

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Maisch

Abteilung für Gastroenterologie und Endokrinologie, Direktor: Prof. Dr. med. Arnold

Untersuchung zur IGF-I-vermittelten Signaltransduktion in der humanen Karzinoidzelllinie LCC-18

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dong-Hun Kim
aus Marburg

Marburg 2004

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 19.02.2004
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs**

Dekan: Prof. Dr. med. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Göke

Coreferent: Prof. Dr. med. Lill

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Karzinoide	8
1.1.1	Definition	8
1.1.2	Epidemiologie	8
1.1.3	Einteilung	8
1.1.4	Biologie	9
1.1.5	Klinik	10
1.1.6	Diagnostik	12
1.1.6.1	Labordiagnostik	12
1.1.6.2	Lokalisationsdiagnostik	13
1.1.7	Therapie	13
1.1.7.1	Operative Therapie	13
1.1.7.2	Medikamentöse Therapie	14
1.1.8	Prognose	15
1.2	Wachstumsfaktoren	16
1.2.1	Einführung	16
1.2.2	Einzelne Wachstumsfaktoren	16
1.2.2.1	Epidermal Growth Factor (EGF)	16
1.2.2.2	Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	17
1.2.2.3	Transforming Growth factors (TGF)	18
1.2.2.4	Fibroblast Growth Factor (FGF)	19
1.2.2.5	Insulin-like Growth Factors (IGF)	19
1.3	Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-I)	21
1.3.1	Einführung	21
1.3.2	Biosynthese und Struktur	22
1.3.3	IGF-Bindungsproteine	22
1.3.4	IGF-I-Rezeptor	23
1.3.5	Regulation und Physiologie	25
1.4	IGF-I und Tumoren	26
1.4.1	Proliferation und Transformation	26
1.4.2	Beispiele aus der Onkologie	27
1.4.3	IGF-I und neuroendokrine Tumoren	28

Inhaltsverzeichnis

1.5	Aufgabenstellung	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Untersuchungsgut	29
2.2	Geräte	30
2.2.1	Allgemeine Laborgeräte	30
2.2.2	Zellkulturgeräte	31
2.2.3	Analysegeräte	31
2.2.4	Elektrophoresegeräte	31
2.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	32
2.3.1	Verbrauchsmaterialien	32
2.3.1.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	32
2.3.1.2	Zellkulturmaterialien	32
2.3.2	Chemikalien und Gebrauchslösungen	33
2.3.2.1	Chemikalien	33
2.3.2.2	Gebrauchslösungen	33
2.3.2.3	Zellkulturmedien	34
2.3.2.4	Kommerzielle Versuchssysteme	34
2.3.2.5	Peptide, Antagonisten et al.	35
2.4	Methoden	35
2.4.1	Zellkultur	35
2.4.1.1	Zellkulturmedium	35
2.4.1.2	Passagierung	36
2.4.1.3	Cryokonservierung	36
2.4.2	Polymerase Kettenreaktion	37
2.4.2.1	Probengewinnung	37
2.4.2.2	RT-PCR	37
2.4.2.3	Analyse	38
2.4.3	Wachstumsversuche	39
2.4.4	Konditioniertes Medium	40
2.4.5	Transiente Transfektionen	41
2.4.5.1	Plasmidgewinnung	41
2.4.5.2	Transfektion	42

Inhaltsverzeichnis

2.4.5.3	Stimulation	42
2.4.5.4	Messung	42
2.4.5.5	Proteinbestimmung	43
2.4.6	Western Blot	43
2.4.6.1	Vorbereitung	43
2.4.6.2	Durchführung	44
3	Ergebnisse	46
3.1	RT-PCR	46
3.2	Wachstumsversuche	46
3.2.1	Berechnung	47
3.2.2	Stimulation mit IGF-I	47
3.2.3	IGF-I nach Vorinkubation mit PD 098059	49
3.2.4	Konditioniertes Medium	50
3.2.5	Konditioniertes Medium mit Anti-IGF-I-Antikörpern	51
3.2.6	Weitere Wachstumsversuche	52
3.3	RIA	53
3.4	Transiente Transfektionen	53
3.5	Western Blot	55
4	Diskussion	56
5	Zusammenfassung	59
A	Anhang	60
A1	Literaturverzeichnis	60
A2	Abbildungen und Graphiken	73
A3	Tabellen	74
A4	Abkürzungen	75
A5	Lebenslauf	78
A6	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	79

Inhaltsverzeichnis

A7	Danksagung	80
A8	Ehrenwörtliche Erklärung	81

1 Einleitung

1.1 Karzinoide

1.1.1 Definition

Karzinoide sind Neoplasien, die sich aus den enterochromaffinen Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems nach Feyrter bzw. des APUD-Zellsystems nach Pearse entwickeln. Die Erstbeschreibung wird Lubarsch zugerechnet, der diese Tumoren 1888 bei autoptischen Ileumpräparaten charakterisierte. Der Begriff Karzinoide wurde 1907 von Oberndorfer eingeführt, der dadurch diese Gruppe von Tumoren gegen die in ihrem biologischen Verhalten unterschiedlichen Adeno-Karzinome abgrenzen wollte [Creutzfeldt, 1994].

1.1.2 Epidemiologie

Karzinoide sind eine insgesamt seltene Tumorart. Sie haben einen Anteil von 0,5-2 % aller Neoplasien. Die alterskorrigierte Inzidenz betrug in den USA 1-2 neue Fälle pro 100.000 Einwohner in den Jahren 1969-1971 bzw. 1973-1991 [Modlin und Sandor, 1997]. Aus Autopsiepräparaten ermittelte Inzidenzen, wie zum Beispiel 8,4 Fälle pro 100.000 Einwohner in den Jahren 1958-1969 in Schweden, lassen vermuten, daß ein Großteil der Karzinoide zeitlebens asymptomatisch bzw. unentdeckt bleibt [Berge und Linell, 1976].

1.1.3 Einteilung

Die Einteilung erfolgt traditionellerweise nach der anzunehmenden embryonalen Herkunft in Foregut-, Midgut- und Hindgut-Karzinoide [Williams und Sandler, 1963]. Nach der WHO-Klassifikation von 1980 werden alle Tumoren des diffusen neuroendokrinen Systems als Karzinoide bezeichnet. Ausnahmen bilden endokrine Tumoren des Pankreas, das medulläre Karzinom der Schilddrüse, Paragangliome, das kleinzellige Lungenkarzinom und der Merkel-Zelltumor [Williams et al., 1980].

Eine neuere Klassifikation berücksichtigt die verschiedenen Lokalisationen und Funktionen der einzelnen Tumoren besser unter Miteinbeziehung morphologischer, funktioneller und biologischer Kriterien; der Begriff „Karzinoide“ wird dabei durch „neuroendokrine Tumoren“ ersetzt. Sie umfaßt das gesamte Spektrum neuroendokriner Tumoren, so daß neben den klassischen Karzinoiden (langsames Wachstum, relativ gute Prognose) auch hochmaligne, undifferenzierte Karzinome beschrieben werden können. Die Einteilung erfolgt in erster Linie nach der primären Tumorlokali-

sation (Lunge, Pankreas, Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum, Appendix, Colon und Rektum), nach der Dignität, die durch Differenzierungsgrad, Größe, Ausdehnung in die Umgebung und Angioinvasion bestimmt wird (benigne, unklare Dignität (intermediär), niedrig maligne, hoch maligne) und schließlich durch die endokrine Funktion der Tumoren, wobei mit Funktion in diesem Falle nicht nur pathologisch erhöhte Hormonwerte im Serum gemeint sind, sondern auch das Vorhandensein klinischer Zeichen einer endokrinen Überfunktion. Nicht berücksichtigt werden in dieser Klassifikation amphikrine Tumoren, die gemischt endokrin-exokrine Eigenschaften aufweisen [Capella et al., 1994].

Die Stadieneinteilung der Karzinoide erfolgt üblicherweise nach den von Haskell und Tompkins vorgeschlagenen Kriterien:

T	Primärtumor
T 0	Kein Primärtumor
T 1	Tumor < 1 cm im größten Durchmesser
T 2	Tumor 1-2 cm im größten Durchmesser
T 3	Tumor 2-3 cm im größten Durchmesser
T 4	Tumor > 3 cm im größten Durchmesser
N	Regionäre Lymphknoten
N 0	Kein regionärer Lymphknotenbefall
N 1	Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
M 0	Keine Fernmetastasen
M 1	Fernmetastasen
Zusatzbezeichnung	
A	Asymptomatisch
B	Symptome eines Karzinoidsyndroms

Tab. 1.1: Stadieneinteilung der Karzinoide [Haskell und Tompkins ,1985]

1.1.4 Biologie

Karzinoide sind histochemisch gekennzeichnet durch ihre Fähigkeit zur Aufnahme bzw. zur Reduktion von Silbersalzen und durch verschiedene Marker neuroendokriner Gewebe, wie zum Beispiel neuronenspezifische Enolase, Synaptophysin und Chromogranin A [Mann und Saller, 2000].

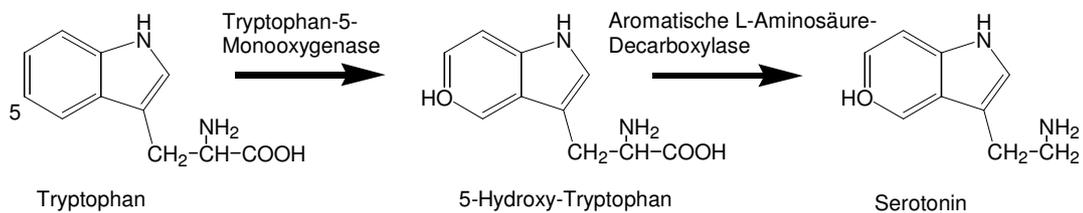
Elektronenmikroskopisch finden sich zahlreiche, membrangebundene neurosekretorische Granula, die eine Vielzahl verschiedener Hormone und biogener Amine

enthalten können. Unter diesen gehört Serotonin zu den am besten untersuchten Substanzen [Kulke und Mayer, 1999].

Serotonin wird aus Tryptophan durch Hydroxylierung in 5-Stellung und Decarboxylierung synthetisiert. Der Abbau erfolgt über Monoaminoxidase und Aldehyddehydrogenasen zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES), die mit dem Harn ausgeschieden wird.

Alkoholgenuß kann den Serotoninspiegel erhöhen, da das beim Alkoholmetabolismus anfallende Aldehyd mit dem 5-Hydroxyindolacetaldehyd bei den Aldehyddehydrogenasen konkurriert und es so zum Stoffwechselstau kommt [Falbe und Regitz, 1995].

Serotoninsynthese:



Serotoninabbau:

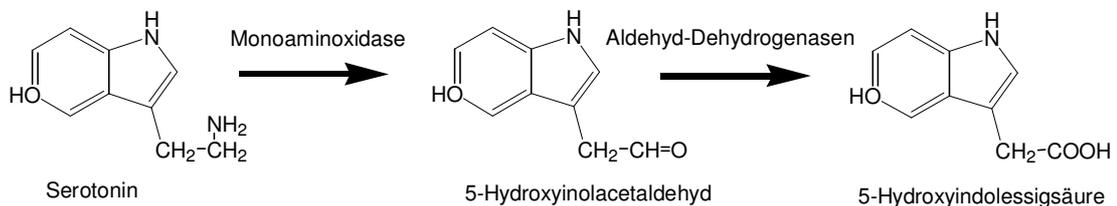


Abb. 1.1: Synthese und Abbau von Serotonin

Weitere Substanzen, die in Karzinoiden nachgewiesen wurden, sind Bradykinine, Hydroxytryptophan, Prostaglandine, Vasoaktives intestinales Polypeptid, Histamin, Tachykinine, Kallikrein, Substanz P, Neurotensin, Dopamin, Adrenocorticotropes Hormon, Parathormon, Gastrin und Somatostatin [Kulke und Mayer, 1999; Mann und Saller, 2000; Schmoll et al., 1999].

1.1.5 Klinik

Auch wenn das Karzinoidsyndrom für die Klinik der Karzinoide bezeichnend ist, tritt es in seiner klassischen Form nur bei 2 – 4 % aller Karzinoidpatienten auf. Es ist meist Hinweis auf ein fortgeschritteneres Stadium mit Metastasierung in die Leber. Auch posthepatische Ausbreitung oder primäres Wachstum außerhalb des portalen

Einstromgebietes kommen vor. In diesen Fällen können die für die Symptomatik verantwortlichen Substanzen, die aus den Karzinoidzellen sezerniert werden, nicht oder nur unzureichend in der Leber metabolisiert werden, bevor sie den systemischen Kreislauf erreichen [Schmoll et al., 1999].

Als Hauptsymptome des Karzinoidsyndroms werden Flush, Diarrhö und abdominelle Schmerzen beschrieben. Weitere typische Symptome sind Bronchospasmen, rechtsherzbetonte Endokardfibrose (beim Bronchialkarzinoid eventuell linksherzbetont), Ödeme, Teleangiektasien, pellagraartige Hautveränderungen und Symptome paraneoplastischer Hormonproduktion wie zum Beispiel das Cushing-Syndrom durch ektope ACTH-Produktion [Liu et al., 1993].

Der Flush ist mit einer Frequenz von 90 % das häufigste Symptom des Karzinoidsyndroms. Er wird durch vasoaktive Substanzen wie Tachykinine, Bradykinin und EDRF ausgelöst und ist gekennzeichnet durch meist im Gesicht beginnende Hitzewallungen und Hautrötungen des Oberkörpers, die einige Minuten bis –seltener– Stunden dauern können. Dazu kommen häufig Hypotonie, Tachykardie, Palpitationen und Hyperhidrosis. Als mögliche Trigger für eine Flush-Attacke werden Mahlzeiten, körperliche und psychische Belastung, Alkohol, Hitze und Druck auf den Tumor genannt [Roberts et al., 1998].

Die meist wässrigen Durchfälle und kolikartigen abdominellen Schmerzen werden durch erniedrigte Flüssigkeitsabsorption, gesteigerte Flüssigkeitssekretion und gesteigerte Darmmotilität mit konsekutiver Passagezeitverkürzung verursacht. Verantwortlich dafür sind in erster Linie Serotonin und Prostaglandine.

Asthmaähnliche Anfälle durch Bronchospasmen im Rahmen eines Karzinoidsyndroms treten häufig während der Flush-Attacken auf [Mann und Saller, 2000].

Die karzinoidassoziierte Endokardfibrose entwickelt sich durch die Wirkung von unter anderem Serotonin und Neuropeptid K in der Regel rechtsherzbetont. Betroffen sind ca. 35 % der Patienten mit metastasiertem Karzinoid [Maton, 1988]. Es kommt zu einer fibrösen Auflagerung auf das Endokard, die auch auf den Klappenapparat übergreift. Als häufigste Folgen werden Trikuspidalinsuffizienz und Pulmonalstenose beschrieben. Außerdem kommt es durch die verminderte Compliance zu einer diastolischen Ventrikelfunktionsstörung, so daß eine Rechtsherzinsuffizienz resultiert, die oft rasch progredient sein kann und dann einen wesentlichen klinischen und prognostischen Faktor darstellt [Mann und Saller, 2000].

1.1.6 Diagnostik

1.1.6.1 Labordiagnostik

Wichtigster Laborparameter für die Diagnose eines Karzinoidsyndroms ist die 5-HIES-Ausscheidung im 24-h-Urin. Werte > 10 mg/24 h geben einen deutlichen Hinweis auf ein Karzinoidsyndrom, Werte > 30 mg/24 h sind nahezu beweisend. Vor der Bestimmung müssen Störgrößen wie Alkohol, serotoninhaltige Nahrungsmittel oder Medikamente, die die 5-HIES-Bestimmung im Urin beeinflussen können, für zwei Tage eliminiert werden [Mann und Saller, 2000].

Nahrungsmittel		Medikamente	
• Ananas	• Mirabellen	• Femoxitin	• Methocarbamol
• Auberginen	• Melonen	• Paroxetin	• Mephenesin
• Avocados	• Stachelbeeren	• Methyldopa	• Phenothiazine
• Bananen	• Tomaten	• Reserpin	• Paracetamol
• Johannesbeeren	• Walnüsse	• Fluorouracil	• Salicylate
• Kiwis	• Zwetschgen		

Tab. 1.2: Nahrungsmittel und Medikamente mit Einfluß auf die 5-HIES-Bestimmung im Urin [Mann und Saller, 2000]

Da ein nicht Serotonin-produzierender Tumor oder ein Karzinoid im Pfortader-Gebiet ohne labordiagnostisch erkennbare Lebermetastasierung vorliegen kann, schließen normale Werte ein Karzinoid nicht aus.

Serotonin kann in dafür ausgestatteten Labors mittels HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie auch direkt bestimmt werden. Pathologisch sind Werte größer 400 ng/ml im Serum oder 100 ng/ml im Urin. Mit dem Radio-Immuno-Assay läßt sich 5-Hydroxytryptophan im Urin nachweisen, das bei Werten $> 0,15$ mg/24 h als pathologisch gilt.

Da Thrombozyten einen relativ hohen Serotoningehalt haben, kann es bei falscher Blutabnahmetechnik oder Probenverarbeitung mit akzidenteller Hämolyse zu falsch hohen Meßwerten kommen. Außerdem wird Serotonin im Plasma rasch zu 5-HIES metabolisiert, so daß trotz erhöhter Ausschüttung von Serotonin relativ niedrige Werte gemessen werden können [Mann und Saller, 2000].

1.1.6.2 Lokalisationsdiagnostik

Die Lokalisationsdiagnostik umfaßt endoskopische Maßnahmen wie Koloskopie inklusive Beurteilung des terminalen Ileum und Ösophagogastroduodenoskopie, Endosonographie, Röntgenkontrastdarstellung des Dünndarms, Sonographie und Computertomographie des Abdomens. Bei Verdacht auf ein Bronchial-Karzinoid sind eine Computertomographie der Lunge und eine Bronchoskopie indiziert.

Sehr sensitiv ist der Nachweis von Tumorgewebe mit der Somatostatinrezeptor-Szintigraphie mit ^{111}In -DTPA-Octreotid [Krenning et al., 1999]. Vor allem in Kombination mit konventionellen bildgebenden Verfahren gelingt so ein sehr genauer und zuverlässiger Nachweis sowohl des Primärtumors als auch eventuell vorhandener Metastasen, was wiederum für die Therapieplanung von entscheidender Bedeutung sein kann [Kwekkeboom und Krenning, 1996].

1.1.7 Therapie

Bei der Therapie von Karzinoiden haben sowohl chirurgische als auch medikamentöse Maßnahmen einen großen Stellenwert. Die Strahlentherapie ist wegen der in der Regel geringen Strahlensensibilität neuroendokriner Tumoren nicht primär indiziert. Weitere Therapiemöglichkeiten, die zum Teil noch in Erprobung sind, sind zum Beispiel nuklearmedizinische Maßnahmen wie die Radioiodtherapie mit ^{131}J -Metebenzylguanidin oder die Gabe von mit ^{90}Y trium markierten Somatostatina-naloga [Mann und Saller, 2000; Schmoll et al., 1999].

1.1.7.1 Operative Therapie

Abgesehen von akuten Operationsindikationen, die durch ein Karzinoid verursacht werden können, wie zum Beispiel ein Ileus oder eine gastrointestinale Blutung, sollte vor einer eventuellen Operation unbedingt ein sorgfältiges Staging erfolgen, um dem Patienten ein bestmögliches Verhältnis zwischen Benefit und Belastung durch den Eingriff anbieten zu können [Mann und Saller, 2000].

Unter kurativer Zielsetzung können alle lokalisierten Stadien durch eine radikale Resektion angegangen werden. Die Radikalität ist dabei von der Größe und der Infiltrationstiefe des Tumors und damit von der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung abhängig. Auch bei multifokalem Befall innerhalb eines Organs oder bei lokoregionären Lymphknotenmetastasen kann eine ausgedehnte chirurgische Resektion ebenso wie bei einem lokalisierten viszeralem oder Skelettbefall unter kurativer Intention sinnvoll sein, sofern weitere Fernmetastasen fehlen.

Bei primär inoperablen Karzinoiden oder dem Nachweis von Fernmetastasen sind palliative chirurgische Maßnahmen wie abdominelle Bypass-Operationen oder ein

Herzklappenersatz bei fortgeschrittener Endokardfibrose wegen der häufig langsamen Progredienz der Erkrankung und der relativ langen Überlebenszeiten auf jeden Fall sinnvoll und angezeigt [Schmoll et al., 1999].

1.1.7.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie richtet sich einerseits gegen die Symptome des Karzinoidsyndroms, andererseits gegen den Tumor selbst.

Für die symptomatische Therapie stehen für die jeweiligen Sekretionsprodukte des Tumors spezifische Antagonisten zur Verfügung [Schmoll et al., 1999].

Das Medikament der Wahl bei der Karzinoidtherapie ist zur Zeit das Somatostatinalogon Octreotid bzw. verwandte Stoffe. Es bindet an die Somatostatinrezeptoren der Tumorzellen, insbesondere an die Somatostatinrezeptor Subtypen 2 und 5, und bewirkt dort eine Hemmung autokriner und endokriner Mechanismen. Es kommt zu einer Abnahme der Sekretionsleistung des Tumors und unter Umständen auch des Tumorwachstums bis hin zur Tumorregression [Öberg, 1999]. Abhängig von der Dosis zeigt sich bei dieser Therapie eine Besserung der Symptome bei 30-75 %, eine biochemisch nachweisbare Verbesserung der endokrinen Dysfunktion bei 30-60 %, eine Stabilisierung der Tumorprogression bei 35-50 % und eine Tumormassenreduktion um mehr als die Hälfte bei 10-15 % der Patienten [Eriksson und Öberg, 1999].

Die antineoplastische Therapie der Karzinoide stützt sich im wesentlichen auf die Chemotherapie, die systemisch oder intraarteriell als Chemoembolisation zum Beispiel der A. hepatica bei Lebermetastasen erfolgen kann, und auf die Therapie mit Interferon α [Öberg, 1999]. Die von Mann und Saller empfohlenen Indikationen für die antineoplastische Therapie sind:

-
- Versagen der symptomatischen und antihormonellen Behandlung bei endokrin aktiven GEP-Tumoren
 - Ende der chirurgischen Interventionsmöglichkeiten
 - Symptomatische Progression über 3 Monate
 - Eindeutige klinische Progressionszeichen bei hormonell inaktiven Tumoren
 - In der Bildgebung belegte Tumorprogression über 3 Monate
-

Tab. 1.3: Indikationen der antineoplastischen Therapie [Mann und Saller, 2000]

Interferon α hemmt wahrscheinlich den Karzinoidzell-Zyklus in der G_1 -/ G_0 -Phase und führt zu einer Prolongation der S-Phase [Öberg, 1992]. Es wird vermutet, daß

Interferon α in der Lage ist, eine Apoptose der Tumorzellen zu induzieren, wobei es zu einem fibrotischen Umbau des Tumorgewebes kommt, so daß ein nachweisbarer Schwund der Tumormasse fehlen kann [Andersson et al., 1990]. Öberg und Mitarbeiter beschreiben in einem Kollektiv von über 350 Patienten unter Interferon α -Therapie bei ca. 65 % der Fälle eine subjektive Besserung des Befindens, bei 44 % eine biochemisch nachweisbare Verbesserung und bei 11 % eine signifikante Tumorreduktion [Öberg et al., 1994].

Bei der Chemotherapie kommen vor allem Doxorubicin, 5-FU und Streptozotocin zum Einsatz. Das klassische Karzinoid ist häufig gut differenziert und spricht oft nur mäßig auf eine Chemotherapie an [Schmoll et al, 1999]. Anders ist die Situation bei schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen, die deutlich besser durch eine Chemotherapie zu beeinflussen sind. Nicht zuletzt auch wegen der zum Teil gravierenden Nebenwirkungen sollte diese Art der Behandlung deshalb den schlecht differenzierten Karzinomen des neuroendokrinen Systems vorbehalten bleiben [Arnold, 1996].

1.1.8 Prognose

Die Prognose neuroendokriner Tumoren ist in den meisten Fällen deutlich besser als die vergleichbarer nicht-endokriner Karzinome. Das gilt auch für Patienten, bei denen bereits Fernmetastasen nachgewiesen wurden.

Die mittlere Fünf-Jahres-Überlebensrate wurde in der SEER-Studie mit 50,4 % angegeben. Abhängig von der Lokalisation des Primärtumors und dem Vorhandensein regionaler und Fernmetastasen schwankten die Fünf-Jahres-Überlebensraten von 94,0 % beim lokalisierten Appendixkarzinoid bis zu 0,0 % beim metastasierten primären Leberkarzinoid. Die mittleren Fünf-Jahres-Überlebensraten betragen beim lokalisierten Karzinoid 79,7 %, bei Vorhandensein regionaler Metastasen 50,6 % und beim Nachweis von Fernmetastasen immer noch 21,8 % [Modlin und Sandor, 1997].

1.2 Wachstumsfaktoren

1.2.1 Einführung

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die die Zellproliferation durch Bindung an spezifische, hochaffine Zellmembranrezeptoren stimulieren. Im Unterschied zu anderen Polypeptidhormonen wie Insulin oder ACTH folgen sie beim Transportprinzip nicht so sehr dem endokrinen Modell, sondern verbreiten sich vermutlich bevorzugt in kleineren Volumina über Diffusion und wirken lokal [Goustin et al., 1986].

Viele Wachstumsfaktoren können im Serum gefunden werden. Einige davon stammen aus Thrombozyten und werden bei der Thrombozytenaggregation ausgeschüttet. Sie können so bei Gefäß- und Gewebeverletzungen gezielt parakrin aktiv werden [Oka und Orth, 1983]. Aber auch zahlreiche andere Gewebe enthalten Wachstumsfaktoren; bei Zellen in Zellkulturen lassen sie sich regelmäßig nachweisen [Shields, 1978].

Die Zelltypspezifität der verschiedenen Wachstumsfaktoren variiert sehr stark. Einige Faktoren sind auf wenige Zelltypen beschränkt wie zum Beispiel einige Vertreter des hämatopoetischen Systems, andere wiederum wie IGF-I oder EGF zeigen bei einer Vielzahl verschiedenster Gewebe wachstumsstimulierende Wirkung [Goustin et al., 1986]. Für optimales Wachstum ist oft die Anwesenheit mehrerer Wachstumsfaktoren notwendig. Die Faktoren beeinflussen dabei den Zellzyklus an verschiedenen Punkten und wirken synergistisch [Leof et al., 1982].

Zu den Wachstumsfaktoren werden auch die Zytokine gezählt. Allgemein kann gesagt werden, daß Zytokine Wachstumsfaktoren sind, die gegen Zellen hämatopoetischer Herkunft gerichtet sind. Zytokine aus Lymphozyten werden Lymphokine genannt, Zytokine aus Monozyten/Makrophagen Monokine. Viele der Lymphokine sind als Interleukine bekannt, da sie nicht nur aus Leukozyten sezerniert werden, sondern auch Verhalten und Zusammenspiel der Leukozyten beeinflussen [Balca-vage und King, 1995].

1.2.2 Einzelne Wachstumsfaktoren

1.2.2.1 Epidermal Growth Factor (EGF)

Der epidermale Wachstumsfaktor wurde erstmals 1962 von Cohen beschrieben als ein Protein, das ein vorzeitiges Öffnen der Augen und eine frühen Zahndurchbruch bei neugeborenen Mäusen bewirkt [Cohen, 1962]. Später wurde die wachstumsstimulierende Wirkung in Zellkulturen erkannt [Carpenter und Cohen, 1975].

EGF ist ein lineares 6045 Da großes Protein bestehend aus 53 Aminosäuren mit drei internen Disulfidbrücken [Taylor et al., 1972]. Es wurde zunächst aus Speicheldrüsen von Mäusen isoliert [Cohen, 1962]; humanes EGF wurde als Urogastron aus menschlichem Urin gewonnen [Gregory, 1975].

In situ Hybridisierung bei Mäusen hat gezeigt, daß EGF-mRNA außer in Speicheldrüsen noch in einer Vielzahl anderer Gewebe nachzuweisen ist. Eine Besonderheit zeigt sich dabei in den distalen Tubuli der Niere, wo große Mengen mRNA transkribiert werden, aber nur wenig von dem Translationsprodukt PreproEGF in EGF umgewandelt wird [Rall et al., 1985]. PreproEGF hat eine über 40-prozentige Übereinstimmung in der Aminosäurestruktur mit dem LDL-Rezeptor [Russel et al., 1984]. Demnach besteht die Möglichkeit, daß es eine Funktion in der transmembranen Signalübertragung besitzt [Underwood und van Wyk, 1992].

Der EGF-Rezeptor ist der wohl am besten untersuchte Wachstumsfaktorrezeptor. Er kann bei zahlreichen Zellarten nachgewiesen werden, bindet EGF und TGF- α an seiner extrazellulären Domäne und besitzt intrazellulär Tyrosin-Kinaseaktivität [Goustin et al., 1986]. Ligandenbindung führt zu Autophosphorylierung von Tyrosinresten und nachfolgender Aktivierung der Signaltransduktionskaskade [Ushiro und Cohen, 1980].

EGF fördert die Proliferation von Zellen vor allem meso- und ektodermaler Herkunft. Dabei wird die Expression nukleärer Proto-Onkogene wie Fos, Jun und Myc induziert. Außerdem hat EGF einen hemmenden Einfluß auf die Magensäuresekretion [Balcavage und King, 1995].

1.2.2.2 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

Balk untersuchte in den frühen siebziger Jahren, warum Plasma eine geringere Kapazität besitzt, die Proliferation von Zellen in Kultur aufrechtzuerhalten, als Serum [Balk et al., 1973]. Es wurde vermutet, daß bei der Lyse von Thrombozyten während der Aggregation ein Mitogen in das Serum gelangt [Mitchell et al., 1975]. Nachfolgend konnte demonstriert werden, daß Plasma durch Zugabe von Thrombozytenextrakt eine Steigerung der wachstumsstimulierenden Wirkung erhält, die der Wirkung von Serum gleichwertig ist [Rutherford und Ross, 1976].

PDGF ist ein basisches Proteindimer mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Bei aus Thrombozyten stammendem PDGF ist eine A-Kette über Disulfidbrücken mit einer B-Kette verbunden [Goustin et al., 1986]. Die Gene für die A- und die B-Kette liegen separat auf dem Chromosom 22. Die Erbinformation für die B-Kette ist im c-Sis Proto-Onkogen enthalten [Johnsson et al., 1984].

Auch in vielen anderen Geweben wird PDGF gebildet, und es kommen alle drei Isoformen vor: AA, AB und BB [Underwood und van Wyk, 1992].

Der PDGF-Rezeptor besteht aus zwei transmembranen Untereinheiten α und β , die einen funktionellen Dimer bilden. Die extrazelluläre Domäne bindet PDGF, wobei die A-Kette nur an die Untereinheit α binden kann, während die B-Kette an die α - und β -Untereinheit bindet. Der zytoplasmatische Teil des Rezeptors trägt die Tyrosin-Kinase [Heldin und Westermark, 1990].

PDGF ist eines der Hauptmitogene im Serum. In manchen Zellen kann es sogar in Abwesenheit weiterer Wachstumsfaktoren sowohl die DNA-Synthese als auch die Zellteilung induzieren [Goustin et al., 1986]. PDGF hat außerdem noch chemotaktische Effekte auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen, was auf seine Rolle bei der Wundheilung hinweist [Seppä et al., 1982]. Es wird vermutet, daß PDGF von vielen transformierten mesenchymalen Zellen sezerniert wird [Bowen-Pope et al., 1984].

1.2.2.3 Transforming Growth Factors (TGF)

TGF wurden beschrieben als von Tumoren sezernierte Proteine mit der Fähigkeit, bei nicht transformierten Fibroblasten einen reversiblen, transformierten Phänotyp zu erzeugen. Zellen, die normalerweise für ihr Wachstum auf eine Verankerung angewiesen sind, wurden befähigt, in Agar zu wachsen [Todaro et al., 1980]. Nachfolgend wurden zwei sehr unterschiedliche Proteine, TGF- α und - β , isoliert [Goustin et al., 1986].

TGF- α ist ein einkettiges 5,6 kDa Protein aus 50 Aminosäuren und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit EGF [Marquardt et al., 1984]. Die TGF- β -Familie hat zahlreiche Vertreter, TGF- β im engeren Sinne sind TGF- β 1 bis TGF- β 5 (TGF- β 1 = TGF- β 4) [Balcavage und King, 1995]. Es handelt sich um 25 kDa schwere Homodimere, die aus zwei 112 Aminosäuren langen, durch Disulfidbrücken verbundene Ketten bestehen [Derynck et al., 1985].

TGF- α wird hauptsächlich von transformierten Zellen sezerniert; aber auch aktivierte Makrophagen und Keratinozyten produzieren TGF- α [Balcavage und King, 1995]. TGF- β ist weit verbreitet und wird von einer Vielzahl von Zellen als inaktive Vorstufe hergestellt [Moses et al., 1987].

TGF- α bindet an den EGF-Rezeptor [Reynolds et al., 1981]. Auch ein eigener TGF- α -Rezeptor ist beschrieben worden. Die TGF- β binden an verschiedene TGF- β -Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität. Die TGF- β -Rezeptoren kommen auf den meisten Zellen vor; es gibt jedoch zelltypspezifische Unterschiede in der Verteilung der Rezeptor-Subklassen. Anders als die Rezeptoren für EGF, PDGF und FGF besitzen sie eine intrinsische Serin-/Threonin-Kinase. [Balcavage und King, 1995].

Die Effekte von TGF- α ähneln denen von EGF. Es wirkt wachstumsstimulierend auf zum Beispiel Tumorzellen, die es autokrin sezernieren, und fördert die Neovaskularisation. TGF- β besitzt sowohl proliferationsstimulierende als auch -hemmende Wirkung [Roberts et al., 1985]. Normalerweise hemmt TGF- β das Wachstum der meisten Zelltypen, besonders bei Epithelien. Unter Umständen kann TGF- β ein Stimulus für das Wachstum besonders mesenchymaler Zellen wie Fibroblasten oder Osteoblasten sein [Underwood und van Wyk, 1992]. Es wird vermutet, daß TGF- β dabei indirekt über c-Sis-Expression und Aktivierung eines PDGF-ähnlichen Effektes wirkt, der dann das eigentliche Mitogen darstellt [Leof et al., 1986].

1.2.2.4 Fibroblast Growth Factors (FGF)

FGF wurden beschrieben als in Extrakten aus Rinderhirn und -hypophyse enthaltene mitogene Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Endothelzellen in Kultur [Gospodarowicz, 1975; Gospodarowicz et al., 1978].

FGF sind einkettige Proteine mit einem Molekulargewicht von 14-18 kDa [Goustin et al., 1986]. Es gibt mindestens sieben Vertreter der FGF-Familie; die beiden ursprünglich isolierten FGF sind aFGF (acidic) und bFGF (basic) [Balcavage und King, 1995]. Sie besitzen eine hohe Affinität zu Heparin und wurden aus verschiedensten Zellkulturen, Organextrakten und Tumoren isoliert [Burgess und Maciag, 1989].

Wie bei EGF und PDGF besitzt der FGF-Rezeptor Tyrosinkinase-Aktivität, die nach Ligandenbindung die Signaltransduktion durch Autophosphorylierung initiiert [Balcavage und King, 1995]. Der Abbau des Liganden-Rezeptor-Komplex erfolgt durch intrazellulären Abbau nach Phagozytose [Falbe und Regitz, 1995].

FGF fördert vor allem das Wachstum von Endothelzellen. Auch bei anderen Zellen vor allem meso- und neuroektodermalen Ursprungs konnte ein proliferationsfördernder Effekt beobachtet werden. FGF sind außerdem neurotroph, spielen eine Rolle bei der frühembryonalen, mesodermalen Differenzierung und haben Einfluß auf die Regulation von hypophysären und ovariellen Zellfunktionen [Balcavage und King, 1995].

1.2.2.5 Insulin-like Growth Factors (IGF)

Es gibt zwei Vertreter der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren, IGF-I und IGF-II.

IGF-I und die Geschichte der IGF wird in Kapitel 1.3 behandelt.

IGF-II ist ein neutrales, 67 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7471 Dalton [Rinderknecht und Humbel, 1978a]. IGF-II wird als Sekretions-

ons-Protein aus Prepro-IGF-II synthetisiert, das Gen liegt auf Chromosom 11 in enger räumlicher Beziehung zum Preproinsulin-Gen [Brissenden et al., 1984].

IGF werden sowohl nach dem endokrinen Wirkungsmuster in der Leber gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert als auch in den meisten Geweben lokal produziert, wo sie auto-/parakrinen Mechanismen folgen [Cohick und Clemmons, 1993].

Es gibt zwei IGF-Rezeptoren, den IGF-I-Rezeptor und den IGF-II/Mannose-6-Phosphat-(M6P-)Rezeptor. IGF-II bindet bevorzugt an den IGF-II-Rezeptor. Dieses ist ein 2451 Aminosäuren langes, transmembranes Glykoprotein. Der extrazelluläre Teil besteht aus 15 repetitiven Segmenten, die die Bindungsstellen für IGF-II und M6P tragen. Bindung an den Rezeptor bewirkt eine Umverteilung neugebildeter lysosomaler Enzyme zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten, Internalisierung des Rezeptors im Sinne einer Endozytose und Ankopplung inhibitorischer G-Proteine [Stewart und Rotwein, 1996]. Es wurden auch ligandenabhängige Phosphorylierungen am zytoplasmatischen Teil des Rezeptors beobachtet, deren Bedeutung aber noch unklar ist [Rosorius et al., 1993].

IGF-II hat eine stärker insulinähnliche Wirkung als IGF-I und ist dafür weniger stark wachstumsfördernd [Underwood und van Wyk, 1992]. Wie auch bei IGF-I spielen IGF-Bindungsproteine eine Rolle bei der Regulation der Wirkung und dem Metabolismus [Ferry et al., 1999].

1.3 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-I)

1.3.1 Einführung

IGF-I ist ein aus 70 Aminosäuren bestehendes, basisches Einzelstrang-Polypeptid, das drei Disulfidbrücken enthält und ein Molekulargewicht von 7.649 Dalton aufweist [Rinderknecht und Humbel, 1978b].

Die Existenz eines die Wirkung des Somatotropin/Wachstumshormones vermittelnden Agens wurde als erstes von Salmon und Daughaday vermutet. Der Versuch, eine Meßmethode für das Wachstumshormon zu entwickeln, die auf die Aufnahme von radioaktivem Sulfat in Knorpelgewebe als Parameter für die Höhe des Wachstumshormonspiegel in vitro beruhen sollte, zeigte, daß das Wachstumshormon im Gegensatz zur in vivo Wirkung nicht in der Lage war, die Sulfataufnahme in den Knorpel direkt zu fördern. Die vermutete, unbekannte intermediäre Substanz wurde sulfation factor (SF) genannt [Daughaday, 1989]. Im Laufe weiterer Forschung konnte gezeigt werden, daß der sulfation factor noch weitere wachstumshormonabhängige Wirkungen vermittelte. Der sulfation factor wurde umgetauft und erhielt den weniger spezifizierenden Namen Somatomedin; auch die Hypothese der Abhängigkeit der Wachstumshormonwirkung von diesem intermediären Faktor wurde ausgeweitet. So formulierten Chochinov und Daughaday 1976, daß das „(...) Wachstumshormon die Gewebe nicht wesentlich direkt zum Wachstum stimuliert, sondern zur Entstehung eines sekundären hormonellen Agens, Somatomedin(e), führt, welches auf der zellulären Ebene wirkt“ [Chochinov und Daughaday, 1976].

Im weiteren Verlauf konnte gezeigt werden, daß der sulfation factor/Somatomedin insulinähnliche Eigenschaften aufwies [Salmon und DuVall, 1970; Underwood et al., 1972]. Leonards hatte 1959 festgestellt, daß eine komplette Unterdrückung der Insulinwirkung durch Insulin-Antikörper im Serum nicht möglich war [Van den Brande, 1999]. Dieser nicht unterdrückbaren insulinähnlichen Aktivität (NSILA=non-suppressible insulin-like activity) konnte nun umgekehrt nachgewiesen werden, daß sie somatomedinähnliche Wirkung hatte [Zingg und Froesch, 1973]. Der Verdacht lag nahe, daß den beiden Aktivitäten die gleiche Substanz zugrunde lag, was später durch Sequenzanalysen auch bestätigt werden konnte [Klapper et al., 1983].

Als ebenfalls identisch mit Somatomedin, genauer IGF-II, wurde das mitogene Prinzip von bestimmten Zellkultursystemen identifiziert, die multiplication stimulating activity (MSA) [Dulak und Temin, 1973; Moses et al., 1980].

Da die Entdeckung und Charakterisierung der Somatomedine / IGF aus verschiedenen Lagern und auf verschiedenen Routen erreicht wurde, gab es naturgemäß Uneinigkeiten in der Terminologie [Van den Brande, 1999]. 1987 schlugen Daugha-

day et al. vor, den Begriff Somatomedin(e) dann zu verwenden, wenn diese im allgemeinen bezeichnet werden sollen, und IGF-I bzw. IGF-II, wenn es um diese Peptide im speziellen geht [Daughaday et al., 1987].

1.3.2 Biosynthese und Struktur

IGF-I wird unter Einfluß des Wachstumshormones hauptsächlich in der Leber gebildet, aber auch zahlreiche extrahepatische Gewebe sind zur Synthese befähigt [LeRoith et al., 1992]. Das Gen für das präpro-IGF-I liegt auf dem langen Arm des Chromosom 12 [Brissenden et al., 1984]. Die Struktur von IGF-I ist sehr stark konserviert. Bei allen Säugetieren besitzt das IGF-I eine Länge von 70 Aminosäuren und auch die Aminosäuresequenz weist bei den verschiedenen Spezies starke Homologien auf. Sie ist zum Beispiel beim Rind und beim Menschen identisch [Rutanen und Pekonen, 1990].

Die Proteinbiosynthese erfolgt wie bei sekretorischen Proteinen üblich signalsequenzvermittelt in das endoplasmatische Reticulum, wo posttranslationelle Modifikationen stattfinden. Es bestehen Homologien zu Proinsulin: Die Positionen 1 bis 29 ähneln der B-Kette und die Positionen 42 bis 62 der A-Kette von Insulin; die Positionen 30 bis 41 von IGF-I entsprechen dem C-Peptid des Proinsulins, weisen aber keine Übereinstimmungen in der Sequenz auf; für das C-terminale Oktapeptid gibt es beim Proinsulin keine Entsprechung [Rinderknecht und Humbel, 1978b].

1.3.3 IGF-Bindungsproteine

Sezerniertes IGF zirkuliert nicht frei im Körper, sondern ist zum größten Teil an IGF-Bindungsproteine (IGF-BP) gebunden. Es gibt wenigstens sechs verschiedene IGF-Bindungsproteine [Stewart und Rotwein, 1996]. Zusätzlich zu diesen sechs IGF-BP 1-6, die durch eine hohe Bindungsaffinität für IGF gekennzeichnet sind, sind sechs sogenannte IGF-BP-verwandte Proteine bekannt, die eine niedrigere Affinität zu IGF-I haben und noch nicht endgültig in die IGF-BP-Familie eingeordnet sind [Ferry et al., 1999]. Ergänzend zu der anfänglichen Annahme, daß die Aufgabe der IGF-BP im wesentlichen aus Transport und Schutz der IGF besteht, gibt es mittlerweile Hinweise auf weitere wichtige Funktionen [Rutanen und Pekonen, 1990].

-
- Limitierung der Bioverfügbarkeit von freiem IGF
 - Schutz vor IGF-induzierter Hypoglykämie
 - Regulation des Transports der IGF zwischen intra- und extravasalen Raum
 - Verlängerung der Halbwertszeit der IGF
 - Verstärkung der IGF-Wirkung durch Bildung eines IGF-Pools mit langsamer Freisetzung
 - Einfluß auf Zellproliferation / Zelltod über IGF-BP-Rezeptoren
-

Tab. 1.4: Funktionen von IGF-Bindungsproteinen [Ferry et al., 1999]

Am häufigsten findet man IGF in einem ternären Komplex mit IGF-BP 3 und einem Glycoprotein, der säurelabilen Untereinheit (acid-labile subunit, ALS) [Janosi et al., 1999]. Nur weniger als 1% der IGF zirkulieren in freier Form [Baxter, 1994].

Es gibt in in vitro Studien Hinweise für IGF-unabhängige Wirkungen von IGF-Bindungsproteinen. Vor allem IGF-BP 3 scheint eine Rolle in der Regulation des Wachstums verschiedener Zellen und Gewebe zu haben [Ferry et al., 1999]. Die Existenz von IGF-BP 3 Rezeptoren wurde schon 1993 von Oh et al. nach Bindungsstudien mit IGF-BP 3 an Mammakarzinom-Zellen angenommen [Oh et al., 1993]. IGF-BP konnten auch intranukleär nachgewiesen werden, wo eine Einflußnahme auf die Genexpression vermutet wird [Jaques et al., 1997]. Für IGF-BP 3 und 5 konnte kürzlich der Transportweg in den Nukleus identifiziert werden [Schedlich et al., 2000].

1.3.4 IGF-I-Rezeptor

Der IGF-I-Rezeptor (IGF-I-R) ist ein heterotetrameres Glykoprotein, das aus zwei ligandenbindenden α -Untereinheiten aus 706 Aminosäuren und aus zwei transmembranen β -Untereinheiten mit Tyrosinkinase-Aktivität aus 627 Aminosäuren besteht. Das Gen für den Rezeptor liegt auf Chromosom 15 und codiert ein 1367 Aminosäuren langes Präprotein, das während der posttranslationalen Modifikationen in eine α - und eine β -Untereinheit gespalten wird. Durch Disulfidbrücken wird aus diesen zunächst ein halber Rezeptor und schließlich aus zwei halben ein ganzer Rezeptor gebildet [LeRoith et al., 1995]. Es bestehen Homologien zum Insulin-Rezeptor, mehr als 50 % der Aminosäuresequenz sind identisch [Ullrich et al., 1986].

Die α -Untereinheit bindet IGF-I mit einer Dissoziationskonstante von < 1 nM; IGF-II besitzt eine mehrfach und Insulin eine hundertfach niedrigere Affinität. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zu einer Aktivierung der intrazellulären

Tyrosinkinase der β -Untereinheit und zur Autophosphorylierung [Stewart und Rotwein, 1996].

Als gesicherte unmittelbare Substrate des aktivierten IGF-I-Rezeptor gelten IRS-1, IRS-2 und Shc [Myers et al., 1993; Araki et al., 1994; He et al., 1996]. Auch Grb10 bzw. bestimmte Isoformen davon könnten Substrate des IGF-I-R sein [Morrione et al., 1996; Morrione et al., 1997]. Weitere mögliche Kandidaten wie eine splicing-Variante von Grb-IR oder das Protein 14.3.3 bedürfen noch weiterer Untersuchungen [O'Neill et al., 1996]. Von diesen Substraten gehen dann Signale aus, die über verschiedene Signaltransduktionswege weitergegeben werden können [Baserga et al., 1997].

Einer dieser möglichen Signaltransduktionswege, die für die Kontrolle von Zellwachstum und -differenzierung von Bedeutung sind, ist der Ras-Weg [Egan et al., 1993]. Die wesentlichen Schritte der Signaltransduktionskaskade sind die Aktivierung von Ras durch Austausch von GDP gegen GTP, Aktivierung von MAPKKK (Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase) durch Ras, Aktivierung von MAPKK durch MAPKKK und Aktivierung von MAPK durch MAPKK. Schließlich phosphoryliert die aktivierte MAP-Kinase spezifische Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die in Folge dessen zellspezifisch die Transkription bestimmter Gene initiieren [Egan und Weinberg, 1993]. Unterbrochen wird der Ras-Weg durch GTPase-aktivierende Proteine, die die Hydrolyse des Ras-gebundenen GTP zu GDP fördern [Boguski und McCormick, 1993].

Die Signaltransduktion über Ras kommt bei verschiedenen Wachstumsfaktoren wie IGF-I, PDGF oder EGF vor [LeRoith et al., 1995]. Zellkulturversuche mit Anti-Ras-Antikörpern zeigen, daß Ras für die Signaltransduktion des IGF-I-Rezeptors eine besondere Bedeutung hat [Lu und Campisi, 1992]. Andere Zellkulturversuche mit IGF-I-Rezeptor-negativen Zellen geben deutliche Hinweise, daß noch weitere Signaltransduktionswege, die für den IGF-I-Rezeptor spezifisch sein müssen, eine Rolle spielen, da der Verlust des IGF-I-Rezeptors weder durch ein Überangebot anderer Wachstumsfaktoren noch durch Transfektion mit konstitutionell aktiviertem Ras gegenüber dem Wildtyp voll ausgeglichen werden konnte. Erst nach Transfektion mit Plasmiden, die für den IGF-I-Rezeptor codieren, stellte sich wieder ein normales Wachstumsverhalten ein [Sell et al., 1994].

Neben der MAP-Kinase wird durch den aktivierten IGF-I-Rezeptor auch die PI3-Kinase aktiviert [Baserga, 1999]. Möglicherweise ist v-Src für diesen Effekt verantwortlich [Barone und Courtneidge, 1995].

1.3.5 Regulation und Physiologie

Eine wesentliche Aufgabe von IGF-I ist die Vermittlung und Regulation der wachstumsfördernden Wirkung des hypophysären Wachstumshormons. Diese in der Hauptsache anabole Funktion umfaßt unter anderem die Anregung des Aminosäuretransports, die Stimulation der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese und die Induktion von Zellproliferation und -wachstum [Jones und Clemmons, 1995]. Studien mit IGF-I-Rezeptor-defizienten Mäusen, die eine starke Beeinträchtigung des Wachstums zeigen, oder mit rezeptornegativen Fibroblasten, bei denen eine Retardierung des Zellzyklus beobachtet werden konnte, unterstreichen die Bedeutung eines intakten IGF-I/IGF-I-R-Systems [Liu et al., 1993; Sell et al., 1994]. Der Plasmaspiegel von IGF-I ist der zuverlässigste Parameter für die zu erwartenden Körpergröße von Heranwachsenden [Grothey et al., 1999]. In der Leber steuern das Wachstumshormon, Insulin und wichtige Stoffwechselmetabolite wie zum Beispiel essentielle Aminosäuren die Synthese und Sekretion von IGF-I [Phillips et al., 1990]. Diese dem endokrinen Modell folgende Rolle des IGF-I ist in letzter Zeit allerdings vermehrt in den Hintergrund getreten zu Gunsten der para- und autokrinen Funktionen, den lokalen Wirkmechanismen [Rutanen und Pekonen, 1990]. In den extrahepatischen Geweben stimulieren einerseits die allgemeinen anabolen Hormone und andererseits auch gewebespezifische Hormone die Produktion sowohl von IGF-I als auch von IGF-I-Rezeptoren. Es kommt zu einer lokalen Wirkung von IGF-I nach dem para-/autokrinen Modell [Phillips et al., 1990].

1.4 IGF-I und Tumoren

Die meisten Zellen sind für optimales Wachstum auf wenigstens zwei Wachstumsfaktoren angewiesen. IGF-I ist häufig einer davon und wird für das Wachstum von zum Beispiel Fibroblasten, Epithelzellen, Knochenmarkstammzellen und Osteoblasten benötigt [Baserga und Rubin, 1993]. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der IGF-I-Rezeptor. Seine Anwesenheit und Funktion sind essentiell für ein Wachstum in serumfreien Medien mit definierten Wachstumsfaktoren und werden für ein optimales Wachstum in serumhaltigen Medien benötigt [Baserga, 1995]. Der IGF-I-Rezeptor ist außerdem erforderlich für die PDGF- bzw. EGF-vermittelten wachstumsfördernden und transformierenden Wirkungen [Coppola et al., 1994; DeAngelis et al., 1995].

1.4.1 Proliferation und Transformation

Die durch das IGF-I/IGF-I-R-System vermittelten Wirkungen sind mitogen, transformierend und antiapoptotisch [Grothey et al., 1999].

3T3-Zellen, Fibroblasten aus Mäuseembryos, wachsen optimal in serumfreiem Medium unter Zugabe von IGF-I und PDGF bzw. EGF [Leof et al., 1982]. Fibroblasten mit gezielter homozygoter Ausschaltung des IGF-I-R-Gens (R^- -Zellen) zeigten kein Wachstum in serumfreiem, wachstumsfaktorsupplementiertem Medium und abgeschwächtes Wachstum gegenüber dem Wildtyp in 10 %igem Serum [Sell et al., 1994]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche, in denen die IGF-I-Rezeptor-Funktion mit Antikörpern oder Antisense-Oligodesoxynucleotiden blockiert wurde [Pietrzkowski et al., 1992; Porcu et al., 1992; Reiss et al., 1992].

Überexpression oder konstitutionelle Aktivierung von IGF-I-Rezeptoren führt zu einem transformierten Phänotyp bei verschiedenen Zellen. Diese Eigenschaft haben auch andere Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF oder FGF, aber nur das IGF-I/IGF-I-R-System scheint für eine Transformation essentiell zu sein [Grothey et al., 1999]. Sell et al. zeigten 1993, daß IGF-I-R-negative 3T3-Zellen gegen eine Transformation durch SV 40 Antigen resistent waren [Sell et al., 1993]. Diese Tatsache ist besonders bemerkenswert unter dem Gesichtspunkt, daß Mäuseembryofibroblasten, zu denen die 3T3-Zellen zählen, eine ausgesprochene Neigung zur spontanen Transformation haben. Auch andere Substanzen, die in der Lage sind 3T3- oder andere Zellen zu transformieren, waren bei R^- -Zellen dazu nicht in der Lage [Baserga, 1999]. Eine Ausnahme bildet v-Src [Valentinis et al., 1997]. Es scheint die Signaltransduktionswege von IGF-I unter Umgehung des Rezeptors aktivieren zu können [Baserga, 1999]. Eine mögliche Rolle bei der Signaltransduktion wurde bereits erwähnt.

Die zytoprotektiven Eigenschaften von IGF-I sind vor allem im Zentralen Nervensystem gut bekannt [D'Mello et al., 1993]. Auch schützt IGF-I vor dem Einfluß apoptoseinduzierender Substanzen wie Etoposid, TNF oder c-Myc [Sell et al., 1995; Wu et al., 1996; Evan et al., 1992]. Bei Tumorzellen kann der Zelltod durch eine Reduktion der Anzahl bzw. Funktion der IGF-I-Rezeptoren ausgelöst werden [Resnicoff et al. 1995a; D'Ambrosio et al., 1996]. Im Zusammenhang mit der antiapoptotischen Wirkung von IGF-I scheint die Caspase-3 von besonderer Bedeutung zu sein [Grothey et al., 1999]. Caspase-3 spielt bei der Apoptose eine zentrale Rolle als der Haupteffektor der enzymatischen Spaltung. Sie wird durch das proapoptotische Bax und das antiapoptotische Bcl-2 kontrolliert [Villa et al., 1997]. Der IGF-I-Rezeptor ist in der Lage, die Aktivität der Caspase-3 zu hemmen [Wang et al., 1998].

1.4.2 Beispiele aus der Onkologie

Minuto et al. berichteten 1986 von operativen Lungentumorpräparaten, die einen erhöhten Gehalt an IGF-I aufwiesen [Minuto et al., 1986]. Studien mit konditioniertem Medium aus Lungentumorzellkulturen und Wachstumsversuche mit und ohne IGF-I-R-Antikörper wiesen auf einen autokrinen Stimulationsmodus hin [Macaulay et al., 1988; Nakanishi et al., 1988]. Diese Eigenschaften konnten sowohl bei kleinzelligen Lungenkarzinomen als auch bei nicht kleinzelligen nachgewiesen werden [Kaiser et al., 1993]. Versuche mit Antisense-IGF-I-Rezeptor-DNA verdeutlichten die tragende Rolle der IGF-I-Achse bei der Proliferation der Tumorzellen [Lee et al., 1996].

Auch die meisten Mammakarzinome exprimieren Insulin- und IGF-Rezeptoren [Peyrat et al., 1990]. Für viele Zelllinien aus Mammakarzinomen sind IGF wichtige Wachstumsfaktoren [Karey und Sirbasku, 1988]. Es konnten para-/autokrine Mechanismen der Wachstumsregulation nachgewiesen werden [Yee et al., 1989]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch bei dieser Tumorentität der IGF-I-Rezeptor eine zentrale Rolle spielt [Cullen et al., 1990].

Der Gastrointestinaltrakt gehört zu den auf IGF besonders empfindlich reagierenden Geweben. Homöostase und funktionelle Integrität des intestinalen Epithels sind in besonderem Maße vom IGF-System abhängig [Drucker, 1997]. In Kolonkarzinomen wurden erhöhte Level von IGF-mRNA nachgewiesen [Tricoli et al., 1986]. Veränderungen des IGF-I/IGF-I-R-Systems sind vielfach im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen beschrieben worden, so daß die Vermutung naheliegt, daß es einen pathogenetischen Zusammenhang gibt [Guo et al., 1992; Remacle-Bonnet et al., 1992; Singh und Rubin, 1993]. In einer prospektiven Studie konnte gezeigt werden,

daß erhöhte IGF-I- (und IGF-BP 3-) Spiegel im Plasma mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [Ma et al., 1999].

1.4.3 IGF-I und neuroendokrine Tumoren

Auch neuroendokrine Tumoren exprimieren Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [Chaudhry et al., 1993]. Der Nachweis von IGF-I und IGF-I-Rezeptoren bei kultivierten Karzinoidzellen ließ vermuten, daß IGF-I auch bei Karzinoiden auf auto- bzw. parakrinem Weg das Tumorstadium beeinflusst [Nilsson et al., 1992].

1.5 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob IGF-I Einfluß auf das Wachstumsverhalten der humanen Karzinoidzell-Linie LCC-18 hat, welche Form dieser Einfluß hat und auf welchem Wege er möglicherweise vermittelt wird.

Zu diesem Zwecke wurden Untersuchungen mit folgendem Inhalt durchgeführt:

- Nachweis von IGF-I-Rezeptoren,
- Nachweis einer IGF-I Sekretion,
- Einflußnahme von IGF-I auf die Proliferation,
- Antagonisierbarkeit der IGF-I-Wirkung.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Untersuchungsgut war die humane Karzinoid-Zelllinie LCC-18. Sie wurde 1986 aus dem schwach differenzierten, neuroendokrinen Kolontumor eines 27-jährigen Australiers etabliert und erstmals 1991 charakterisiert.

Immunhistochemisch ließen sich Tyrosin-Hydroxylase, Synaptophysin und L-Dopa-Decarboxylase nachweisen. Etwas weniger stark positiv war der Nachweis von Chromogranin A und NSE. Außerdem fanden sich Substanz P, VIP, und Glucagon, die beiden letztgenannten auch im Kulturmedium. Die Zellen behielten ihre neuroendokrinen Eigenschaften auch nach über 100 Passagen bei [Lundqvist et al., 1991].

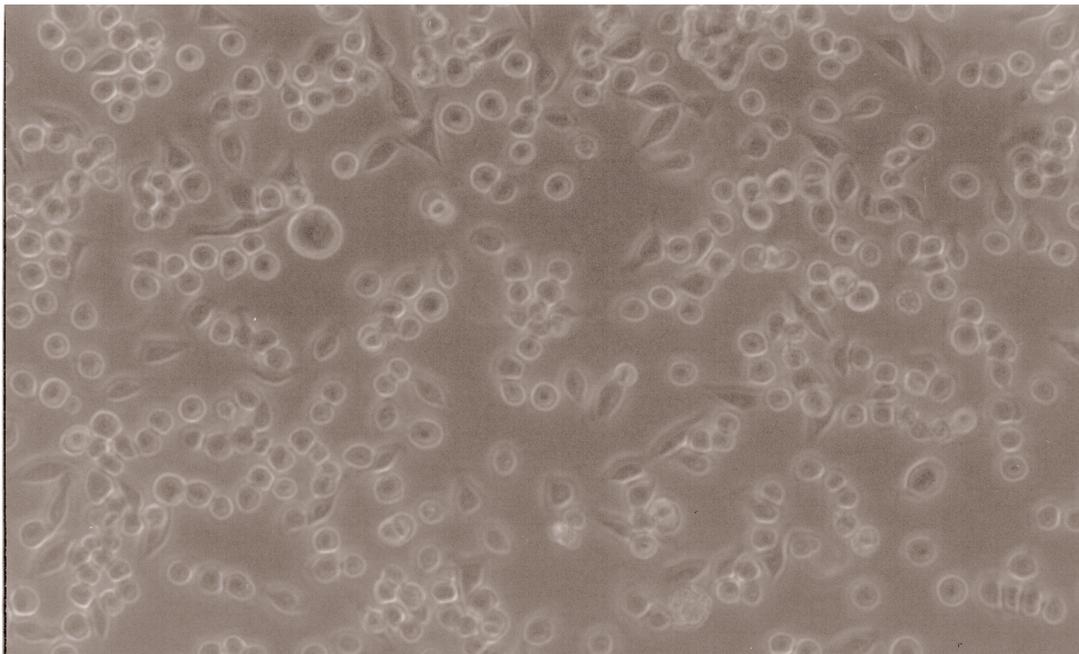


Abb. 2.1: LCC-18 Zellen in Kultur

2.2 Geräte

2.2.1 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage:	AE 163	Mettler, Gießen
Autoklav:	Laborautoclav Typ GLA 40	Gössner, Hamburg
Bakterien-Brutschrank:	BE 400	Memmert, Schwalbach
Bakterien-Inkubator:	Inkubationshaube CERTO-MAT H/HK	Braun, Melsungen
Geigerzähler:	Monitor LB 1210 D	Berthold, Wildbach
Heizblock:	DRI-Block DB2A	Techne, Princeton / USA
	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	GPHR 1400	Greisinger electronic, Regenstauf
Pipettierhilfen:	Pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, F
	Accujet	Brand, Wertheim
	Pipetboy acu	Integra, Fernwald
	Vacuboy	Integra, Fernwald
	Fireboy plus	Integra, Fernwald
Vortexer:	REAX 2000	Heidolph, Kelkheim
Waage:	SPO 52	Scaltech, Heiligenstadt
Wasserbad:	Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifugen:	J2-21	Beckman, München
	Biofuge A	Heraeus, Karlsruhe
	Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
	Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman, München

Tab. 2.1: Allgemeine Laborgeräte

2.2.2 Zellkulturgeräte

Cryotank:	18 HC	Taylor-Wharton, Camp Hill, USA
Inkubator:	BB 16	Heraeus, Karlsruhe
Mikroskop:	Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Sterile Werkbank:	Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Karlsruhe
Zentrifuge:	Labofuge 400e	Heraeus, Karlsruhe

Tab. 2.2: Zellkulturgeräte

2.2.3 Analysegeräte

ELISA-Reader:	MRX	Dynatech, Denkendorf
Luminometer:	Lumat LB 9501/16	Berthold, Wildbach
RNA/DNA Calculator:	Genequant	Pharmacia, Freiburg
Densitometer:	Elscript 400	Hirschmann, Unterhaching
Transilluminator:	TFX-20.M	MWG-Biotech, Ebersberg
UV-Kamera:	Gel Print 1000	BioPhotonics
Gamma-Zähler:	Gamma Counter	Oakfield Instruments, Oxforg GB

Tab. 2.3: Analysegeräte

2.2.4 Elektrophoresegeräte

Agarosegelapparatur:	Hoefler Minigel HE 33	Serva, Heidelberg
Filmentwicklungsgerät:	Curix 60	Agfa, Leverkusen
Röntgenkassetten:	Curix	Agfa, Leverkusen
Verstärkerschirme:	Cronex	DuPont, Bad Nauheim
Western-Blot-System:	Mini Protean II	Biorad, Hercules, USA

Tab. 2.4: Elektrophoresegeräte

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Verbrauchsmaterialien

2.3.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

µl-Pipettenspitzen:		Eppendorf, Hamburg
		Gilson, Villiers-le-Bel, F
Blotting-Membran:	Cellulosenitrate BA85	Schleicher & Schuell, Dassel
Blotting-Papier:	GB 002	Schleicher & Schuell, Dassel
Filme:	X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
ml-Pipetten:	Gold Seal 9702, 2 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
	60 61 80, 5 ml	Greiner, Frickenhausen
	60 71 80, 10 ml	Greiner, Frickenhausen
	Gold Seal 9725, 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
	Falcon 7550, 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Multipipettenspitzen:	Combitips 1,25	Eppendorf, Hamburg
	Combitips 12,5	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:	3810	Eppendorf, Hamburg
	55.476	Sarstedt, Nümbrecht

Tab. 2.5: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

2.3.1.2 Zellkulturmaterialien

Gewebekulturplatte:	Falcon 3072	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen:	Cryo Vials	Greiner, Frickenhausen
Kulturgewebsschalen:	Falcon 3025	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

	Nunclon	Nunc, Wiesbaden
	Falcon 3004	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter:	Millex-GS	Millipore, Bedford, USA
Zellschaber:	Disposable Cell Scraper	Greiner, Frickenhausen

Tab. 2.6: Zellkulturmaterialien

2.3.2 Chemikalien und Gebrauchslösungen

2.3.2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3.2.2 Gebrauchslösungen

Gebrauchslösungen wurden aus bidestilliertem oder äquivalent entionisiertem Wasser und Chemikalien in p.a. Qualität hergestellt.

KRB(-H) (Krebs-Ringer Puffer)	7,01 g NaCl, 3,03 g Tris, 1,23 g NaHCO ₃ , 0,37 g KCl, 0,30 g MgSO ₄ und 0,29 g NaEDTA (eventuell HEPES) in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit HCl auf pH 7,4 titrieren, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
LB-Medium	10 g Bacto-Tryptone, 10 g NaCl und 5 g Yeast Extract in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit NaOH auf pH 7,5 titrieren, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
PBS(-EDTA) (Phosphate buffered saline)	8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ und 0,20 g KH ₂ PO ₄ (eventuell 0,20 g EDTA) in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit HCl auf pH 7,4 titrieren, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

SDS Sample Puffer (SDS 10%)	100 g SDS in 800 ml Aqua bidest. bei 68 ° C lösen, mit HCl auf pH 7,2 titrieren, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen.
TBS (Tris buffered saline)	137 mMol NaCl, 25 mMol Tris-HCl, 5 mMol KCl, 0,7 mMol CaCl ₂ und 0,5 mMol MgCl ₂ in 800 ml Aqua bidest. lösen, mit HCl auf pH 7,4 titrieren, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
TE-Puffer	1 ml 1M Tris-Puffer (pH 8,0) und 200 µl 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0) mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren

Tab. 2.7: Gebrauchslösungen

2.3.2.3 Zellkulturmedien

RPMI 1640	PAA Laboratories, Linz, A
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, GB
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Linz, A
POnly	500 ml RPMI mit 25 ml Penicillin/Streptomycin

Tab. 2.8: Zellkulturmedien

2.3.2.4 Kommerzielle Versuchssysteme

Plasmidpräparations-kit:	Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren
Protein Essay:	BCA Protein Essay	Pierce, Bedford, USA
Reporter-Gen System:	Luciferase Essay System	Promega, Heidelberg
Transfektionskit:	PerFect Lipid Pfx-3	Invitrogen, Leek, NL

Western Blot Analyse-kit:	PhosphoPlus p44/42 Kinase Antibody Kit	MAP	New England Biolabs, Schwalbach
Zellproliferationstest:	EZ4U, Easy for you		Biomedica, Wien, A
Proteinbestimmung:	BCA Protein Assay		Pierce, Bedford, USA
RNA-Isolierung:	RNAclean		AGS, Heidelberg

Tab. 2.9: Kommerzielle Versuchssysteme

2.3.2.5 Peptide, Antagonisten et al.

Peptide und Antagonisten wie IGF-I, PD 098059 oder der Anti-IGF-I-Antikörper wurden von Schützdecker (Tübingen) und Calbiochem (San Diego, USA) bezogen. Der chicken-IGF-I-Promotor mit Luciferase-Gen pIGFLuc/-2100 wurde von Dr. Kajimoto (Osaka, Japan) zu Verfügung gestellt.

2.4 Methoden

2.4.1 Zellkultur

Die Zellen wurden auf Zellkulturschalen von Becton Dickinson und Nunc mit angereichertem RPMI 1640 Medium im Berthold-Inkubator bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Der Zeitraum der Zellzahlverdopplung betrug circa 24 h. Der Zustand der Zellen wurde täglich makroskopisch und mit dem Zellkulturmikroskop kontrolliert. Mit dem Mikroskop wurden die Zellen auch auf Kontamination vor, während und nach den einzelnen Arbeitsschritten untersucht. Alle Arbeiten an nicht geschlossenen Kulturgefäßen fanden zum Schutz vor Kontamination unter der Werkbank Lamin Air von Heraeus statt.

2.4.1.1 Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium für die Zelllinie LCC-18 besteht aus 500 ml RPMI 1640 angereichert mit 25 ml Fetalem Kälberserum (FCS), 50.000 IU Penicillin, 50 mg Streptomycin, 1,81 µg Hydrokortison, 665 µg Insulin, 20 mg Transferrin, 0,54 µg β-Estradiol und 1,93 µg Natriumselenit (HITES-Medium).

RPMI 1640, FCS und eine kombinierte Lösung von Penicillin und Streptomycin lagen steril vor (Gibco), die übrigen Mediumzusätze wurden aus Stammlösungen in PSoonly entnommen (Tab. 2.1) und wurden vor Zugabe steriltfiltriert.

2.4.1.2 Passagierung

Der Zell-Monolayer wurde bei Erreichen einer Oberflächenabdeckung von ca. 70-90 % von der Zellkulturschale gelöst und die Zellsuspension auf neue Schalen mit frischem Medium überführt. Alle verwendeten Lösungen mußten dabei vorher Raumtemperatur erreicht haben.

Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und verworfen. Die Kulturschale wurde danach durch vorsichtiges Einlassen von 10 ml PBS, kurzes Schwenken und anschließendes Absaugen gewaschen und mit 3 ml PBS-EDTA für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 7-9 ml Medium durch wiederholtes Aufnehmen und Ablassen mit der Pipette von der Unterlage gelöst, was makroskopisch sichtbar kontrolliert werden konnte. Die resultierende Zellsuspension wurde auf 4 bis 6 auf neue Zellkulturschalen verteilt, mit frischem Medium auf 15 ml aufgefüllt, kurz geschwenkt und anschließend im Inkubator versorgt.

Substanz	Konzentration	Zugegebene Menge in 500 ml RPMI 1640
Transferrin	20 mg/ml	1 ml
Insulin	1 mg/ml	665 µl
Natriumselenit	38,6 µg/ml	50 µl
Hydrokortison	36,25 µg/ml	50 µl
β-Estradiol	27,24 µg/ml	20 µl

Tab. 2.10: Stammlösungen der Mediumzusätze für LCC-18

2.4.1.3 Cryokonservierung

LCC-18-Zellen können in einem äquipartem Gemisch aus FCS und DMSO bei -196° C cryokonserviert werden.

Einfrieren

Die entsprechend 2.4.1.2 gewonnene Zellsuspension wurde 2 Minuten lang bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in 1 ml FCS/DMSO pro ursprünglicher Zellkulturgewebsschale resuspendiert. Die Resuspension wurde in Cryo Vials aliquotiert und für 24 Stunden bei -20° C

tiefgefroren. Anschließend wurden die Cryo Vials in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Cryotank verwahrt.

Auftauen

Vorbedingung zum Auftauen ist eine Zellkulturschale mit 37° C warmen Medium. Das Cryo Vial mit dem Aliquot wurde dem Cryo Tank entnommen und in einfaches Wasser mit Raumtemperatur getaucht. Nach ca. 60 Sekunden hatte sich die Zellsuspension verflüssigt und konnte auf die vorbereitete Zellkulturschale gegossen werden. Diese wurde für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel ohne Passagierung.

2.4.2 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wurden die Zellen auf Expression von IGF-I-Rezeptor-mRNA und IGF-I-mRNA untersucht. Dazu wurde die RT-PCR-Technik (Reverse Transkriptase) angewendet.

2.4.2.1 Probengewinnung

Die zelluläre RNA wurde aus großen, konfluenten Kulturgewebsschalen mit Hilfe von RNAClean von AGS gewonnen.

Das analog zu 2.4.1.3 gewonnene Zell-Pellet wurde mit 2 ml RNAClean und 0,2 ml Chloroform gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 20 min bei 4° C und 16000 U/min zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin gelöste RNA mit einem Äquivolumen eisgekühltem Isopropanol gefällt. Nach 10 min wurde die RNA für 15 min bei 4° C und 16000 U/min abzentrifugiert und das resultierende RNA-Pellet in TE-Puffer resuspendiert und nochmals mit einem Äquivolumen Ethanol gefällt. Nach einer letzten Zentrifugation (15 min, 4° C, 16000 U/min) wurde die RNA in TE-Puffer gelöst und die Konzentration im RNA/DNA Calculator Genequant von Pharmacia gemessen.

2.4.2.2 RT-PCR

1 µg RNA wurde in 30 µl RT-Reaktionslösung revers transkribiert. Die Reaktionslösung enthielt außer der RNA 25 mM TrisCl, 37,6 mM KCl, 5 mM DTT, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP-Mix (Boehringer Mannheim), 20 U RNAsin (Perkin Elmer) und 0,8 µg Oligo dT 15 (Boehringer Mannheim). Die Lösung wurde für 5 min bei 65° C und für 10 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden 50 UMMLu-RT (Perkin Elmer)

zugegeben und die Lösung für eine weitere Stunde bei 37° C belassen. Es folgte ein Denaturierungsschritt bei 75° C für 5 min.

1 µl der cDNA-Lösung wurde in 30 µl PCR-Reaktionslösung amplifiziert. Außer der cDNA-Lösung enthielt die Reaktionslösung 50 mM KCl, 10 mM TrisCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP-Mix, 0,5 µM von jedem Primer, 5 % DMSO, 0,001 % Gelatine und 1 U Taq-Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifizierung der cDNA wurde im Thermocycler von Landgraf durchgeführt.

Es wurden 40 Zyklen mit folgendem Aufbau ausgeführt: 60 s bei 95° C, 40 s bei 55° C, 60 s bei 72° C. Der erste Zyklus begann mit einem Denaturierungsschritt von 200 s Länge bei 95° C.

Als Primer dienten folgende Oligonukleotide:

- IGF-I-Rezeptor Primer:
Sense: 5'-ACCCGGAGTACTTCAGCGC-3'
Antisense: 5'-CACAGAAGCTTCGTTGAGAA-3'
Produkt: 229 bp, spezifisch für IGF-I-Rezeptor
- IGF-I Primer:
Sense: 5'-GAAGGTGAAGATGCACACCA-3'
Antisense: 5'-AGCGAGCTGACTTGGCAGGCAGGCTTGA-3'
Produkt: 302 bp, spezifisch für IGF-I

2.4.2.3 Analyse

Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Agarose-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid analysiert.

Zur Herstellung des 1 prozentigen Agarosegels wurden 0,1 g Agarose in 10 ml 90° C heißem TAE-Puffer gelöst, 5 µg Ethidiumbromid zugemischt, das unausgehärtete Gel bei ca. 55° C in die Gelkammer gegeben und die Kämme für die Proben taschen eingesteckt. Nach dem Abkühlen und Erhärten des Gels wurden die Kämme und die Abdeckungen der Stirnseiten der Gelkammer entfernt und die Gelkammer in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Diese wurde mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel mindestens 1 mm mit Puffer bedeckt war. Die Taschen wurden mit einem Gemisch zu gleichen Teilen aus 10fach Loading-Puffer und den Proben, der Kontrolle und einem Marker gefüllt.

Die Stromquelle wurde mit der Anode taschen fern an die Elektrophoreseapparatur angeschlossen und eine Spannung von 80 V eingestellt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau aus dem Loading-Puffer, das ungefähr mit der

Geschwindigkeit eines 500 bp großen DNA-Fragments wandert, ca. die Mitte des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese aus der Apparatur ausgebaut und im UV-Transilluminator betrachtet bzw. zur Dokumentation fotografiert.

2.4.3 Wachstumsversuche

Die Wachstumsversuche wurden mit Hilfe des Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest EZ4U von Biomedica durchgeführt.

Es handelt sich um einen nichtradioaktiven, kolorimetrischen Test, der auf der Fähigkeit vitaler Zellen beruht, schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in stark gefärbte Formazanderivate reduzieren zu können. Die durch die Umwandlung erhöhte Absorption kann in einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen werden [Hansen et al., 1989]. Bei richtiger Handhabung ist das Tetrazolium-/Formazan-System eine genaue und zuverlässige Methode, um proliferative bzw. antiproliferative Vorgänge im Zellstoffwechsel zu dokumentieren [Marshall et al., 1995].

Vorbereitung

Die Zellen wurden in POnly mit Multipipetten auf 96-well-Zellkulturgewebsplatten ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde eine Zellzahl von ca. 3000 pro well angestrebt. Die Menge des eingesetzten Mediums betrug 180 bzw. 160 µl, je nachdem ob später noch ein oder zwei Substanzen zugefügt werden sollten. Die wells A-1 bis A-4 wurden für die Leerwertmessung reserviert und nur mit POnly (200 µl) befüllt. Desweiteren wurden auch alle übrigen randständigen wells nur mit POnly befüllt, in Vorversuchen hatte sich in diesen unregelmäßiges Zellwachstum gezeigt.

Stimulation

Nach einer ersten Inkubationszeit von 24 h wurden die wells mit den zu testenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen bestückt. Das Endvolumen in den einzelnen wells am Ende dieses Arbeitsschrittes betrug jeweils 200 µl. Dabei wurden regelmäßig die wells B-2 bis G-2 für die unbehandelte Kontrolle und die wells B-3 bis G-3 für die Positiv-Kontrolle verwendet. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit POnly aufgefüllt, die Positivkontrolle mit FCS und eventuell mit POnly bis zu einer FCS-Endkonzentration von 10 %. PD 098059 wurde nach Herstellerempfehlung 1 Stunde vor Zugabe der anderen Substanzen vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert.

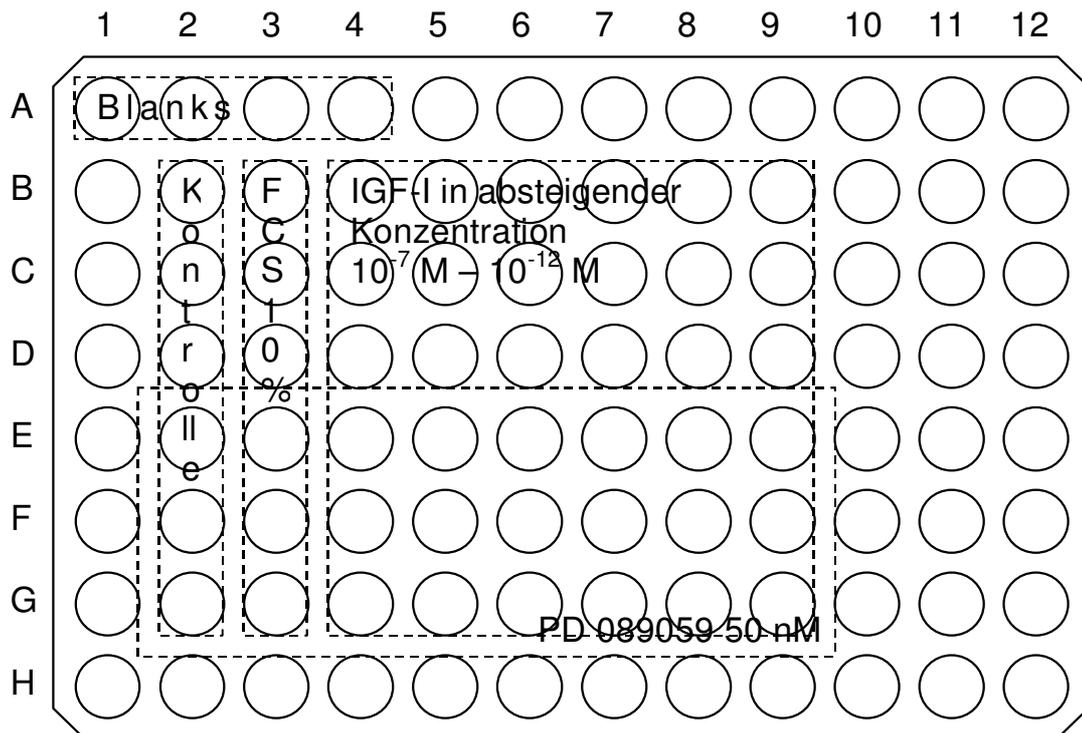


Abb. 2.2: Belegung der Mikrotiterplatte bei Wachstumsversuchen, Beispiel: IGF-I +/- PD 098059

Messung

Nach der zweiten Inkubationszeit wurden die wells mit je 20 μ l Farbstofflösung aus dem EZ4U Zellproliferationstests nach Vorschrift des Herstellers bestückt und verblieben für weitere drei Stunden im Brutschrank. Nach dieser Zeit wurden die Zellkulturgewebsplatten im MRX ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm Wellenlänge gemessen.

2.4.4 Konditioniertes Medium

Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden große, ca. 40 % konfluente Kulturgewebschalen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 15 ml POnly befüllt. Nach 24 h im Inkubator wurde das so konditionierte Medium abgesaugt, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand als Stimulans in Wachstumsversuchen analog zu 2.4.3 verwendet.

Desweiteren wurde das konditionierte Medium einem Radioimmunoassay (RIA) unterzogen, um die Konzentration von eventuell sezerniertem IGF-I zu bestimmen. Der RIA wurde extern durchgeführt und von Biochem Immunosystems, Freiburg, bezogen.

2.4.5 Transiente Transfektionen

Die Transfektionsversuche wurden an ca. 60 % konfluenten Zellen auf 40 mm durchmessenden Kulturgewebsschalen mit dem Plasmid pIGFI Luc/-2100 durchgeführt. Das Plasmid trägt das Gen für den Hühner-IGF-I-Promoter und nachgeschaltet das transkriptionelle Luciferase-Reporter-Gen; außerdem vermittelt das Plasmid Ampicillinresistenz.

2.4.5.1 Plasmidgewinnung

Ein Aliquot einer Übernachtskultur eines plasmidtragenden Stammes wurde in 400 ml LB-Medium zuzüglich Ampicillin überimpft und 16 h bei 37° C und 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde die Bakterienzellmasse bei 3000 U/min abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Plasmid-Präparations-Kits Nucleobond AX von Qiagen aufgearbeitet.

Dazu wurde das Bakterienpellet im RNase-haltigen Puffer P1 aufgenommen, anschließend erfolgten Lyse der Zellen und Denaturieren der genomischen sowie der Plasmid-DNA durch den SDS-haltigen, alkalischen Puffer P2 (5 min bei RT). Durch Zugabe des sauren, 3,3 M Kaliumacetat-haltigen Puffer P3 (20 min bei 4° C) präzipitierten aufgrund des hohen Salzgehaltes denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS, während die Plasmid-DNA bei dem jetzt neutralen pH-Wert reassoziieren konnte. RNA wurde durch die RNase abgebaut. Nach zweifacher Zentrifugation bei 15000 U/min für 20 bzw. 15 min bei 4° C wurden maximal 200 ml des klaren Überstandes auf die präequilibrierten Anionenaustauschersäulen gegeben, an die nur Nukleinsäuren (genomische- und Plasmid-DNA, RNA), nicht aber zelluläre Proteine oder Metabolite binden. Nach zwei Waschschritten mit 30 ml des 1 M NaCl-haltigen Puffers QC, erfolgte die Eluation der DNA aus den Säulen mit 15 ml Puffer QF. Das Eluat wurde mit 12 ml Isopropanol und 1,5 ml 3 M Na-Acetat-Lösung gefällt und die DNA bei 10000 U/min für 45 min bei 4° C abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das gewonnene Pellet in 200 - 400 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert und mit 2,5 Volumen Ethanol erneut gefällt. Nach einer letzten Zentrifugation bei 14000 U/min für 20 min bei 4° C wurde das Pellet wieder in 200 - 400 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert.

Der DNA-Gehalt wurde im RNA/DNA Calculator Genequant von Pharmacia gemessen. Dazu wurden 10 µl der Suspension mit 990 µl TE-Puffer verdünnt. Die DNA-Konzentration berechnete sich nach der Formel:

$$\text{Meßwert} \times 5 = \text{DNA in } \mu\text{g} / \mu\text{l}.$$

2.4.5.2 Transfektion

Transfiziert wurde mit dem Lipid # 3 aus der PerFect Lipid Transfektionsset von Invitrogen. Das Transfektionsmedium bestand aus POnly mit 12 μ l Lipid und 4 μ g Plasmid pro 1 ml Medium. Nach Vorschrift des Herstellers wurden das Lipid und das Plasmid zunächst getrennt in doppelter Konzentration angesetzt und anschließend beide Lösungsansätze zusammengekippt.

Die Zellen wurden in Vollmedium auf kleine Zellkulturgewebsschalen ausgesät, so daß sie am nächsten Tag zu ca. 60 % konfluent waren. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Anschließend wurden je 3 ml frisch angesetztes Transfektionsmedium pro Schale eingelassen und die Zellen für vier Stunden im Brutschrank belassen. Danach wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch POnly ersetzt. Es folgte eine zweite Inkubationszeit von 24 Stunden.

2.4.5.3 Stimulation

Am zweiten Tag wurden den transfizierten Zellen die verschiedenen Testsubstanzen zugesetzt. Die Negativkontrolle verblieb in POnly, die Positivkontrolle wurde mit FCS in einer Endkonzentration von 10 % stimuliert.

2.4.5.4 Messung

Luciferase als Produkt der IGF-I-Promoteraktivität im Plasmid wurde mit dem Luciferase Assay System von Promega gemessen.

Zuerst wurde eine Zellextraktpräparation durchgeführt. Die Zellkulturschalen wurden vor dem Ernten 2 mal mit 3 ml PBS gewaschen und 15 min mit 400 μ l Reporter Lysis Puffer (5-fach Puffer, 1:5 in Aqua bidest.) zur Lyse der Zellen bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zell-Lysate mit einem Zellscraper von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Trockeneis durchgefroren, um die Lyse zu verbessern. Nach dem Auftauen wurden die Lysate für 10-15 s auf dem Vortexer durchgeschüttelt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min wurde das Lysat durch Abkippen in ein neues Reaktionsgefäß von den Zelltrümmern getrennt. Die Leuchtkraft als Korrelat der Luciferasekonzentration von je 20 μ l des gewonnenen Zellextraktes wurde im Berthold Luminometer unter Zugabe von jeweils 100 μ l Luciferin-Lösung –das Substrat von Luciferase– gemessen.

2.4.5.5 Proteinbestimmung

Um die im Luciferase Assay gemessenen Werte (RLU, Relative Light Units) miteinander vergleichen zu können, mußte die relative Zellzahl der einzelnen Proben ermittelt werden. Dies wurde durch eine Proteinbestimmung der Proben mit dem BCA Protein Assay von Pierce näherungsweise bestimmt.

Die Reagenzien A und B wurden nach Herstellervorschrift aufbereitet und sowohl den Proben als auch einer frisch angesetzten Albuminverdünnungsreihe in einer Mikrotiterplatte zugesetzt (200 µl BCA Reagens auf 10 µl Probe/Standard). Nach 30 min Inkubation bei 37° C und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Absorptionswerte im MRX ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Absorptionwerte der Albuminverdünnungsreihe konnten dann gegen die Albuminkonzentrationen auf Millimeterpapier aufgetragen und die Proteinkonzentration der einzelnen Proben graphisch abgelesen werden. Der Quotient aus den im Luciferase Assay gemessenen LU und der Proteinkonzentration erhielt den Namen kLU (korrigierte Light Units) und erlaubte einen Vergleich der Meßdaten verschiedener Proben.

2.4.6 Western Immunoblotting

Mit dem Western-Blot Verfahren wurden die Effekte von IGF-1 auf der Zellsubstratebene geprüft. Durchgeführt wurde der Test mit dem PhosphoPlus p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody Kit von New England Biolabs.

2.4.6.1 Vorbereitung

Probengewinnung

Die Zellkulturschalen wurden zweimal mit PBS gespült und mit auf 37° C vorgewärmten KRB-H für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit folgte ein erneuter Mediumwechsel mit KRB-H. Nach 10 Minuten wurden die Proben mit FCS und IGF-I mit und ohne Hemmstoffe stimuliert. Die Kontrolle blieb unstimuliert.

Gelkammer

Die Western-Blot-Apparatur Mini-Protean II wurde nach Oberflächenreinigung derjenigen Teile, die Kontakt zum Gel hatten, mit Aqua bidest. und hochreinem Ethanol nach Herstellervorschrift zusammengesetzt.

SDS-Acrylamidgel

Für eine Mini Protean II Kammer, die zwei Gele faßt, wurden Trenngel und Sammelgel nach folgenden Rezepten hergestellt:

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30%)	7,2 ml	1,6 ml
Aqua destillata	1,8 ml	5,9 ml
Running-Buffer (4x)	3,0 ml	-
Stacking-Buffer (4x)	-	2,5 ml
SDS (10 %)	900 µl	200 µl
APS (10 %)	37,5 µl	60 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Tab. 2.11: SDS-Acrylamidgel

Die Ingredienzen des Trenngels wurden in der Reihenfolge der Tabelle 2.2 blasenfrei in ein Becherglas pipettiert und unter Schwenken vermischt. Das Gemisch wurde in die Gelkammer gegossen und anschließend mit SDS (0,1%) überschichtet, um nach dem Aushärten eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Der Spiegel wurde so eingestellt, daß die Taschen des Sammelgels über ihm enden würden. Nach ca. einer Stunde konnte das SDS (0,1%) von der Trenngeloberfläche abgeschüttet und das analog hergestellte Sammelgel gegossen werden. Vor dem Aushärten des Sammelgels wurden die Kämme für die Sammeltaschen eingeschoben.

2.4.6.2 Durchführung

Elektrophorese

Nach Entfernung der Kämme für die Sammeltaschen aus dem ausgehärteten Gel wurden die Gelkammern in das Elektrophorese-Gehäuse eingelassen und mit Running-Puffer überschichtet. In den Sammeltaschen eventuell verbliebene Luftblasen wurden mit Running-Puffer aus einer sterilen Einmalspritze mit einer Kanüle unter mäßigem Druck aus den Taschen gespült. Die Taschen wurden unmittelbar vor Beginn der Elektrophorese mit Kontrollen, Standards und den Proben mit einem Volumen von 2-5 µl unterschichtend befüllt. Die eingesetzte Menge richtete sich nach der Proteinkonzentration der Proben, die analog 2.4.5.5 ermittelt wurde. Anschließend wurde die Apparatur mit dem Deckel vervollständigt,

die Elektroden mit der Stromquelle verbunden und eine Spannung von 40 V eingestellt.

Western Blot

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gelkammern aus dem Gehäuse entfernt und abgetropft. Die Gelkammern wurden geöffnet und die Trenngele vorsichtig von den Glasplatten gehoben. Die Sammelgele konnten an der Demarkationslinie abgetrennt werden und wurden verworfen. Die Gele wurden nun zusammen mit einer kongruenten Nitrocellulose-Membran zwischen vier Lagen Blotting-Papier in die Blotting-Kammern eingespannt. Die Blotting-Kammern wurden in die Elektrophorese-Gehäuse eingelassen, der Deckel geschlossen und die Apparatur an die Stromquelle angeschlossen. Geblottet wurde im Eisbad für 2 h bei 300 mA.

Entwicklung

Nach Ende des Blotting-Vorgangs wurden die Membranen für 90 min in 20 ml Blocking-Puffer aus TBS, 0,3 % Tween-20 und 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt. Es folgten drei Waschgänge von jeweils 5 min mit 10 ml TBS-T. Danach wurde mit dem ersten Antikörper, Phospho-specific p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody bzw. p44/42 MAP Kinase Antibody, 1:1000 verdünnt in 10 ml TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend folgte ein zweiter Waschzyklus analog dem ersten. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 in 10 ml TBS-T verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dritten Waschzyklus, diesmal mit 4 Waschgängen, wurden die Membranen 1 min in 10 ml frisch hergestellter Detektionslösung aus 0,5 ml 20-fach LumiGLO, 0,5 ml 20-fach Peroxid und 9 ml Aqua bidest. geschwenkt. Nach Abstreifen überschüssiger Flüssigkeit und Einwickeln der Membranen in Saran-Wrap folgte die Kontaktbelichtung von drei Röntgenfilmen in Sequenz mit Belichtungszeiten von 1, 5 und 10 Minuten. Die Belichtungsintensität/Filmschwärzung wurde mit dem Elscript Densitometer gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 RT-PCR

Die elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte mit den IGF-I-Rezeptor Primern zeigte die Amplifikation eines 229 bp großen DNA-Fragmentes. Bei Verwendung von IGF-I Primern wurde eine 302 bp großes DNA-Fragment amplifiziert.

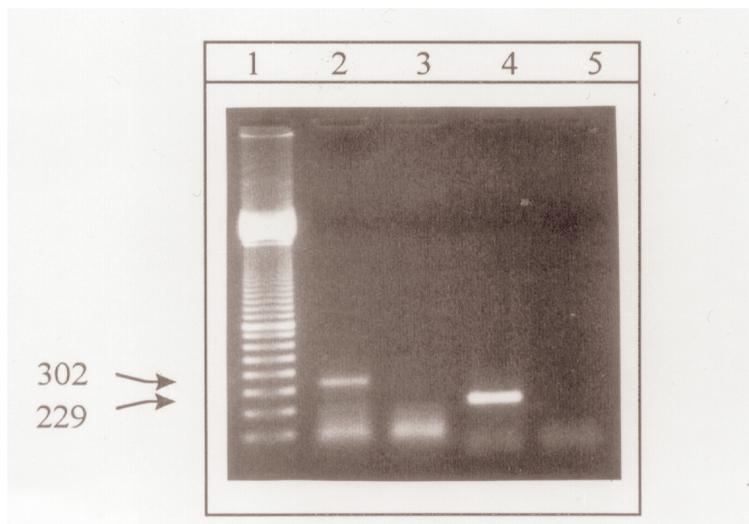


Abb. 3.1: Die Abbildung zeigt die Fotografie des Ethidiumbromid-Gels nach Elektrophorese der RT-PCR-Produkte. Säule 1 ist mit einem 100 bp-Marker beladen. Säule 2 enthält die Produkte der RT-PCR mit dem IGF-I-Primer, Säule 4 die Produkte der RT-PCR mit dem IGF-I-Rezeptor-Primer. Die Säulen 3 und 5 enthalten die jeweiligen Negativkontrollen ohne Primer. Die Bande in der Säule 2 im Bereich von 302 bp ist spezifisch für das Produkt des IGF-I-Primers, die Bande in Säule 4 im Bereich von 229 bp ist spezifisch für das Produkt des IGF-I-Rezeptor-Primers.

3.2 Wachstumsversuche

In den Wachstumsversuchen sollte gezeigt werden, ob und wie IGF-I die Proliferation von LCC-18 Zellen beeinflusst und wie diese Wirkung durch verschiedene Stoffe modifiziert werden kann. Gemessen wurde die Wirkung von IGF-I in den Konzentrationen 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} und 10^{-13} M, der Einfluß von PD 098059 (50 μ M) auf die Wirkung von IGF-I sowie der Einfluß von konditioniertem Medium. Als Kontrollen wurden POnly (keine externe Stimulation) und FCS (10 %, maximale, unspezifische Stimulation) verwendet.

3.2.1 Berechnung

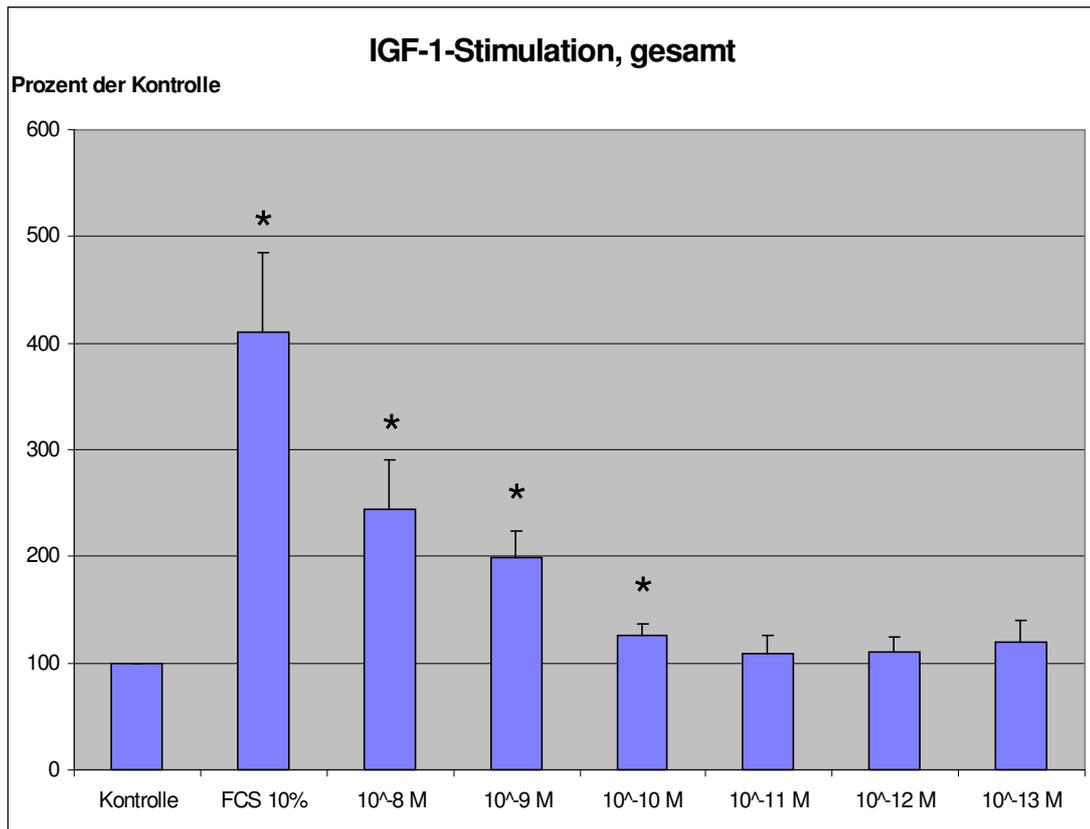
Die gemessenen Extinktionswerte wurden in Microsoft Excel-Tabellen ausgewertet. Die Leerwerte der jeweiligen Mikrotiterplatte wurden gemittelt, und dieser Wert von den übrigen Extinktionswerten subtrahiert. Um die verschiedenen Meßreihen zusammenfassen zu können, wurden die Mittelwerte der korrigierten Extinktionswerte prozentual auf die Kontrolle bezogen. Die Extinktion der Kontrolle wurde dabei jeweils auf 100 % gesetzt. Es wurden sechs unabhängige Messungen durchgeführt und zusammengefaßt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben geprüft, das Signifikanzniveau wurde im Vorfeld mit 0,05 definiert.

3.2.2 Stimulation mit IGF-I

Die Zusammenfassung der Daten der einzelnen Datensätze als Prozent der Kontrolle ergab folgendes Gesamtbild:

IGF-I-Stimulation	Prozent der Kontrolle	Standardabweichung	t-Test
Kontrolle	100,00	0	—
FCS 10 %	409,67	75,8652	0,000171
IGF-I 10^{-8} M	244,09	46,3045	0,000618
IGF-I 10^{-9} M	198,36	24,8774	0,000200
IGF-I 10^{-10} M	125,51	11,5244	0,002890
IGF-I 10^{-11} M	108,88	16,3686	0,241202
IGF-I 10^{-12} M	110,77	14,2948	0,124190
IGF-I 10^{-13} M	118,99	21,6388	0,084277

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Meßwerte der verschiedenen Wachstumsversuche mit IGF-I-Stimulation (10^{-8} M – 10^{-13} M, n = 6). Der t-Test bezieht in diesem Fall die einzelnen Meßwerte auf die unstimulierte Kontrolle.



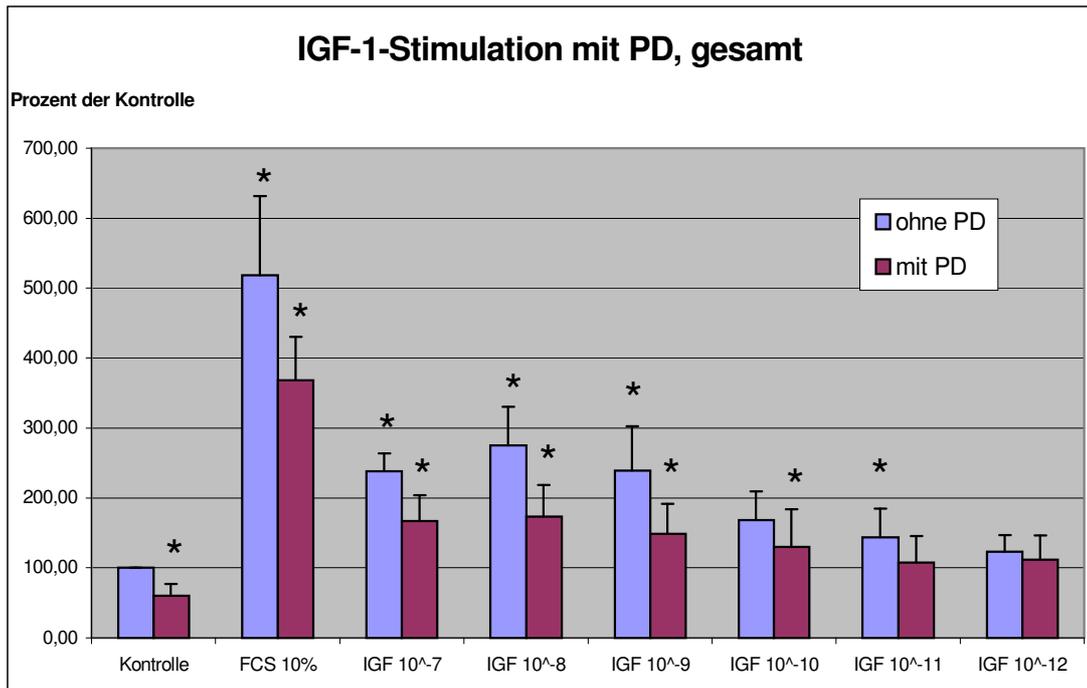
Graph. 3.1: Graphische Darstellung der zusammengefaßten Meßwerte der verschiedenen Wachstumsversuche. Zugabe von IGF-I zum Kulturmedium in einer Konzentration von 10^{-8} – 10^{-10} M führt zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Extinktionswerte gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt ist bei einer Konzentration von 10^{-8} M am ausgeprägtesten.

3.2.3 IGF-I nach Vorinkubation mit PD 098059

Nachfolgend sind die Extinktionswerte aus den Wachstumsversuchen mit IGF-I mit und ohne Vorinkubation mit PD 098059 (50 μ M) dargestellt. Die prozentual umgerechneten Daten wurden zu folgendem Gesamtdatensatz zusammengefaßt:

IGF-I-Stimul. +/- PD 098059	% der Kontrolle	StAbw.	t-Test	% der Kontrolle	StAbw.	t-Test
Kontrolle	100,00	0,000	—	59,70	17,361	0,002346
FCS 10 %	518,73	113,283	0,000275	367,90	62,211	0,006495
IGF-I 10^{-7} M	238,20	25,382	0,000042	166,82	37,026	0,020044
IGF-I 10^{-8} M	275,64	54,572	0,000528	173,56	45,175	0,008025
IGF-I 10^{-9} M	239,15	63,603	0,003042	148,93	42,197	0,002847
IGF-I 10^{-10} M	168,42	40,799	0,009282	129,90	54,245	0,058918
IGF-I 10^{-11} M	143,57	41,421	0,049655	107,47	37,800	0,022506
IGF-I 10^{-12} M	123,35	23,568	0,059655	111,75	34,272	0,343544
	ohne PD			mit PD		

Tab. 3.2: Zusammenfassung der Meßwerte der verschiedenen Wachstumsversuche mit IGF-I (10^{-7} M – 10^{-12} M) mit und ohne Vorinkubation mit PD 098059 (50 mM). Der t-Test prüft in diesem Fall einerseits die Irrtumswahrscheinlichkeit der IGF-I-Stimulation gegenüber der Kontrolle und andererseits die Änderung der Meßwerte nach Vorinkubation mit PD 098059 gegenüber den Proben ohne Vorinkubation mit PD 098059.



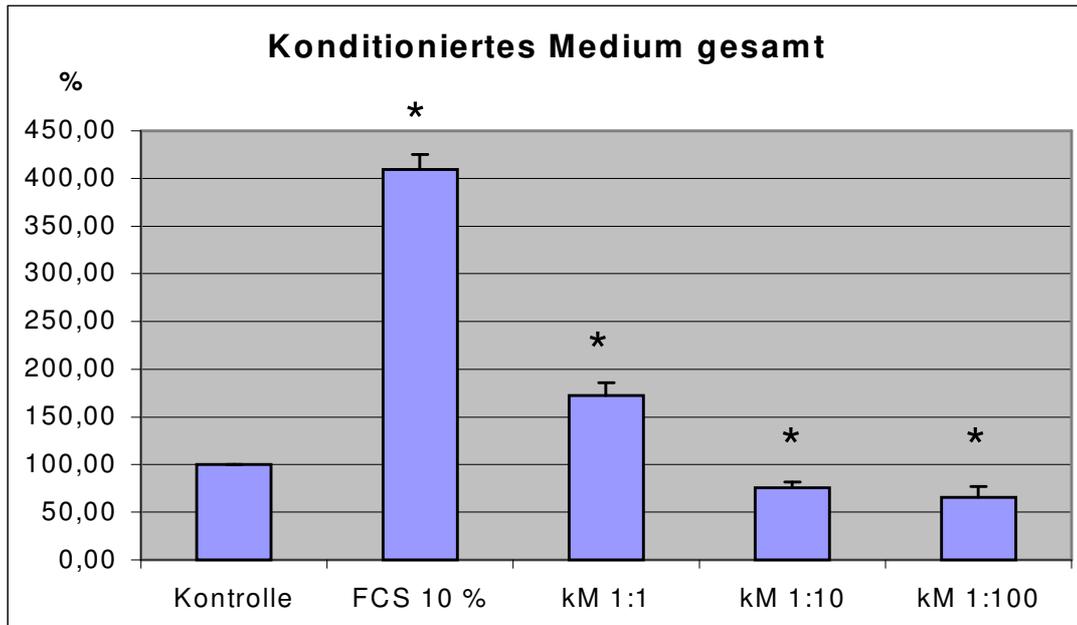
Graph. 3.2: Graphische Darstellung der zusammengefaßten Meßwerte der Wachstumsversuche mit IGF-I (10^{-7} M – 10^{-12} M, $n = 6$) nach Vorinkubation mit PD 098059 (50 mM). Zugabe von IGF-I zum Kulturmedium in einer Konzentration von 10^{-7} - 10^{-9} M und von 10^{-11} M führt zu einem signifikanten Anstieg der Extinktionswerte. Vorinkubation mit PD 098059 in einer Konzentration von 50 mM hat eine signifikante Senkung der Extinktionswerte sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Proben zur Folge

3.2.4 Konditioniertes Medium

In weiteren Wachstumsversuchen wurde konditioniertes Medium auf seinen Einfluß auf die Proliferation der LCC-18-Zellen geprüft.

Konditioniertes Medium	% der Kontrolle	Standardabweichung	t-Test
Kontrolle	100,000	0,000	—
FCS 10 %	409,114	16,228	0,00004
Kond. Medium 1:1	172,605	13,203	0,00161
Kond. Medium 1:10	75,757	5,628	0,00329
Kond. Medium 1:100	65,234	11,656	0,00942

Tab. 3.3: Zusammenfassung der Meßwerte der verschiedenen Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium (1:1, 1:10 und 1:100, $n = 6$).



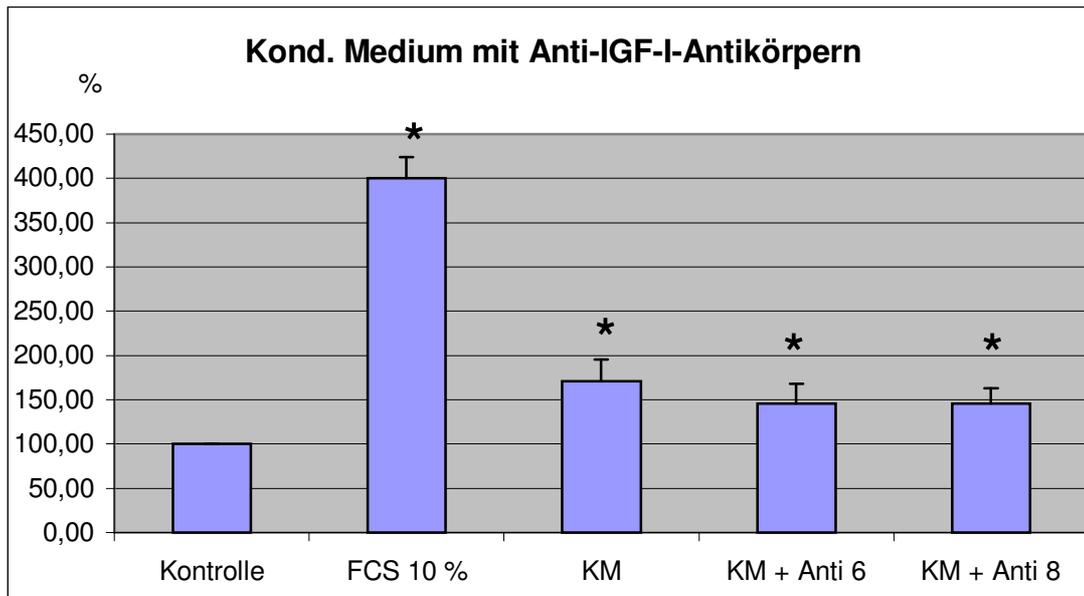
Graph. 3.3: Graphische Darstellung der zusammengefaßten Meßwerte der verschiedenen Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium (1:1, 1:10 und 1:100, $n = 6$). Bei Kultur der Zellen in unverdünntem konditioniertem Medium zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Extinktionswerte gegenüber der Kontrolle. Auch die Erniedrigung der Extinktionswerte bei Kultur in 1:10 und 1:100 verdünntem konditioniertem Medium ist eine signifikant Änderung gegenüber der Kontrolle.

3.2.5 Konditioniertes Medium mit Anti-IGF-I-Antikörpern

Bei diesen Wachstumsversuchen wurden dem konditionierten Medium vor Befüllung der Mikrotiterplatte Anti-IGF-I-Antikörper in einer Konzentration von 10^{-6} bzw. 10^{-8} M zugegeben, um den Anteil von IGF-I am proliferationsförderndem Effekt zu untersuchen.

Kond. Medium mit Anti-IGF-I	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Kontrolle	100,000	0,000	—
FCS 10 %	400,302	23,850	0,00013732
Kond. Medium	171,155	23,969	0,00955059
KM + Anti-IGF-I 10^{-6} M	145,460	22,472	0,00234413
KM + Anti-IGF-I 10^{-8} M	145,556	17,240	0,01924945

Tab. 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium unter Zugabe von Anti-IGF-I-Antikörpern in einer Konzentration von 10^{-6} bzw. 10^{-8} M.



Graph. 3.4: Die Graphik veranschaulicht die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium unter Zugabe von Anti-IGF-I-Antikörpern. Es zeigt sich einerseits analog zu Graph. 3.3 ein signifikanter Anstieg der Proliferation im konditioniertem Medium gegenüber der Kontrolle, andererseits wird der proliferationsfördernde Effekt durch die Zugabe von Anti-IGF-I-Antikörpern signifikant reduziert.

3.2.6 Weitere Wachstumsversuche

Analog zu den Wachstumsversuchen mit IGF-I wurden auch die Wachstumsfaktoren EGF, PDGF und bFGF untersucht. Diese zeigten jedoch im Gegensatz zu IGF-I keine signifikante Steigerung der Proliferation gegenüber den Kontrollen.

Wachstumsversuche mit IGF-I und dem PI 3-Kinase-Inhibitor LY 294002 (50 mM) zeigten, daß auch durch Hemmung der PI 3-Kinase eine signifikante Reduktion des Wachstums der LCC-18-Zellen erreicht wird. Versuche mit PD 098059 und LY 294002 zeigten eine additive Hemmung des Wachstums, die proliferationsfördernde Wirkung von IGF-I wurde dabei abhängig von der Konzentration teilweise vollständig aufgehoben.

3.3 RIA

Im IGF-I-RIA konnte in konditioniertem Medium IGF-I nachgewiesen werden. Die IGF-I-Konzentration betrug dabei 476,7 ng/ml. In der Kontrolle (nicht konditioniertes Medium) ließ sich mit dem RIA kein IGF-I nachweisen.

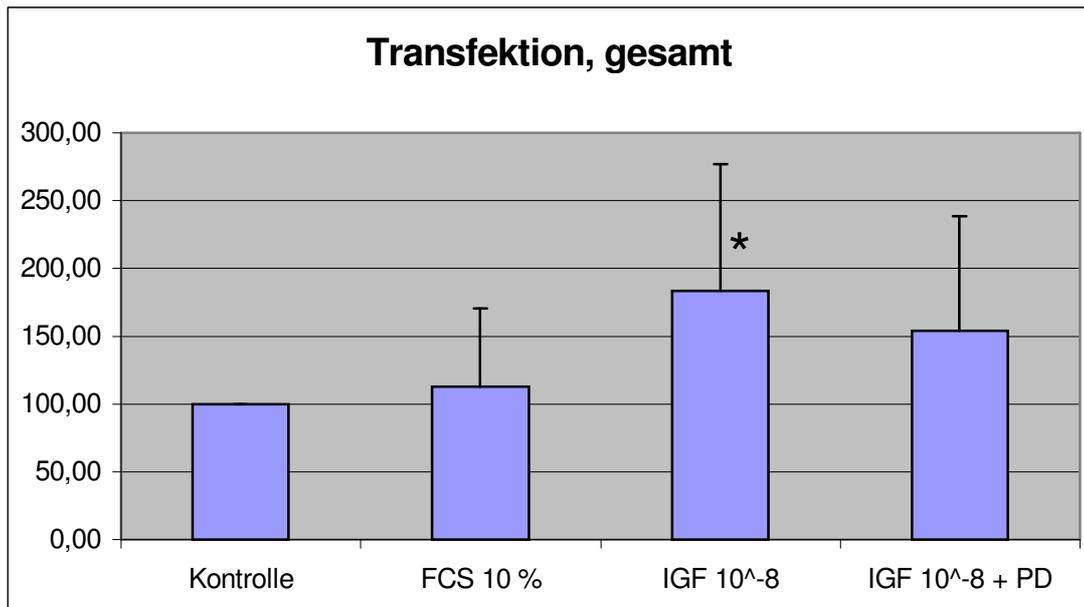
3.4 Transiente Transfektionen

Die Aktivität des IGF-I-Promotors wurde mit Hilfe transienter Transfektion des chicken-IGF-I-Promotors mit einem nachgeschalteten Reporter-gen (Luciferase) studiert. Die mit der Promotoraktivität korrelierende Expression des Reporter-genproduktes wurde auf Einfluß durch IGF-I in der Konzentrationen 10^{-8} M untersucht. Auch die Modulation dieses Einflusses durch PD 098059 (50 μ M) wurde getestet. Als Kontrollen dienten POnly und FCS (10 %).

Die Werte wurden prozentual auf die Kontrolle bezogen und die einzelnen Datensätze zu folgendem Gesamtbild zusammengefaßt.

Transiente Transfektionen	Mittelwert	Standardabweichung	t-Test
Kontrolle	100,000	0,000	—
FCS 10%	112,950	57,605	0,53881705
IGF-I 10^{-8} M	183,452	93,558	0,04147736
IGF-I 10^{-8} M + PD	153,958	84,741	0,13678057

Tab: 3.5: Zusammenfassung der Meßwerte der Luciferase-Messung der Zell-Lysate nach transienter Transfektion mit dem chicken-IGF-I-Promoter mit nachgeschaltetem Luciferase-Gen und Stimulation mit IGF-I (10^{-8} M, n = 6) ohne und mit Vorinkubation mit PD 098059.



Graph. 3.5: Graphische Darstellung der Luciferase-Aktivität der Zell-Lysate nach transienter Transfektion mit dem chicken-IGF-I-Promoter mit nachgeschaltetem Luciferase-Gen und Stimulation mit IGF-I ohne und mit Vorinkubation mit PD 098059. Stimulation mit IGF-I (10^{-8} M) führt zu einer signifikanten Anhebung der Luciferase-Aktivität. Vorinkubation mit PD 098059 führt zu keiner signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität gegenüber der mit IGF-I stimulierten Probe.

3.5 Western Blot

Die Bindung der p44/42-MAP-Kinase-Antikörper an der Western-Blot-Membran zeigte folgende Verteilungs- und Intensitätsmuster.

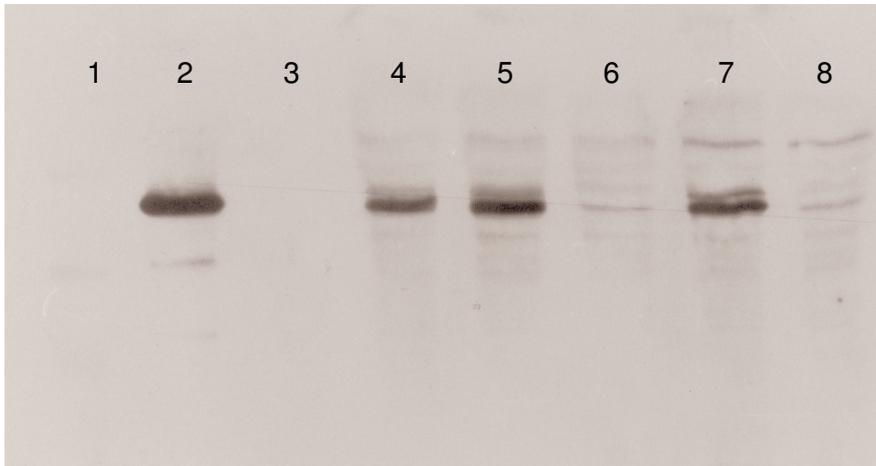


Abb. 3.2: Abbildung des Western Blot der LCC-18-Proben nach Stimulation mit IGF-I (10^{-8} M) ohne und mit Vorinkubation mit PD 089059 (50 nM). Säule 1 enthält den Marker, der sich bei der Belichtung nicht darstellt, die Säulen 2 und 3 enthalten die Positiv- bzw. die Negativkontrolle aus dem p44/42-MAP-Kinase Antibody Kit. Säule 4 wurde mit der unstimulierten Probe (Kontrolle) beladen, die Säulen 5 und 7 mit den IGF-I-stimulierten Proben (Säule 5: 10^{-8} M, Säule 7: 10^{-10} M). Die Säulen 6 und 8 enthalten die mit PD 098059 vorinkubierten Äquivalente zu 5 und 7. Stimulation mit IGF-I führt zu einem Anstieg der p44/42-MAP-Kinase gegenüber der Kontrolle. Nach Vorinkubation mit PD 098059 läßt sich die p44/42-MAP-Kinase auf der Blotting Membran nicht mehr eindeutig nachweisen.

4 Diskussion

Die Wachstumsregulation humaner, endokrin aktiver Tumoren des Gastrointestinaltraktes ist nur unzureichend aufgeklärt. Zelllinien, die sich aus solchen Tumoren ableiten, sind daher für die Erforschung der Biologie solcher Tumoren besonders interessant. Die aus einem Colon Karzinoid etablierte Zelllinie LCC-18 zeigte sich bezüglich ihrer endokrinen Eigenschaften auch nach über 100 Passagen stabil und ist damit ein geeignetes Werkzeug, um die Wachstumsregulation dieser Tumoren zu untersuchen [Lundqvist et al., 1991].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Zellen der Linie LCC-18, funktionell aktive IGF-I-Rezeptoren exprimieren. Auch konnte gezeigt werden, daß IGF-I von diesen Zellen sowohl gebildet als auch sezerniert wird. Stimulation mit IGF-I steigert die Proliferation von LCC-18 Zellen. Die Kultur der LCC-18-Zellen in konditioniertem Medium führt zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation. Nach Immunoneutralisierung von IGF-I in konditioniertem Medium wird die wachstumsfördernde Wirkung teilweise aufgehoben. Durch PD 098059, einem spezifischen MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor, wird sowohl die Proliferation unstimulierter Zellen als auch die proliferationsfördernde Wirkung von zugesetztem IGF-I signifikant reduziert. Die Ergebnisse der Versuche mit transienten Transfektionen von chicken-IGF-I-Promotor zeigen, daß die Aktivität des IGF-I-Promotors durch IGF-I gesteigert wird. In den Western Blots konnte gezeigt werden, daß die p44/42-MAP-Kinase für die Signaltransduktion eine Rolle spielt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung harmonisieren gut mit denen zahlreicher anderer, verwandter Studien, bei denen andere Zelltypen untersucht worden sind, und werden im folgenden weiter erörtert.

Auch bei anderen Tumoren konnte der mitogene und antiapoptotische Effekt des IGF-I/IGF-I-R-Systems nachgewiesen werden [Resnicoff et al., 1995b; Grothey et al., 1999]. Mäuseembryo-Fibroblasten, die eine Nullmutation für den IGF-I-Rezeptor tragen, zeigten in 10 prozentigem FCS ein verlangsamtes Wachstum und einen elongierten Zellzyklus. Ein Wachstum in serumfreiem, mit Wachstumsfaktoren angereichertem Medium war erst nach Transfektion mit einem Plasmid, das die mRNA des IGF-I-Rezeptors exprimiert, möglich [Sell et al., 1994]. Untersuchungen mit Zelllinien, die ein aberrantes p53 exprimieren, zeigen, daß dadurch eine Hochregulation von IGF-I-Rezeptoren bewirkt wird, die mit

großer Wahrscheinlichkeit eine bedeutende Rolle für die Proliferation und das Überleben maligner Zellen spielt [Girnita et al., 2000].

Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Wirkung von IGF-I bei verschiedenen Tumorzellarten über einen autokrinen bzw. parakrinen Rückkopplungsmechanismus vermittelt wird [Bergmann et al., 1995; Georgii-Hemming et al., 1996; Steller et al., 1996]. Die Ergebnisse der RT-PCR mit dem IGF-I-Primer, die Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium und Anti-IGF-I-Antikörpern und der IGF-I-RIA des konditionierten Mediums sprechen für eine auto- bzw. parakrine Stimulation der Proliferation von LCC-18-Zellen. Die Ergebnisse der Versuche mit transienter Transfektion von chicken-IGF-I-Promotor und anschließender Stimulation mit IGF-I sprechen für einen positiven Rückkopplungsmechanismus der IGF-I-Produktion bei LCC-18-Zellen. Untersuchungen mit BON-Zellen, einer Zelllinie aus einem humanem Pankreaskarzinoid, liefern vergleichbare Erkenntnisse. Auch hier konnte ein positiver Rückkopplungsmechanismus für die autokrine Sekretion von IGF-I gezeigt werden [Pircher, mündlich; Von Wichert, 2000].

Der autokrine Wirkmechanismus des IGF-I/IGF-I-R-Systems wird zumindest teilweise über den MAP-Kinase Weg vermittelt [Patti et al., 2000]. Bei vielen Tumorzellen konnte dieser Mechanismus der Signaltransduktion als essentiell nachgewiesen werden [Cowley et al., 1994; Mansour et al., 1994]. In Tierversuchen konnte eine Hemmung des Wachstums von Kolontumorzellen nach Applikation des spezifischen MAP-Kinase-Hemmers PD 184352 in vivo nachgewiesen werden [Sebolt-Leopold et al., 1999]. PD 098059 ist ein spezifischer Inhibitor der MAP-Kinase-Kinase bzw. MEK-Kinase. Die Aktivität der MAP-Kinase wird davon nicht beeinflusst [Dudley et al., 1995]. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit PD 098059 und der Western Blot-Analyse zeigen, daß die MEK-Kinase auch bei den LCC-18-Zellen für die Signaltransduktion des IGF-I-Rezeptors eine bedeutende Rolle spielen muß.

Arbeiten mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor LY 294002 zeigen, daß auch der PI 3-Kinase-Weg für die Signaltransduktion des IGF-I-Rezeptors von Bedeutung ist [Santosh et al., 1997]. Es konnte gezeigt werden, daß auch bei der Zelllinie LCC-18 durch LY 294002 eine Hemmung des IGF-I-induzierten Wachstums erreicht wird. Wachstumsversuche mit PD 0098059 und mit LY 294002 zeigten eine additive Hemmung des Wachstums als weiteren Hinweis dafür, daß der MEK-

Kinase-Weg und der PI 3-Kinase-Weg zwei parallele Alternativen der Signaltransduktion des IGF-I-Rezeptors darstellen. Abhängig von der Konzentration des zugegebenen IGF-I konnte eine vollständige Hemmung des stimulierten Wachstums erreicht werden. Es gibt jedoch Untersuchungen, die darauf hinweisen, daß neben dem MAP-Kinase- und dem PI 3-Kinase-Weg noch weitere Signaltransduktionswege für die IGF-I-vermittelte Mitogenese eine Rolle spielen müssen [Scrimgeour et al., 1997].

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, daß IGF-I bei den Zellen der Zelllinie LCC-18 über einen autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus als ein wesentliches mitogenes Agens wirksam ist. Da auch bei anderen neuroendokrinen Tumoren eine autokrine Wachstumsstimulation über IGF-I gezeigt werden konnte, können weitere Untersuchungen, die die Signaltransduktion detaillierter entschlüsseln, möglicherweise zu einem neuen, ergänzenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung dieser Tumoren führen, der gemeinsam mit der chirurgischen und der Chemo- bzw. Chemoradiotherapie zu einer Verbesserung der Prognose dieser Tumoren führen kann.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wachstumsregulation der Zelllinie LCC-18 durch IGF-I untersucht. Die Zelllinie LCC-18 wurde aus einem humanen Kolon-Karzinoid etabliert und zeigte stabile neuroendokrine Eigenschaften über eine Dauer von über 100 Zellpassagen. IGF-I hat physiologischerweise eine große Bedeutung bei der Regulation der Proliferation und wirkt antiapoptotisch. Für viele Tumorentitäten ist IGF-I ein wichtiger Wachstumsfaktor. Untersucht wurden die Expression von IGF-I-Rezeptoren, die Produktion und die Wirkung von IGF-I sowie die Signaltransduktionswege des IGF-I-Rezeptors. Über RT-PCR konnte die Expression von IGF-I-Rezeptoren in LCC-18-Zellen nachgewiesen werden. Ebenfalls über RT-PCR und über einen IGF-I-RIA sowie über Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium ohne und mit Anti-IGF-I-Antikörpern konnte die Produktion von IGF-I nachgewiesen werden. Wachstumsversuche mit IGF-I zeigten eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung der Proliferation. Wachstumsversuche mit IGF-I nach Vorinkubation mit PD098059 und Western Blot-Analysen zeigten, daß die MEK-Kinase bzw. die MAP-Kinase für die Signaltransduktion eine bedeutende Rolle spielt. Auch der PI 3-Kinase-Weg ist für die Signaltransduktion des IGF-I/IGF-I-R-Systems von großer Bedeutung, wie Wachstumsversuche mit IGF-I und LY 294002 zeigten. Wie bei anderen Tumorzellen auch spielt IGF-I für die Proliferation und das Überleben von LCC-18-Zellen eine bedeutende Rolle. Diese neuroendokrinen Tumorzellen scheinen IGF-I zudem über einen auto- bzw. parakrinen Mechanismus als wichtigen Wachstums- und Überlebensfaktor zu nutzen. Transiente Transfektionen mit einem chicken-IGF-I-Promotor mit einem nachgeschaltetem Luciferase-Reporter-Gen und nachfolgende Stimulation mit IGF-I sprechen für einen positiven Rückkopplungsmechanismus.

Möglicherweise können die Ergebnissen dieser Arbeit zu einem neuen, alternativen therapeutischen Ansatz dieser und eventuell auch anderer Tumoren beitragen.

A1 Literaturverzeichnis

Andersson T, Wilander E, Eriksson B, Lundgren PG, Öberg K: Effects of interferon on tumor tissue content in liver metastases of carcinoid tumors. *Cancer Res* **1990** Jun 1;50(11):3413-5

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brunning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR: Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* **1994** Nov 10;372(6502):186-90

Arnold R, Frank M, Kajdan U: Management of gastroendopancratic endocrine tumors: The Place of Somatostatin Analogues. *Digestion* **1994**;55 Suppl 3:107-113

Arnold R: Medical treatment of metastazing carcinoid tumors. *World J Surg* **1996** Feb;20(2):203-7

Balcavage WX, King MW: Examination & Board Review Biochemistry. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut **1995**

Balk SD, Whitfield JF, Youdale T, Braun AG: Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **1973**;70(3):675-9

Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B: The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1997** Jun 7 ;1332(3):F105-26

Baserga R, Rubin R: Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1993**;3:47-61

Baserga R: The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* **1999** Nov 25;253(1):1-6

Baserga R: The role of the insulin-like growth factor I receptor in cell growth and transformation. In: NIH Conference. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* **1995**;122:54-59

Baxter RC: Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* **1994**;42(4-5):140-4

Berge T, Linell F: Carcinoid tumors. Frequency in a defined population during a 12-year-period. *Acta Pathol Microbiol Scand* **1976**;84:322-30

Bergmann U, Funatomi H, Yokoyama M, Beger HG, Korc M: Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* **1995** May 15;55(10):2007-11

Boguski MS, McCormick F: Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **1993** Dec 16;366(6465):643-54

Bowen-Pope DF, Vogel A, Ross R: Production of platelet derived growth factor-like molecules and reduced expression of platelet-derived growth factor receptors accompany transformation by a wide variety of agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **1984** Apr;81(8):2396-400

Brissenden JE, Ullrich A, Francke U: Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* **1984** Aug 30-Sep 5;310(5980):781-4

Buchanan KD, Johnston CF, O'Hare MM, Ardill JE, Shaw C, Collins JS, Watson RG, Atkinson AB, Hadden DR, Kennedy TL, Sloan JM: Neuroendocrine tumors. A European View. *Am J Med* **1986** Dec 22;81(6B):14-22

Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* **1989**;58:575-606

Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Klöppel G: Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* **1994**;55 Suppl 3:11-23

Carpenter G, Cohen S: Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol* **1975** Jun;88(2):227-238

Chaudhry A, Funa K, Öberg K: Expression of growth factor peptides and their receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Acta Oncol* **1993**;32(2):107-14

Chochinov RH, Daughaday WH: Current concepts of somatomedin and other biologically related growth factors. *Diabetes* **1976** Oct;25(10):994-1004

Cohen S Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* **1962**;237:1555-62

Coppola D, Ferber A, Miura M, Sell C, D'Ambrosio C, Rubin R, Baserga R: A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **1994** Jul;14(7):4588-95

Cowley S, Patterson H, Kemp P, Marshall CJ: Activation of Map kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **1994** Jun 17;77(6): 841-52

Creutzfeldt W: Historical background and natural history of carcinoids. *Digestion* **1994**;55 Suppl 3:3-10

Cullen KJ, Yee D, Sly WS, Perdue J, Hampton B, Lippman ME, Rosen N: Insulin-like growth factor expression and function in human breast cancer. *Cancer Res* **1990** Jan 1;50(1):48-53

D'Ambrosio C, Ferber A, Resnicoff M, Baserga R: A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells in vivo and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* **1996** Sep 1;56:4013-20

Daughaday WH, Hall K, Salmon WD Jr, van den Brande JL, van Wyk JJ: On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* **1987** Nov;65(5):1075-6

Daughaday WH: A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspect Biol Med* **1989** Winter;32(2):194-211

DeAngelis T, Ferber A, Baserga R: Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor. *J Cell Physiol* **1995** Jul;164(1):214-21

Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV: Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* **1985** Aug 22-28;316(6030):701-5

D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, Calissano P: Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993** Dec 1;90(23):10989-93

Drucker DJ: Epithelial cell growth and differentiation. I. Intestinal growth factors. *Am J Physiol* **1997** Jul;273(1 Pt1):G3-6

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR: A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995** Aug;92: 7686-9

Dulak NC, Temin HM: Multiplication-stimulating activity for chicken embryo fibroblasts from rat liver cell conditioned medium: a family of small polypeptides. *J Cell Physiol* **1973** Apr;81(2):161-70

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA: Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **1993** May 6;363(6424):45-51

Egan SE, Weinberg RA: The pathway to signal achievement. *Nature* **1993** Oct 28;365(6449):781-3

Eriksson B, Öberg K: Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook. *Ann Oncol* **1999**;10 Suppl 2:S31-8

Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **1992** Apr 3;69(1):119-28

Falbe J, Regitz M (Hrsg.): Römpp Chemie Lexikon. Thieme, Stuttgart, 9. Aufl. **1995**

Ferry RJ Jr, Cerri RW, **Cohen** P: Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. *Horm Res* **1999**;51(2):53-67

Georgii-Hemming P, Wiklund HJ, Ljunggren O, Nilsson K: Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* **1996** Sep 15;88(6):2250-8

Girnita L, Girnita A, Brodin B, Xie Y, Nilsson G, Dricu A, Lundeberg J, Wejde J, Bartolazzi A, Wiman KG, Larsson O: Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: functional impact. *Cancer Res* **2000** Sep 15;60(18):5278-83

Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G: Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem* **1978** May 25;253(10):3736-43

Gospodarowicz D, Moran M, Braun D, Birdwell CR: Clonal growth of bovine endothelial cells in tissue culture: fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **1976** Nov;73(11):4120-4

Gospodarowicz D: Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. *J Biol Chem* **1975** Apr 10;250(7):2515-20

Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL: Growth factors and cancer. *Cancer Res* **1986** Mar;46(3):1015-29

Gregory H: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* **1975** Sep 25;257(5524):325-7

Grothey A, Voigt W, Schöber C, Müller T, Dempke W, Schmoll HJ: The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* **1999**;125(3-4):166-73

Guo YS, Narayan S, Yallampalli C, Singh P: Characterization of insulinlike growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* **1992** Apr;102(4 Pt 1):1101-8

Håkanson R, Chen D, Tielemans Y, Andersson K, Ryberg B, Sundler F, Mattson H: ECL cells: Biology and pathobiology. *Digestion* **1994**;55 Suppl 3:38-45

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **1989** May 12;119(2):203-10

He W, Craparo A, Zhu Y, O'Neill TJ, Wang LM, Pierce JH, Gustafson TA: Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J Biol Chem* **1996** May 17;271(20):11641-5

Heldin CH, Westermark B: Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul* **1990**;1:555-66

Janosi JB, Ramsland PA, Mott MR, Firth SM, Baxter RC, Delhanty PJ: The acid-labile subunit of the serum insulin-like growth factor-binding protein complexes. Structural determination by molecular modeling and electron microscopy. *J Biol Chem* **1999** Aug 13;274(33):23328-32

Jaques G, Noll K, Wegmann B, Witten S, Kogan E, Radulescu RT, Havemann K: Nuclear localization of insulin-like growth factor binding protein 3 in a lung cancer cell line. *Endocrinology* **1997** Apr;138(4):1767-70

Johnsson A, Heldin CH, Wasteson Å, Westermark B, Deuel T Huang JS, Seeburg PH, Gray A, Ullrich A, Scrace G, Stroobant P, Waterfield M: The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J* **1984** May;3(5):921-8

Jones JI, Clemmons DR: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **1995** Feb;16(1):3-34

Kaiser U, Schardt C, Brandscheidt D, Wollmer E, Havemann K: Expression of insulin-like growth factor receptors I and II in normal human lung and in lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **1993**;119(11):665-8

Karey KP, Sirbasku DA: Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and beta-estradiol. *Cancer Res* **1988** Jul 15;48(14):4083-92

Klapper DG, Svoboda ME, van Wyk JJ: Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **1983** Jun;112(6):2215-7

Krenning EP, de Jong M, Kooij PP, Breeman WA, Bakker WH, de Herder WW, van Eijck CH, Kwekkeboom DJ, Jamar F, Pauwels S, Valkema R: Radiolabelled somatostatin analogue(s) for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. *Ann Oncol* **1999**;10 Suppl 2:S23-9

Kwekkeboom DJ, Krenning EP: Somatostatin receptor scintigraphy in patients with carcinoid tumors. *World J Surg* **1996** Feb;20(2):157-61

Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, Chen H, Nadaf-Rahrov S, Ciernik IF, Carbone DP: Antitumor effects of adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* **1996** Jul 1;56(13):3038-41

Leof EB, Proper JA, Goustin AS, Shipley GD, DiCorleto PE, Moses HL: Induction of c-sis mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986** Apr;83(8):2453-7

Leof EB, Wharton W, van Wyk JJ, Pledger WJ: Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res* **1982** Sep;141(1):107-15

LeRoith D, McGuinness M, Shemer J, Stannard B, Lanau F, Faria TN, Kato H, Werner H, Adamo M, Roberts CT Jr: Insulin-like growth factors. *Biol Signals* **1992** Jul-Aug;1(4):173-81

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr: Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* **1995** Apr;16(2):143-63

Liu TH, Liu HR, Lu ZL, Wang ZY, Cao Y, Chen J, Wang Y: Thoracic ectopic ACTH-producing tumors with Cushing's syndrome. *Zentralbl Pathol* **1993** Jun;139(2):131-9

Lu K, Campisi J: Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor 1 late in the G1 phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992** May 1;89(9):3889-93

Lundqvist M, Mark J, Funa K, Heldin NE, Morstyn G, Wedell B, Layton, Oberg K: Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. *Eur J Cancer* **1991**;27(12):1663-8

Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ: Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* **1999** Apr ;91(7):620-5

Macaulay VM, Teale JD, Everard MJ, Joshi GP, Smith IE, Millar JL: Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I is a mitogen for human small cell lung cancer. *Br J Cancer* **1988** Jan;57(1):91-3

Mann K, Saller B: Endokrine Tumoren. Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas. In: Wilmanns W, Huhn D, Wilms K (Hrsg.): *Internistische Onkologie*. Thieme, Stuttgart, 2. Aufl. **2000**; 666-82

Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Van de Woude GF, Ahn, NG: Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* **1994** Aug 12;265(5174): 966-70

Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ: Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* **1984** Mar 9;264(4640):1079-82

Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ: A critical assessment of the use of microculture assays to measure cell growth and function. *Growth Regul* **1995** Jun;5(2):69-84

- Maton** PN: The carcinoid syndrome. *JAMA* **1988** Sep 16;260(11):1602-5
- Minuto** F, Del Monte P, Barreca A, Fortini P, Cariola G, Catrambone G, Giordano G: Evidence for an increased somatomedin-C/insulin-like growth factor I content in primary human lung tumors. *Cancer Res* **1986** Feb;46(2):985-8
- Mitchell** RS, Balk SD, Frank O, Baker H, Christine MJ: The failure of methotrexate to inhibit chicken fibroblast proliferation in a serum-containing culture medium. *Cancer Res* **1975** Sep;35(9):2613-5
- Modlin** IM, Sandor A: An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer* **1997** Feb 15;79(4):813-29
- Morrione** A, Valentinis B, Li S, Ooi JY, Margolis B, Baserga R: Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* **1996** Jul 15;56(14):3165-7
- Morrione** A, Valentinis B, Resnicoff M, Xu Sq, Baserga R: The role of mGRB10alpha in insulin-like growth factor I-mediated growth. *J Biol Chem* **1997** Oct 17;272(42):26382-7
- Moses** AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, Podskalny JM: Purification and characterization of multiplication-stimulating activity. Insulin-like growth factors from rat-liver-cell-conditioned medium. *Eur J Biochem* **1980** Jan;103(2):387-400
- Moses** HL, Coffey RJ Jr, Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J: Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J Cell Physiol Suppl* **1987**;Suppl 5:1-7
- Myers** MG Jr, Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, White MF: IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* **1993** Apr;132(4):1421-30
- Nakanishi** Y, Mulshine JL, Kasprzyk PG, Natale RB, Maneckjee R, Avis I, Treston AM, Gazdar AF, Minna JD, Cuttitta F: Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small cell lung cancer cell lines in vitro. *J Clin Invest* **1988** Jul;82(1):354-9
- Nilsson** O, Wangberg B, Theodorsson E, Skottner A, Ahlman H: Presence of IGF-I in human midgut carcinoid tumours – an autocrine regulator of carcinoid tumour growth? *Int J Cancer* **1992** May 8;51(2):195-203

O'Neill TJ, Rose DW, Pillay TS, Hotta K, Olefsky JM, Gustafson TA: Interaction of a GBR-IR splice variant (a human GRB10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for a role in mitogenic signaling. *J Biol Chem* **1996** Sep 13;271(37):22506-13

Öberg K, Eriksson B, Janson ET: Interferons alone or in combination with chemotherapy or other biologicals in the treatment of neuroendocrine gut and pancreatic tumors. *Digestion* **1994**;55 Suppl 3:64-69

Öberg K: The action of interferon-alpha on human carcinoid tumors. *Semin Cancer Biol* **1992** Feb;3(1):35-41

Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* **1993** Jul 15 ;268(20):14964-71

Oka Y, Orth DN: Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* **1983** Jul;72(1):249-59

Patti R, Reddy CD, Georger B, Grotzer MA, Raghunath M, Sutton LN, Phillips PC: *Int J Oncol* **2000** Mar;16(3):577-84

Pearse AGE: The diffuse endocrine (paracrine) system: Feyrter's concept and its modern history. *Verh Dtsch Ges Pathol* **1977**;61:2-6

Peyrat JP, Bonnetterre J, Vennin PH, Jammes H, Beuscart R, Hecquet B, Djiane J, Lefebvre J, Demaille A: Insulin-like growth factor 1 receptors (IGF1-R) and IGF1 in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1990** Dec 20;37(6):823-7

Phillips LS, Harp JB, Goldstein S, Klein J, Pao CI: Regulation and action of insulin-like growth factors at the cellular level. *Proc Nutr Soc* **1990** Oct;49(3):451-8

Pietrkowski Z, Sell C, Lammers R, Ullrich A, Baserga R: Roles of insulinlike growth factor 1 (IGF-1) and the IGF-1 receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **1992** Sep;12(9):3883-9

Porcu P, Ferber A, Pietrkowski Z, Roberts CT, Adamo M, LeRoith D, Baserga R: The growth-stimulatory effect of simian virus 40 T antigen requires the interaction of insulinlike growth factor 1 with its receptor. *Mol Cell Biol* **1992** Nov;12(11):5069-77

Quinn KA, Treston AM, Unsworth EJ, Miller MJ, Vos M, Grimley C, Battey J, Mulshine JL, Cuttitta F: Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. *J Biol Chem* **1996** May 10;271(19):11477-83

Rall LB, Scott J, Bell GI, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, Coghlan JP: Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* **1985** Jan 17-23;313(5999):228-31

Reiss K, Porcu P, Sell C, Pietrkowski Z, Baserga R: The insulin-like growth factor 1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* **1992** Nov;7(11):2243-8

Remacle-Bonnet MM, Culouscou JM, Garrouste FL, Rabenandrasana C, Marvaldi JL, Pommier GJ: Expression of type I, but not type II insulin-like growth factor receptor on both undifferentiated and differentiated HT29 human colon carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* **1992** Aug;75(2):609-16

Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, Zoltick P, Baserga R: The Insulin-like Growth Factor I Receptor Protects Tumor Cells from Apoptosis in Vivo. *Cancer Res* **1995b** Jun 1;55(11):2463-9

Resnicoff M, Burgaud JL, Rotman HL, Abraham D, Baserga R: Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* **1995a** Sep 1;55(17):3739-41

Reynolds FH Jr, Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR: Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature* **1981** Jul 16;292(5820):259-62

Rinderknecht E, Humbel RE: Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* **1978a** May 15;89(2):283-6

Rinderknecht E, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* **1978b** Apr 25;253(8):2769-76

Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **1985** Jan;82(1):119-23

Roberts LJ, Anthony LB, Oates JA: Disorders of vasodilator hormones: carcinoid syndrome and mastocytosis. In Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (Hrsg.): *Williams Textbook of Endocrinology*. WB Saunders Philadelphia, Pennsylvania **1998** 9. Aufl. S. 1711

Rosorius O, Mieskes G, Issinger OG, Korner C, Schmidt B, von Figura K, Braulke T: Characterization of phosphorylation sites in the cytoplasmatic domain of the 300 kDa mannose-6-phosphate receptor. *Biochem J* **1993** Jun 15;292(Pt3):833-8

Russell DW, Schneider WJ, Yamato T, Luskey KL, Brown MS, Goldstein JL: Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* **1984** Jun;37(2):577-85

Rutanen EM, Pekonen F: Insulin-like growth factor and their binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* **1990** Jul;123(1):7-13

Rutherford RB, Ross R: Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Biol Chem* **1976**;69:196-203

Salmon WD Jr, Du Vall MR: In vitro stimulation of leucine incorporation into muscle and cartilage protein by a serum fraction with sulfation factor activity: differentiation of effects from those of growth hormone and insulin. *Endocrinology* **1970** Dec;87(6):1168-80

Schedlich LJ, Le Page SL, Firth SM, Briggs LJ, Jans DA, Baxter RC: Nuclear Import of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3) and IGFBP-5 is Mediated by the Importin β subunit. *J Biol Chem* **2000** Aug 4;275(31):23462-70

Schmoll HJ, Schmoll E, Dralle H, Arnold R: Karzinoide. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): *Kompendium Internistische Onkologie*, Springer, Berlin, 3. Aufl. **1999**

Schulz HJ, Ladhoff A: Neuroendokrines System mit seinen Tumoren. *Zentralbl Pathol* **1993** Jun;139(2):101-6

Scrimgeour AG, Blakesley VA, Stannard BS, LeRoith D: Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways Are Not Sufficient for Insulin-Like Growth Factor I-Induced Mitogenesis and Tumorigenesis. *Endocrinology* **1997** Jun;138(6): 2552-8

Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, Satiel AR: Blockade of the MAP kinase pathway supresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* **1999** Jul;5(7): 810-6

Sell C, Baserga R, Rubin R: Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* **1995** Jan 15;55(2):303-6

Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R: Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* **1994** Jun;14(6):3604-12

Sell C, Rubini M, Rubin R, Liu JP, Efstratiadis A, Baserga R: Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **1993** Dec 1;90(23):11217-21

Seppä HEJ, Grotendorst GR, Seppä SI, Schiffmann E, Martin GR: The platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* **1982** Feb;92(2):584-8

Shields R: Growth factors for tumours. *Nature* **1978** Apr 20;272(5655):670-1

Singh P, Rubin N: Insulinlike growth factors and binding proteins in colon cancer. *Gastroenterology* **1993** Oct;105(4):1218-37

Solcia E, Sessa F, Rindi G, Villani L, Riva C, Buffa R, Capella C: Classification and histogenesis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Eur J Clin Invest* **1990** Oct;20 Suppl 1:S72-81

Steller MA, Delgado CH, Bartels CJ, Woodworth CD, Zou Z: Overexpression of the insulin-like growth factor-1 receptor and autocrine stimulation in human cervical cancer cells. *Cancer Res* **1996** Apr 15;56(8):1761-5

Stewart CE, Rotwein P: Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* **1996** Oct;76(4):1005-26

Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S: Epidermal growth factor Physical and chemical properties. *J Biol Chem* **1972** Sep 25;247(18):5928-34

Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE: Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980** Sep;77(9):5258-62

Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, Shows TB: Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* **1986** Dec;46(12 Pt 1):6169-73

Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al.: Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* **1986** Oct;5(10):2503-12

Underwood LE, Hintz RL, Voina SJ, van Wyk JJ: Human somatomedin, the growth hormone dependent sulfation factor, is antilipolytic. *J Clin Endocrinol Metab* **1972** Aug;35(2):194-8

Underwood LE, van Wyk JJ: Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW (Hrsg.): *Williams textbook of endocrinology*. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania **1992** 8. Aufl. S. 1088

Ushiro H, Cohen S: Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem* **1980** Sep 25;255(18):8363-5

Valentinis B, Morrione A, Taylor SJ, Baserga R: Insulin-like growth factor I receptor signaling in transformation by src oncogenes. *Mol Cell Biol* **1997** Jul;17(7):3744-54

Van den Brande JL: A personal view on the early history of the insulin-like growth factors. *Horm Res* **1999**;51 Suppl 3:149-75

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **1997** Oct;22(10):388-93

Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH: Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* **1998** Mar;139(3):1354-60

Von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T: Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of Chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res* **2000** Aug 15;60:4573-81

Williams ED, Sandler M: The classification of carcinoid tumours. *Lancet* **1963**;1:238-9

Williams ED, Siebenmann RE, Sobin LH: Histological typing of endocrine tumors. In: *International typing of tumors*. No. 23. World Health Organization, Genf **1980**

Wu Y, Tewari M, Cui S, Rubin R: Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor-induced cell death. *J Cell Physiol* **1996** Sep;168(3):499-509

Yee D, Paik S, Lebovic GS, Marcus RR, Favoni RE, Cullen KJ, Lippman ME, Rosen N: Analysis of insulin-like growth factor I gene expression in malignancy: evidence for a paracrine role in human breast cancer. *Mol Endocrinol* **1989** Mar;3(3):509-17

Zingg AE, Froesch ER: Effects of partially purified preparations with non-suppressible insulin-like activity (NSILA-S) on sulfate incorporation into rat and chicken cartilage. *Diabetologica* **1973** Dec;9(6):472-6

A2 Abbildungen und Graphiken

Abbildung 1.1: Synthese und Abbau von Serotonin	3
Abbildung 2.1: LCC-18 Zellen in Kultur	22
Abbildung 2.2: Belegung der Mikrotiterplatte bei Wachstumsversuchen	33
Abbildung 3.1: Elektrophoresebild der Produkte der RT-PCR aus LCC-18-mRNA mit IGF-I- und IGF-I-R-Primern	39
Abbildung 3.2: Western Blot aus LCC-18-Zellysat mit p44/42-MAP-Kinase-Antikörpern	48
Graphik 3.1: Wachstumsversuche mit IGF-I	41
Graphik 3.2: Wachstumsversuche mit IGF-I und PD 098059	43
Graphik 3.3: Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium	44
Graphik 3.4: Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium und Anti-IGF-I-Antikörpern	45
Graphik 3.5: Transiente Transfektion mit chicken-IGF-I-Promotor und Luciferase	47

A3 Tabellen

Tabelle 1.1:	Stadieneinteilung der Karzinoide	2
Tabelle 1.2:	Nahrungsmittel und Medikamente mit Einfluß auf die 5-HIES-Bestimmung im Urin	5
Tabelle 1.3:	Indikationen der antineoplastischen Therapie	7
Tabelle 1.4:	Funktionen von IGF-Bindungsproteinen	16
Tabelle 2.1:	Allgemeine Laborgeräte	23
Tabelle 2.2:	Zellkulturgeräte	24
Tabelle 2.3:	Analysegeräte	24
Tabelle 2.4:	Elektrophoresegeräte	24
Tabelle 2.5:	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 2.6:	Zellkulturmaterialien	25
Tabelle 2.7:	Gebrauchslösungen	26
Tabelle 2.8:	Zellkulturmedien	27
Tabelle 2.9:	Kommerzielle Versuchssysteme	27
Tabelle 2.10:	Stammlösungen der Mediumzusätze für LCC-18	29
Tabelle 2.11:	SDS-Acrylamidgel	37
Tabelle 3.1:	Wachstumsversuche mit IGF-I	40
Tabelle 3.2:	Wachstumsversuche mit IGF-I und PD 098059	42
Tabelle 3.3:	Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium	43
Tabelle 3.4:	Wachstumsversuche mit konditioniertem Medium und Anti-IGF-I-Antikörpern	44
Tabelle 3.5:	Transiente Transfektion mit chicken-IGF-I-Promotor und Luciferase	46

A4 Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
al.	alii
ALS	acid-labile subunit
APUD	Amine precursor uptake and decarboxylation
Aufl.	Auflage
bidest.	Bidestillata
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cpm	Counts per minute
Da	Dalton
DTPA	Diethylenpentaessigsäure
EC	Enterochromaffin
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	
EGF	Epithelial growth factor
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEP	Gastroenteropankreatisch
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde(n)

HITES	Akronym: Hydrocortison Insulin Transferrin Estradiol Selenit
HPLC	High performance liquid chromatography
Hrsg.	Herausgeber
IGF	Insulin-like growth faktor
IGF-1-R	Insulin-like growth factor 1 Rezeptor
IGF-BP	Insulin-like growth factor-binding protein
In	Indium
IRS	Insulin receptor substrate
IU	International unit(s)
J	Jod
K	Kinase
kDa	Kilo-Dalton
kRL	Korrigierte Light Units
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LDL	Low density Lipoprotein
M	Molar
mA	Milliampere
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
mg	Milligramm
mMol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSA	Multiplication stimulating activity
μl	Mikroliter
n. pub.	Nicht publiziert
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer

NSILA	Non-suppressible insulin-like activity
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PI 3	Phosphatidylinositol 3
RIA	Radioimmunoassay
RLU	Relative light units
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase chain reaction
SEER	Surveillance, epidemiology, and end results
SF	Sulfation factor
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming growth factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	World Health Organisation

A5 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Kim
Vorname	Dong-Hun
Geburtsdatum/-ort	26.04.1974 / Marburg
Anschrift	Rhönweg 9 36129 Gersfeld-Altenfeld
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Eltern	Vater Chaegyong Kim, Professor für Politologie und Diplomatie, Han- nam University, Taejon/Korea
	Mutter Myong-Cho Ahn-Fenner, Dipl.-Pädagogin, Sprach- und Kulturreisen
Geschwister	Chung-Hun Kim, Student

Schulbildung:

1979 – 1984	Grundschule am Richtsberg, Marburg
1984 – 1993	Gymnasium Philippinum, Marburg
Abschlüsse	Allgemeine Hochschulreife, Latinum, Grae- cum

Hochschulbildung:

1993 – 1999	Studium der Humanmedizin an der Philipps- Univer-sität Marburg
1999 - 2000	Praktisches Jahr am Klinikum Fulda, Wahl- fach: Neurochirurgie

Beruf:

07/2000 – 01/2002	Arzt im Praktikum, Klinik für Neurochirurgie, Klinikum Fulda
Seit 02/2002	Weiterbildungsassistent, Klinik für Neurochir- urgie, Klinikum Fulda

A6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums in Marburg und während meiner Ausbildung im Praktischen Jahr in Fulda waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte:

Arnold	Görk	Kretschmer	Rothmund
Arps	Gotzen	Krieg	Rumpf
Aumüller	Gressner	Kroll	Schäfer
Barth	Griss	Kummer	Schachtschabel
Basler	Grzeschik	Kuni	Schmitz-Moormann
Baum	Haas	Lang	Schüffel
Beato	Habermehl	Lange	Schulz
Bien	Happle	Langohr	Schumacher
Behr	Hasilik	Lauer	Seitz
Berger	Havemann	Legrum	Seyberth
Bohner	Hebebrand	Lennartz	Siegel
Bonzel	Hesse	Leppek	Slenczka
Czernik	Heubel	Lorenz	Spätling
Daut	Hilgermann	Maisch	Stegmann
Dölp	Höffken	Mennel	Steiniger
Doss	Hoffmann	Möröy	Stinner
Draf	Huffmann	Moosdorf	Strempel
Engel	Jaspersen	Mueller	Sturm
Eschenbach	Jipp	Netter	Thomas
Fassbinder	Joseph	Oertel	Vohland
Fehmann	Kälble	Peters	Voigt
Feuser	Kaffarnik	Pfab	Wallenfang
Fruhstorfer	Kern	Podszus	Weihe
Fuhrmann	Klose	Pohlen	Werner
Ganz	Kleine	Radsak	Westermann
Gemsa	Klenk	Remschmidt	von Wichert
Geus	Koolmann	Riedmiller	Wörsdörfer
Göke	Krause	Röhm	

A7 Danksagung

Ich möchte all denjenigen Menschen meinen Dank aussprechen, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und die mir durch ihren beständigen Zweifel an meinen Fähigkeiten keine Gelegenheit gelassen haben, in meinen Bemühungen nachzulassen.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Christoph Fehmann, dessen Ideenfluß eine niemals versiegende Quelle zu haben schien, meinem Betreuer Dr. med. Matthias Stamm, der mir alles gezeigt hat, was man für eine Arbeit wie diese wissen und können muß, unserer MTA Kathleen Dörsch und dem Biochemiker Dr. rer. nat. Ullrich Wulbrand, die mir alles gezeigt haben, was Matthias nicht wußte oder konnte, meiner Kollegin und Vorgängerin Petra Staats, die den empirischen Beweis erbrachte, daß jede Sache auch ihre gute Seite hat, meinem Freund und Studienkollegen Benedikt Pircher, der nicht nur während dieser Arbeit immer ein guter Freund gewesen ist, Claudia Molly Dressler für all die Jahre der Unterstützung und Freundschaft, natürlich meinen Eltern, die die entscheidende Voraussetzung für diese Arbeit geschaffen haben, und schließlich allen bisher ungenannten Mitarbeiter des Sonderforschungsbereiches 3 und Prof. Dr. med. Rudolph Arnold, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

A8 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Untersuchung zur IGF-I-vermittelten Signaltransduktion in der humanen Karzinoidzelllinie LCC-18

im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie, unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Arnold mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. H.-C. Fehmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 19. Februar 2004

Dong-Hun Kim