

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

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel

Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Wirkung und Wirkungsweise von Insulin-like Growth-factor-I  
auf das proliferative Wachstum neuroendokriner Tumorzellen  
am Beispiel der humanen Karzinoidzelllinie BON

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

vorgelegt von  
Benedikt Johannes Pircher  
aus Issum

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 23. September 2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD Dr. med. H.-C. Fehmann

Correferent: Prof. Dr. med. R. Moll

---

## Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung	1-18
<b>1.1</b>	<b>Neuroendokrine Tumoren (Karzinoide) des gastroenteropankreatischen Systems (GEP)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Historische Entwicklung	2
1.1.3	Klassifikation	3
1.1.4	Klinische Symptome, Diagnostik, therapeutische Grundsätze und Prognose	6
<b>1.2</b>	<b>Insulin-like growth factor-I: Rezeptor, Ligand und deren Funktionen</b>	<b>8</b>
1.2.1	Das IGF-System	8
1.2.2	Struktur des IGF-I-Rezeptors und IGF-I	10
1.2.3	Signaltransduktionswege ausgehend vom IGF-I-Rezeptor	11
1.2.4	Funktionen des IGF-I-Rezeptors und des IGF-I	16
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung der Arbeit</b>	<b>18</b>
Kapitel 2	Material und Methoden	19 - 41
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Geräte	19
2.1.1.1	Allgemeine Laborgeräte	19
2.1.1.2	Elektrophoresegeräte	20
2.1.1.3	Zellkultur	20
2.1.1.4	Analysegeräte	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2.1	Laborbedarf	21
2.1.2.2	Zellkultur	22
2.1.2.3	Westernblot	22
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.3.1	Medien	23
2.1.3.2	Kommerziell erworbene Systeme	23

---

2.1.3.3	Peptide und Hormone	23
2.1.3.4	Lösungen	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
2.2.1	Die humane Karzinoidzelllinie BON und ihre Kultivierung	26
2.2.1.1	Vorbemerkung - Etablierung der Zelllinie	26
2.2.1.2	Morphologie und Wachstumseigenschaften	26
2.2.1.3	Kultivierung der BON-Zellen	27
2.2.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.2.2	Rezeptor-Bindungsstudien	28
2.2.3	Nachweis einer IGF-I Sekretion von BON-Zellen	29
2.2.4	Wachstumsversuche	29
2.2.4.1	Stimulation der Zellen	29
2.2.4.2	Versuchsaufbauten	30
2.2.4.3	Bestimmung des proliferativen Wachstums	32
2.2.5	Western-Blotting und MAP-Kinase-Assay	33
2.2.5.1	Vorbereitung der Zellen	33
2.2.5.2	Versuchsaufbauten	34
2.2.5.3	Elektrophorese und Blotting	35
2.2.5.4	Detektion spezifischer Antigene	35
2.2.6	Transfektion	37
2.2.6.1	Plasmid-Präparation	38
2.2.6.2	Transiente Transfektion und Zellextraktpräparation	39
2.2.6.3	Versuchsaufbau	40
2.2.6.4	Luciferase-Assay	40
2.2.6.5	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)	41
<b>Kapitel 3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42 - 54</b>
<b>3.1</b>	<b>Bindungsstudien mit IGF-I und IGF-II</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Nachweis der IGF-I-Sekretion durch BON-Zellen</b>	<b>43</b>
<b>3.3</b>	<b>Wachstumsstudien</b>	<b>44</b>
3.3.1	Stimulation von BON-Zellen	44
3.3.2	Hemmung des basalen und stimulierten Wachstums	

---

	von BON-Zellen	46
<b>3.3</b>	<b>MAP-Kinase-Assay</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Transfektion eines IGF-I-Promotors und Promotoraktivitätsprüfung</b>	<b>52</b>
Kapitel 4	Diskussion	55 - 63
Kapitel 5	Zusammenfassung	64 - 65
Anhang		A-1 - A-13
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>A- 1</b>
	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>A-10</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>A-12</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Tumoren (Karzinoide) des gastroenteropankreatischen Systems (GEP)

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Endokrine Tumoren (Karzinoide, VIPome, Gastrinome, Somatostatinome, funktionell nicht aktive Tumore) des gastroenteropankreatischen Systems (GEP) leiten sich von neuroendokrinen Zellen im Gastrointestinaltrakt ab [Schmoll et al., 1997(a)]. Das System der neuroendokrinen Zellen umfaßt, nach heutiger Definition, alle neuronalen und endokrinen Zellen mit einem gemeinsamen Phenotyp, charakterisiert durch die gleichzeitige Expression verschiedener Markerproteine (z. B. allgemeine neuroendokrine Marker, s. Tab. 1.1) und zelltypspezifischer Regulatorproteine (zell-spezifische Marker) [Klöppel et al., 1996].

---

#### 1. Cytoplasmatische Marker

- Neuron-specific enolase (NSE)
- Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)
- Neurofilament

#### 2. Small-vesicle-assoziierte Marker

- Synaptophysin

#### 3. Sekretgranula-assoziierte Marker

- Chromogranin A und B
  - Sekretogranin II (Chromogranin C)
  - Sekretogranin III
  - Sekretogranin IV (HISL 19)
  - Sekretogranin V
  - Phe 5
  - Leu 7
- 

Tabelle 1.1 Immunhistochemische neuroendokrine Marker endokriner Tumore [Höfler et al., 1997]

Insgesamt gesehen sind Karzinoide sehr seltene Tumoren (Häufigkeit: 0,5 bis 2% aller Neoplasien [Schmoll et al., 1997(a)]). Die Inzidenz wird in mehreren Studien mit 0,7 auf 100 000 Einwohner angegeben. Interessanterweise fanden sich im Autopsiegut bei 0,65% der Fälle neuroendokrine Tumoren des GEP [Neary et al., 1997].

Die Ätiologie ist, abgesehen von multiplen Karzinoiden im Magen bei Achlorhydrie mit begleitender Hypergastrinämie, unklar. Genetische Faktoren sind ebenso unbekannt, mit Ausnahme des erhöhten Risikos bei der familiär gehäuften Multiplen endokrinen Neoplasie vom Typ I (MEN-I) und der Neurofibromatose von Recklinghausen [Schmoll et al., 1997(b)].

Einen Überblick über die Verteilung neuroendokriner Tumoren im Gastrointestinaltrakt gibt Tabelle 1.2.

Ösophagus	1%	Ileum	25%
Magen	2%	Appendix	45%
Duodenum	5%	Kolon	5%
Jejunum	3%	Rektum	15%

Tabelle 1.2 Verteilung endokriner Tumoren im gastroenteropankreatischen System [Mann, 1994]

### 1.1.2 Historische Entwicklung

Mit der Beschreibung pankreatischer Inseln war Langerhans 1869 der erste, der „normale“ neuroendokrine Zellen beschrieb. Ein Jahr später entdeckte Heidenhain in der Darmmukosa ebenfalls neuroendokrine Zellen, die er „*chromaffine Zellen*“ nannte. 27 Jahre später, 1897, wiederholte Kultschintzky die Entdeckung endokriner Zellen in der Mukosa des Darms, nannte sie jedoch „*granuläre Zellen*“ [Capella et al., 1994].

Den Begriff „*Karzinoide*“ prägte 1907 Oberndorfer, um eine morphologisch selbständige Gruppe intestinaler Tumoren, von den in ihrem Verhalten aggressiveren und sehr viel häufigeren intestinalen Adenokarzinomen abzugrenzen. Die endokrine Natur der Karzinoide kannte er jedoch noch nicht [Arnold, 1997]. Die Erstbeschreibung dieser Tumoren geht auf Lubarsch, 1888, zurück, der bei der Autopsie zweier Patienten multiple kleine Tumoren im distalen Ileum fand. Mikroskopisch fiel ihm das Fehlen glandulärer Strukturen auf und er folgerte, dass sich diese Tumoren im Unterschied zu intestinalen Adenokarzinomen aus Epithelzellen des Darms entwickeln. Gosset und

Masson zeigte 1914 mit der Silber-Impregnationstechnik, dass Karzinoide aus enterochromaffinen Zellen (Kultschitzky-Zellen) bestehen. Den endokrinen Ursprung postulierte Ciaccio 1906, als er im Dünndarm endokrine Zellen nachwies. 1928 bezeichnete Masson Karzinoide als „*argentaffine Zellen*“, entsprechend ihrer Fähigkeit, Silbersalze aufnehmen zu können [Creutzfeldt, 1996]. Die Fähigkeit zur Reduktion von Silbersalzen wies Hamperl 1932 bei der Mehrzahl der endokrinen Zellen im Darm nach, die er folglich „*argyrophile Zellen*“ nannte. Feyrter war es dann, der 1938 sein Konzept des „*diffusen endokrinen Systems*“ vorstellte. Aufgrund der Färbereigenschaften bezeichnete er es auch als „*Helle Zellen-System*“. Die Beobachtung, dass die endokrinen Zellen fähig sind, Aminvorstufen aufzunehmen und zu dekarboxilieren (englisch: *amin precursor uptake and decarboxylation*) machte Pearse 1969 und formulierte das APUD-Konzept. Hieraus leitet sich auch der Begriff „*APUDome*“ für endokrin aktive Tumoren ab. Lembeck wies dabei schon 1953 Serotonin in Karzinoiden nach [Arnold, 1997].

Dass solche Tumoren auch klinische Symptome verursachen können, vermutete erstmals Ranson 1890, ohne dafür eine Überproduktion der jeweiligen Hormone verantwortlich zu machen. Er beschrieb damals bei einem Patienten mit Ileumtumor, der bereits in die Leber metastasiert war, die Symptome Diarrhöe und postprandial verstärkte Dyspnoe. Erst 1954 stellte Thorson aus der Arbeitsgruppe um Waldenström das „*Karzinoidsyndrom*“ vor. Er zeigte bei mehreren Patienten mit Dünndarm-Karzinoiden, ebenfalls mit Leber-metastasen, das Auftreten typischer Symptome: Diarrhöe, Flush, Asthma, Zyanose und Klappenfehler der rechten Herzseite, die unter anderem auf die Überproduktion von 5-Hydroxytryptamin und Histamin zurückzuführen waren (siehe auch Kapitel 1.1.4) [Creutzfeldt, 1996].

### 1.1.3 Klassifikationen

Williams und Sandler haben 1963 eine erste Klassifikation der Karzinoide vorgeschlagen. Entsprechend dem entwicklungsgeschichtlichen Ursprungsort unterscheiden sie „*Foregut-*“ (Respirationstrakt, Magen, Duodenum, oberes

Jejunum und Pankreas), „*Midgut-*“ (unteres Jejunum, Ileum, Appendix und rechtes Kolon) und „*Hindgut-Karzinoid*“ (linkes Kolon und Rektum). Vor allem im Falle der Foregut-Karzinoid wird der Nutzen dieser Klassifikation heute jedoch in Frage gestellt, einerseits aufgrund einer fehlenden Charakterisierung individueller Tumorarten mit gut definierten histologischen, cytologischen, klinisch-pathologischen und/oder Hormon-Profilen, andererseits wegen der Zuordnung endokriner Tumoren des Pankreas, des Thymus und des Bronchialsystems [Capella et al., 1994].

1980 folgte ein Vorschlag für eine weitere Klassifikation von der Weltgesundheits-Organisation (WHO), basierend auf der Vorstellung, dass Karzinoid Tumoren des diffusen endokrinen Zellsystems des Gastrointestinaltraktes sind und folglich nur dort entstehen können, wo sich diese Zellen befinden [Arnold, 1997]. Daraus folgt, dass der Begriff „Karzinoid“ für endokrine Pankreastumoren (Insel-Zell-Tumoren), das medulläre Schilddrüsenkarzinom, das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Paragangliom und die Merkel-Zelltumoren der Haut keine Anwendung finden soll. Die WHO nimmt eine Unterteilung in drei Gruppen vor: (1.) enterochromaffine Karzinoid („klassische“ Karzinoid, argentaffine Karzinoid), (2.) G-Zell-Karzinoid (Gastrinome) und (3.) andere Karzinoid. Auch der Gebrauch dieser Klassifikation birgt Schwierigkeiten und sorgte häufig für Verwirrung zwischen Pathologen und Klinikern [Klöppel et al., 1996]. Die Gründe für diese Verwirrung sind vor allem in den Fortschritten im Verständnis der Tumorbologie sowie neuen histochemischen und immunochemischen Färbeverfahren der Tumoren zu sehen, die zeigen, dass endokrine Tumoren in ihrer Histologie nicht selten wesentliche Unterschiede aufweisen [Arnold, 1997].

Die europäischen Pathologen Cappella, Heitz, Höfler, Solcia und Klöppel schlagen vor, aufgrund der uneinheitlichen Nomenklatur und der Schwierigkeit, das biologische Verhalten dieser Tumoren zu prognostizieren [Höfler et al., 1997], endokrine Tumoren der Lunge, des Pankreas und der verschiedenen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes generell als „*neuroendokrine Tumoren*“, bei Metastasierung oder makroskopisch erkennbarer Invasion als „*neuroendokrine Karzinome*“ zu bezeichnen [Cappella et al., 1994]. Die Einteilung fußt auf drei Grundsätzen: (1.) die Tumoren werden

entsprechend ihrem Ursprungsort unterschieden (der Gastrointestinaltrakt wird dabei in seine einzelnen Abschnitte weiter unterteilt); (2.) in jeder Gruppe erfolgt eine Einteilung in vier Dignitätsgruppen: (a) benignes Verhalten, (b) benignes oder niedrig malignes Verhalten, (c) malignes Verhalten und (d) hochgradig malignes Verhalten - Kriterien dafür sind die histologische Differenzierung, eine Gefäßinvasion, die direkte Invasion in Nachbarorgane, eine bestehende Metastasierung sowie als prognostisches Kriterium die Tumorgroße [Klöppel et al., 1996]; (3.) Unterscheidung zwischen „funktionierenden“ und „nicht-funktionierenden“ neuroendokrinen Tumoren, abhängig davon, ob sie eine in Blut- oder Urinproben meßbare, aktive Hormonproduktion mit einem typischen klinischen Syndrom zeigen oder durch das Fehlen von Hormonproduktion und hormonabhängigen Symptomen gekennzeichnet sind [Arnold und Frank, 1996].

Diese Klassifikation beinhaltet nicht die sogenannten gemischt-exokrin-endokrinen Tumoren.

Für die Stadieneinteilung der Karzinoide wird die Einteilung nach Haskell und Tomkins (1985) empfohlen (s. Tabelle 1.3) [Schmoll et al., 1997(b)].

<b>T</b>	<u>Primärtumor</u>	<b>M</b>	<u>Fernmetastasen</u>
<b>T0</b>	Kein Primärtumor	<b>M0</b>	Keine Metastasierung
<b>T1</b>	Tumor < 1 cm im größten Durchmesser	<b>M1</b>	Metastasen vorhanden
<b>T2</b>	Tumor 1-2 cm im größten Durchmesser		
<b>T3</b>	Tumor 2-3 cm im größten Durchmesser		<u>Zusatzbezeichnung</u>
<b>T4</b>	Tumor > 3 cm im größten Durchmesser	<b>A</b>	Asymptomatisch
		<b>B</b>	Karzinoidsyndrom vorhanden
<b>N</b>	<u>Regionäre Lymphknoten</u>		
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen		
<b>N1</b>	Regionärer Lymphknotenbefall		

Tabelle 1.3 Stadieneinteilung der Karzinoide nach Haskell und Tomkins 1985 [Schmoll et al., 1997 (b)]

#### 1.1.4 Klinische Symptome, Diagnostik, therapeutische Grundsätze und Prognose

Neuroendokrine Tumoren des GEP zeigen ein langsames Wachstum und eine geringere Tendenz zur lokalen Ausbreitung als andere maligne Neoplasien [Neary et al., 1997]. Ihre Metastasierungswahrscheinlichkeit variiert je nach Lokalisation und Größe des Primärtumors zwischen 2% (Appendixkarzinoide) und 100% (Tumorgröße > 2 cm im größten Durchmesser) [Mann, 1994].

40 bis 60% aller Karzinoide bleiben dabei ohne Symptome, was sich auch darin widerspiegelt, dass der Großteil der endokrinen Tumoren als Zufallsbefund bei Appendektomie (1 von 250 Appendektomien ergibt ein Karzinoid) [Schmoll et al., 1997(b)] und circa 20% erst bei Obduktionen als Nebenbefund gefunden werden [Neary et al., 1994]. Der Grund für einen asymptomatischen Verlauf trotz nachweisbarer endokriner Aktivität ist letztlich nicht geklärt. Diskutiert werden die Produktion biologisch inaktiver Peptide (Prohormone) sowie eine rasche Inaktivierung durch den Tumor selbst oder im Blut [Creutzfeldt, 1996].

Treten bei funktionell aktiven neuroendokrinen Tumoren Symptome auf, so sind diese abhängig von der jeweiligen Hormon-/Peptidproduktion, der Lokalisation und einer eventuellen Metastasierung. Da auch Hormone verminderter biologischer Aktivität sezerniert werden, die den Hormonspiegel mitbeeinflussen können, korrelieren die Symptome nicht in jedem Fall mit der Höhe des Blutspiegels. Es werden den gastroenteropankreatischen Tumoren verschiedene Symptome und Syndrome zugeschrieben. Das häufigste klinische Syndrom ist dabei das „klassische Karzinoidsyndrom“ bei bis zu 4% der Patienten [Mann, 1994]. Es tritt nach Metastasierung von Primärtumoren aus dem Bereich des „midgut“, seltener auch des „foregut“, in die Leber auf [Neary et al., 1997], da nur in diesem Fall ausreichend hohe Blutspiegel der aktiven Hormone erreicht werden können [Creutzfeldt, 1996].

Die ebenso klassischen Symptome sind anfallsartiger (Gesichts-)Flush (94%), Diarrhöe (78%), abdominelle Schmerzen (Krämpfe 51%), Klappenfibrosen vor allem der rechten Herzhälfte (40%), asthmaähnliche Beschwerden und periphere Ödeme (je 19%) [Creutzfeldt, 1996]. Für diese Beschwerden werden

hauptsächlich die Tumorprodukte Serotonin (Diarrhöe, Fibrose, Bronchokonstriktion, Ödeme), Bradykinin und Tachykinine (Flush, Bronchokonstriktion) sowie Histamin (Flush) und Prostaglandine (Diarrhöe) verantwortlich gemacht. Die abdominalen Krämpfe werden auf Obstruktionen des Dünndarms und/oder Gefäßobliterationen durch den Tumor zurückgeführt [Arnold, 1996].

Zur Diagnose dient vor allem der Nachweis von 5-Hydroxy-Indolessigsäure (5-HIES), dem Abbauprodukt des Serotonins, im Urin mittels photometrischer Messung oder besser HPLC (*high-pressure liquid chromatography*) (Referenzwert 10-50  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ ) [Koop und Keller, 1995]. Werte über 100  $\mu\text{mol}$  pro Tag sprechen für das Vorliegen eines serotoninproduzierenden Karzinoids [Neary et al., 1997]. Die Lokaldiagnostik kann mit endoskopischen und radiologischen Techniken versucht werden [Mann, 1994].

Die Therapie neuroendokriner Tumoren erfolgt nach vier Grundsätzen: (1.) wenn möglich und keine Metastasen vorliegen, chirurgische Extirpation des Primärtumors; (2.) symptomatische Behandlung während der präoperativen Phase und postoperativ, wenn kein Tumor gefunden wurde, sowie bei Metastasierung, vor allem durch lang-wirkende Somatostatinanaloga (Octreotid); (3.) pharmakologische Inhibition des Tumorwachstums (Interferon- $\alpha$ , Octreotid oder einer Kombination aus beiden) und (4.) Tumorreduktion durch Embolisation der Leberarterien oder chirurgisches Debulking [Arnold, 1996]. Die Erfolge der Chemotherapie bei gut differenzierten Karzinoiden gelten als unbefriedigend [Höfler et al., 1997].

Die 5-Jahres-Überlebenszeit aller Karzinoidtumortypen zusammengenommen wird derzeit mit  $50,4 \pm 6,4\%$  angegeben [Modlin und Sandor, 1997]. Die Prognose ist jedoch in erster Linie abhängig von Größe, Metastasierung und Lokalisation des Primärtumors [Creutzfeldt, 1996]. So liegt die 5-Jahres-Überlebenszeit für Patienten mit lokal begrenzten Appendixkarzinoiden im Mittel bei 94%, während durchschnittlich nur 18,3% der Patienten mit einem weit metastasierten Rektumkarzinoid diesen Zeitraum überleben [Modlin und Sandor, 1997].

## 1.2 Insulin-like growth factor-I: Rezeptor, Ligand und deren Funktionen

### 1.2.1 Das IGF-System

In ihren Studien über das Wachstumshormon (*growth hormone*, GH) stellten Salmon und Daughaday die Vermutung auf, dass dessen Wirkung durch einen im Serum befindlichen Faktor vermittelt wird. Später wurde dieser Faktor als ein Mediator des somatischen Wachstums Somatomedin C (heute IGF-I) genannt.

Forschungen in den 60er Jahren zeigten Serumfaktoren mit insulin-ähnlicher metabolischer Wirkung, die nicht durch Anti-Insulin-Antikörper gehemmt werden konnten und folglich als *nonsuppressible insulin-like activity* (NSILA) bekannt wurden (heute IGF-I und IGF-II).

Pierson und Temin machten dann in den frühen 70er Jahren die Beobachtung, dass in Zellkultur gehaltene Ratten-Leberzellen ihre eigene sogenannte *multiplication-stimulating activity* (MSA) sezernieren (heute wahrscheinlich IGF-II).

In der Folge wurde 1976 schließlich der Begriff des *insulin-like growth factor* (IGF) in Anlehnung an die zum einen insulin-ähnliche und zum anderen wachstumsstimulierende Wirkung dieser Substanzen geprägt. [Stewart und Rotwein, 1996].

Vereinfacht dargestellt umfaßt das IGF-System heute drei Rezeptoren, drei Liganden und sechs sogenannte IGF-bindende Proteine (IGFBP).

Die drei Rezeptoren sind der IGF-I-Rezeptor, auch Typ-I-IGF-Rezeptor genannt (siehe 1.3.2), der IGF-II-Rezeptor und der Insulin-Rezeptor, die Liganden IGF-I, IGF-II und Insulin [Baserga et al., 1997]. Abbildung 1.1 zeigt die Verknüpfungen dieses Systems.

Für das proliferative Zellwachstum ist der IGF-I-Rezeptor in diesem System der bedeutsamste. Er kann durch alle drei Liganden aktiviert werden und ist eine notwendige Struktur für die Signaltransduktion weiterer Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel dem EGF und PDGF (siehe Abschnitt 1.3.2) [Baserga et al., 1997].

Der IGF-II-Rezeptor ist auch als kationen-abhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor bekannt. Für das Zellwachstum ist er nur in sofern wichtig, als dass durch ihn zirkulierendes IGF-II gebunden und somit der Blutspiegel gesenkt wird. Die mitogene Aktivität des IGF-II wird jedoch durch den Typ-I-IGF-Rezeptor vermittelt [Rubin und Baserga, 1995].

Die sechs bekannten IGF-Bindungsproteine regulieren ebenfalls die Blutspiegel von IGF-I und IGF-II und modulieren zudem ihre Wirkung. Circa 90% der zirkulierenden IGFs sind an sie gebunden [Froesch et al., 1996]. IGF-Bindungsproteine haben mehrere und zum Teil gegensätzliche Funktionen: (1.) dienen sie als Reservoir für IGF in der Zirkulation (vor allem IGFBP-3); (2.) können sie gebundene IGFs aus der Zirkulation durch die Kapillarschranke hindurch in periphere Gewebe transportieren (IGFBP-1, IGFBP-2 und IGFBP-4) und können (3.) die IGF-Wirkung entweder potenzieren oder inhibieren [Stewart und Rotwein, 1996]. Die inhibitorische überwiegt dabei gegenüber der potenzierenden Wirkung, die nur für IGFBP-1, IGFBP-3 und IGFBP-5, abhängig von verschiedenen Mechanismen, beschrieben ist [Zapf, 1995]. Neben diesen Funktionen konnte auch eine IGF-unabhängige direkte biologische Wirkung für IGFBP-3 gezeigt werden [Stewart und Rotwein, 1996].

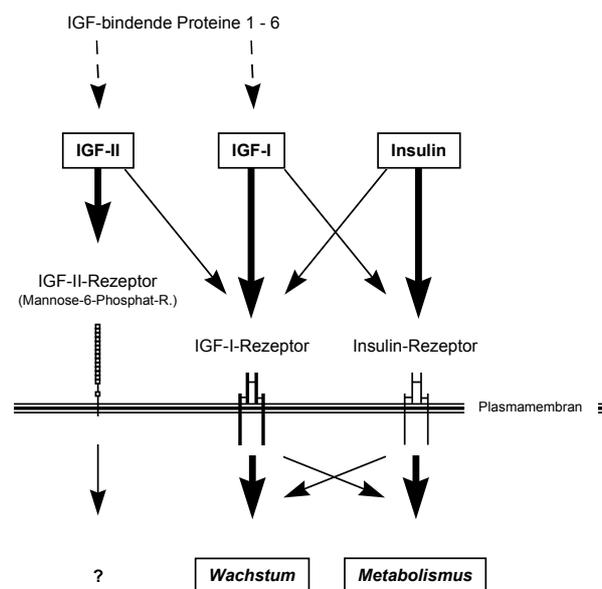


Abbildung 1.1 Das IGF-System [Vereinfachte Darstellung nach Rubin und Baserga 1995]

## 1.2.2 Struktur des IGF-I-Rezeptor und IGF-I

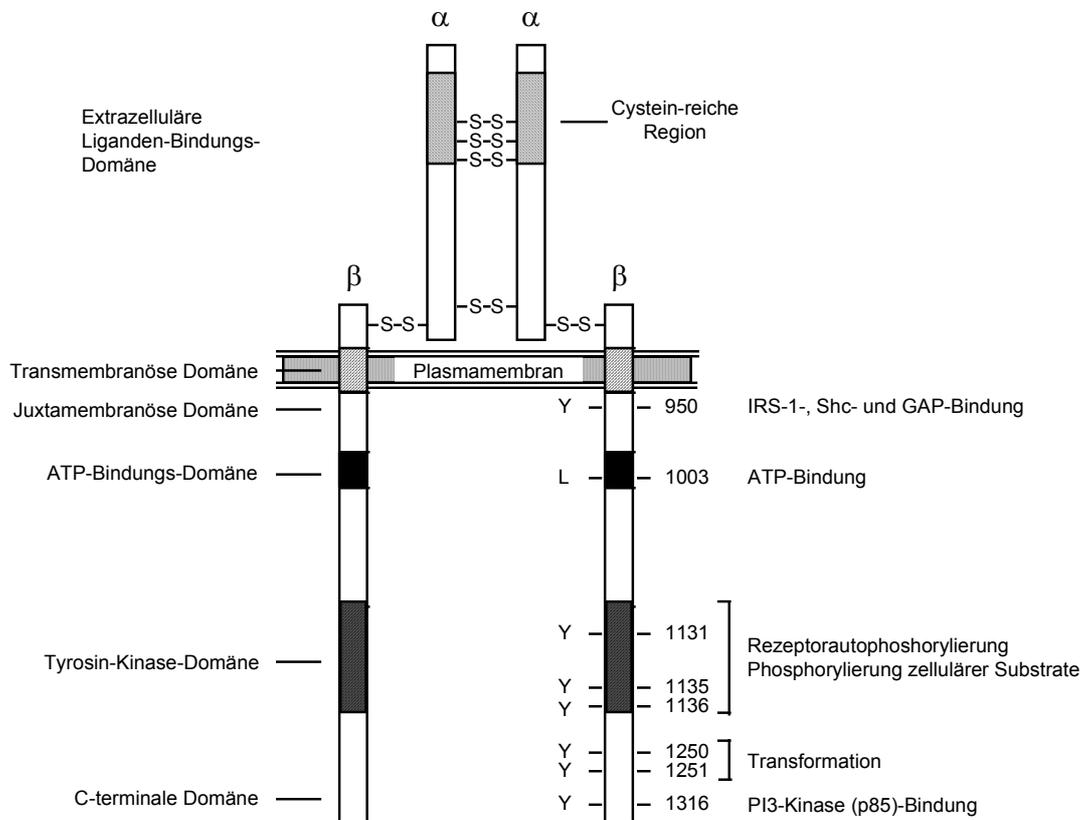


Abbildung 1.2 Der IGF-I-Rezeptor [nach Rubin und Baserga, 1995, Stewart und Rotwein, 1996, und Sepp-Lorenzino, 1998]

Der IGF-I-Rezeptor (Abbildung 1.2), der zu der Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört, ist ein heterotetrameres Glykoprotein, bestehend aus zwei extrazellulären  $\alpha$ - und zwei transmembranösen  $\beta$ -Untereinheiten.

Die Erbinformation für diesen Rezeptor ist beim Menschen auf dem Chromosom 15q25-q26 lokalisiert [LeRoith et al., 1995]. Dieses Gen erstreckt sich über mehr als 100 Kilobasen und enthält 21 Exons. Sowohl in seiner Größe, als auch in der Anzahl der Exons ist es homolog zu dem Insulin-Rezeptor-Gen [Rubin und Baserga, 1995]. Der Typ-I IGF-Rezeptor wird als ein Einzelstrang-Polypeptid mit 1367 Aminosäuren, strukturiert in  $\text{NH}_2$ -Signalpeptid,  $\alpha$ -Untereinheit und  $\beta$ -Untereinheit-COOH, sezerniert und anschließend, nach Abspaltung des Signalpeptids, durch Glykosylierung und

Spaltung in die  $\alpha$ - (706 Aminosäuren) und  $\beta$ -Untereinheit (627 Aminosäuren) getrennt [Baserga et al., 1997]. Die beiden Untereinheiten lagern sich durch eine Disulfidbrücke zu einem  $\alpha\beta$ -„Halbrezeptor“ zusammen und bilden mit einem zweiten Halbrezeptor über Disulfidbrücken zwischen den  $\alpha$ -Untereinheiten den funktionsfähigen Rezeptor [Stewart und Rotwein, 1996]. In seiner Aminosäuresequenz ist der IGF-I-Rezeptor zu 70% homolog dem Insulin-Rezeptor [Baserga et al., 1997].

Die  $\alpha$ -Untereinheiten dienen der Liganden-Bindung. Sowohl IGF-I als auch IGF-II und Insulin können an den Typ-I-IGF-Rezeptor binden und über ihn ihre Signale in die Zelle vermitteln. Die Bindungsaffinitäten liegen für IGF-II mehrfach und für Insulin mehr als 100fach unter der für IGF-I (Dissoziationskonstante  $K_D$  für IGF-I = 1nM). Der Grund ist eine cystein-reiche Region, die für die hohe IGF-I-Bindungsaffinität notwendig ist. Die für die IGF-II-Bindung verantwortliche Region ist bisher noch unbekannt [Stewart und Rotwein, 1996].

Das menschliche Gen für IGF-I, bestehend aus fünf Exons, liegt auf Chromosom 12. IGF-I wird als Präprotein synthetisiert und reift nach Abspaltung des  $\text{NH}_2$ -Signalpeptids und der für IGFs spezifischen E-Domäne zu einem 70 Aminosäuren langen Peptid (relative Molekülmasse 7649), in dem vier Domänen unterteilt werden können (B-C-A-D). In seiner Sequenz ist es zu 70% mit IGF-II identisch [Rubin und Baserga, 1995]. Die A- und B-Domänen beider IGFs zeigen in ihrer Struktur zudem 45% Homologie zum Insulin-Molekül.

### 1.2.3 Signaltransduktionswege ausgehend vom IGF-I-Rezeptor

Für die Signaltransduktion nach Ligandenbindung an die  $\alpha$ -Untereinheit sind die Tyrosin-Autophosphorylierung des Rezeptors und die Tyrosin-Phosphorylierung cytoplasmatischer Substrate durch die intrinsische Tyrosinkinase im intrazellulären Abschnitt der  $\beta$ -Untereinheit die entscheidenden Schritte [Rubin und Baserga, 1995].

Durch Versuche mit IGF-I-Rezeptor-Mutationen konnten wichtige Regionen für die einzelnen Schritte auf der  $\beta$ -Untereinheit gezeigt werden (siehe Abbildung 1.2). Die initiale (Auto-) Phosphorylierung der drei Tyrosine in den Positionen 1131, 1135 und 1136, für die die Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) an Lysin in Position 1003 eine zwingende Voraussetzung darstellt, ist essentiell für die über den Rezeptor vermittelten biologischen Funktionen. Nach der Autophosphorylierung ist der Rezeptor in der Lage, weitere tyrosinhaltige Substrate zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung der Tyrosine in den Positionen 950 und 1313 ist entscheidend für die Phosphorylierung wichtiger cytoplasmatischer Substrate, unter anderem die des MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinase- und des PI3- (*Phosphatidylinositol-3*)-Kinase-Signaltransduktionsweges [LeRoith et al., 1995, und Werner und Le Roith, 1997].

Zwei entscheidende Proteine in der Signalkaskade nach Aktivierung des IGF-I-Rezeptors sind *insulin receptor substrate 1* (IRS-1) und Shc [Werner und Le Roith, 1997].

Als sogenanntes „docking“-Protein reguliert IRS-1 verschiedene SH2-Domänen-haltige Proteine, die in die Signaltransduktionswege eingreifen. Zu ihnen gehören das Adapterprotein Grb-2, die p85  $\beta$ -Untereinheit der Phosphoinositol 3'-Kinase - somit die direkte Verbindung zum PI-3-Kinase-Weg -, sowie Syp (eine Phosphotyrosin-Phosphatase) und Nck (ebenfalls ein Adapterprotein).

Grb-2 ist von diesen Molekülen ein entscheidender Faktor in der Regulierung des ras-raf-MAP-Kinase-Weges. Es bindet mit Sos (Son of sevenless; ein Guanin-Nukleotid-Austauschprotein) und überführt somit das membranständige Ras-Protein von seiner inaktiven Ras-GDP- in seine aktive Ras-GTP-Form [Sepp-Lorenzino, 1998].

Der Grb-2/Sos-Komplex kann jedoch auch unabhängig von IRS-1 vor allem durch Shc (*src homology domain-containing protein*) und wahrscheinlich durch IRS-2, nach deren Phosphorylierung durch den IGF-I-Rezeptor, direkt aktiviert werden [Rubin und Baserga, 1995].

Der IGF-I-Rezeptor tritt zudem mit mehreren anderen Proteinen in Interaktion (z.B. Grb10 und andere), deren Funktionen jedoch noch unklar sind [Sepp-Lorenzino, 1998].

Für mitogene Wachstumsfaktoren wird der Ras-Signaltransduktionsweg als einer der wichtigsten beschrieben [Rubin und Baserga, 1995]. Durch ihn kommt es über die Aktivierung des MAP-(mitogen-activated protein-) Kinase-Weges zu verschiedenen biologischen Aktivitäten, unter anderem zur Regulierung der Genexpression [Stewart und Rotwein, 1996].

Die Familie der MAP-Kinasen besteht aus drei Untergruppen: (1.) die *extracellular-regulated kinases* (ERKs, die in der internationalen Literatur sehr häufig mit dem allgemeinen Begriff *MAP-Kinase* gleichgesetzt werden), (2.) die *Jun amino-terminal kinases / stress-activated protein kinases* (JNKs/SAPKs) und (3.) die p38-MAP-Kinasen. Jede dieser MAP-Kinasen ist Teil eines nach ihnen benannten Signaltransduktionsweges und jede wird von einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MEKK) über eine MAP-Kinase-Kinase (MEK) aktiviert [Liebmann, 2001, und Robinson und Cobb, 1997] (siehe Abbildung 1.3).

Dem ERK-Signalweg - und damit dem bekanntesten aus der MAP-Kinase-Familie - werden entscheidende Rollen in der Kontrolle des Zellzyklus und damit der Zellproliferation sowie der Differenzierung von Zellen zugeschrieben [Marshall, 1999, und Liebmann, 2001]. Wie wichtig dieser Weg für Mitogenität und Tumorgenität ist, ist jedoch umstritten [Robinson und Cobb, 1997, und Scrimgeour et al., 1997].

Hemmend eingreifen kann man in den ERK-Signaltransduktionsweg mit dem spezifischen MEK 1 und 2- Inhibitor PD 98059 (2'-amino-3'methoxyflavone). Diese Substanz inhibiert selektiv die MAP-Kinase-Kinase (MEK) 1 und 2 und schützt somit die ERKs vor der Phosphorylierung [Dudley et al, 1995] ohne dabei die MAP-Kinase selbst oder andere MAP-Kinasen zu hemmen [Alessi et al., 1995].

Inwieweit der JNK/SAPK- oder der p38 MAP-Kinase-Transduktionsweg an den Signalkaskaden beteiligt sind, die vom IGF-I-Rezeptor ausgehen, ist unklar.

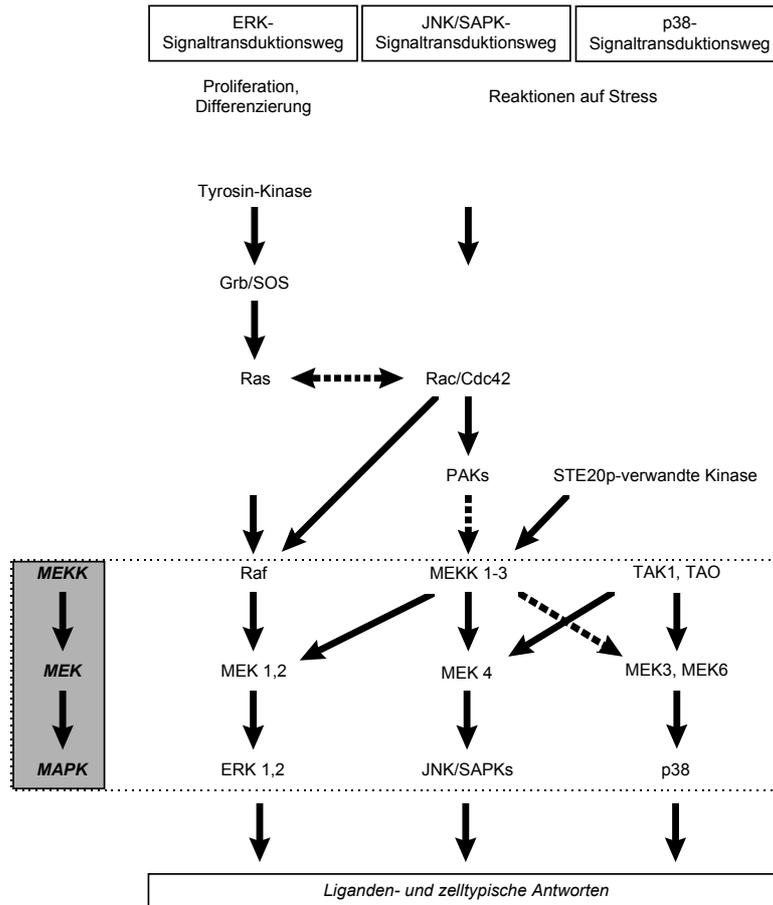


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der MAP-Kinasen-Familie [vereinfachte Darstellung nach Robinson und Cobb, 1997]

Einer weiterer, wichtiger Signaltransduktionsweg ist der über die Enzymfamilie der Phosphoinositol 3'-Kinase (PI3-Kinase). In Säugetierzellen wurden bisher drei PI3-Kinase-Klassen unterteilt, deren Enzyme sich unter anderem in ihren Aktivierungsmechanismen und in der Substratspezifität unterscheiden [Toker, 2000]. Klasse I PI3-Kinasen sind Heterodimere mit einer katalytischen Untereinheit p110 und einer Adapter-, beziehungsweise Regulator-Untereinheit p85 (benannt jeweils nach ihrer Molekularmasse), die unter anderem durch Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen aktiviert werden können (Klasse Ia PI3-Kinase) [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Für die Signaltransduktion über die PI3-Kinase sind ebenfalls Einflüsse auf das Zellwachstum, die Transformation und Differenzierung von Zellen sowie auf den programmierten Zelltod beschrieben [Duronio et al., 1998].

Die regulatorische p85-Untereinheit kann auf verschiedene Weisen aktiviert werden, unter anderem über IRS-1 aber auch über IRS-2 [Fukui et al., 1998, und Duronio et al., 1998]. Nach deren Aktivierung kommt es zur allosterischen Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit und es erfolgt die Produktion von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) und in geringeren Mengen von Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Geringe Mengen dieser Lipidprodukte genügen, um die Serine/Threonin-Kinase PKB (auch bekannt als Akt, in Anlehnung an die Verwandtschaft mit dem viralen Onkogen v-Akt) zu aktivieren, der eine entscheidende Rolle in der PI3-Kinasekaskade zugeordnet wird. Nach neueren Untersuchungen bedarf es dazu jedoch einem Zwischenschritt über die Aktivierung der *phospholipid-dependent kinase 1* (PDK-1) [Duronio et al., 1998]. Von dieser Kinase sind zudem Verbindungen zu einer Vielzahl weiterer Signalwege beschrieben [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Derzeit ist jedoch nicht sicher geklärt, ob nun PKB/Akt, wie ursprünglich angenommen, auch unmittelbar durch PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> oder PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> aktiviert werden kann. Eine Substanz, mit der der PI3-Kinaseweg untersucht werden kann, ist LY 294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one). LY 294002 hemmt spezifisch die PI3-Kinase-Aktivität, ohne Einfluß auf andere bisher untersuchte Protein- oder Lipidkinasen (unter anderem PI4-Kinase) zu nehmen [Vlahos et al. 1994].

In manchen Zellen konnte zudem die Aktivierung der phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C beobachtet werden. Ein Nebenprodukt dieser Phospholipase C, das Diacylglycerol, aktiviert die Protein-Kinase C (PKC), von der ebenfalls angenommen wird, dass sie in die IGF-I-Rezeptor-Signaltransduktion eingreift [Rubin und Baserga, 1995]. Daneben soll sie den Kalziumeinstrom in die Zelle durch einen für Kalziumionen permeablen Ionenkanal fördern [Rubin und Baserga, 1995].

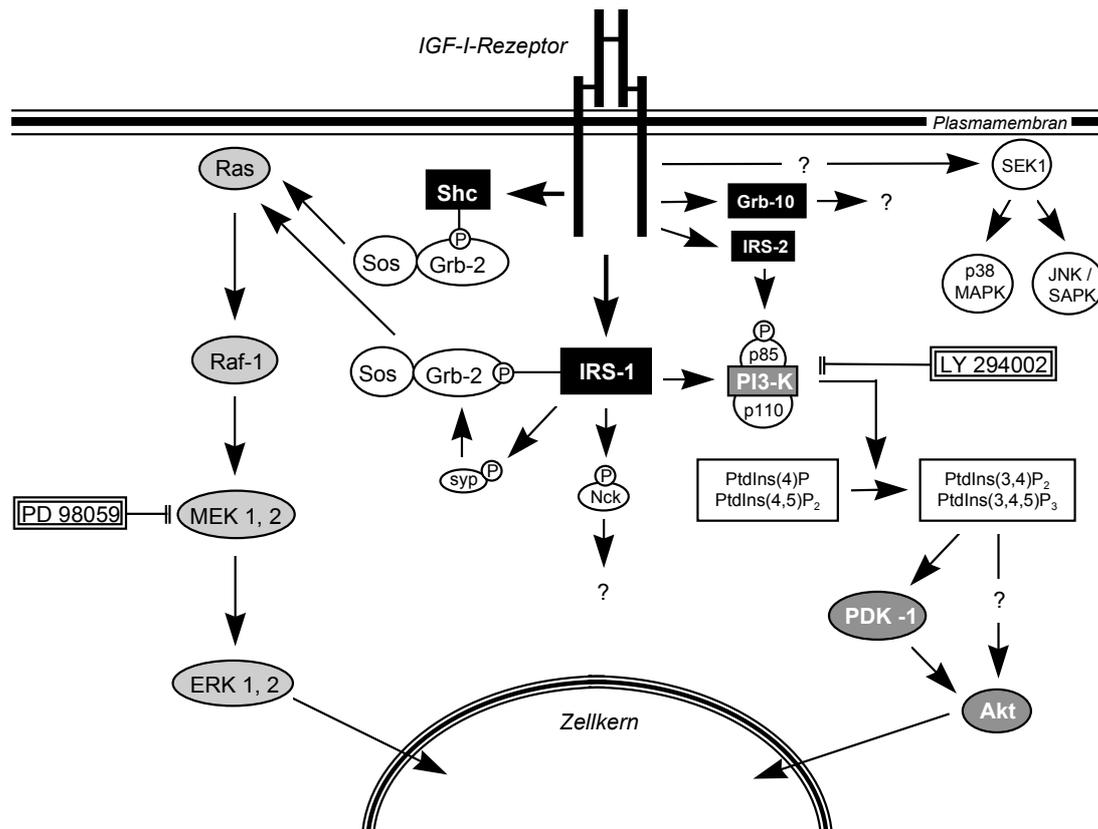


Abbildung 1.4 Signaltransduktionswege ausgehend vom IGF-I-Rezeptor  
 [vereinfachte Darstellung nach Le Roith et al., 1995, Werner und Le Roith, 1997, Rubin und Baserga, 1995, O'Connor et al., 1999, Blume-Jensen und Hunter, 2001, und Duronio et al., 1998]

#### 1.2.4 Funktionen des IGF-I-Rezeptors und des IGF-I

Während der IGF-I-Rezeptor in seinem Aufbau dem Insulin-Rezeptor stark ähnelt, zeigen beide Rezeptoren in ihren physiologischen Auswirkungen größere Unterschiede. Zwar sind beide in der Lage, sowohl ähnliche metabolische als auch mitogene Mechanismen zu induzieren, dennoch wirkt der Typ-I-IGF-Rezeptor hauptsächlich mitogen, während der Insulin-Rezeptor in erster Linie metabolische Aktivitäten zeigt [Rubin und Baserga, 1995].

Für das proliferative Wachstum von Säugetierzellen ist die Aktivierung des IGF-I-Rezeptors, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, von entscheidender Bedeutung. Dies zeigten unter anderem Baserga und Mitarbeiter in Versuchen mit sogenannten R<sup>-</sup>Zellen - Mausembryo-Fibroblasten, deren IGF-I-Rezeptorgen gezielt zerstört wurde. Diese Zellen zeigten im Gegensatz zu

Kontrollzellen (Wildtypzellen, W-Zellen) mit IGF-I-Rezeptor kein Wachstum in serumfreien Medium mit zugesetzten Wachstumsfaktoren (IGF-I, IGF-II, PDGF, EGF). Zwar konnte ein Wachstum dieser R-Zellen in Medium mit 10% Serum nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei den W-Zellen. Dies zeigt, dass der IGF-I-Rezeptor zwar nicht für das Zellwachstum allgemein, aber für die optimale Wachstumsrate notwendig ist. Diese Studien belegten zudem eine wichtige Rolle des Typ-I-IGF-Rezeptors im Zellzyklus: bei R-Zellen waren alle Phasen des Zellzyklus verlängert [Sell et al., 1994]. Auch andere in vitro Studien, bei denen die IGF-I-Rezeptorfunktion durch Antisense-Techniken oder IGF-I-Analoga gehemmt wurde, führten zu geringerem Zellwachstum und unterstreichen so die Wichtigkeit dieses Rezeptors [Baserga, 1997]. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch PDGF und EGF, selbst bei Überexpression ihrer Rezeptoren, für die Signaltransduktion auf einen funktionsfähigen Typ-I-IGF-Rezeptor angewiesen sind [Rubin und Baserga, 1995].

Der IGF-I-Rezeptor hat jedoch nicht nur eine bedeutende mitogene Aktivität, er ist auch entscheidend für die Ausprägung und Aufrechterhaltung eines transformierten Phänotyps und somit für eine mögliche Tumorgenese. Ebenfalls an R-Zellen zeigten Baserga und Mitarbeiter, dass virale Onkogene nicht in der Lage sind, Zellen ohne den IGF-I-Rezeptor zu transformieren - wiederum im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen mit dem IGF-I-Rezeptor. Umgekehrt konnte auch gezeigt werden, dass Zellen mit transformiertem Phänotyp durch Reduktion der IGF-I-Rezeptordichte oder Funktionseinschränkung des Rezeptors einen nicht-transformierten Phänotyp ausprägen können. Dies konnte sowohl für das simian virus 40 large tumor antigen (SV40T Ag) und ras-Onkogen [Sell et al., 1993], aber auch für andere Onkogene (bovines Papilloma Virus, v-src und Raf) [Baserga, 1995] gezeigt werden.

Tumorstadium schließlich ist jedoch nicht nur von der Zellproliferation abhängig, sondern auch von der Anzahl absterbender Zellen. Ein Mechanismus des Zelluntergangs ist der sogenannte programmierte Zelltod (Apoptose). Sowohl in vitro, viel deutlicher jedoch in vivo, konnte ein anti-apoptotischer Effekt des IGF-I-Rezeptors beobachtet werden. Während verschiedene, zum Teil menschliche Tumorzellen gut in speziellen Diffusionskammern im subkutanen Gewebe von Ratten oder Mäusen

wuchsen, unterlagen mit Antisense-RNA gegen den Typ-I-IGF-Rezeptor transfizierte, beziehungsweise mit Antisense-Oligodeoxynukleotiden gegen die IGF-I-Rezeptor-RNA inkubierte Zellen dem programmierten Zelltod [Baserga, 1997].

Der Großteil der Versuche, die die Wirkung des IGF-I-Rezeptors und von IGF-I untersuchten, wurde, wie erwähnt, in Modellen mit Ratten- oder Mäusezellen durchgeführt. Es gilt die Relevanz der erworbenen Erkenntnisse für den Menschen durch menschliche Modelle zu prüfen [Baserga, 1995].

### 1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung und Wirkungsweise von IGF-I auf das proliferative Wachstum von humanen Karzinoidzellen, hier am Beispiel der Zelllinie BON, zu untersuchen.

Dazu wurden folgende vier Teilfragen formuliert:

1. Exprimieren BON-Zellen einen IGF-I-Rezeptor?
2. Produzieren und sezernieren BON-Zellen IGF-I?
3. Welchen Einfluß hat IGF-I auf das proliferative Wachstum von BON-Zellen?
4. Wenn es einen Einfluß von IGF-I auf BON-Zellen gibt, über welche Signaltransduktionswege wird dieser vermittelt?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### 2.1.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Pipettierhilfen	Pipetman (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Villes-le-Bel, Frankreich
	Distriman (Multipipette)	Gilson, Villes-le-Bel, Frankreich
	Accu Jet	Brand, Wertheim
	Pipetboy acu	Integra, Fernwald
Analysewaage	AE 163	Mettler, Gießen
Waage	Precision Plus	Ohaus, N.J., USA
pH-Meter	GPHR 1400	Greissinger Electronics, Regenstauf
Zentrifugen	Biofuge A	Heraeus, Karlsruhe
	Labofuge 400e	Heraeus, Karlsruhe
	Kühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
	J2-21	Beckman, München
	Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman, München
Autoklav	Laborautoklav Typ GLA 40	Gössner, Hamburg
Sonifikator	Labsonic U	Braun, Melsungen
Heizblock	DRI-Block DB2A	Techne, Princeton, USA
	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Bakterien-Inkubator	Inkubationshaube	Braun, Melsungen
	CERTOMAT H/HK	
	Tisch-Rundschüttler	Braun, Melsungen
	CERTOMAT R	

Bakterien-Brutschrank	BE 400	Memmert, Schwalbach
Schüttelplatte	KS 250 Basic	Janke und Kunkel, Staufen
Vortexer	REAX 2000	Heidolph, Kelkheim
Magnetrührer	500 Series	NeoLab, Heidelberg
Wasserbad		Köttermann, Hänigsen
Geigerzähler	Monitor LB 1210 D	Berthold, Wildbach

#### 2.1.1.2 Elektrophoresegeräte

Gelkammern	Mini 2-D Cell	BioRad, München
	Minigel HE 33	Hofer, San Francisco, USA
Blottingkammer	Mini Trans Blot	BioRad, München
Netzgeräte	PS 500 XT DC Power Supply	Hofer, San Francisco, USA
Röntgenkassetten	Curix	AGFA, Leverkusen
Filmentwicklungsgerät	Curix 60	AGFA, Leverkusen

#### 2.1.1.3 Zellkultur

Sterile Werkbank	Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Karlsruhe
Brutschrank	BB 16	Heraeus, Karlsruhe
Mikroskop	Olympus IX 50	Olympus, Hamburg
Stickstoff-Tanks	18 HC	Taylor-Wharton, Camp Hill, USA
Neubauer-Zählkammer		Schreck, Hofheim

#### 2.1.1.4 Analysegeräte

Spektralphotometer	Gene Qaunt	Pharmacia, Freiburg
Luminometer	Lumat LB 9501/16	Berthold, Wildbach
Mikrotiterplatten-Reader	MRX	Dynatech, Denkendorf
Densitometer	Elscript 400	Hirschmann, Unterhaching
Transilluminator	TFX-20.M	MWG-Biotech, Ebersberg
UV-Kamera	Gel Print 1000	BioPhotonics
Gamma-Counter		Oakfield Instruments, Oxford, GB

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

##### 2.1.2.1 Laborbedarf

Pipetten	Falcon 7550, 50 ml	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
	Gold Seal 9702, 2 ml	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
	Gold Seal 9725, 25 ml	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
	606180, 5 ml	Greiner, Frickenhausen
	607180, 10 ml	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen	Cellstar	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf Cups 3810	Eppendorf, Hamburg
	55.476	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugen-Röhrchen		Nalge, Nunc, USA

## 2.1.2.2 Zellkultur

Gewebekulturschalen	Falcon 3025 (150 x 25 mm)	Becton-Dickison, New Jersey, USA
	Falcon 3004 (60 x 15 mm)	Becton-Dickison, New Jersey, USA
	Nunclon	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten	Falcon 3072	Becton-Dickison, New Jersey, USA
Kryoröhrchen	Cryo Vials	Greiner, Frickenhausen
Zell-Scraper	Disposable Cell Scraper	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter	Millex-GS	Millipore, Bedford, USA

## 2.1.2.3 Westernblot

Blotting-Papiere	Optitran BA-S 85 Reinforced NC	Schleicher & Schuell, Dassel
	GB 002 Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Filme	X-OMAT AR	Kodak, Rochester, USA

## 2.1.3 Chemikalien, Medien, Wachstumsfaktoren und Hemmstoffe

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

## 2.1.3.1 Medien

DMEM/HAM's F12 (1:1)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
FCS	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

## 2.1.3.2 Kommerziell erworbene Systeme

EZ4U (nicht-radioaktives Zellproliferations-Kit)	Biomedica GmbH, Wien, Österreich
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham International plc, Buckinghamshire, GB
Phospho-Plus p44/42 MAP Kinase Antibody Kit	New England Biolabs, Beverly, USA
Luciferase Assay System	Promega, Heidelberg
BCA Protein Assay Reagenzien	Pierce, Bedford USA
Quiagen Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden

## 2.1.3.3 Peptide und Hormone

Wachstumsfaktoren:

IGF-I	Schützdeller, Tübingen
IGF-II	Schützdeller, Tübingen
<sup>125</sup> I-IGF-I	Amersham, Braunschweig
<sup>125</sup> I-IGF-II	Amersham, Braunschweig
FGF	Sigma, Deisenhofen
EGF	Sigma, Deisenhofen
PDGF	Sigma, Deisenhofen

## Hemmstoffe:

PD 98059

Calbiochem, San Diego, USA

2'-Amino-3'-methoxyflavone

LY 294002

Calbiochem, San Diego, USA

2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one

## 2.1.3.4 Lösungen

PBS

(PBS-EDTA)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> lösen, pH 7,4 (mit HCl) einstellen, Lösung auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ergänzen und sterilisieren.

SDS-Sample buffer 10%

100 g SDS (electrophoresis-grade) in 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> durch Erhitzen auf 68 °C lösen, pH 7,2 (mit HCl) einstellen und Lösung auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ergänzen.

Tank-Buffer

(Transfer-Buffer)

0,025 M Tris  
0,192 M Glycin  
0,1 % SDS  
( 20 % Methanol )  
pH 8,3

TBS

8 g NaCl, 0,2 g KCl und 3 g Tris (base) in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> lösen, pH 7,4 (mit HCl) einstellen, Lösung auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ergänzen und destillieren.

---

KRB	0,1 M MgSO <sub>4</sub>
<i>HEPES-buffered, steril filtriert</i>	0,2 M CaCl <sub>2</sub>
	0,2 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,0 M KCl
	5,0 M NaCl
	1,0 M NaHCO <sub>3</sub>
	1,0 M HEPES
	pH 7,4

---

CaCl <sub>2</sub> 1 M	54 g CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O in 200 ml H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> lösen und steril filtrieren.
-----------------------	---

---

2 x HBSS	1,6 g NaCl, 0,074 g KCl, 0,027 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,2 g Dextrose und 1 g HEPES in 90 ml H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> lösen, pH 7,05 (mit 0,5 M NaOH) einstellen, Lösung auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> ergänzen und steril filtrieren.
----------	---

---

LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Bacto-Tryptone, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt in 800 ml H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> lösen, mit HCl auf pH 7,4 titrieren, mit H <sub>2</sub> O <small>bidest</small> auf 1,0 l auffüllen, autoklavieren.
------------------------------	--

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Die humane Karzinoidzelllinie BON und ihre Kultivierung

#### 2.2.1.1 Vorbemerkung - Etablierung der Zelllinie

1986 gelang es Townsend Jr. und Mitarbeitern, die erste kontinuierliche Zelllinie (genannt BON) zu etablieren, die einem menschlichem Pankreas-Karzinoid entstammt:

Bei einem 28jährigen Patienten mit Verschlussikterus und Diarrhoe zeigte eine durchgeführte Laparoskopie ein metastasiertes und irresektables Karzinoid des Pankreaskopfes. Unter sterilen Bedingungen wurde eine Probe einer peripankreatischen Lymphknotenmetastase entnommen und kultiviert. Als Kulturmedium verwandte man Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) und F-12K (1:1) mit 1% Gentamycin und 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FCS) bei Kulturbedingungen von 37°C und einer umgebenden Luftzusammensetzung aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. [Evers et al., 1991, und Parekh et al., 1994].

#### 2.2.1.2 Morphologie und Wachstumseigenschaften

Unter einem Phasen-Kontrast-Mikroskop kann man BON-Zellen als polygonale Zellen sehen, zum Teil mit Dendriten ähnlichen cytoplasmatischen Ausläufern, die typisch für Zellen neuroendokrinen Ursprungs sind (siehe Abbildung 2.1). Elektronenmikroskopisch finden sich eine Fülle membrangebundener cytoplasmatischer Sekretionsgranula durchsetzt von Cytokeratinfilamenten - ein Bild, das charakteristisch für die epitheliale und endokrine Differenzierung ist.

Das Wachstumsmuster der BON-Zellen in Monolayer-Kulturen erscheint pflastersteinartig und zeigt keine Kontaktinhibition [Evers et al. 1994].

In Versuchen mit Nacktmäusen, denen die Thymusanlage fehlt, konnte gezeigt werden, dass die in Kultur gehaltenen Zellen nach subkutaner Injektion erneut

hormonproduzierende Neoplasien bilden [Parekh et al. 1994]. Diese so erzeugten transplantablen Tumoren zeigten sich darüber hinaus histologisch identisch mit dem Ursprungstumor des 28-jährigen Patienten. Die Verdopplungszeit der Tumorzellen lag in vivo bei 13 Tagen [Evers et al. 1991]. In vitro wird die Verdopplungszeit mit 60 Stunden angegeben [Evers et al. 1994].

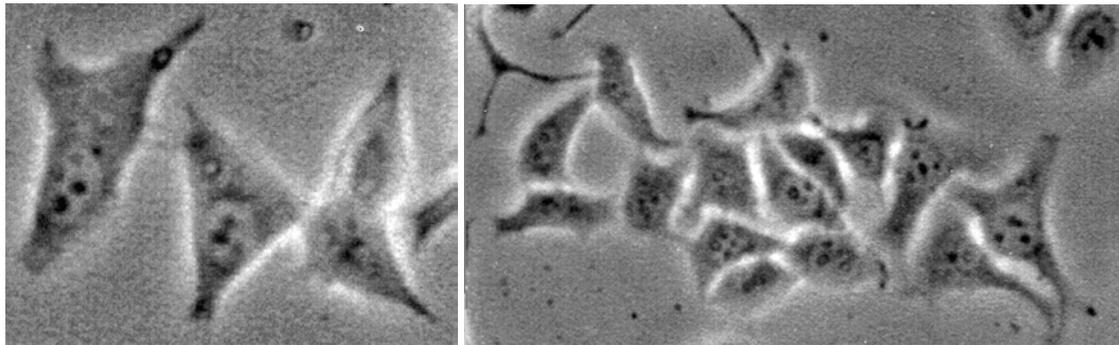


Abbildung 2.1 Bon-Zellen in Kultur: Links einzelne Zellen, rechts Zellgruppen (Photos: privat)

#### 2.2.1.3 Kultivierung der BON-Zellen

Die BON-Zellen wurden analog der Etablierung in einem DMEM- und HAM's F12 Mediumgemisch (1:1), mit Zusatz von 5% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (im Folgenden BON-Medium genannt), bei 37°C warmer, feuchter Luft mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert.

Zur Teilung, beziehungsweise Ablösung der Zellen von der Gewebekulturschale wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37°C drei Minuten inkubiert und nach Zugabe von BON-Medium durch vorsichtiges Resuspendieren vom Boden der Kulturschalen gelöst. Eine Teilung der Zellen wurde bei Gewebekulturschalen, die zu circa 80 % bewachsen waren, im Verhältnis 3:1 oder 4:1 durchgeführt.

#### 2.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die nicht für Versuche gebraucht wurden, sind in Flüssigstickstoff gelagert worden. Dazu wurden die Zellen vor dem Einfrieren von den

Gewebekulturschalen wie oben beschrieben abgelöst und in einem Falcon bei 1000 Rpm zwei Minuten zentrifugiert. Das Gesamtpallet wurde in DMSO/FCS (1:10) resuspendiert und in Kryoröhrchen, zu je 1 ml, zunächst für einen Tag bei  $-20^{\circ}\text{C}$  langsam eingefroren und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde die gewünschte Anzahl Kryoröhrchen bei Raumtemperatur in Wasser kurz aufgetaut und deren Inhalt schnell in jeweils 25 ml vorgewärmtem BON-Medium auf Falcon 3025-Gewebekulturschalen gegeben. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel.

## 2.2.2 Rezeptor-Bindungsstudien

Die Zellen wurden mit PBS-EDTA von den Kulturschalen abgelöst und nach Überführung der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen 3 Minuten bei maximal 1000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpallet wurde in KRB-Puffer (unter Zusatz von 1 % Humanem Serumalbumin, 0,1 % Bacitracin und 1 mmol/l EDTA) resuspendiert.

Jeweils circa  $10^6$  Zellen pro Ansatz wurden mit ungelabeltem IGF-I beziehungsweise IGF-II für 5 Minuten vor und anschließend nach Zusatz von Tracer ( $^{125}\text{J}$ -IGF-I beziehungsweise  $^{125}\text{J}$ -IGF-II, jeweils 25000 cpm) für insgesamt 25 Minuten im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Vor der 5-minütigen Radioaktivitätsmessung im Gamma-Counter wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, die Überstände abgekippt und das nach Abkippen noch verbleibende Restreaktionsgemisch vorsichtig mit einer Pipette abgezogen.

Die spezifische Bindung wurde dabei definiert als Differenz zwischen totaler Bindung und unspezifischer Bindung (entsprechend dem gebundenen Tracer in Gegenwart von  $1\ \mu\text{mol/l}$  ungelabeltem Hormon). Unter diesen Bedingungen erfolgt ein stady-state der Bindung nach etwa 30 Minuten.

### 2.2.3 Nachweis einer IGF-I Sekretion von BON-Zellen

Zum Nachweis einer möglichen Eigenproduktion und -sekretion von IGF-I wurden die Gewebekulturschale mit ca.  $3 \times 10^6$  BON-Zellen insgesamt dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen, um Rückstände des allgemeinen Wachstumsmediums zu vermeiden. Anschließend wurde die Zellen mit 10 ml PS-only, welchem lediglich die Antibiotika zugegeben waren, für insgesamt 24 Stunden „inkubiert“.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die IGF-I-Konzentration in diesem konditionierten Medium mittels Radioimmunoassay gemessen.

### 2.2.4 Wachstumsversuche

Die Einflüsse von IGF-I sowie weiteren Wachstumsfaktoren auf das proliferative Wachstum der BON-Zellen wurde nach 48-stündiger Inkubation mittels dem nicht-radioaktiven Zellproliferations-Kit EZ4U bestimmt.

Die zugrundeliegende Methode basiert auf der Verstoffwechslung von schwach gefärbten Tetrazoliumsalzen in den Mitochondrien vitaler Zellen zu einem stark, braun-rötlich gefärbten Formazan-Derivat [Mosmann 1983].

#### 2.2.4.1 Stimulation der Zellen

Für die Wachstumsversuche wurden die Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben von einer zu ca. 80% vollgewachsenen Falcon 3025-Gewebekulturschale abgelöst. Anstatt von 10 ml BON-Medium wurde jedoch serumfreies PS-only verwendet. Die Zellsuspension wurde soweit in PS-only verdünnt, dass 160 µl Suspension ca. 3000 Zellen enthielten. Die entsprechenden Mengenverhältnisse wurden nach mehrmaligen Zählungen der Zellkonzentration mittels der Neubauer-Zählkammer schließlich erfahrungsgemäß ermittelt.

Mit der Multipipette wurden je 160  $\mu\text{l}$  Zellsuspension (entsprechend 3000 Zellen, s.o.) in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte, je nach Versuchsaufbau, pipettiert. Vier definierte Wells wurden jeweils für die Leerwert-Bestimmung mit 200  $\mu\text{l}$  PS-only gefüllt.

Nach 24 Stunden in PS-only, zum Ausnüchtern der Zellen, erfolgte am 2. Tag die Stimulation der Zellen entsprechend des jeweiligen Versuchsaufbaus (siehe unter 2.2.4.2). Bei Einsatz von Hemmstoffen wurden diese entsprechend der Herstellerinformationen vorinkubiert. Die Auswertung des Zellwachstums erfolgte nach 48-stündiger Inkubation unter den für die Zellkultur gültigen Bedingungen.

#### 2.2.4.2 Versuchsaufbauten

In Vorversuchen über das Wachstum der Zellen auf den Mikrotiterplatten konnte herausgefunden werden, dass bei gleichem Stimulus in jeder der 96 Wells die Ergebnisse des Zellwachstums in der ersten und letzten Zeile sowie Spalte ungleichmäßig und geringer ausfiel, während in den restlichen Wells die Auswertung zu gleichen Werten führte. Auf die Absorptionmessungen in Versuchsansätzen ohne Zellen traf dieses Phänomen nicht zu. Die Ursache dafür bleibt unklar.

Als Konsequenz wurden für die Messung des eigentlichen Zellwachstums nur die inneren Wells benutzt.

Für die Versuche galten folgende Versuchsaufbauten:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK											
B	Kontrolle ▶							FCS 10% ▶				
C	IGF-I 10nM				[FGF 10nM / EGF 10nM / PDGF 10nM]				▶			
D	IGF-I 1nM				[FGF 1nM / EGF 10M / PDGF 1nM]				▶			
E	IGF-I 0,1nM				[FGF 0,1nM / EGF 0,1nM / PDGF 0,1nM]				▶			
F	IGF-I 10pM				[FGF 10pM / EGF 10pM / PDGF 10pM]				▶			
G	IGF-I 1pM				[FGF 1pM / EGF 1pM / PDGF 1pM]				▶			
H												

Tabelle 2.1 Untersuchung des konzentrationsabhängigen Einflusses von IGF-I, FGF, EGF und PDGF auf ads proliferative Wachstum der BON-Zellen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK											
B	Kontrolle ▶					PD 50µM						
C	FCS 10% ▶					▼						
D	FCS 1% ▶											
E	FCS 0,1% ▶											
F	IGF-I 10nM ▶											
G	IGF-I 0,1nM ▶											
H												

Tabelle 2.2 Hemmwirkung von PD 98059

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Leerwert											
B	Kontrolle			▶						▶		
C	FCS 10%			▶						▶		
D	FCS 5%			▶						▶		
E	FCS 2%			▶						▶		
F	IGF-I 10nM			▶						▶		
G	IGF-I 0,1nM			▶						▶		
H	PS-only			▶ LY 50µM		PD 50µM		LY + PD		▶ PS-only		

Tabelle 2.4 Hemmwirkung von LY 294002 im Vergleich zu PD 98059

2.2.4.3 Bestimmung des proliferativen Wachstums

Das lyophilisierte Substrat des EZ4U-Tests wurde vor Gebrauch mit der im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmten Aktivatorlösung vermischt. Anschließend wurden 20 µl dieser Farbstofflösung zu den Versuchsansätzen auf den Mikrotiterplatten pipetiert. Nach zweistündiger und, in Vergleichsuntersuchungen, dreistündiger Inkubation wurde dann die Absorption im MRX-Mikrotiterplatten-Reader bei 450 nm (Referenzfilter: 620 nm) gemessen.

Stimulation mit IGF-1 (10 nM und 0,1 nM), FCS (10%, 5% und 2%) und Hemmung mit LY 294002 und PD 98059 (je 50µM)  
 BON p42-II Stimulation über 2 Tage Messung 2 Std. nach Farbstoffauftrag

I. Rohdaten nach Übertragung aus dem MRX Mikrotiterplatten-Reader:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,213	0,210	0,203	0,206	0,112	0,108	0,107	0,109	0,103	0,106	0,110	0,109
B Kontrolle	0,107	0,526	0,520	0,400	0,402	0,449	0,451	0,407	0,384	0,211	0,211	0,107
C IGF-I 10 nM	0,108	0,574	0,634	0,432	0,421	0,494	0,502	0,382	0,363	0,210	0,210	0,106
D IGF-I 0,1 nM	0,110	0,539	0,581	0,389	0,527	0,456	0,400	0,382	0,382	0,216	0,215	0,110
E FCS 10%	0,112	1,059	1,175	0,784	0,826	0,872	0,670	0,599	0,567	0,281	0,284	0,110
F FCS 5%	0,111	0,975	1,132	0,546	0,646	0,610	0,563	0,502	0,519	0,244	0,237	0,107
G FCS 2%	0,111	0,754	0,739	0,588	0,551	0,551	0,501	0,411	0,440	0,222	0,217	0,110
H Keine Zellen	0,100	0,187	0,196	0,204	0,207	0,208	0,203	0,208	0,210	0,198	0,195	0,107
		Keine Hemmstoffe			LY 294002 [50 µM]	PD 98059 [50 µM]	LY + PD [je 50 µM]		Keine Zellen			

II. Werte nach Abzug des Leerwertes (Blank):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Blank	*	*	*	*	*	*	*	*
B Kontrolle	*	0,318	0,312	0,192	0,194	0,241	0,243	0,199	0,176	0,003	0,003	*
C IGF-I 10 nM	*	0,366	0,426	0,224	0,213	0,286	0,294	0,174	0,155	0,002	0,002	*
D IGF-I 0,1 nM	*	0,331	0,373	0,181	0,319	0,248	0,192	0,174	0,174	0,008	0,007	*
E FCS 10%	*	0,851	0,967	0,576	0,618	0,664	0,462	0,391	0,359	0,073	0,076	*
F FCS 5%	*	0,767	0,924	0,338	0,438	0,402	0,355	0,294	0,311	0,036	0,029	*
G FCS 2%	*	0,546	0,531	0,380	0,343	0,343	0,293	0,203	0,232	0,014	0,009	*
H Keine Zellen	*	-0,021	-0,012	-0,004	-0,001	0,000	-0,005	0,000	0,002	-0,010	-0,013	*
		Keine Hemmstoffe			LY 294002 [50 µM]	PD 98059 [50 µM]	LY + PD [je 50 µM]		Keine Zellen			

Blank-Mittelwert (A1-A4): 0,208

III. Auswertung aus II.:

	Mittelwert:				Standardabweichung:				Wachstum bezogen auf Kontrolle [%]:			
	Keine H.	LY	PD	LY + PD	Keine H.	LY	PD	LY + PD	Keine H.	LY	PD	LY + PD
Kontrolle	0,315	0,193	0,242	0,188	0,00424	0,00141	0,00141	0,01626	100,00	61,27	76,83	59,52
IGF-I 10 nM	0,396	0,219	0,290	0,165	0,04243	0,00778	0,00566	0,01344	125,71	69,37	92,06	52,22
IGF-I 0,1 nM	0,352	0,250	0,220	0,174	0,0297	0,09758	0,0396	0	111,75	79,37	69,84	55,24
FCS 10%	0,909	0,597	0,563	0,375	0,08202	0,0297	0,14284	0,02263	288,57	189,52	178,73	119,05
FCS 5%	0,846	0,388	0,379	0,303	0,11102	0,07071	0,03323	0,01202	268,41	123,17	120,16	96,03
FCS 2%	0,539	0,362	0,318	0,218	0,01061	0,02616	0,035355	0,020506	170,95	114,76	100,95	69,05

Interferenz der Wachstumsfaktoren mit Farbstoff (gemessen ohne Zellen in Spalten 10 und 11):

	Mittelwert:	Entsprechender "Wachstumsanteil" bezogen auf Kontrolle [%]:
IGF-I 10 nM	0,002	0,63
IGF-I 0,1 nM	0,008	2,38
FCS 10%	0,075	23,65
FCS 5%	0,033	10,32
FCS 2%	0,012	3,65
LY 50 µM	-0,003	-0,79
PD 50 µM	-0,002	-0,79
LY + PD	0,001	0,32

Abbildung 2.2 Auswertung der Rohdaten

Die Rohdaten, angegeben in *optical density* (OD), wurden in Microsoft Excel übertragen und dort verarbeitet. Von den absoluten Zahlenwerten wurde der Leerwert, berechnet als Mittelwert aus den vier Leerwertmessungen, subtrahiert und die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsgruppen gebildet. Zur Verdeutlichung wurden die Ergebnisse in Prozent bezogen auf die Kontrolle (= 100 %) umgerechnet. Die Standardabweichung wurde ausgehend von einer Stichprobe mit der zugehörigen Excel-Funktion berechnet. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der Student-t-Test, ebenfalls in der dafür vorgesehenen Excel-Funktion, herangezogen. Die Auswertungsschritte werden in Abbildung 2.2 an einem Beispiel verdeutlicht.

Die Aussagekraft dieses Verfahrens wurde durch Zellzählungen entsprechender Versuchsaufbauten bestätigt. Dazu wurden jeweils 10.000 Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät, am Folgetag entsprechend stimuliert und am Tag 1, 2, 3, 4 und 5 nach Stimulation mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt.

## 2.2.5 Western-Blotting und MAP-Kinase-Assay

Mit Hilfe der Westernblot-Technik werden Proteine in einem Gel aufgetrennt (eigentliche Gelelektrophorese), über - in diesem Fall - Elektrotransfer auf einen Träger (hier Nitrocellulosemembran) übertragen und für die folgende Immunedektion immobilisiert. Diese Technik wurde 1979 sowohl von Tomlin als auch von Renard eingeführt.

### 2.2.5.1 Vorbereitung der Zellen

Für die Probenaufarbeitung wurden die Zellen auf kleine Falcon 3004-Kulturschalen dünn ausgesät und für 5 Tage in serumfreiem Medium ausgenüchert. Entsprechend dem Versuchsaufbau erfolgte die Stimulation mit und ohne Einsatz von Hemmstoffen (Vorinkubation entsprechend der internationalen Literatur) für 10 Minuten im Brutschrank. Anschließend wurde

das Medium abgekippt, nach zweimaligem Waschen mit PBS 200 µl SDS-Sample-Buffer (ohne DTT) auf die Zellen aufgetragen und das so entstandene Zell-Lysat durch abscrapen in Eppendorf-Cups gegeben, die auf Eis gelagert wurden. Nach 15sekündigem Sonifizieren wurde das Zelllysate für fünf Minuten bei 95 - 100 °C erhitzt und nach Abkühlen im Eisbad für eine Minute bei 15 000 rpm zentrifugiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit der BCA-Methode (nach Pearce) durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Acrylamidgel wurde zu den Proben 50 mM DTT (Endkonzentration) gegeben und diese nochmals auf 95 - 100 °C für weitere 5 Minuten erhitzt.

### 2.2.5.2 Versuchsaufbauten

Die Polyacrylamid-Gele wurden wie folgt mit Proben bestückt:

1. Proteinstandard
2. Kontrolle = unstimulierte BON-Zellen
3. BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 5 Minuten stimuliert
4. BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit PD 98059 [50 µM]
5. BON-Zellen mit IGF-I [0,1 nM] 5 Minuten stimuliert
6. BON-Zellen mit IGF-I [0,1 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit PD 98059 [50 µM]

Tabelle 2.5 Erster Versuchsansatz

1. Proteinstandard
2. Kontrolle = unstimulierte BON-Zellen
3. BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 5 Minuten stimuliert
4. BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit PD 98059 [50 µM]
5. BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit LY 294002 [50 µM]
6. BON-Zellen mit IGF-I [0,1 nM] 5 Minuten stimuliert
7. BON-Zellen mit IGF-I [0,1 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit PD 98059 [50 µM]
8. BON-Zellen mit IGF-I [0,1 nM] 5 Minuten stimuliert nach ½-stündiger Vorinkubation mit LY 294002 [50 µM]

Tabelle 2.6 Zweiter Versuchsansatz

### 2.2.5.3 Elektrophorese und Blotting

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in 8-beziehungsweise 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen bei einer Spannung von 40 Volt.

Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele ist in Tabelle 2.7 aufgeführt.

	Sammelgel	Trenngel	
		8 %	12 %
Acrylamid (30 %)	1,6 ml	4,8 ml	7,2 ml
H <sub>2</sub> O bidest	5,9 ml	4,2 ml	1,8 ml
Running-buffer (4 x)		3,0 ml	3,0 ml
Stacking-buffer (4 x)	2,5 ml		
SDS (10 %)	200 µl	900 µl	900 µl
APS (10 %)	60 µl	37,5 µl	37,5 µl
TEMED	20 µl	20,0 µl	20,0 µl
SDS (0,1 %)		nach Bedarf	nach Bedarf
Mengenangaben für je zwei BIO-RAD Minigele			

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine in Westernblot-Technik auf Nitrocellulosemembran übertragen (300 mA, zwei Stunden). Ein besseres Transferergebnis wurde durch Verwendung von eisgekühltem Transferbuffer und unter Kühlung der Westernblotkammer im Eisbad erzielt.

### 2.2.5.4 Detektion spezifischer Antigene

Die Detektion erfolgte nach dem ECL Western blotting protocol (siehe dazu auch Tabelle 2.8 A und B). Hierbei handelt es sich um eine nicht radioaktive Methode, bei der immobilisierte spezifische Antigene durch direkte oder

indirekte Konjugation mit Meerrettich-Peroxidase gelabelten Antikörpern (siehe Abbildung 2.3) sichtbar gemacht werden.

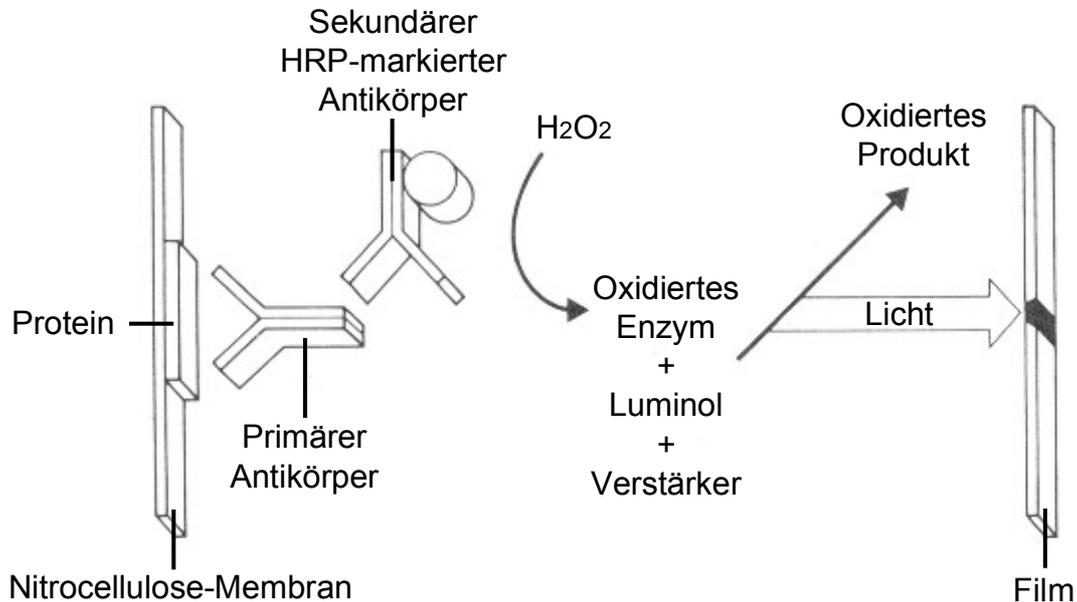


Abbildung 2.3 Prinzip des ECL-Systems (geändert nach Amersham International plc)

Um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu vermeiden, wurde die Nitrocellulose-Membran zunächst für 2 Stunden in einer 5 %igen Magermilch-TBS-Lösung mit 0,3 % Tween 20 (pH 7,4-7,6) „geblockt“. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte jeweils eine mehrfache Waschung mit TBS-T (0,1 % Tween 20, pH 7,4-7,6). Der primäre Antikörper wurde 1:1.000 in TBS-T verdünnt, der sekundäre - HRP markierte - Antikörper 1:10.000 ebenfalls in TBS-T verdünnt eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 Stunde. Bei allen Schritten wurde die Membran in der jeweiligen Lösung auf einer Schüttelplatte vorsichtig bei Raumtemperatur geschwenkt. Zur Dedektion der Proteine erfolgte eine 1-minütige Überschichtung mit einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Dedektionsreagentien, in Saran-Wrap luftblasenfrei eingewickelt und direkt auf den Film (unter Dunkelkammerbedingungen) gelegt. Die Belichtungszeit betrug zunächst 1 Minute. Abhängig von dem Ergebnis konnten weitere Belichtungen mit anderen Belichtungszeiten erfolgen.

	1. Elektrophorese u. Blotting	2. Blocken	3. Waschen	4. Erster Antikörper
Reagentien		5% Blockinglösung: TBS + 0,3% Tween 20 + 5% Magermilchpulver  pH 7,4 - 7,6	TBS-T (0,1% Tween 20)  pH 7,4 - 7,6	Antikörper in TBS-T (0,1% Tween 20) 1:1000 verdünnen  pH 7,4 - 7,6
Volumen		10 ml	10 ml	10 ml
Dauer	übliche Elektrophorese- und Blotting-Zeiten	1 - 3 h	1 x 15 min 3 x 5 min	1 h

Tabelle 2.8 A ECL western blotting protocol (Schritte 1-4)

5. Waschen	6. Zweiter Antikörper	7. Waschen	8. Detektion	9. Entwickeln
TBS-T (0,1% Tween 20)	in TBS-T (0,1% Tween 20) 1:10000 verdünnen  pH 7,4 - 7,6	TBS-T (0,1% Tween 20)  pH 7,4 - 7,6	Beide Reagentien 1:1 mischen	Blot in Saran ®-Wrap luftblasenfrei „einwickeln“,
10 ml	10 ml	10 ml	0,125 ml/cm <sup>2</sup>	
1 x 15 min 3 x 5 min	1 h	1 x 15 min 4 x 5 min	1 min	Film sofort für 1 min belichten, zweiten Film auflegen und entspr. dem Ergebnis des ersten Films belichten (5 min / 10 min)

Tabelle 2.8 B ECL western blotting protocol (Schritte 5-9)

## 2.2.6 Transfektion

Die Transfektion des pIGF-I Luc/-2100 Plasmid in die BON-Zellen erfolgte mit der HEPES-gepufferten Calciumphosphat-Methode. Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA mittels einem auf der Zelloberfläche anhaftenden Precipitats durch einen bisher ungeklärten Mechanismus in die Monolayer-Zellkultur eingeführt.

Mit der Calciumphosphat-Methode können sowohl transiente als auch stabile Transfektionen durchgeführt werden (Current Protocols in Molecular Biology 1996).

Das Plasmid enthält 2100 Basenpaare eines Hühnchen-IGF-I-Promotors, der an das transkriptionale Reportergen Luciferase gekoppelt ist [Kajimoto et al., 1991].

#### 2.2.6.1 Plasmid-Präparation

Zur Gewinnung des Plasmides wurde das Quiagen Maxi Kit nach der Methode der alkalischen Bakterienlyse entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

Eine Probe plasmidhaltiger Bakterien mit einem Antibiotikaresistenzgen wurde in 400 ml LB-Medium zusammen mit Ampicillin für 16 Stunden bei 37 °C und unter Schütteln (200 U/Min) inkubiert. Die so gewonnene Bakterienzellmasse wurde bei 3000 U/Min abzentrifugiert und in 10 ml des RNase-haltigen Puffers P1 resuspendiert (Degradation bakterieller RNA). Durch Zugabe von 10 ml SDS- und NaOH-haltigem Puffer P2 und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln wurden die Zellwände der Bakterien gelöst und chromosomale DNA sowie Proteine denaturiert. Das Lysat wurde anschließend mit 10 ml des sauren, Kaliumacetat-haltigen Puffers P3 für 5 Minuten auf Eis unter Schütteln inkubiert. Durch das entstandene Kaliumdodecylsulfat bildeten die denaturierten Proteine und DNA sowie der bakterielle Zelldetritus unlösliche Komplexe und wurden zusammen mit dem Salz präzipitiert, während die Plasmid-DNA bei wieder neutralem pH-Wert renaturieren konnte.

Nachdem die Lösung bei 15.000 U/Min und 4 °C für zunächst 30 Minuten zentrifugiert wurde, wurde der jetzt klare und die DNA enthaltende Überstand bei gleicher Umdrehung und Temperatur für weitere 15 Minuten zentrifugiert.

200 ml des Überstandes wurden dann in die, mit 10 ml Puffer QBT vorher equilibrierten, Anionenaustauscher-Säulen gefüllt. Die negativ geladene DNA wird bei Durchlaufen der Anionenaustauscher-Säulen an das Säulenmaterial

gebunden, während degradierte RNA und Proteine nicht binden. Es erfolgte das zweimalige Waschen der Säulen mit jeweils 30 ml Puffer QC Salzkonzentration 1 M, um Spuren von Proteinen oder RNA-ase zu eliminieren, bevor die gebundene DNA mit 15 ml Puffer QF ausgeschlämmt wurde.

Das so entstandene Eluat wurde mit 12 ml Isopropanol und 1,5 ml Na-Acetat-Lösung gefällt. Bei 10.000 U/Min wurde die Plasmid-DNA dann für 45 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert, in 300 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert und mit 5 ml Ethanol erneut gefällt. Abschließend wurde die Plasmid-DNA nochmals bei 14.000 U/Min für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 300 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert.

Die Konzentration an gewonnener Plasmid-DNA konnte aus der Messung der verdünnten Suspension (10 µl der Suspension in 990 µl TE-Puffer) mit dem RNA/DNA Calculator Genequant berechnet werden: 5x Meßwert = DNA in µg/µl.

#### 2.2.6.2 Transiente Transfektion und Zellextraktpräparation

Zur Durchführung wurden pro Ansatz 3 µg des pIGF-I Luc/-2100 Promotor in 250 µl einer 250 mM Calciumchloridlösung aufgenommen, unter vorsichtigem Schütteln (Vortexer Stufe 2, Dauerbetrieb) langsam tropfenweise in 2xHBS überführt und für 30 - 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der eigentlichen Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel der am Vortag auf Falcon 3004-Gewebekulturschalen in serumfreien PS-only ausgesäten Zellen durch DMEM mit einem Zusatz von 1% (v/v) FCS. Nach Zugabe des DNA-Konstruktes und 24stündiger Inkubation wurde ein weiterer Mediumwechsel, wiederum durch PS-only, durchgeführt. Entsprechend dem Versuchsaufbau wurden die Zellen stimuliert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Bei dem Einsatz von Hemmstoffen ging der Stimulation eine Vorinkubation voraus. Die Versuche wurden in Doppelbestimmungen ausgeführt.

Am vierten Versuchstag wurden die Zellen zur Zellextraktpräparation nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS, mit jeweils 400 µl Reporterlysis-Buffer für 15 Minuten unter regelmäßigem Schwenken inkubiert.

Um eine bessere Zellyse zu erreichen, wurde das Zell-Lysis-Buffer-Gemisch nach abscrapen der Zellen in einem Eppendorf-Cup auf Trockeneis durchgefroren. Nach dem erneuten Auftauen bei Raumtemperatur und Durchmischung (Vortexer, 15 Sekunden) schloß sich die Zentrifugation des Zelllysates bei 15 000 rpm für circa 15 Sekunden an.

### 2.2.6.3 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden wie folgt inkubiert:

Kontrolle = unstimulierte Zellen

---

Kontrollgruppe mit ½-stündiger Inkubation mit PD 98059 [50 µM]

---

Kontrollgruppe mit ½-stündiger Inkubation mit LY 294002 [50µM]

---

Kontrollgruppe mit ½-stündiger Inkubation mit PD und LY [jeweils 50µM]

---

BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 1 Tag stimuliert

---

BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 1 Tag stimuliert nach ½-stündiger Inkubation mit PD [50 µM]

---

BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 1 Tag stimuliert nach ½-stündiger Inkubation mit LY [50µM]

---

BON-Zellen mit IGF-I [10 nM] 1 Tag stimuliert nach ½-stündiger Inkubation mit PD und LY  
[jeweils 50 µM]

Tabelle 2.9 Versuchsansätze (jeweils in Doppelbestimmung)

### 2.2.6.4 Luciferase-Assay

Die Promotoraktivität wurde mittels Messung der Lichtreaktion, die durch die Umsetzung des Substrates Luciferin durch das Promotorprodukt Luciferase bedingt ist, am Luminometer nachgewiesen.

Dazu wurde pro Probe 20 µl Lysat eingesetzt, die im Luminometer automatisch mit je 100 µl Luciferin (Substrat) versetzt wurden. Die Messung erfolgte standardisiert über eine Minute. Der zuvor gemessene Leerwert wurde von den Meßwerten abgezogen.

Ein weiterer Teil des Lysates wurde zur Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay (Pierce) genutzt, um vergleichbare Daten zu erhalten. Nach der Proteinbestimmung wurden die Luciferaseergebnisse auf eine Standardkonzentration von 1 mg/ml verrechnet.

#### 2.2.6.5 Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

Der BCA-Assay ist eine Kombination der Biuret-Methode mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem. Die Methode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , mit dem BCA spezifisch einen Farbkomplex bildet. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei einer Wellenlänge 562 nm [Lottspeich und Zorbas 1998].

Zur Durchführung wurden die BCA Protein Assay Reagenzien A und B aus dem Kit im Verhältnis 50:1 gemischt und je 200  $\mu\text{l}$  zu 10  $\mu\text{l}$  Zellextrakt der zu bestimmenden Probe oder eines entsprechenden BSA-Standards in unbeschichtete 96-Well-Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Proteinkonzentration im ELISA-Reader.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bindungsstudien mit IGF-I und IGF-II

Die Expression des IGF-I Rezeptors kann durch verschiedenen Methoden nachgewiesen werden.

In Voruntersuchungen zu dieser Arbeit wurde bereits durch Wulbrand und Stamm die Expression des IGF-I-Rezeptorgens (IGF-I-Rezeptor-mRNA) mittels RT-PCR beschrieben (Abbildung 3.1).

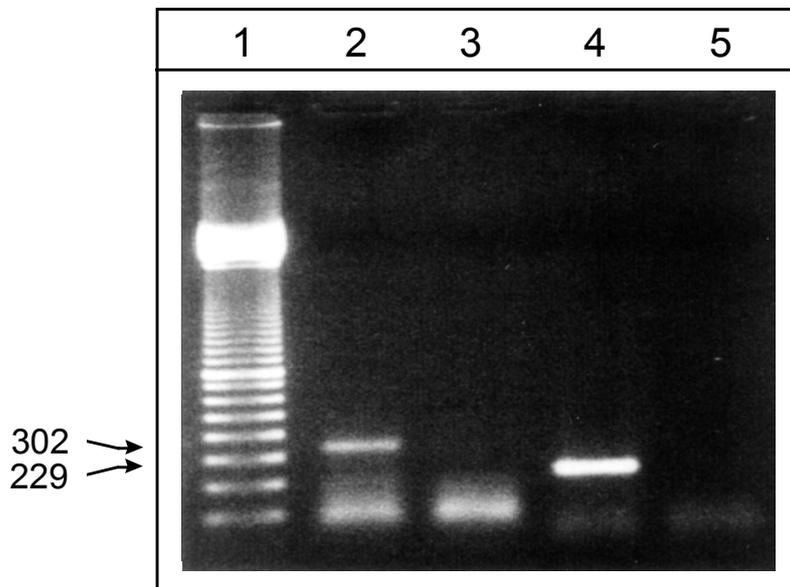


Abbildung 3.1 Expression von IGF-I und IGF-I-Rezeptor-mRNA in BON-Zellen:

- 1 = Standard 100 bp ladder
- 2 = IGF-I-mRNA
- 3 = IGF-I-mRNA (keine RT)
- 4 = IGF-I-Rezeptor-mRNA
- 5 = IGF-I-Rezeptor-mRNA (keine RT)

[Abbildung mit freundlicher Genehmigung durch U. Wulbrand und M. Stamm]

In dieser Arbeit wurde der für IGF-I spezifische Rezeptor durch Bindungsstudien mit  $^{125}\text{J}$ -IGF-I markiertem Tracer analog dem Versuchsaufbau (siehe Kapitel 2.2.2) untersucht.

Nach Hinzugabe von ungelabeltem IGF-I in logarithmisch aufsteigenden Konzentrationsschritten von 1 pM bis 1  $\mu$ M zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Tracers mit einer  $EC_{50}$  bei 2,5 nM. Ab einer Konzentration von 0,1  $\mu$ M kam es zu einer 100-%igen Verdrängung des Tracers durch IGF-I.

Ungelabeltes IGF-II war in keiner Konzentrationsstufe in der Lage, den  $^{125}$ -J-IGF-I-Tracer zu verdrängen.

Diese Ergebnisse zeigen damit indirekt die Präsenz des IGF-I-Rezeptors durch die selektive Verdrängung des Tracers durch nicht radioaktiv markiertes IGF-I (Abbildung 3.2).

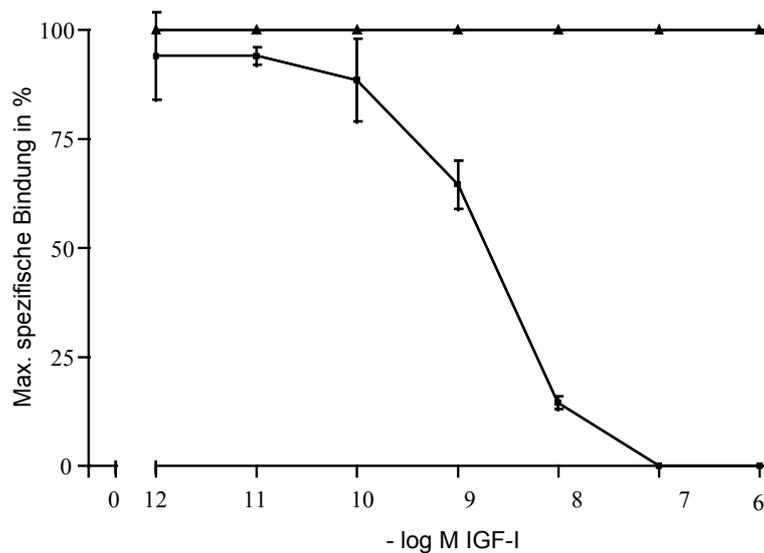


Abbildung 3.2 IGF-I-Bindung von BON-Zellen

—●— IGF-I  
—▲— IGF-II

### 3.2 Nachweis der IGF-I-Sekretion durch BON-Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden des wachstumsfaktorfreien Überstandes der  $3 \times 10^6$  BON-Zellen konnten im Radioimmunoassay 20 ng/ml IGF-I nachgewiesen werden.

### 3.3 Wachstumsstudien

Vor Auswertung der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Methode des nicht-radioaktiven Zellproliferations-Kit EZ4U wurden die eingesetzten Wachstums- und Hemmstoffe auf eine mögliche Eigenfärbung oder eine von dem Zellwachstum unabhängige Interaktion mit den Tetrazoliumsalzen geprüft, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse hätten führen können. Für die im folgenden genannten Versuche konnten solche Störfaktoren durch Mitführen von Negativ-Kontrollen ausgeschlossen oder als irrelevant angesehen werden.

#### 3.3.1 Stimulation von BON-Zellen

In Vorversuchen mit FCS in den Verdünnungen 10%, 5%, 2% und 1% konnte eine dosisabhängige Stimulation nachgewiesen werden, so wie sie bereits von den Etablierern der Zelllinie beschrieben worden ist [Townsend et al., 1993]. Für die folgenden Wachstumsversuche diente FCS 10% entsprechend als Positivkontrolle.

In einem ersten Versuchsaufbau wurde der alleinige Einfluß von IGF-I in den Konzentrationen 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 10 pM und 1 pM auf das proliferative Wachstum der BON-Zellen untersucht (n=10).

Unter den in Kapitel 2.2.4.1 ff. beschriebenen Bedingungen konnte dabei nach 48 Stunden eine konzentrationsabhängige signifikante Wachstumsstimulation auf maximal 131,22 % ( $\pm 15,28$  %) bei der IGF-I-Konzentration 10 nM im Vergleich zu den zur Kontrolle nicht stimulierten Zellen (Wachstum = 100 %) nachgewiesen werden. Weitere signifikante Wachstumsstimulationen zeigten sich für die IGF-I-Konzentrationen 1 nM (114,65 %  $\pm 8,69$  %), 0,1 nM (112,30 %  $\pm 5,58$  %) und 10 pM (107,69 %  $\pm 5,19$  %). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 graphisch dargestellt.

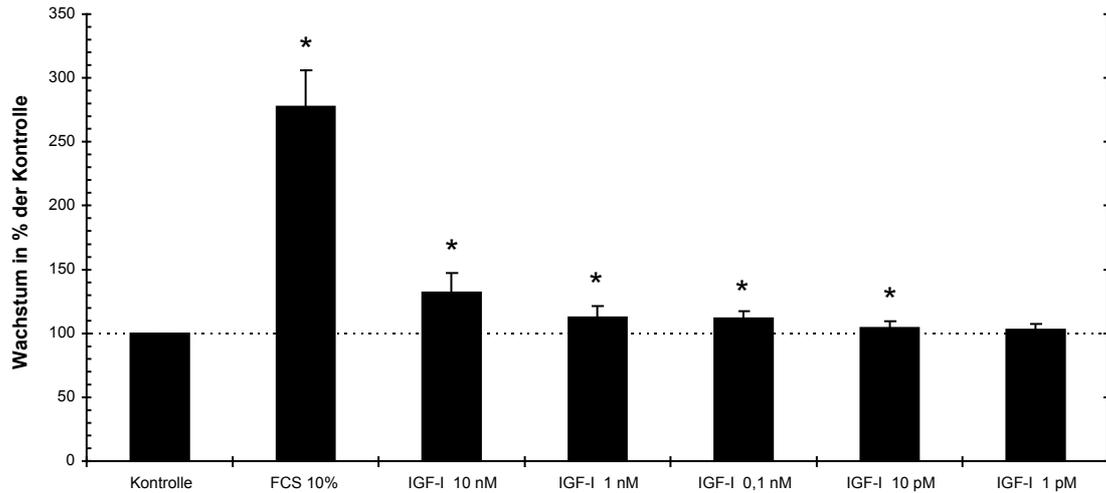


Abbildung 3.3 IGF-I stimuliertes Wachstum von BON-Zellen (n=10)  
 \* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle

Dem gleichen Versuchsaufbau folgend wurden die Wirkungen der Wachstumsfaktoren FGF, EGF und PDGF untersucht.

Dabei konnte auch für FGF (n=7), in gleichen Konzentrationen wie IGF-I eingesetzt, ein wachstumsstimulierender Effekt nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen, zeigte sich das ebenfalls signifikante Wirkungsmaximum mit 122,82 % ( $\pm 9,83$  %) jedoch bei der FGF-Konzentration 0,1 nM.

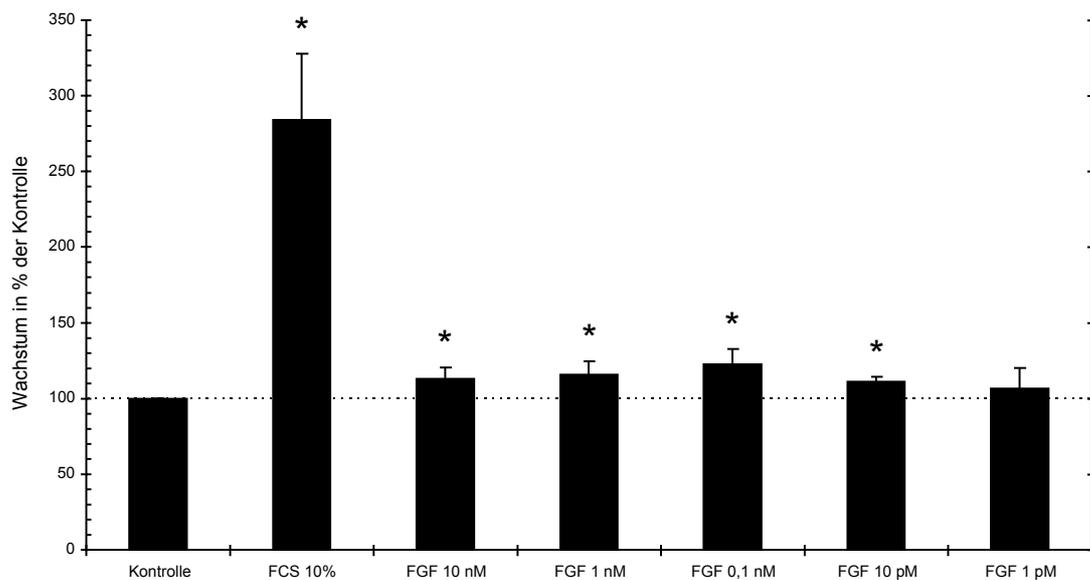


Abbildung 3.4 FGF stimuliertes Wachstum von BON-Zellen (n=7)  
 \* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle

In den Versuchen mit EGF und PDGF konnten keine wachstumsstimulierenden Wirkungen beobachtet werden. Dieses Ergebnis entspricht für EGF den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Townsend [Townsend et al., 1993], die durch eine andere Untersuchungsmethode gemacht wurden. Für PDGF liegen keine Literaturstellen vor.

### 3.3.2 Hemmung des basalen und stimulierten Wachstums von BON-Zellen

Im nächsten Versuchsaufbau wurde untersucht, wie das Wachstum der BON-Zellen unter Stimulation durch IGF-I gehemmt werden kann, mit dem Ziel, Hinweise über verantwortliche Signaltransduktionswege zu erhalten.

Zunächst wurden dafür der spezifische MEK-Inhibitor PD 98059 in der laut internationaler Literatur empfohlenen Konzentration 50  $\mu$ M eingesetzt (n=8).

Nach 30-minütiger Vorinkubation des Hemmstoffes wurden die BON-Zellen mit IGF-I in den Konzentrationen 10 nM und 0,1 nM sowie mit FCS 10%, 1% und 0,1% stimuliert.

In dieser ersten Versuchsreihe mit PD 98059 zeigten sich signifikante Hemmungen des Wachstums sowohl in der Kontrolle, entsprechend dem basalen Wachstum der Zellen, als auch in den mit IGF-I und FCS stimulierten Ansätzen.

Im Vergleich zur Kontrolle wurde das basale Wachstum unter PD 98059 auf 63,59 % ( $\pm$  7,12 %) vermindert. Eine entsprechende Hemmwirkung zeigte sich auch bei den mit IGF-I stimulierten Zellen: Bei der IGF-I-Konzentration von 10 nM wurde das Wachstum von 138,87 % ( $\pm$  13,22 %) auf 87,90 % ( $\pm$  14,47%), entsprechend einer Hemmung um 36,70 %, und bei der IGF-I-Konzentration 0,1 nM von 110,63 % ( $\pm$  13,20 %) auf 71,20 % ( $\pm$  12,17 %), entsprechend einer Hemmwirkung um 35,64 %, reduziert (Signifikanz siehe Abbildung 3.5).

In der Gruppe der mit FCS stimulierten Zellen zeigte sich eine etwas deutlichere Hemmung um 48,27 % bei FCS 10% (von 286,67 %  $\pm$  31,74 % auf 148,30 %  $\pm$  35,61 %), sowie um 49,45 % bei FCS 1% (von 191,22 %  $\pm$  16,44 % auf 96,67 %  $\pm$  21,05 %) und 42,78 % bei FCS 0,1 % (von 137,57 %  $\pm$  11,17

% auf  $78,72 \% \pm 11,81 \%$ ) (Signifikanz siehe Abbildung 3.5). Die graphische Darstellung zeigt Abbildung 3.5.

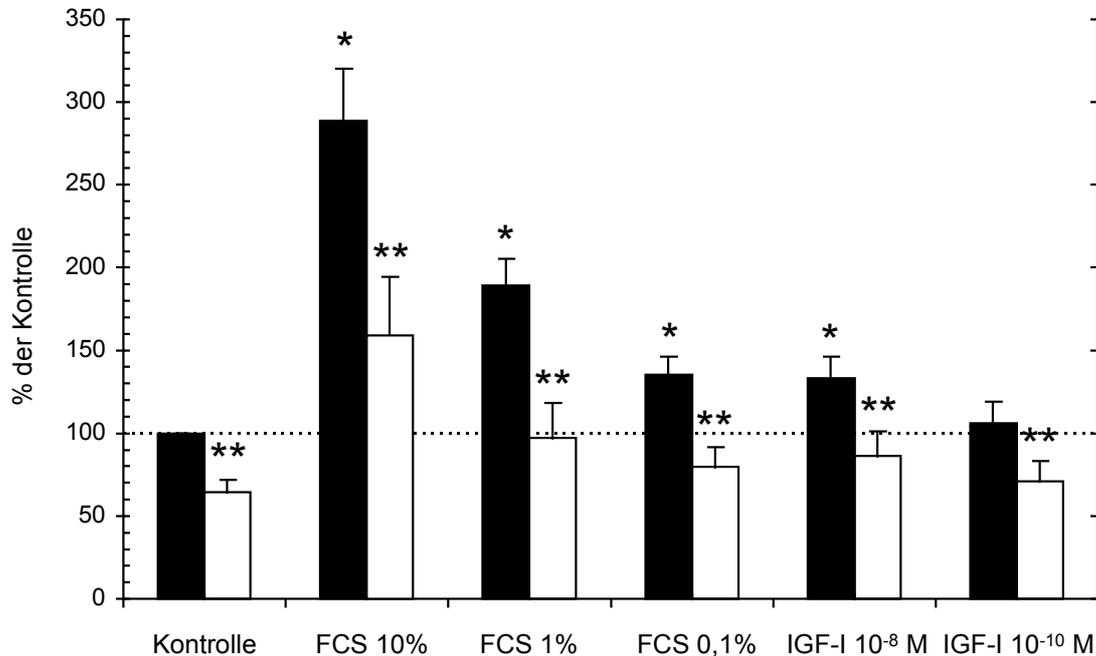


Abbildung 3.5 Hemmwirkung von PD 98059 auf das stimulierte Wachstum von BON-Zellen mit FCS und IGF-I (n=8)

■ Ohne PD 98059

□ Mit PD 98059 [50 µM]

\* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle

\*\* = T-Test:  $p < 0,05$  versus stimulierte Zellen

Diese starke Hemmwirkung von PD 98059 auf das stimulierte und nicht-stimulierte Wachstum konnte auch in Versuchsreihen deutlich gemacht werden, die in der Neubauer-Zählkammer ausgewertet wurden (siehe Tabelle 3.1 und Abbildung 3.6). Die dabei abweichenden absoluten Zahlenwerte können am ehesten auf die beiden verschiedenen Bewertungskriterien (makroskopische Beurteilung versus Verstoffwechslung von Tetrazoliumsalzen in funktionstüchtigen Mitochondrien) zurückgeführt werden.

	Zellzahlen x 10.000 nach			
	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
PS-only = Kontrolle	12,2 ± 2,38	12,0 ± 1,58	18,7 ± 1,08	29,0 ± 3,60
FCS 10%	14,0 ± 3,53	47,5 ± 8,29	62,5 ± 7,22	80,0 ± 10,19
FCS 10% + PD 50µM	10,7 ± 1,92	17,0 ± 1,58	16,0 ± 2,73	43,7 ± 11,92
IGF-I 10 nM	10,5 ± 0,50	28,0 ± 5,09	30,5 ± 5,22	57,5 ± 9,39
IGF-I 10 nM + PD 50µM	11,0 ± 1,41	11,5 ± 1,11	12,2 ± 2,16	12,5 ± 3,16
IGF-I 0,1 nM	11,0 ± 1,00	13,0 ± 2,12	22,2 ± 3,26	37,0 ± 6,16

Tabelle 3.1 Absolutzahlen des Zellwachstums nach Stimulation mit FCS und IGF-I sowie Hemmung durch PD 98059, Auswertung in der Neubauer-Zellkammer

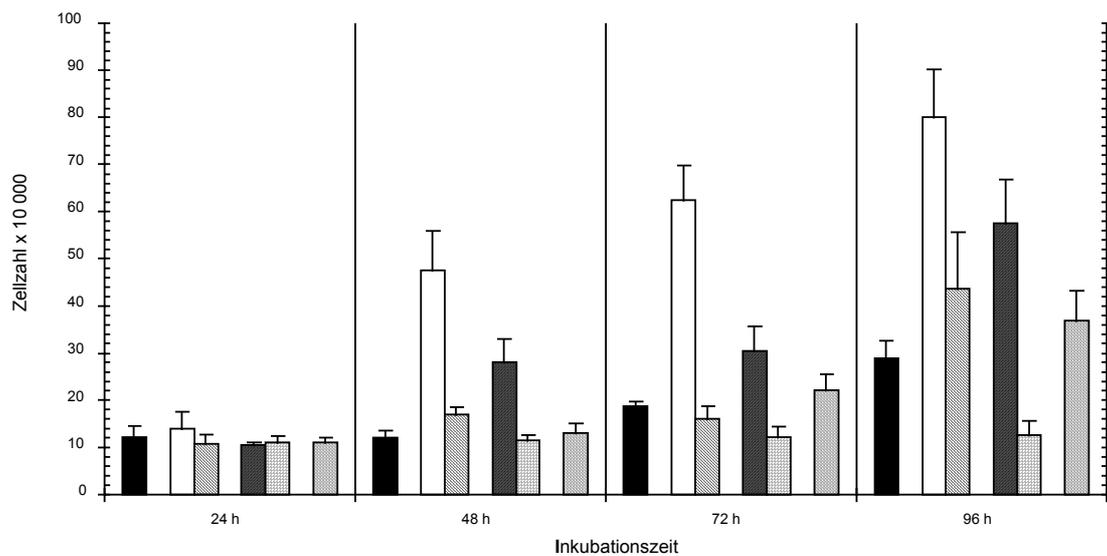


Abbildung 3.6 Auswertung des mit FCS und IGF-I stimulierten und durch PD 98059 gehemmten Wachstums von BON-Zellen in der Neubauer-Zellkammer

- PS-only
- FCS 10%
- ▨ FCS 10% + PD 98059 50µM
- IGF-I 10 nM
- ▨ IGF-I 10 nM + PD 98059 50 µM
- ▨ IGF-I 0,1 nM

Die Bedeutung der PI-3-Kinase vermittelten Signaltransduktion wurde mit dem dafür spezifischen Hemmstoff LY 294002, ebenfalls in der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ , untersucht.

Neben der alleinigen Wirkung von LY 294002 auf das stimulierte und nicht stimulierte Wachstum der Zellen wurde zudem der direkte Vergleich zu PD 98059 (Konzentration 50  $\mu\text{M}$ ) und die Wirkung der Kombination aus LY 294002 und PD 98059 (Konzentrationen jeweils 50  $\mu\text{M}$ ) untersucht (n=9). Als Stimuli dienten wiederum IGF-I in den Konzentrationsstufen 10 nM und 0,1 nM sowie FCS 10%, 5 % und 2 %.

Im direkten Vergleich konnte hierbei ein höherer Hemmeffekt von Ly 294002 auf das basale und das IGF-I-stimulierte Wachstum gezeigt werden, während bei FCS-stimulierten Zellen PD 98059 eine größere Hemmung aufweist. Kombiniert zeigte sich jeweils ein deutlicher additiver Effekt. Die absoluten Zahlen sind zur besseren Übersicht in Tabelle 3.2 aufgeführt und in Abbildung 3.7 graphisch dargestellt.

Stimulus	Wachstum in % der Kontrolle (Mittelwerte)			
	Ohne Hemmstoff	LY 294002 [50 $\mu\text{M}$ ]	PD 98059 [50 $\mu\text{M}$ ]	LY + PD [je 50 $\mu\text{M}$ ]
Kontrolle	100	49,49 $\pm$ 6,97	72,09 $\pm$ 12,80	43,45 $\pm$ 9,53
IGF-I	10 nM	130,67 $\pm$ 12,76	65,11 $\pm$ 6,75	79,64 $\pm$ 17,89
	0,1 nM	114,02 $\pm$ 7,52	59,59 $\pm$ 21,10	83,61 $\pm$ 21,48
FCS	10 %	243,25 $\pm$ 68,99	164,56 $\pm$ 36,08	131,12 $\pm$ 37,19
	5 %	195,69 $\pm$ 52,84	111,51 $\pm$ 34,02	98,54 $\pm$ 19,96
	2 %	166,83 $\pm$ 12,88	102,35 $\pm$ 10,68	101,37 $\pm$ 15,87

Tabelle 3.2 Hemmwirkungen von LY 294002 und PD 98059 auf das basale und mit IGF-I sowie FCS stimulierte Zellwachstum von BON-Zellen

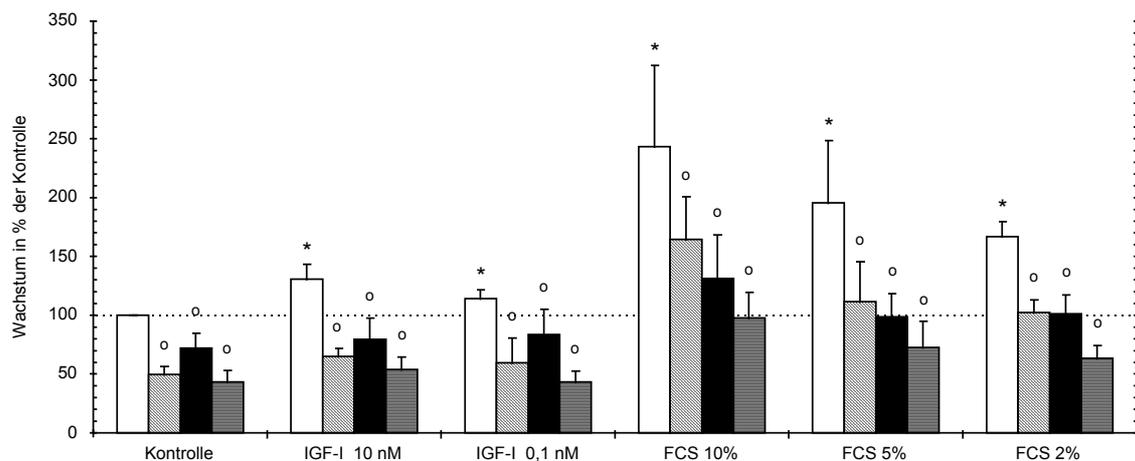


Abbildung 3.7 Hemmwirkungen von LY 294002 und PD 98059 auf das basale und mit IGF-I sowie FCS stimulierte Wachstum von BON-Zellen (n=9)

- Kontrolle
- ▨ LY 294002 50µM
- PD 98059 50µM
- ▩ LY 294002 + PD 98059 jeweils 50µM
- \* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle
- ° = T-Test:  $p < 0,05$  versus stimulierte Zellen

### 3.3 MAP-Kinase-Assay

Mit Hilfe der Westernblot Technik konnte entsprechend der Anleitung in Kapitel 2.2.5 im MAP-Kinase-Assay die MAP-Kinase und ihre Aktivität untersucht werden.

Es zeigte sich in wiederholten Untersuchungen bei einer vorherigen Stimulation der BON-Zellen mit IGF-I in einer Konzentration von 10nM die Erhöhung der MAP-Kinase-Aktivität bis auf das 1,6-fache im Vergleich zur Kontrolle. Durch den spezifischen MEK-Inhibitor PD 98059 konnte diese Aktivität um 90% reduziert werden.

Abbildung 3.8 (A und B) zeigt einen solchen Westernblot, bei dem auch die erhöhte MAP-Kinaseaktivität nach IGF-I-Stimulation andeutungsweise zu sehen ist. Im oberen Teil der Abbildung (3.8 A) wurde durch den Phospho-spezifischen MAP-Kinase Antikörper phosphoriliertes Tyrosin 204 der p44- und

p42-MAP-Kinase (MAP-Kinase 1 und 2) und damit die durch MEK 1 und 2 aktivierte Form der MAP-Kinase im ERK-Signaltransduktionsweg dedektiert. Dieser Antikörper geht keine Kreuzreaktionen mit entsprechend phosphorylierten Tyrosinen des JNK/SAPK- oder des p38-MAP-Kinaseweges ein.

Im unteren Teil der Abbildung (3.8 B) wurde mit dem p44/p42-MAP-Kinase-Antikörper die gesamte MAP-Kinase unabhängig von ihrem Phosphorylierungsgrad sichtbar gemacht. Die Inkubation mit diesem Antikörper dient somit als Positivkontrolle. In jeder Versuchsreihe wurden jeweils beide Antikörper bei mit gleichen Proteinkonzentrationen bestückten SDS-Polymerasegelen beziehungsweise nach Transfer Nitrocellulosemembranen eingesetzt.

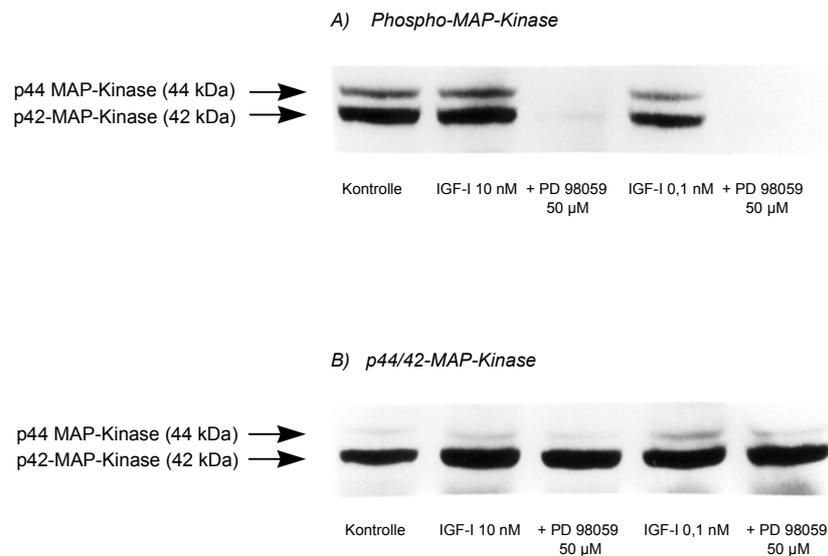


Abbildung 3.8 A u.B MAP-Kinase-Assay: BON-Zellen nach Stimulation mit IGF-I und Hemmung durch PD 98059

In einer zweiten Versuchsreihe zeigt sich, dass diese MAP-Kinase-Aktivität im ERK-Signaltransduktionsweg durch Hemmung des PI3-Kinasewege unbeeinträchtigt bleibt, da nach Hemmung mit LY 294002 keine Aktivitätsreduktion sichtbar wird. Abbildung 3.9 zeigt ein Beispiel dieses Versuches. Die Darstellung ist analog der Abbildung 3.8.

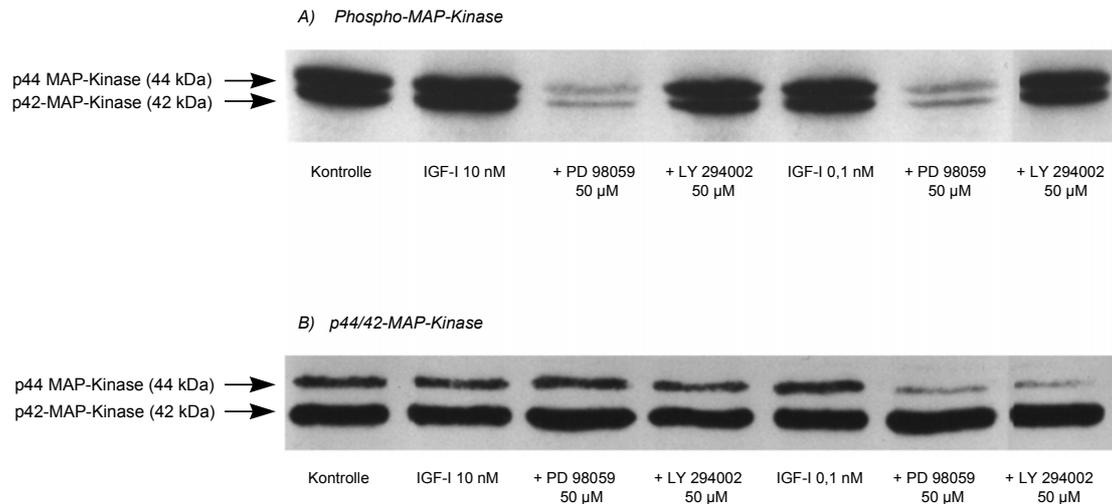


Abbildung 3.9 A u.B MAP-Kinase -Assay: BON-Zellen nach Stimulation mit IGF-I und Hemmung durch PD 98059 sowie LY 294002

### 3.4 Transfektion eines IGF-I-Promotors und Promotoraktivitätsprüfung

Abschließend wurde untersucht, wie sich die verschiedenen Signaltransduktionswege auf die IGF-I-Genexpression auswirken. Hierzu dienten Transfektionsstudien mit dem pIGF-I Luc/-2100 Plasmid, entsprechend der HEPES- gepufferten Calciumphosphat-Methode, wie sie im Kapitel 2.2.6 beschrieben sind.

Die erfolgreiche Transfektion des Promotors mittels dieser Methode zeigt der deutliche Unterschied der gemessenen *relative light units* (RLU) zwischen dem sogenannten Nullwert, also kein vorhandenes Luciferase-Reporter-Gen beziehungsweise keine Luciferaseaktivität, und der RLU der Kontrollgruppe, entsprechend unstimulierten BON-Zellen, in die das Luciferase-Reporter-Gen transfiziert wurde.

Die Stimulation mit IGF-I selbst zeigte keine signifikanten Ergebnisse. In Voruntersuchungen (n=8) wurde kein Einfluß auf die eigene Promotor-Aktivität

beobachtet (siehe Abb. 3.10), während in dem Hauptversuch (n=25) Hinweise einer eigenen Promotoraktivierung gesehen werden konnten.

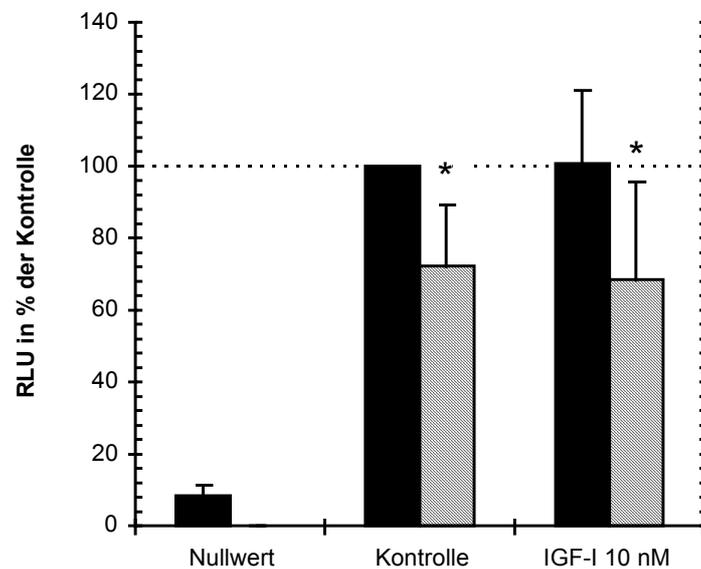


Abbildung 3.10 Voruntersuchungen zur Transfektion des pIGF-I Luc/-2100 Plasmid (n=8)

- Ohne PD 98059 50 µM
- ▨ Mit PD 98059 50 µM
- \* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle

Signifikante Ergebnisse zeigen sich dagegen für die Beeinflussung durch Hemmung der MAP-Kinase durch PD 98059 und der PI3-Kinase durch LY 294002, sowie durch die gleichzeitige Hemmung beider Kinasen mit jeweils einer Hemmstoffkonzentration von 50 µM: Sowohl in der nicht stimulierten Kontrollgruppe als auch in der mit IGF-I in einer Konzentration von 10 nM stimulierten Gruppe ist eine deutliche Abschwächung der Promotoraktivität durch diese Hemmung zu beobachten.

Dabei zeigt sich bei der Hemmung durch PD 98059 ein gleichartiger Effekt in beiden untersuchten Zellgruppen: Kontrolle ohne PD 98059 = 100%, nicht stimulierte Zellen mit PD 98059 66%, damit eine Abschwächung um 34%: IGF-I-stimulierte Zellen ohne PD 98059 118% (nicht signifikant), IGF-I-stimulierte Zellen mit PD 98059 69%, damit eine Abschwächung um 41,5%.

Bei der Hemmung durch LY294002 findet sich dagegen eine wesentlich stärkere Abschwächung der Promotoraktivität in der durch IGF-I stimulierten

Gruppe: Kontrolle ohne LY 294002 = 100%, nicht stimulierte Zellen mit LY 294002 83%, damit Abschwächung 17%; IGF-I-stimulierte Zellen ohne LY294002 118% (nicht signifikant), IGF-I-stimulierte Zellen mit LY 294002 65%, damit 44,9% Abschwächung.

Beide Hemmstoffe zusammen eingesetzt zeigen eine deutliche additive hemmende Wirkung auf die Promotoraktivität in der Gruppe der nicht mit IGF-I stimulierten Zellen, während sich der ergänzende Effekt in der stimulierten Zellgruppe geringer darstellt: Kontrolle ohne Hemmstoffe = 100%, nicht stimulierte Zellen mit PD 98059 und LY 294002 53%, damit eine Abschwächung um 47%: IGF-I-stimulierte Zellen Hemmstoffe 118% (nicht signifikant), IGF-I-stimulierte Zellen mit PD 98059 und LY 294002 62%, damit eine Abschwächung um 47,5%.

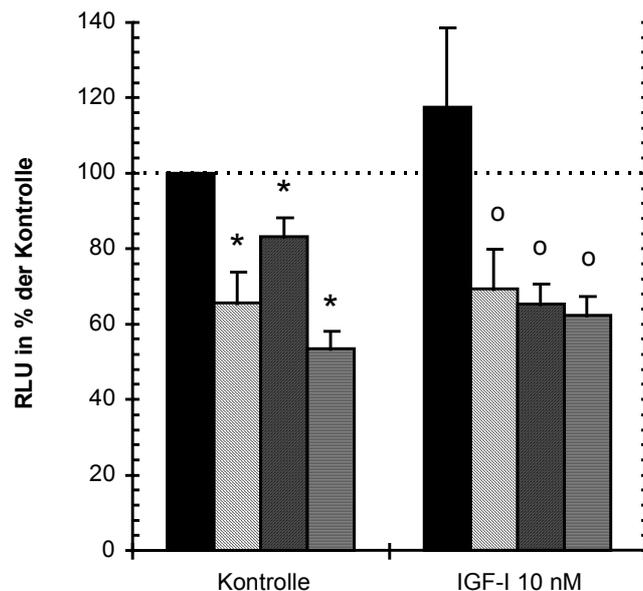


Abbildung 3.11 Promotoraktivität nach Transfektion des pIGF-I Luc/-2100 Plasmid in BON-Zellen nach Stimulation der Zellen mit IGF-I sowie nach Hemmung durch PD 98059, LY 294002 und der Kombination beider Hemmstoffe (n=25)

- Ohne Hemmstoffe
- ▨ Mit PD 98059 50 µM
- Mit LY 294002 50µM
- ▨ PD 98059 +LY 294002 jeweils 50 µM
- \* = T-Test:  $p < 0,05$  versus Kontrolle
- ° = T-Test:  $p < 0,05$  versus stimulierte Zellen

## 4. Diskussion

Bis heute gibt es, mit Ausnahme der chirurgischen Intervention, keine effektiven kurativen Strategien zur Behandlung neuroendokriner Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems beim Menschen. Die medikamentösen Therapieansätze haben mit der Einführung von Somatostatinanaloga zwar vielversprechende Ergebnisse gezeigt, beschränken sich jedoch größtenteils auf die symptomatische Behandlung oder sind noch unzureichend wirksam [Eriksson und Öberg, 1999, Caplin et al., 1998, und Kulke et al., 1999]. Für die weitere Entwicklung kurativer Therapien muß das biologische Verhalten derartiger Tumoren weiter aufgeklärt werden, insbesondere bezüglich des Wachstumsvermögens sowie der Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [Öberg, 1999].

Unlängst ist durch Untersuchungen einer Vielzahl renommierter Laboratorien bekannt, dass das IGF-I-System - insbesondere der IGF-I-Rezeptor und IGF-I selbst - entscheidende Rollen in der Entwicklung und Erhaltung verschiedener Tumorarten spielen. Die Aufklärung regulatorischer Elemente dieses Systems gilt als wichtiger Schritt in der Entwicklung neuer Therapieansätze gegen die Tumorentstehung allgemein [u.a. Werner und Le Roith 1997 und Sepp-Lorenzino 1998].

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung und Wirkungsweise von IGF-I auf das proliferative Wachstum von Karzinoidzellen zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurden BON-Zellen - kultivierte Zellen eines humanen Karzinoidtumors (siehe dazu auch Kapitel 2.2.1) - gewählt. Diese Zellreihe hat sich bereits in der Forschung bewährt und gilt als ein „Modell-System für die Erforschung von Karzinoid-Tumoren“ [Evers et al., 1994]. Seit der Etablierung 1986 durch Townsend Jr. und Mitarbeitern befinden sich die Zellen in permanenter Kultivierung.

In einem ersten Schritt der Arbeit wurde die Präsenz des IGF-I-Rezeptor bei BON-Zellen durch Rezeptor-Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem IGF-I nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1). Passend zu diesem Ergebnis konnte durch Wulbrand und Mitarbeiter die mRNA dieses Rezeptors bei der überwiegenden

Zahl neuroendokrin aktiver Tumoren, insbesondere bei Karzinoiden, nachgewiesen werden [Wulbrand et al., 1998 und 2000].

Der IGF-I-Rezeptor ist dabei nicht nur für das „normale“ Wachstum und die Differenzierung von Zellen notwendig [O'Connor et al., 2000]; es konnte zudem gezeigt werden, dass Zellen ohne den IGF-I-Rezeptor auch nicht durch bedeutende Onkogene transformiert werden und somit keinen malignen Phenotyp ausprägen können [Werner und Le Roith 1997]. Die beiden Wirkungen, nicht-mitogen und mitogen, wurden bereits zu Beginn der intensiveren Forschungsbemühungen um den IGF-I-Rezeptor von Baserga als „Doppelleben“ des IGF-I-Rezeptors beschrieben [Baserga, 1992]. Dabei zeigt sich die Wichtigkeit des IGF-I-Rezeptors in seiner mitogenen Wirkung nicht allein für IGF-I selbst, sondern auch für andere Wachstumsfaktoren, zum Beispiel für EGF und PDGF sowie ihre Rezeptoren [Coppola et al, 1994, und Baserga, 1992].

Die Sekretion von IGF-I durch die BON-Zellen selbst konnte durch Radioimmunoassays quantitativ nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2). Die dazugehörige IGF-I-messenger-RNA wurde ebenfalls von Wulbrand und Mitarbeitern mittels RT-PCR bei der deutlichen Mehrzahl funktionell aktiver neuroendokriner Tumoren aufgezeigt [Wulbrand et al., 2000]. Die Wirkung von IGF-I über autokrine und parakrine Stimulation ist heute allgemein bekannt [Le Roith et al., 1995, und Daughaday, 1990]. In BON-Zellen wurden diese Wirkmechanismen bereits für weitere wichtige Hormone nachgewiesen, unter anderem auch für FGF [Beauchamp et al., 1991].

In den Wachstumsversuchen konnte eine konzentrationsabhängig signifikante Steigerung des proliferativen Wachstums durch IGF-I nachgewiesen werden, die im direkten Vergleich zu den untersuchten Wachstumsfaktoren FGF, EGF und PDGF den stärksten Effekt zeigt - wobei bei EGF und PDGF keine Wachstumsförderung nach Stimulation in den verschiedenen Konzentrationstufen beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 3.3.1).

Townsend und Mitarbeiter, die die BON-Zelllinie etablierten, haben in ihren Wachstumstudien mit FGF und EGF entsprechende Ergebnisse durch direkte Zellzählung mittels Coulter-Counter erzielt [Townsend et al., 1993].

Nach Bindung an seinen Rezeptor kann IGF-I die Enzyme einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege aktivieren [Adams et al., 2000]. Als zwei bedeutende Signalkaskaden gelten dabei der ERK-Signaltransduktionsweg (das bisher bekannteste und am besten untersuchte Mitglied der MAP-Kinase-Familie) und die Signalübermittlung über PI3-Kinasen [Liebmann, 2001, Toker, 2000, Baserga, 1999, und Marshall, 1999].

Durch Versuche mit spezifischen Hemmstoffen dieser beiden Signalwege wurde deren Einfluß auf das basale, also unstimulierte, und das mit IGF-I stimulierte Wachstum der BON-Zellen untersucht (siehe Kapitel 3.3.2).

Die Signaltransduktion über ERK1 und 2 führt zu zellproliferativen und zelldifferenzierenden Effekten [Marshall, 1999, und Liebmann, 2001]. Frühe Arbeiten von Stacey und Mitarbeiter haben gezeigt, dass das Enzym *ras* in dieser Signalkaskade wichtig für den Zellproliferationseffekt aller untersuchten Wachstumsfaktoren und für die Induktion der Transformation aller untersuchten Tyrosinkinase-Onkogene ist [Mulcahy et al., 1985, und Smith et al., 1986]. Die *ras-raf-ERK*-Kaskade gilt daher als ein Ansatzpunkt zur Hemmung der Zellproliferation [Marshall, 1995].

Mit dem spezifischen MAP-Kinase-Inhibitor PD 98059 konnte eine identische, signifikante und mit jeweils -36 % deutliche Hemmwirkung sowohl auf das basale, als auch auf das mit IGF-I stimulierte Wachstum der BON-Zellen gezeigt werden. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg auch eine wesentliche Bedeutung für das Wachstum der BON-Zellen besitzt, zum anderen zeigt das Ausmaß der Hemmwirkung jedoch auch, dass es weitere, entscheidende Signalkaskaden für die Zellproliferation in diesen Zellen geben muß.

Deshalb wurde mit dem Einsatz des spezifischen PI3-Kinase-Inhibitors LY 294002 ein weiterer, bekanntermaßen wichtiger Signaltransduktionsweg untersucht [Toker, 2000, und Vlahos et al., 1994]. Die Signalvermittlung über PI3-Kinasen nimmt unter anderem ebenfalls Einfluß auf das Zellwachstum [Duronio et al., 1998].

Im Vergleich zur Hemmung mit PD 98059 zeigt sich beim Einsatz des PI3-Kinase-Inhibitors eine mit -50 % noch deutlichere aber ebenso identische und

signifikante Hemmwirkung auf das basale und mit IGF-I stimulierte Zellwachstum.

Beide Hemmstoffe zusammen eingesetzt zeigen einen leicht additiven Effekt der Wachstumsreduktion, ebenfalls sowohl auf das basale als auch auf das stimulierte Wachstum der BON-Zellen. Dieser additive Effekt ist dabei jedoch nicht absolut: Nach Kombination beider Hemmstoffe zeigt sich eine fast identische Reduktion des basalen (-56,5 %) und des mit IGF-I stimulierten Wachstums (-58 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden untersuchten Signaltransduktionswege von wesentlicher Bedeutung für die Signalvermittlung innerhalb der BON-Zellen sind. Die sich nicht absolut ergänzende Wirkung bei gleichzeitigem Einsatz beider Hemmstoffe kann als ein Indiz für mögliche Verknüpfungen auf den verschiedenen Ebenen innerhalb der beiden Signalwege angesehen werden.

Derartige Verbindungen verschiedener Signaltransduktionswege sind heute bereits bekannt. Auch wenn linear verlaufende Signalvermittlungen in der Regulation biologischer Vorgänge von bedeutender Art zu sein scheinen, verknüpfen sich viele verschiedene Signalkaskaden zu sogenannten Netzwerken, die zu einer Modulierung der verschiedenen Signale führen können [Bhalla und Iyengar, 2001]. Diese Netzwerke sind dabei sehr komplex, da es vielfache, von Zelle zu Zelle und von Stimulus zu Stimulus unterschiedliche, Verknüpfungsmöglichkeiten und Auswirkungen gibt beziehungsweise geben kann. Dieses Phänomen führt dazu, dass heute teilweise widersprüchliche Ergebnisse in der Erforschung von Signaltransduktionswegen zu finden sind, abhängig davon welche Zellart mit welchen Stimuli oder Inhibitoren untersucht wurde [Wennström und Downward, 1999].

Mit Hilfe des MAP-Kinase-Assay (siehe Kapitel 3.3) konnte zum einen die bekannte und spezifische Hemmwirkung von PD 98059 auf die MAP-Kinase-Kinase 1 und 2 (MEK 1 und 2) durch Darstellung der durch dieses Enzym aktivierten MAP-Kinase sichtbar gemacht werden, darüber hinaus lassen sich aber noch weitere interessante Schlüsse ziehen.

So zeigt sich trotz der langen „Ausnüchterungsphase“ der BON-Zellen von 5 Tagen eine im Vergleich zur IGF-I stimulierten Probe zwar geringere, aber

dennoch deutliche MAP-Kinase-Aktivität. Diese spricht für einen möglichen, bereits beschriebenen auto- beziehungsweise parakrinen Wirkungsmechanismus.

Die Tatsache, dass es unter Einwirkung von PD 98059 zu keiner 100 %-igen Unterdrückung der MAP-Kinase-Aktivität kommt, kann auf Kreuzreaktionen mit den MAP-Kinase-Familienmitgliedern JNK/SAPK und p38 MAP-Kinase hindeuten, für die eine stressbedingte Aktivierung beschrieben ist [Robinson und Cobb, 1997].

Durch den Einsatz von LY 294002 kommt es zu keiner Verminderung der MAP-Kinase-Aktivität. Damit zeigt sich, dass bei der anzunehmenden Verknüpfung beider Signalkaskaden kein direkter Einfluß der PI3-Kinase auf die MAP-Kinase besteht. Die Netzwerkverbindung muß also auf einer anderen Ebene innerhalb der Kaskaden liegen.

In einer abschließenden Untersuchung konnte durch transiente Transfektion eines IGF-I-Promotors gezeigt werden, wie sich die Stimulation mit IGF-I und wie sich die Beeinflussung der beiden bisher untersuchten Signaltransduktionswege auf die Promotoraktivität auswirken (siehe Kapitel 3.4).

Während IGF-I keinen signifikanten Einfluß zu nehmen scheint, zeigen die Versuche mit den beiden Hemmstoffen deutliche und signifikante Minderungen der Promotoraktivität. Dabei ist interessant, dass bei der selektiven Hemmung der PI3-Kinase der hemmende Effekt in der mit IGF-I stimulierten Zellgruppe wesentlich deutlicher ausfällt. Ähnlich den Ergebnissen der Wachstumshemmung mit beiden Inhibitoren zeigt sich ein leicht additiver Effekt auch bei der Beeinflussung der Promotoraktivität durch den gemeinsamen Einsatz beider Stoffe.

Diese Daten sprechen dafür, dass sowohl der MAP- als auch der PI3-Kinaseweg nicht nur von großer Bedeutung für das IGF-I vermittelte Zellwachstum an sich, sondern auch für die Unterstützung der autokrinen IGF-I-Produktion sind.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefaßt lassen interessante Schlüsse zu, die im Einklang mit bisherigen Untersuchungsergebnissen der IGF-I-Forschung stehen.

Insbesondere werden die hier vorgestellten Ergebnisse und Erkenntnisse mit denen einer nach Beginn der Arbeit und Abschluß der Datenerhebung dieser Dissertationsschrift veröffentlichten, unabhängigen Arbeit von von Wichert et al. bestätigt [von Wichert et al., 2000].

In dieser umfassenden Arbeit wird die autokrine Wirkungsweise von IGF-I in BON-Zellen in verschiedenen Ansatzweisen untersucht und schließlich belegt. Dies geschieht vor allem durch die schwerpunktmäßige Untersuchung der Wirkung von endogen sezerniertem IGF-I, im Gegensatz zu der vorliegenden Dissertation, in der ausschließlich die Wirkung von exogen zugesetztem IGF-I untersucht wurde.

Auch wenn beide Arbeiten im Ansatz und in Versuchsteilen Parallelen aufweisen, unterscheiden sie sich doch in wesentlichen Punkten eindeutig in ihrem methodischen Vorgehen.

In beiden Arbeiten konnte zunächst mittels IGF-I-Bindungsstudien der funktionelle IGF-I-Rezeptor ( $EC_{50}$  bei von Wichert et al. 0,72 nM –  $EC_{50}$  in der vorliegenden Arbeit 2,5 nM, dabei sind u.a. unterschiedliche Inkubations- und Kultivierungszeiten zu berücksichtigen) sowie im Radioimmunoassay die eigenständige IGF-I-Sekretion (max. 15 ng IGF-I/ml nach 7 Tagen, ohne Zellzahlangabe – 20 ng IGF-I/ml nach 24 Stunden bei  $3 \times 10^6$  BON-Zellen) nachgewiesen werden. Die IGF-I-Sekretion konnte in Versuchen von von Wichert et al. durch einen spezifischen Inhibitor der PI3-Kinase (LY 294002) vollständig gehemmt werden. Damit muß diese Kinase maßgeblich an der Regulation der autokrinen Wirkmechanismen beteiligt sein.

In der Arbeit von von Wichert et al. wurde darüber hinaus im Westernblot durch einen spezifischen Anti-IGF-I-Antikörper gegen die  $\beta$ -Kette des IGF-I-Rezeptors dieser dargestellt. Somit zeigen sich in beiden Arbeiten die Grundvoraussetzungen einer autokrinen Wirkung von Wachstumsfaktoren.

Mit Hilfe entsprechender Immunkomplex-Kinase-Assays wiesen von Wichert et al. die direkte Aktivierung von PI3-Kinase, p70<sup>S6k</sup> und ERK2, sowie deren

Hemmung durch Einsatz der jeweiligen spezifischen Inhibitoren nach (im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit bei von Wichert et al.: 20  $\mu\text{M}$  LY 294002 zur Hemmung der PI3-Kinase, Rapamycin 20 ng/ml zur Hemmung von  $\text{p70}^{\text{S6k}}$ , 20  $\mu\text{M}$  PD 98059 zur Hemmung von ERK2; jeweils 40-minütige Inkubation, Stimulation mit 100 ng/ml IGF-I über 15 Minuten). Durch diese Versuchsreihe wird das Ergebnis des MAP-Kinase-Assays dieser Dissertationsschrift (siehe oben und Kapitel 2.2.5 sowie 3.3) hinsichtlich der Aktivierung durch exogen zugesetztem IGF-I bestätigt. Darüber hinaus wurde zudem eine Hemmung der „basalen“ MAP-Kinase-Aktivität durch PD 98059 um 40% beobachtet.

Unterschiedliche Ergebnisse zeigen sich jedoch in den Befunden über den Einfluss von LY 294002 auf die MAP-Kinase-Aktivität: Wurde in der vorliegenden Arbeit keine Hemmungswirkung von LY 294002 auf die durch IGF-I stimulierte MAP-Kinaseaktivität gefunden (Vergleiche Kapitel 3.3 und Abbildung 3.9 A und B), findet sich eine solche in der Publikation von von Wichert et al. sowohl auf die basale als auch auf die stimulierte MAP-Kinase-Aktivität, wenn auch in deutlich geringerem Umfang als durch PD 98059. Daraus wird geschlußfolgert, dass für eine ERK-Aktivierung durch IGF-I die Aktivierung von MEK-1 und PI3-Kinase erforderlich sind. Somit scheint die in dieser Promotionsschrift diskutierte Verknüpfung verschiedener Signaltransduktionswege doch bereits auf dieser Kaskadenebene möglich zu sein.

Die im Rahmen des MAP-Kinase-Assays oben beschriebene deutliche basale Aktivität dieser Kinase trotz langer „Ausnüchterungsphase“ zeigt sich auch in der Publikation von von Wichert et al.. Sie veranlaßte die Autoren zu der Untersuchung in wie weit diese ERK2-Aktivierung (sowie die von  $\text{p70}^{\text{S6k}}$ ) dem endogen freigesetzten IGF-I zuzuschreiben ist. Dazu wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit einem neutralisierenden, direkt gegen IGF-I gerichteten Antikörper inkubiert und anschließend die ERK2-Aktivität gemessen. Nach 24 Stunden zeigte sich eine ERK2-Aktivitätsminderung von bis zu 50% im Immunkomplex-Kinase-Assay, was beweisend zu sein scheint für die autokrine Aktivierung dieser Kinase. In einem weiteren Versuchsansatz

konnte durch Anti-IGF-I auch das proliferative Wachstum um 50% reduziert werden.

Von Wichert et al. untersuchten ebenfalls in einer kleinen Stichprobe (jeweils zwei unabhängige Versuche, in denen der Mittelwert aus 2 Messungen gebildet wurde) die Wirkung von exogenem IGF-I auf das proliferative Wachstum von BON-Zellen. Diese Untersuchungen wurden getrennt sowohl für ein kontaktbezogenes Wachstum als auch für ein kolonienbildendes, kontakt-unabhängiges Wachstum in Agarose-Medium durchgeführt.

In der Publikation dargestellt werden die Ergebnisse nach Stimulation mit 100 ng/ml IGF-I [ca. 13 nM] mit oder ohne Hemmung durch Rapamycin, PD 98059 oder LY 294002 (jeweils einzeln mit 20 ng/ml eingesetzt) im Vergleich zu einer gleichen Gruppe ohne IGF-I-Stimulation. Im Gegensatz zu der Auswertung der Wachstumsversuche dieser Dissertation mittels des nicht-radioaktiven Zellproliferationskit EZ4U (vergleiche Kapitel 2.2.4), wurde bei von Wichert et al. das kontaktbezogene proliferative Wachstum durch Zählung in einer Zell-Zählkammer bestimmt. Die Zählungen erfolgten 2 bis 7 Tage nach Inkubation. Es konnte eine maximale IGF-I-Stimulation um das 1,6-fache nach 7 Tagen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe gezeigt werden. PD 98059 hemmte das basale Wachstum um 70%, das durch IGF-I stimulierte Wachstum um 65%. Bei LY 294002 zeigte sich mit 80% in der unstimulierten Gruppe bzw. 75% in der stimulierten Zellgruppe eine etwas ausgeprägtere Hemmwirkung auf das kontaktbezogene Wachstum.

Auch wenn die Daten durch den methodischen Unterschied und die unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Substrate nicht direkt miteinander vergleichbar sind, so weisen beide Arbeiten in die gleiche Richtung: In beiden Arbeiten konnte eine konzentrationsabhängige Stimulation durch IGF-I auf das proliferative Wachstum von BON-Zellen nachgewiesen werden und durch Einsatz der spezifischen Inhibitoren der MAP- und PI3-Kinase konnte sowohl das basale (also autokrine) als auch das stimulierte Wachstum deutlich – wenn auch nicht zu 100% – gehemmt werden, was die Bedeutung dieser beiden Kinasen in der Signaltransduktion nach exogener IGF-I-Stimulation belegt.

Insgesamt ergänzen sich die beiden voneinander unabhängigen Arbeiten somit sehr gut und eignen sich, die gewonnenen Erkenntnisse zu validieren.

Der Nachweis eines funktionellen IGF-I-Rezeptors und der eigenständigen Produktion von IGF-I sowie der gezeigte wachstumsfördernde Effekt durch IGF-I sprechen dafür, dass dieses Peptid auch in BON-Zellen (als Beispiel für eine humanen Karzinoidzelllinie) von großer Bedeutung ist, zumal ein autokriner Wirkmechanismus belegt werden konnte [von Wichert et al., 2000]. Mit dem MAP- und dem PI3-Kinase-Signaltransduktionsweg konnten zwei für die Signalvermittlung entscheidende Kaskaden innerhalb der BON-Zellen nachgewiesen werden. Diese Bedeutung konnte explizit für das proliferative Wachstum, aber auch für die IGF-I-Expression gezeigt werden.

Um das IGF-I-vermittelte Wachstum also zu unterbinden erscheinen mehrere Ansatzpunkte möglich: (1.) Auf der Ebene des Rezeptors durch Antagonisierung des IGF-I-Rezeptors, (2.) auf Cytoplasmaebene durch Unterbrechung der Signaltransduktionswege beziehungsweise Antagonisierung des autokrin sezernierten IGF-I oder (3.) auf Genebene durch Störung der IGF-I-Expression selbst.

## 5. Zusammenfassung

Karzinoide sind neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems. Bis heute gibt es mit Ausnahme eines chirurgischen Eingriffes keine adäquate kurative Therapiemöglichkeit.

Die Expression des IGF-I-Rezeptors und von IGF-I konnte bei dieser Tumorart bereits nachgewiesen werden. Diese beiden Teile des IGF-Systems sind von besonderer Bedeutung für das Entstehen und das Erhalten verschiedener Tumorarten und gelten heute als sehr interessanter Ansatzpunkt für die Erforschung neuer Therapiestrategien.

Ziel dieser Arbeit war es, am Beispiel der humanen Karzinoid-Zelllinie BON, das proliferative Wachstum dieser Tumorart unter dem Einfluß von IGF-I zu untersuchen und mögliche, für die Signalvermittlung verantwortliche Transduktionswege zu entschlüsseln.

In einem ersten Schritt konnte durch Rezeptor-Bindungsstudien gezeigt werden, dass BON-Zellen einen funktionstüchtigen IGF-I-Rezeptor tragen. Im Radioimmunoassay wurde zudem die IGF-I-Synthese quantitativ nachgewiesen.

Die Stimulation der Zellen mit IGF-I bewirkt eine deutliche und signifikante Steigerung des proliferativen Zellwachstums. In Versuchen mit den Hemmstoffen PD 98059 als spezifischer Inhibitor der MAP-Kinasen ERK1 und 2 sowie mit LY 294002 als selektiven PI-3Kinase-Inhibitor konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Signalkaskaden dieser beiden Kinasefamilien für die Signaltransduktion nach Bindung von IGF-I an seinen Rezeptor von wesentlicher Bedeutung sind. Aus diesen Hemmungsversuchen ergeben sich zudem Hinweise für eine mögliche Verknüpfung beider Transduktionswege.

Im MAP-Kinase-Assay wurden die Einflüsse auf die MAP-Kinase visualisiert.

Abschließend wurde durch Transfektionsstudien mit einem IGF-I-Promotor die Bedeutungen beider Signaltransduktionswege auch auf die IGF-I-Produktion der BON-Zellen nachgewiesen. Zusammen mit dem beschriebenen quantitativen Nachweis von IGF-I ergeben sich damit deutliche Hinweise für

einen auto- beziehungsweise parakrinen Wirkungsmechanismus dieses Peptides bei BON-Zellen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung und Wirkungsweise von IGF-I auf das proliferative Wachstum von BON-Zellen stellen einen - wenn auch kleinen - Baustein in der Erkenntnisgewinnung des Wachstum neuroendokriner Tumorzellen dar.

In einer nach Beginn dieser Dissertation veröffentlichten Publikation von von Wichert et al. [von Wichert et al., 2000] über die autokrine Wirkung von IGF-I am Beispiel der BON-Zellen wurden auf methodisch unterschiedliche Art und Weise die Kernaussagen der vorliegenden Arbeit bestätigt. Beide von einander unabhängigen Arbeiten ergänzen sich sehr gut und eignen sich, ihre gewonnenen Erkenntnisse zu validieren.

Es gilt sicherlich diese Erkenntnisse an weiteren vorhandenen Zellmodellen humaner Karzinoidtumoren (z.B. LCC- oder KRJ-Zellen) zu prüfen oder neue Aspekte aus Versuchen mit diesen Modellen zu sammeln, um Stück für Stück das Rätsel dieser Tumoren zu entschlüsseln und wirkungsvolle Ansätze für eine wünschenswerte medikamentös-kurative Therapieoption zu gewinnen.

## Literaturverzeichnis

**Adams** TE, Epa VC, Garrett TPJ, Wars CW

Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor

Cellular and Molecular Life Science 57: 1050-1093, 2000

**Alessi** DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR

PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo

Journal of Biological Chemistry 270 (46): 27489-27494, 1995

**Arnold** R

Das Carcinoid - Eine in Frage gestellte Entität?

Chirurg 68: 132-135, 1997

**Arnold** R

Medical treatment of metastasizing carcinoid tumors

World Journal of Surgery 20: 203-207, 1996

**Arnold** R, Frank M

Control of growth in neuroendocrine gastro-enteropancreatic tumors

Digestion 57(suppl 1): 69-71, 1996

**Baserga** R

The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?

Cancer Research 55: 249-252, 1995

**Baserga** R

The Double Life of the IGF-I Receptor

Receptor 2 (4): 261-266, 1992

**Baserga** R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B

The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis

Biochemica et Biophysica Acta 1332: F105-F126, 1997

**Beauchamp** RD, Coffey RJ Jr, Lyons RM, Perkett EA, Townsend CM Jr, Moses HL

Human Carcinoid Cell Production of Paracrine Growth Factors That Can Stimulate Fibroblast and Endothelial Cell Growth

Cancer Research 51: 5253-5260, 1991

**Bhalla** US, Iyengar R

Functional modules in biological signalling networks

Novartis Foundation Symposium 239: 4-13, 2001

**Blume-Jensen** P, Hunter T

Oncogenic kinase signalling

Nature 411: 355-365, 2001

**Capella** C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G

Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut

Digestion 55 (suppl 3): 11-23, 1994

**Caplin** ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK

Carcinoid tumour

Lancet 352: 799-805, 1998

**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

Molecular And Cellular Biology 14(7): 4588-4595, 1994

**Creutzfeldt** W

Carcinoid tumors: development of our knowledge

World Journal of Surgery 20: 126-131, 1996

**Daughaday** W

Editorial: The Possible Autocrine/Paracrine and Endocrine Roles of Insulin-Like Growth Factors of Human Tumors

Endocrinology 127 (1): 1-4, 1990

**Dudley** DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein cascade

Proceedings of the National Academy of Science 92:7686-7689, 1995

**Duronio** V, Scheid MP, Ettinger S

Downstream Signalling Events Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity

Cell Signal 10 (4): 233-239, 1998

**ECL** Western blotting protocols

Amersham Life Science, 1995

**Eriksson** B, Öberg K

Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: Future outlook

Annals of Oncology 10 (Suppl. 2): S31-S38, 1999

**Evers** BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC

The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors

Annals of the New York Academy of Sciences 733: 393-406, 1994

**Evers** BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr., Rajaraman S, Thompson JC

Expression of Neurotensin Messenger RNA in a Human Carcinoid Tumor

Annals of Surgery 214 (4): 448-455, 1991

**Froesch** ER, Hussain MA, Schmid C, Zapf J

Insulin-like growth factor I: physiology, metabolic effects and clinical uses

Diabetes/Metabolism Reviews 12(3): 195-215, 1996

**Fukui** Y, Ihara S, Nagata S

Downstream of Phosphatidylinositol-3 Kinase, a Multifunctional Signaling Molecule, and Its Regulation in Cell Respons

Journal of Biochemistry 124: 1-7, 1998

**Höfler H**, Stier A, Schusdziarra V, Siewert JR

Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas und ihre therapeutische Relevanz

Chirurg 68: 107-115, 1997

**Kingston RE**, Chen CA, Okayama H, Rose JK

Transfection of DNA into eukaryotic cells [Chapter 9: Introduction of DNA into mammalian cells]

*aus*

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K

Current Protocols in Molecular Biology

John Wiley & Sons, 1996

**Klöpffel G**, Heitz PU, Capella C, Solcia E

Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions

World Journal of Surgery, 20: 132-141, 1996

**Koop H**, Keller R

Spezielle Pathobiochemie und klinisch-chemische Diagnostik [Kap. Gastrointestinalsystem]

*aus*

Greiling H, Gressner AM (Hrsg.)

Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie

Schattauer Verlag, 3.Aufl.: 688-698, 1995

**Kulke MH**, Mayer RJ

Carcinoid tumors

The New England Journal of Medicine 340 (11): 858ff, 1999

**Le Roith D**, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr

Insulin-like Growth Factors and Cancer

Annals of Internal Medicine 122: 54-59, 1995

**LeRoith D**, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr

Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor

Endocrine Reviews 16(2): 143-163, 1995

**Liebmann C**

Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway -

Paradigms of multiplicity

Cellular Signalling 13: 777-785, 2001

**Mann K**

Tumoren des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas

*aus*

Huhn D, Wilms K (Hrsg.)

Internistische Onkologie

Thieme Verlag: 584-599, 1994

**Mao C**, el Attar A, Domenico DR, Kim K, Howard JM

Carcinoid tumors of the pancreas. Status report based on two cases and review of the world's literature

International Journal of Pancreatology 23(2): 153-164, 1998

**Marshall CJ**

How do the small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry?

Current Opinion in Cell Biology 11: 732-736, 1999

**Marshall CJ**

Opportunities for pharmacological intervention in the ras pathway

Annals of Oncology 6 (Supplement 1): 63-67, 1995

**Modlin IM**, Sandor A

An Analysis of 8305 Cases of Carcinoid Tumors

Cancer 79(4): 813-829, 1997

**Mosmann T**

Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Applikation to Proliferation and Cytotoxicity Assays

Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983

**Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW**

Requirement for ras proto-oncogen function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells

Nature 313: 241-243, 1985

**Neary PC, Redmond PH, Houghton T, Watson GRK, Bouchier-Hayes D**

Carcinoid Disease

Diseases of Colon and Rectum 40(3): 349-362, 1997

**O'Connor R, Fennelly C, Krause D**

Regulation of survival signals from the insulin-like growth factor-I receptor

Biochemical Society Transactions 28(2): 47-51, 2000

**Öberg K**

Neuroendocrine gastrointestinal tumors - a condensend overview of diagnosis and treatment

Annals of Oncology 10 (Suppl. 2): S3-S8, 1999

**Parekh D, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Haber B, Beauchamp RD, Karp G, Kim SW, Rajaraman S, Greeley G Jr, Thompson JC**

Charakerization of a human pancreatic carcinoid in vito: morphology, amine and peptide storage, and secretion

Pancreas 9(1): 83-90, 1994

**Qiagen Plasmid Handbook**

Qiagen GmbH und Qiagen Inc., 1995

**Robinson MJ, Cobb MC**

Mitogen-activated protein kinase pathways

Current opinion in Cell Biology 9: 180-186, 1997

**Rubin R, Baserga R**

Biology of disease. Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity

Laboratory Investigation 73(3): 311-331, 1995

**Schmoll HJ (a), Dralle H, Arnold R, Schmoll E**

Endokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP)

*aus*

Schmoll HJ, Höffken K, Possinger, Schöffski P

Kompendium Internistische Onkologie - Teil 2

Springer Verlag, 2. Aufl.: 836-861, 1997

**Schmoll HJ (b), Schmoll E, Dralle H, Arnold R**

Karzinoide

*aus*

Schmoll HJ, Höffken K, Possinger, Schöffski P

Kompendium Internistische Onkologie - Teil 2

Springer Verlag, 2 Aufl.: 862-885, 1997

**Scrimgeour AG, Blakesley VA, Stannard BS, Le Roith D**

Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways Are Not Sufficient for Insulin-Like Growth-Factor I-Induced Mitogenesis and Tumorigenesis

Endocrinology 138: 2552-2558, 1998

**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

Molecular and Cellular Biology 14(6): 3604-3612, 1994

**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-I IGF receptor

Proceedings of the National Academy of Science 90: 11217-11221, 1993

**Sepp-Lorenzino L**

Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor  
Breast Cancer Research and Treatment 47: 235-253, 1998

**Smith MR, DeGudicibus SJ, Stacey DW**

Requirement for c-ras proteins during viral oncogenes transformation  
Nature 320: 540-543, 1986

**Stewart CEH, Rotwein P**

Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors  
Physiological Reviews 76(4): 1005-1026, 1996

**Toker A**

Protein Kinases as Mediators of Phosphoinositide 3-Kinase Signaling  
Molecular Pharmacology, 57: 652-658, 2000

**Townsend CM Jr, Ishizuka J, Thompson JC**

Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line  
Acta Oncologica 32(2): 125-130, 1993

**Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF**

A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY 294002)  
Journal of Biological Chemistry 269(7): 5241-5248, 1994

**von Wichert G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedemann 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 Research 60(16): 4573-4581, 2000

**Wennström S, Downward J**

Role of Phosphoinositide 3-Kinase in Activation of Ras and Mitogen-Activated Protein Kinase by Epidermal Growth Factor  
Molecular and Cellular Biology 19(6): 4279-4288, 1999

**Werner H, Le Roith D**

The Insulin-Like Growth Factor-I Receptor - Signaling Pathways Are Important for Tumorigenesis and Inhibition of Apoptosis

Critical Reviews in Oncogenesis 8(1): 71-92, 1997

**Wulbrand U, Remmert G, Zofel P, Wied M, Arnold R, Fehmann HC**

mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours

European Journal of Clinical Investigation 30 (8): 729-739, 2000

**Wulbrand U, Wied M, Zofel P, Göke B, Arnold R, Fehmann H**

Growth factor receptor expression in human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours

European Journal of Clinical Investigation 28 (12): 1038-1049, 1998

**Zapf J**

Physiological role of the insulin-like growth factor binding proteins

European Journal of Endocrinology 132: 645-654, 1995

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Zu meinen akademischen Lehrern gehörten folgende Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg und des Klinikums Fulda, Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg:

Arnold	Geus	Klose
Aumüller	Göke	Koolmann
Barth	Görg	Koop
Basler	Gotzen	Krause
Baum	Gressner	Kretschmer
Beato	Griss	Kroll
Behr	Gröne	Kummer
Berger	Grün	Lang
Bien	Grzeschik	Langohr
Bohner	Haas	Lauer
Bonzel	Habermehl	Legrum
Czernik	Happle	Lennartz
Daut	Havemann	Lorenz
Dölp	Hertel	Maisch
Doss	Hilgermann	Manke
Draf	Höffkes	Martin
Effendy	Höfken	Mennel
Engel	Hoffmann	Moll
Eschenbach	Hofmann	Moosdorf
Fassbinder	Jaspersen	Müller
Fehmann	Joseph	Mutters
Feldmann	Kalbfleisch	Oertel
Feuser	Kälble	Perst
Fruhstorfer	Kern	Peters
Fuhrmann	Kienapfel	Pfab
Ganz	Kleine	Podszus
Gemsa	Klenk	Pohlen

Radsak	Schüffel	Sturm
Rehder	Schulz	Thomas
Remschmidt	Schwarz	Töllner
Richter	Seifart	Vohland
Rogausch	Seitz	Voigt
Röhm	Seyberth	von Wichert
Rothmund	Slenczka	Wallenfang
Rumpf	Spätling	Werner
Schachtschabel	Stegmann	Westermann
Schäfer	Steininger	Westphal
Schmitz-Moormann	Steinmetz	

Für meine Ausbildung möchte ich mich bei Ihnen herzlich bedanken.

## Danksagung

„Es scheint paradox, daß wissenschaftliche Forschung - die menschliche Betätigung, die am meisten in Frage stellt und am skeptischsten ist - von persönlichem Vertrauen abhängen soll. Doch Tatsache ist: ohne Vertrauen kann das Unternehmen Forschung nicht funktionieren.“

Arnold S. Relman,  
Herausgeber des 'New England Journal of Medicine', 1983

Aus: Carl Djerassi, „Cantors Dilemma“, Roman

Während meiner Arbeit habe ich viel Vertrauen, vor allem jedoch Unterstützung und Zuspruch erfahren dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold, Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke und Herrn PD Dr. med. Hans-Christoph Fehmann für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung und vielen Anregungen.

Besonderer Dank gilt dem „Labor 4331“: Dr. med. Matthias Stamm (für Deine über das übliche Maß hervorragende und freundschaftliche Betreuung - nicht nur während der Arbeit!), Dr. rer. nat. Ulrich Wulbrand (für Deine vielen Hilfestellungen, anregenden Diskussionen und das Mischkreuz), Kathleen Dörsch und Petra Staats (für Euere große Hilfe und Euere offenen Ohren) und Peter Berghöfer und Heike Prieke (für Euere Unterstützung).

Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten und von Euch zu lernen.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Elisabeth und Helmar Pircher (unter anderem dafür, daß Ihr mir dieses Studium ermöglicht habt und für Euere unermüdliche Unterstützung während diesem und dieser Arbeit), Marion (für Deine Liebe, Dein Zuhören, Deine Geduld und Unterstützung, Deine Anregungen, Deinen Zuspruch und für den Verzicht während dieser Zeit), Johanna (für Deine Geduld mit Papa), Dong-Hun „Huny“ Kim (unter anderem

für Deine Initiative zu und der großen Hilfe während unserer Arbeiten), Alexa Wulff (für Deine Geduld zuzuhören, Deine Unterstützung und Deinen Zuspruch), Claudia „Molly“ Dressler (für das Korrekturlesen und die vielen „entspannenden“ Backgammon-Spiele - ... und ich schlag Dich doch!), Kerstin Bringezu (ebenfalls für Dein Korrekturlesen), Doris und Karl-Heinz Bruns (für Euer liebe Unterstützung); Frau Klug (die gute Fee unserer Ambulanz – für die Endkorrektur) und allen Freunden und Bekannten, die mir in dieser Zeit geholfen, zugehört und mich entbehrt haben.

Vielen Dank an alle, die im Forschungsbereich 3 mit mir zu tun hatten und mir geholfen haben: Dr. rer. nat. Brigitte Buttgereit, Thomas Höfken, Dr. med. Wolfgang Metzler, Bernd Noll, Petra Roth, „dem Simon-Labor“, Harald Schmidt, Heidi Trusheim, Dr. rer. nat. Andreas Wilmen, Firuzeh, Petra und Laslo.