binding protein-3 binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 86(4):1806-1813.

- Wu HB, Lee CY, Rechler MM. 1999. Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 in serum from pregnant, non-pregnant and fetal rats by matrix metalloproteinases and serine proteases. *Horm Metab Res* 31:186-191.
- Xu Y, Papageorgiou A, Polychronakos C. 1998. Developmental regulation of the soluble form of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in human serum and amniotic fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2):437-442.
- Young SCJ, Miles MV, Clemmons DR. 1992. Determination of the pharmacokinetic profiles of insulin-like growth factor binding proteins-1 and -2 in rats. *Endocrinology* 131:1867-1873.
- Zeslawski W, Beisel HG, Kamionka M, Kalus W, Engh RA, Huber R, Lang K, Holak TA. 2001. The interaction of insulin-like growth factor-I with the N-terminal domain of IGFBP-5. *Embo J* 20(14):3638-3644.
- Zwad O, Kübler B, Scharf JG, Saftig P, Peters C, Bräulke T. 2002. Decreased intracellular degradation of insulin-like growth factor binding protein-3 in cathepsin L-deficient fibroblasts. *FEBS Lett* 510(3):211-215.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest	doppelt destilliertes Wasser
ADAM	<u>a</u> <u>d</u> isintegrin <u>a</u> nd <u>m</u> etalloprotease
bp	Basenpaar
BP	Bindungsprotein
BSA	Rinder-Serumalbumin
cDNA	copy-DNA (zur mRNA komplementäre DNA)
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Disuccinimidylsuberat
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	<u>e</u> xtrac <u>e</u> llular <u>m</u> atrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FGF	fibroblast growth factor
FKS	fötales Kälberserum
GFP	green fluorescent protein
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
HeLa	humane Tumorzelllinie
HEPES	N-[<u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl]-piperazin-N'-[2- <u>e</u> thansulfonsäure]
HRP	<u>h</u> orser <u>a</u> dish <u>p</u> eroxidase
IEF	isoelektrische Fokussierung
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
Lb	Ligandblot
LB	liquid broth
M6P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MAIB	<u>M</u> ethyl <u>a</u> mino <u>i</u> sob <u>u</u> ttersäure
MDCK	<u>M</u> adin- <u>D</u> arby <u>c</u> anine <u>k</u> idney

Abkürzungsverzeichnis

MMP	<u>M</u> atrix <u>m</u> etalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MS-MALDI-TOF	<u>M</u> ass <u>s</u> pectrometry - <u>m</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption <u>i</u> onization - <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAPP-A	<u>p</u> regnancy- <u>a</u> ssociated <u>p</u> lasma <u>p</u> rotein A
PBS	<u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TAPI	<u>t</u> umor necrosis factor α - <u>a</u> ctivating- <u>p</u> rotein- <u>i</u> nhibitor
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
WB	Westernblot
WT	Wildtyp

Bei einigen Begriffen, wie z.B. blot oder well, wurden die englischen Fachtermini verwendet, da in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich ist.

9 ANHANG

Veröffentlichungen

Oesterreicher, S., Blum, W.F., Braulke, T., Kübler, B. Interaction of IGF-II with multiple plasma proteins. High-affinity binding of plasminogen to IGF-II and IGF-binding protein-3. Journal of Biological Chemistry, in Revision (2004).

Mark, S., Kübler, B., Höning, S., Oesterreicher, S., John, H., Braulke, T., Forssmann, W.-G., Ständker, L. Diversity of human insulin-like growth factor binding protein-2 fragments in human plasma: primary structure, IGF binding properties, and disulfide bonding pattern. Biochemistry, in Revision (2004).

Oesterreicher S., Blum W., Höning S., Braulke T., Kübler B. Isolation of an IGF-II-binding protein complex from human plasma and characterization of protein – protein interactions. Hormone Research 58 (2002) S. 253.

(Vortrag beim “International symposium on the functional role of IGFBPs”, Tübingen)

Oesterreicher S., Blum W.F., Braulke T., Kübler B.: IGF-II-binding protein complex with proteolytic activity isolated from human plasma. Growth Hormone & IGF Research 13 (2003) S. 208.

(Vortrag beim „5th international IGFBP symposium“, Stockholm, Schweden)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2001 bis Oktober 2004 im Biochemischen Labor der Kinderklinik im Universitätskrankenhaus Eppendorf der Universität Hamburg unter Anleitung von Prof. Dr. T. Braulke angefertigt. Die Arbeit wurde finanziell durch das Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie und Signaltransduktion“ unterstützt.

Ich versichere, daß die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet wurden. Die Inanspruchnahme persönlicher Hilfe wurde namentlich aufgeführt.

Ich versichere auch, daß diese Dissertation an keiner anderen Universität eingereicht wurde, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, den 08.12.2004

Sandra Oesterreicher

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Braulke möchte ich für die Bereitstellung des Themas und für die Unterstützung dieser Arbeit danken.

Bei Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Bernd Kübler, der immer Zeit und Ruhe hatte, jegliche Frage zu beantworten und alle Versuche in Experimente umzuwandeln.

Danken möchte ich auch Nicola Ott, Stephan Tiede, Bettina Koch, Claudia Heine, Stephan Storch, Sandra Pohl, Franziska Stellmer, Inke Stange, Juliane Bergmann, Adrian Meder, Chris Mühlhausen und Elke Hammer für 3 Jahre „Wahnsinn“.

Prof. Dr. Werner F. Blum (Eli Lilly, Bad Homburg und Universitäts-Kinderkrankenhaus Gießen) möchte ich für die Bereitstellung der Plasmaproben danken.

Bei Dr. Thomas Weimar und Thies Köhli von der MU Lübeck möchte ich mich für die Bereitstellung des BIAcore Gerätes und für ihre Hilfe bedanken.