

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum
(Vorstand: Prof. Dr. Eckhard Wolf)

Arbeit angefertigt unter Leitung von PD Dr. Andreas Höflich

Die Rolle von Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 (IGFBP-2) in der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Esther Hessel, geborene Braunreuther
aus Würzburg

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	PD Dr. Höflich
Korreferent(en):	Prof. Dr. Sinowatz
	Prof. Dr. Wanke
	Prof. Dr. Hirschberger
	Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Für Felix

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturteil	3
2.1	Die Kolonkarzinogenese	3
2.1.1	Bedeutung von Proliferation und Apoptose für die Entstehung von Neoplasien im Kolon	3
2.1.2	Die chemisch induzierte Kolonkarzinogenese	4
2.1.2.1	Mechanismus der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese	4
2.1.2.2	Chemische Induktion des CRC in der Maus mittels 1,2-Dimethylhydrazin.....	5
2.1.3	Stadien des Kolonkarzinoms	6
2.1.3.1	Aberrante Krypten Foci.....	6
2.1.3.2	Kolonadenome	9
2.1.3.3	Kolonkarzinome	9
2.1.4	Genetische Alterationen in der Kolonkarzinogenese.....	10
2.1.4.1	Funktion und Mutation von Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Mismatch-Reparaturgenen	10
2.1.4.2	Bedeutung CRC-relevanter Gene für die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz	11
2.1.5	β -Catenin	14
2.1.5.1	Der Wnt-Signalweg.....	14
2.1.5.2	Expression von β -Catenin in ACF und Tumoren	16
2.2	Das Insulin-Like Growth Factor System	17
2.2.1	Die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II	18
2.2.1.1	Struktur der IGFs	18
2.2.1.2	Wirkung und Expression der IGFs.....	19
2.2.1.3	Bedeutung der IGFs in der kolorektalen Karzinogenese	20
2.2.2	Die Rezeptoren des IGF-Systems.....	21
2.2.2.1	Der IGF-I Rezeptor	21
2.2.2.2	Der IGF-II Rezeptor	22
2.2.3	Die IGF-Bindungsproteine	23
2.2.3.1	Struktur und Bindungsmotive der IGFBPs.....	23
2.2.3.2	Posttranslationale Modifikationen und Proteolyse der IGFBPs	24

2.2.3.3	IGF-abhängige und -unabhängige Effekte der IGFBPs und deren Bedeutung in der Karzinogenese.....	26
2.2.4	Das Bindungsprotein IGFBP-2	28
2.2.4.1	Bindungsdomänen von IGFBP-2.....	28
2.2.4.2	Regulation der IGFBP-2-Expression	29
2.2.4.3	Proteolyse von IGFBP-2.....	29
2.2.4.4	Effekte von IGFBP-2.....	31
2.2.4.4.1	<i>IGF-abhängige und IGF-unabhängige Effekte in vitro</i>	31
2.2.4.4.2	<i>Wirkung von IGFBP-2 in vivo</i>	33
3	Material und Methoden	37
3.1	Material.....	37
3.1.1	Geräte	37
3.1.2	Chemikalien	38
3.1.3	Enzyme und Reagenzien	39
3.1.4	Lösungen und Reagenzien	40
3.1.5	Molekulargewichtstandards.....	44
3.1.6	Sonstige Materialien.....	44
3.1.7	Primer und Oligonukleotide	46
3.1.8	Antikörper.....	47
3.2	Versuchstiere	47
3.3	Methoden	48
3.3.1	Genotypisierung der Tiere.....	48
3.3.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzen	48
3.3.1.2	PCR-Reaktion.....	48
3.3.1.3	Agarosegelelektrophorese.....	49
3.3.2	Chemische Induktion von ACF und Tumoren.....	50
3.3.3	Gewinnung der Serumproben	50
3.3.4	Radioimmunoassay zur Bestimmung der IGFBP-2- und IGF-II-Serumkonzentrationen	50
3.3.5	Präparation von Kolon und Tumoren	51
3.3.6	Histologie	52
3.3.6.1	Methylenblau-Färbung.....	52
3.3.6.2	Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte	52
3.3.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	53

3.3.6.4	Kriterien der ACF-Klassifizierung	53
3.3.7	Immunhistochemie	55
3.3.7.1	Prinzip der Avidin-Biotin-Methode	55
3.3.7.2	Färbung der Antigene Ki-67, Caspase-3 und β -Catenin	55
3.3.7.3	Bestimmung des Ki-67- und Caspase-3-Markierungsindex	57
3.3.8	Vorbereitung der Proben für die Quantitative PCR	58
3.3.8.1	Isolierung der RNA	58
3.3.8.2	Bestimmung der RNA-Quantität und -Qualität	59
3.3.8.3	Synthese der cDNA	59
3.3.9	Quantitative Real-time PCR	61
3.3.9.1	Prinzip der Quantitativen Real-time PCR	61
3.3.9.2	Quantitative Real-Time PCR-Verfahren	62
3.3.9.2.1	<i>Sybr Green PCR</i>	62
3.3.9.2.2	<i>TaqMan™ PCR</i>	62
3.3.9.3	Design der Quantitativen PCR-Assays.....	64
3.3.9.4	Etablierung und Optimierung der Assays	65
3.3.9.5	Bestimmung der PCR-Effizienz	65
3.3.9.6	Bedingungen der Quantitativen PCR	67
3.3.9.7	Normalisierung	68
3.3.10	Datenauswertung und Statistische Analysen	70
4	Ergebnisse	71
4.1	Genotypisierung	71
4.2	Versuchstiergruppen	71
4.3	Quantifizierung der Serumspiegel	72
4.3.1	IGFBP-2-Serumspiegel	72
4.3.2	IGF-II-Serumspiegel.....	73
4.4	Analysen der ACF	73
4.4.1	Quantifizierung der ACF.....	73
4.4.2	Klassifizierung der ACF.....	76
4.4.3	Korrelation der ACF-Anzahl mit dem IGFBP-2-Serumspiegel.....	78
4.4.4	Lokalisation der ACF im Kolon	80
4.4.5	Proliferation der ACF	81
4.4.6	β -Catenin-Expression im ACF.....	82
4.5	Analyse der Tumoren	84

4.5.1	Tumorprävalenz und Klassifizierung	84
4.5.2	Lokalisation der Tumoren.....	85
4.5.3	Tumorvolumen und Korrelation mit dem IGFBP-2-Serumspiegel	86
4.5.4	Proliferations- und Apoptoserate der Tumoren	87
4.5.5	Expression und Lokalisation von β -Catenin im Adenom	90
4.5.6	Korrelation von β -Catenin-Färbung und Tumorvolumen	92
4.6	Analyse der Genexpression	93
4.6.1	Normalisierung	93
4.6.2	Genexpression	96
4.6.2.1	Expression zum früheren Analysezeitpunkt	98
4.6.2.2	Expression zum späteren Analysezeitpunkt.....	99
5	Diskussion	102
5.1	DMH-induzierte Kolonkarzinogenese versus APC-Min/+ Modell	102
5.2	Detektion von ACF in der Methylenblau-Färbung und im histologischen Schnitt.....	103
5.3	IGFBP-2 und Kolonkarzinogenese.....	104
5.3.1	Lokalisation von ACF und Tumoren	104
5.3.2	Effekte von IGFBP-2 auf die Entstehung und Entwicklung von ACF.....	105
5.3.3	Effekte von IGFBP-2 auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren.....	106
5.3.4	Effekte von IGFBP-2 auf die Expression und Lokalisation von β -Catenin	107
5.4	Genexpressionsanalyse	109
5.4.1	Wirkung von IGFBP-2 auf die Expression von β -Catenin-Zielgenen.....	109
5.4.2	Wirkung von IGFBP-2 auf die Expression von Adhäsions/Migrations- assoziierten Genen	111
6	Zusammenfassung.....	115
7	Summary	117
8	Abkürzungsverzeichnis	119
9	Abbildungsverzeichnis.....	124

10	Tabellenverzeichnis	126
11	Literaturverzeichnis	127
12	Danksagung.....	158
13	Lebenslauf	159

1 Einleitung

Mit rund 54400 Neuerkrankungen und 29700 Todesfällen pro Jahr ist das kolorektale Karzinom (*colorectal carcinoma* - CRC) sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Tumorerkrankung in Deutschland (Angaben der deutschen Krebsgesellschaft e.V. für das Jahr 2000). Dabei beträgt der Anteil der Erkrankungen, der auf eine genetische Disposition zurückzuführen ist, nur 10%. Die meisten Fälle von Darmkrebs werden durch exogene Faktoren hervorgerufen, die zur Entstehung des sporadischen CRC beitragen. Zu diesen Risikofaktoren zählen insbesondere die Ernährung (z.B. N-Nitrosamine), der Lebensstil (z.B. mangelnde Bewegung) sowie Umweltbelastungen (Midgley & Kerr 1999; Willett 2001). Nach einer allgemein anerkannten Hypothese entwickelt sich das Kolonkarzinom in einem mehrstufigen Prozess, in dem es zur Akkumulation von Mutationen kommt. Dabei entstehen zunächst aberrante Krypten Foci (ACF), die sich zu adenomatösen Polypen und schließlich zu invasiven und metastasierenden Kolonkarzinomen weiterentwickeln können (Cheng & Lai 2003; Fearon & Vogelstein 1990; Kinzler & Vogelstein 1996)

In den letzten zehn Jahren wurde der Bedeutung des IGF-Systems in der Kolonkarzinogenese große Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei wird insbesondere dem IGF-Bindungsprotein IGFBP-2 eine wichtige Rolle zugesprochen. Als das zweithäufigste IGF-Bindungsprotein in der Blutzirkulation, vermag IGFBP-2 das Wachstum von Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu hemmen. Aus verschiedenen Zellkulturstudien ist allerdings bekannt, dass IGFBP-2 das Wachstum insbesondere von Tumorzellen nicht nur hemmen, sondern häufig auch stimulieren kann. Zudem kann IGFBP-2 *in vitro* die Expression von Proliferations-hemmenden und Invasions-relevanten Genen in Tumorzellen regulieren. Daneben weisen auch eine Reihe klinischer Studien auf eine bedeutende Rolle von IGFBP-2 in verschiedenen Tumorerkrankungen hin. Bei manifestierter Tumorerkrankung ist die IGFBP-2-Konzentration im Serum erhöht und korreliert mit dem Grad der Malignität sowie mit Tumormarkern des Ovarial-, Prostata- und des Kolonkarzinoms. Auch im Tumorgewebe selbst wird IGFBP-2 verstärkt exprimiert. Für IGFBP-2 werden dabei sowohl IGF-abhängige als auch IGF-unabhängige Wirkmechanismen beschrieben. Die Frage, ob IGFBP-2 in der Kolonkarzinogenese tatsächlich von Bedeutung ist bzw. in welchem Tumorstadium und über welche Mechanismen IGFBP-2 seine mögliche Wirkung entfaltet, ist derzeit jedoch noch unklar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Beantwortung dieser offenen Fragestellungen zu leisten. Hierzu wird ein etabliertes IGFBP-2-transgenes Mausmodell (Hoeflich et al. 1999) eingesetzt, in dem die Kolonkarzinogenese chemisch induziert wird und somit das sporadische Kolonkarzinom des Menschen nachstellt. Durch die erhöhten systemischen und lokalen IGFBP-2-Spiegel der IGFBP-2-transgenen Mäuse werden die in der Kolonkarzinogenese progressiv ansteigenden Konzentrationen von IGFBP-2 imitiert. Um herauszufinden, wo IGFBP-2 in den mehrstufigen Prozess der Kolonkarzinogenese einzugliedern ist, wird die Funktion von IGFBP-2 in einem zweistufigen Modell analysiert.

2 Literaturteil

2.1 Die Kolonkarzinogenese

2.1.1 Bedeutung von Proliferation und Apoptose für die Entstehung von Neoplasien im Kolon

Das Kolongewebe unterliegt einem ständigen Zellerneuerungsprozess. Aus den an der Kryptenbasis lokalisierten Stammzellen entstehen durch Proliferation und Differenzierung differenzierte Epithelzellen. Diese wandern entlang der Kryptenachse weiter in Richtung Darmlumen, wo sie dem programmierten Zelltod (Apoptose) unterliegen und durch den Darminhalt verlagert werden (Renehan et al. 2002).

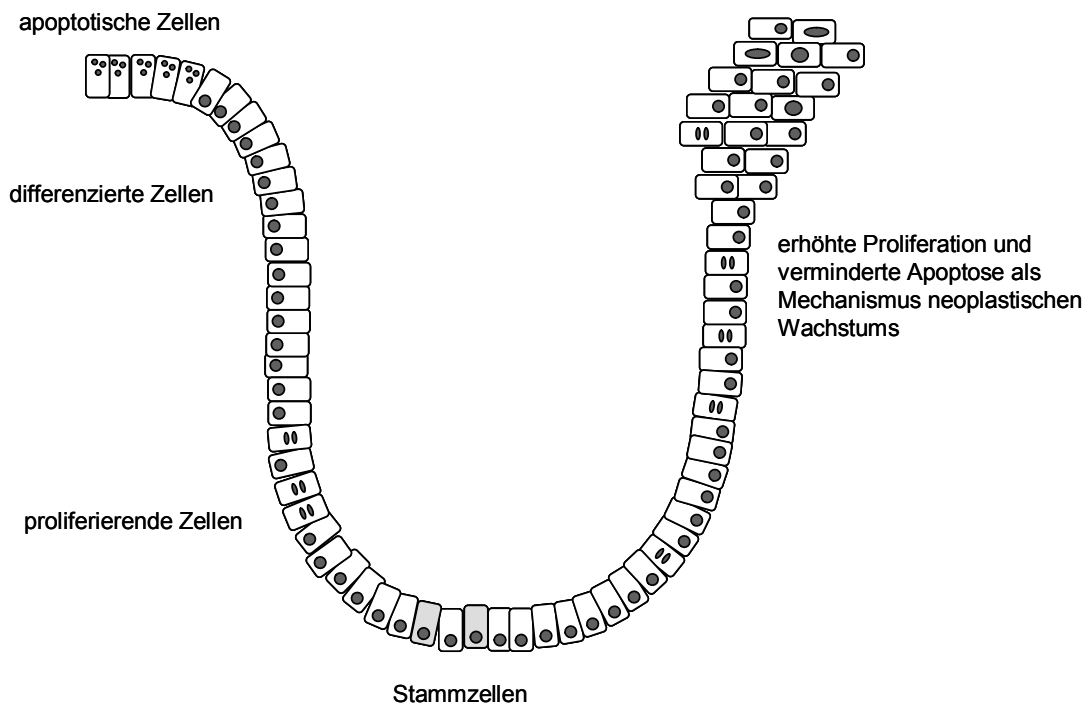


Abbildung 2.1: Gleichgewicht und Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose in der Kolonkrypte

Die linke Kryptenhälfte zeigt das unter physiologischen Bedingungen gegebene Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose. In der rechten Kryptenhälfte ist dargestellt, wie durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose Neoplasien entstehen können.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Proliferation auf das untere Drittel der Kolonkrypte beschränkt, während Differenzierung im mittleren und Apoptose im oberen Kryptenkompartiment stattfinden (siehe Abbildung 2.1). Die Kontrolle der Zellzahl von Kolonkrypten erfolgt demnach über Zellproliferation und Apoptose. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen Zellzugewinn und Zellverlust

aufrechterhalten (Renehan et al. 2002; Roberts et al. 1997). Durch eine gesteigerte Proliferation oder eine gehemmte Apoptose, kann es zu einem hyperplastischen Wachstum bzw. zur Entstehung von Neoplasien kommen (siehe Abbildung 2.1). Somit können Tumoren durch die Aktivierung oder Hemmung von Genen, die den Prozess von Proliferation und Apoptose regulieren, entstehen (Lengauer et al. 1998; Shanmugathasan & Jothy 2000). Im normalen Kolonepithel werden Mutationen im Verlauf der Migration entlang der Kryptenachse durch Apoptose der mutierten Zelle beseitigt. Mutationen, die diesen apoptotischen Prozess unterbinden, tragen somit zur Tumorentstehung bei (Shanmugathasan & Jothy 2000).

2.1.2 Die chemisch induzierte Kolonkarzinogenese

2.1.2.1 Mechanismus der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese

Die Entstehung von Krebs durch chemische Kanzerogene wurde bereits in den 40er Jahren des vergangenen Jahrhunderts beschrieben (BERENBLUM & Shubik 1949). In dem von Berenblum und Shubik beschriebenen Modell wird die Tumorentstehung in zwei Stufen, der Initiation und der Promotion, erläutert. Dieses Zwei-Stufen-Modell, das zunächst anhand der Entstehung von Hauttumoren erstellt wurde, findet auch in der Beschreibung von Tumorerkrankungen anderer Organe wie Leber (Peraino et al. 1971), Lunge (Witschi et al. 1977) und Kolon (Reddy et al. 1977) Anwendung. In der Phase der Initiation sind die Zellen dem karzinogenen Agens ausgesetzt, wobei das Karzinogen als mutagener Stimulus fungiert (Miller & Miller 1981). Ein Promotor, der per se nicht als mutagen definiert ist, verursacht durch Beschleunigung der Proliferation eine Verkürzung der Zeit für z.B. DNA-Reparaturprozesse und führt somit zu einem erhöhten Auftreten von Mutationen, die letztlich zur Entstehung eines neoplastischen Phänotyps beitragen können (Deschner et al. 1983; Potter 1980; Slaga 1983; Deschner 1978). In der Phase der Promotion kommt es somit zur klonalen Expansion der initiierten Zellen, was von genotypischen und phänotypischen Veränderungen begleitet ist (Kuraguchi et al. 2001; Bird 1995). Die dritte Stufe dieses Karzinogenese-Modells, um die das ursprünglich von Berenblum und Shubik entwickelte Modell inzwischen erweitert wurde, ist die Progression. Dieser Prozess, in dem sich weitere Mutationen ereignen und der zu einer zunehmenden genomischen Instabilität beiträgt, führt schließlich zur malignen Entartung (Pitot 1989; Warren et al. 1993).

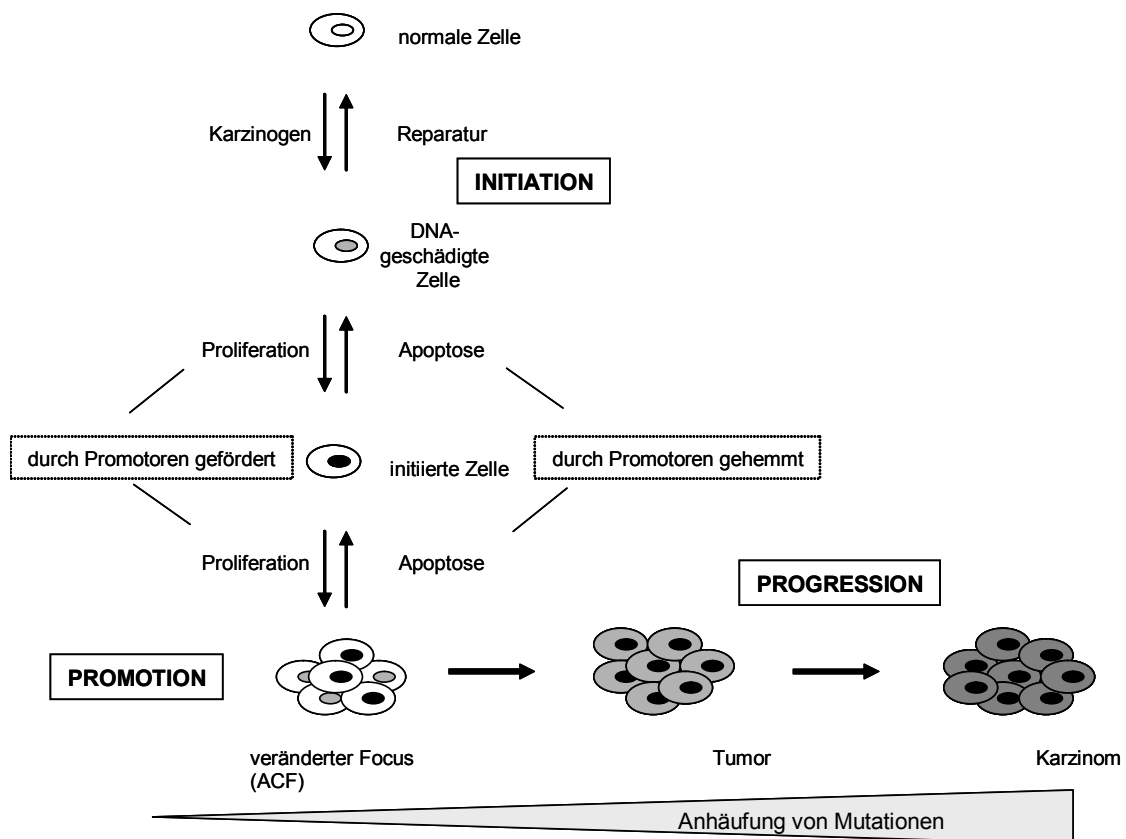


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese

Modifiziert nach (BERENBLUM & Shubik 1949; Roberts et al. 1997).

2.1.2.2 Chemische Induktion des CRC in der Maus mittels 1,2-Dimethylhydrazin

Die Kolonkarzinogenese kann durch verschiedene mutagene Stoffe induziert werden (Kuraguchi et al. 2001; Tudek et al. 1989). Dabei zeichnet sich das Mutagen 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) durch einen ausgeprägten Organtropismus aus und entfaltet daher seine karzinogene Wirkung ausschließlich im Kolon von Nagern.

DMH ist ein Prokarzinogen, das in der Leber zum ultimalen Karzinogen metabolisiert wird. Dabei wird DMH zu dessen aktiven Metabolit Methylmethoxymethanol abgebaut, der wiederum zu hoch reaktiven Carboniumionen zerfällt. Diese Carboniumionen können DNA, RNA und Proteine methylieren (Kuraguchi et al. 2001). In Abhängigkeit von der Dosierung und der Häufigkeit der DMH-Behandlung entstehen 10 bis 15 Wochen nach Beginn der ersten Applikation aberrante Krypten in der Kolonmukosa (Bird 1995; McLellan & Bird 1988). Mikroadenome entstehen nach 12 bis 18 Wochen, makroskopisch sichtbare Tumoren 24 bis 35 Wochen nach der ersten karzinogenen Behandlung (Schmelz et al. 1996; Schmelz et al. 2000). Die

verschiedenen Mausstämmen zeigen, in Abhängigkeit vom jeweiligen genetischen Hintergrund, eine gegenüber dem chemischen Karzinogen unterschiedliche Sensitivität (Deschner et al. 1983; Kuraguchi et al. 2001; Tudek et al. 1989; Thurnherr et al. 1973; Papanikolaou et al. 2000). C57BL/6J-Mäuse haben eine im Vergleich zu anderen Mausstämmen geringere Entstehungsrate von neoplastischen Veränderungen im Kolon (Kuraguchi et al. 2001; Thurnherr et al. 1973).

Da die Entstehung von Kolontumoren in Nagern durch chemische Induktion mit DMH viele Gemeinsamkeiten mit der Entstehung des sporadischen Kolonkarzinoms des Menschen aufweist, wird dieses Modell für verschiedene Studien des humanen CRC angewendet (Cheng & Lai 2003).

2.1.3 Stadien des Kolonkarzinoms

2.1.3.1 Aberrante Krypten Foci

Aberrante Krypten Foci (ACF) wurden erstmals 1987 im Methylenblau-gefärbten Kolon von Mäusen, die mit einem Karzinogen behandelt wurden, gefunden (Bird 1987). Kurz darauf wurde diesen ACF eine Bedeutung für die Entstehung von Kolontumoren in mit einem Karzinogen behandelten Mäusen beigemessen (McLellan & Bird 1988). Wenige Jahre später wurden ACF mit Hilfe der Methylenblau-Färbung auch beim Menschen identifiziert und quantifiziert (Roncucci et al. 1991; Pretlow et al. 1991). Diese wiesen große Gemeinsamkeiten mit den ACF auf, die im Kolon von Mäusen gefunden wurden.

Im Lichtmikroskop erscheinen die ACF im Methylenblau-gefärbten Kolon im Vergleich zum umliegenden Kolonepithel vergrößert, haben ein ovales bis ellipsenförmiges Lumen, ein verdicktes Epithel und ein erhöhtes perikryptales Lumen (Bird 1987; Roncucci et al. 1991; Pretlow et al. 1991; Pretlow et al. 1992).

Mehrere aberrante Krypten bilden einen Focus, der durch den Prozess der Kryptenteilung (*crypt fission*) (Bird 1995; Fujimitsu et al. 1996) entsteht. Dieser Prozess beginnt an der Kryptenbasis, setzt sich lumenwärts fort und führt zur Bildung eines größeren Focus (Otori et al. 1995). Die Anzahl aberranter Krypten pro Focus, die sogenannte *crypt multiplicity*, ist für das Potential der ACF zur Tumorentstehung von Bedeutung (Papanikolaou et al. 2000; Uchida et al. 2001).

Verschiedene Studien zeigen, dass die ACF der Nager mit denen des Menschen Gemeinsamkeiten aufweisen und bestärkten die These, dass ACF vermutlich präneoplastische Läsionen des Kolonkarzinoms bei beiden Spezies sind. ACF sind sowohl beim Menschen (Shpitz et al. 1998; Nascimbeni et al. 1999) als auch beim Nager (Furukawa et al. 2002) vor allem im distalen Bereich des Kolons lokalisiert, in dem auch Tumoren entstehen (Pretlow et al. 1991; Roncucci et al. 1998). Die Anzahl der ACF, vor allem im distalen Kolon, nimmt mit der Entstehung von Tumoren ab (Bird 1995). In ACF wurde eine erhöhte Proliferationsrate nachgewiesen (Otori et al. 1995; Roncucci et al. 1993). Zudem weisen ACF verschiedene Mutationen auf, zu denen u.a. Mutationen der Tumorsuppressorgene APC und p53, des Protoonkogens K-ras sowie der DNA-Mismatch-Reparaturgene zählen (Losi et al. 1996; Shivapurkar et al. 1997; Smith et al. 1994a; Pretlow et al. 1993), die auch im Tumor relevant sind (Vogelstein et al. 1988; Powell et al. 1992; Augenlicht et al. 1996; Luceri et al. 2000). Die Beobachtung, dass ACF von einer einzelnen Vorläufer-Stammzelle abstammen (Ponder et al. 1985) und somit monoklonal sind (Siu et al. 1999), unterstützt desweiteren diese These.

ACF können durch unabhängige Initiationsprozesse entstehen (Smith et al. 1994a; Siu et al. 1999; Minamoto et al. 1995; Pretlow et al. 1993) und zeigen einen unterschiedlichen Grad der histologischen Veränderung. Dieser reicht von Hyperplasie bis hin zu starker Dysplasie.

Hyperplastische und dysplastische ACF

Im Gegensatz zu Patienten der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), bei denen eine Keimbahnmutation des APC-Gens zugrunde liegt und die vor allem die dysplastische ACF aufweisen, entstehen in der sporadischen Kolonkarzinogenese sowohl hyperplastische als auch dysplastische ACF (Di Gregorio et al. 1997; Shpitz et al. 1998; Nascimbeni et al. 1999; Siu et al. 1997). Da bei FAP-Patienten hunderte von Adenomen im Darm, hingegen beim sporadischen Kolonkarzinom nur einzelne Tumoren entstehen, scheint sich nur ein kleiner Teil der ACF zum Tumor weiterzuentwickeln (Nucci et al. 1997).

ACF zeigen in der Histologie eine unterschiedliche Morphologie anhand derer man sie in hyperplastische und dysplastische ACF einteilen kann (Papanikolaou et al. 2000; Shpitz et al. 1998; Nambiar et al. 2004; Siu et al. 1999). Außerdem sind

Mischformen dieser beiden ACF-Typen ebenso wie ein Übergang der hyperplastischen in die dysplastische Form beschrieben (Nascimbeni et al. 1999).

Neuere Studien zeigen, dass sich dysplastische ACF in der Methylenblau-Färbung nicht in der von Bird 1987 beschriebenen Form darstellen und sich zudem in der klassischen Methylenblau-Färbung kaum vom umliegenden Kryptenepithel unterscheiden lassen. Yamada *et al.* bezeichnen dysplastische ACF als β -Catenin-akkumulierende Krypten und umschreiben sie als eingedrückte Läsionen mit kleineren Krypten im Methylenblau-gefärbten Kolon (Yamada et al. 2000). Paulsen *et al.* beschreiben dysplastische ACF als flache ACF, deren Krypten gleichgroß oder moderat vergrößert sind und die zudem ein komprimiertes rund bis länglich geformtes Kryptenlumen haben. Diese ACF können in der Methylenblau-Färbung mit Durchleuchtung identifizieren werden und haben eine leuchtend hellblaue Färbung (Paulsen et al. 2006; Paulsen et al. 2005).

Auch bezüglich der Wachstumsdynamik gibt es Unterschiede zwischen hyperplastischen und dysplastischen ACF. Dysplastische ACF sind in der Regel größer als hyperplastische ACF, d.h. sie besitzen eine höhere *crypt multiplicity* (Papanikolaou et al. 2000; Shpitz et al. 1998; Nascimbeni et al. 1999; Paulsen et al. 2006; Paulsen et al. 2001; Yamada et al. 2001). Außerdem ist die Proliferationsrate im Kolon vom Vorkommen der Dysplasie sowie der Größe dieses ACF-Typs abhängig (Shpitz et al. 1997). Bei hyperplastischen ACF wurde eine Rückentwicklung dieses ACF-Typs beobachtet, wohingegen eine Abnahme der Anzahl dysplastischer ACF mit einer Zunahme an Tumoren verbunden ist (Papanikolaou et al. 2000).

Hyperplastische ACF haben sehr häufig K-ras-Mutationen, während APC-Mutationen vor allem in dysplastischen ACF nachzuweisen sind (Jen et al. 1994; Smith et al. 1994a). In ACF von Nagern, die β -Catenin akkumulieren, tritt häufig eine Mutation im β -Catenin-Gen auf (Takahashi et al. 1998). Dysplastische ACF zeigen eine veränderte Expression von β -Catenin mit Akkumulation dieses Onkoproteins im Zytoplasma und im Zellkern (Paulsen et al. 2005; Yamada et al. 2000; Furihata et al. 2002).

Angesicht dieser beschriebenen Unterschiede zwischen den beiden ACF-Formen, scheint den dysplastischen ACF eine größere Bedeutung für die Entstehung von Tumoren zuzukommen (Papanikolaou et al. 2000; Paulsen et al. 2006; Paulsen et al. 2005; Furihata et al. 2002).

2.1.3.2 Kolonadenome

Kolonadenome sind neoplastische Veränderungen der Kolonmukosa (Morson et al. 1984) und sind durch die WHO als benigne Neoplasien des Drüsenepithels mit Atypien verschiedenen Grades definiert. Nach der WHO-Klassifizierung unterscheidet man histologisch tubuläre, villöse und tubulovillöse Kolonadenome. Die tubulären Adenome stellen die häufigste Form dieser Tumoren beim Menschen dar. Diese sind aus verzweigten Tubuli aufgebaut und wachsen häufig gestielt. Zudem zeigen sie zumeist nur einen geringen Dysplasiegrad (Rickert et al. 1979; Cummings 2000). Villöse Kolonadenome zeigen einen zottigen Stromaaufbau, wachsen überwiegend breitbasig und enthalten Areale mit stärkerer Dysplasie. Zudem neigen sie eher zu Rezidiven sowie zur malignen Entartung (Rex 2003). Tubulovillöse Kolonadenome weisen tubuläre und villöse Strukturen auf und stellen somit eine Mischform dieser beiden Adenomtypen dar. Neben adenomatösen Anteilen können diese Neoplasien auch karzinomatöse Anteile besitzen (*carcinoma in situ*), die zellmorphologische Kriterien der Malignität zeigen, aber eine intakte Lamina muscularis mucosae aufweisen.

2.1.3.3 Kolonkarzinome

Kolonkarzinome sind maligne epitheliale Tumoren der Kolonmukosa und entstehen zumeist aus Kolonadenomen (Adenom-Karzinom-Sequenz) (Fearon & Vogelstein 1990). Das Risiko der malignen Entartung ist dabei von der Größe des Tumors, vom histologischen Typ und vom Dysplasiegrad abhängig (Rex 2003).

Nach dem Grad ihrer Differenzierung werden sie in gut, mäßig, schlecht differenzierte und undifferenzierte Kolonkarzinome eingeteilt. Die TNM-Klassifizierung beurteilt das lokale Wachstumsverhalten sowie die Metastasierung dieser Karzinome. Kolonkarzinome können nach Durchbruch der Lamina muscularis mucosae die Muscularis mucosae infiltrieren und metastasieren. Die Metastasierung kann auf lymphogenem oder hämatogenem Wege stattfinden. Seltener findet eine Infiltration *per continuitatem* in benachbarte Organe statt. Das invasive Kolonkarzinom metastasiert primär über die Pfortader in die Leber (Pfortadertyp) und sekundär in die Lunge. Tiefsitzende Rektumkarzinome metastasieren primär in die Lunge (Kavatyp).

2.1.4 Genetische Alterationen in der Kolonkarzinogenese

Die Kolonkarzinogenese ist ein Mehrschrittprozess, in dem es durch Akkumulation von Mutationen letztlich zur Entstehung eines malignen Phänotyps kommt (Cho & Vogelstein 1992). Diese Mutationen ereignen sich vor allem in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Mismatch-Reparaturgenen. Um einen Überblick über in der kolorektalen Karzinogenese relevante Mutationen zu verschaffen, wird im Folgenden kurz die Funktion und Mutation der genannten Gengruppen dargestellt. Anschließend wird auf die Gene eingegangen, denen eine Schlüsselfunktion in der Kolonkarzinogenese zukommt bzw. deren Bedeutung für die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz.

2.1.4.1 Funktion und Mutation von Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Mismatch-Reparaturgenen

Protoonkogene nehmen eine Funktion in der Regulation des Wachstums wahr. Durch Mutation des Protoonkogens wird ein onkogenes Potential erworben, das zu einer unkontrollierten Proliferation oder Hemmung der Apoptose führt. Durch diese Mutationen, die auch als *gain-of-function* Mutationen bezeichnet werden, wird ein onkogenes Potential bereits durch die Mutation eines Allels erlangt.

Im Gegensatz zu den Onkogenen führt bei Tumorsuppressorgenen meist erst der Verlust von beiden Allelen zum Funktionsverlust des Tumorsuppressors (*loss-of-function* Mutation). Man spricht hier auch von der Two-Hit-Hypothese nach Knudson, wonach der Mutation des ersten Allels die Mutation oder der Verlust des zweiten Allels folgt (Knudson, Jr. 1985; Ilyas et al. 1999; Knudson, Jr. 1971). Der Verlust des zweiten Allels wird als LOH (*loss of heterozygosity*) bezeichnet. Eine Ausnahme hiervon stellt das Tumorsuppressorgen p53 dar, bei dem ein mutiertes Genprodukt das intakte Genprodukt inaktiviert (Fearon & Vogelstein 1990).

Während der DNA-Replikation auftretende Fehler wie Basenfehlpaarungen und einsträngige DNA-Loop-Bildungen, die durch Insertion bzw. Deletion einzelner Basen entstehen, werden durch DNA-Mismatch-Reparaturgene (DNA-MMR-Gene; z.B. hMLH1, hMSH1, GTBP) korrigiert (Modrich 1991). Gene, die repetitive DNA-Sequenzen, sog. Mikrosatelliten, aufweisen, sind für eine fehlerhafte Replikation besonders anfällig. Bei defektem DNA-Mismatch-Reparatursystem werden diese Mutationen nicht mehr beseitigt, sondern im nächsten Replikationszyklus an die

Tochterzellen weitergegeben, die dann Allele unterschiedlicher Länge aufweisen (Ilyas et al. 1999). Neben genetischen können auch epigenetische Veränderungen den Funktionsverlust eines DNA-MMR-Gens bewirken. So kann beispielsweise durch die Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion ein bestimmtes Gen transkriptionell reprimiert und somit das *Silencing* des Gens hervorgerufen werden (Kane et al. 1997).

2.1.4.2 Bedeutung CRC-relevanter Gene für die ACF-Adenom-Karzinom-Sequenz

In dem von Vogelstein et al. beschriebenen und von Kinzler erweiterten Modell der Kolonkarzinogenese (siehe Abbildung 2.3) kann das Auftreten bestimmter Mutationen mit verschiedenen Stadien der Kolonkarzinogenese in Verbindung gebracht werden (Fearon & Vogelstein 1990; Kinzler & Vogelstein 1996). Die Bedeutung der einzelnen Schlüsselgene wird im Folgenden erläutert.

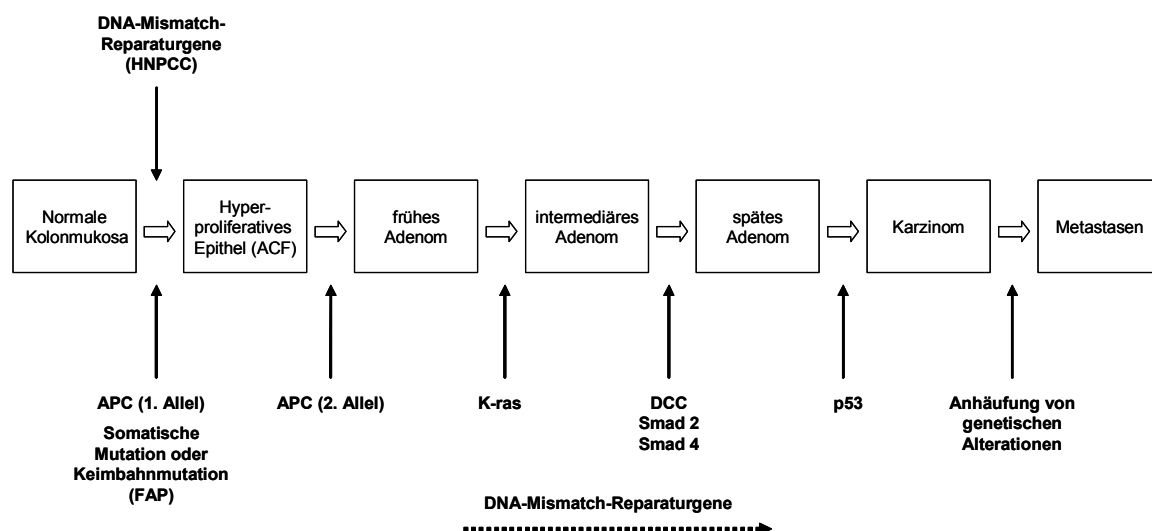


Abbildung 2.3: Modell der genetischen Alterationen in der Kolonkarzinogenese

Eine Mutation von APC (1. Allel) initiiert den Prozess bei CRC- (somatische Mutation) sowie bei FAP-Patienten (Keimbahnmutation). Bei Patienten des hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinoms (HNPCC) wird die Kolonkarzinogenese durch Mutationen von DNA-Mismatch-Reparaturgenen ausgelöst. In der Folge kommt es durch genetische Alterationen von K-ras, Chromosom 18q (DCC bzw. Smad2 und 4), p53 und DNA-Mismatch-Reparaturgenen zur Entstehung des Kolonkarzinoms. Die Akkumulation weiterer Mutationen führt zur Entstehung von Metastasen (Fearon & Vogelstein 1990; Kinzler & Vogelstein 1996).

APC-Mutation

Das auf Chromosom 5q21 lokalisierte (Bodmer et al. 1987) APC-Gen (*Adenomatosis Coli*) wird aufgrund seiner weitreichenden Bedeutung in der Kolonkarzinogenese auch als Gatekeeper bezeichnet (Kinzler & Vogelstein 1996).

Eine Mutation des APC-Gens liegt nicht nur den Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) zugrunde (Nascimbeni et al. 1999), sondern ist bei 60-80% der sporadischen Adenome und Karzinome zu einem früheren Zeitpunkt nachzuweisen (Powell et al. 1992; Miyoshi et al. 1992; Goss & Groden 2000). Die Bedeutung von APC für die Kolonkarzinogenese liegt dabei vor allem in der Regulierung von β -Catenin begründet. Indem das Wildtyp-APC die Verfügbarkeit und Aktivität von β -Catenin im Zytoplasma hemmt, unterbindet es die Aktivierung des Wnt-Signalweges (siehe 2.1.5.1) (Rubinfeld et al. 1993; Rubinfeld et al. 1997; Munemitsu et al. 1995).

K-ras-Mutation

K-ras ist als Vermittler der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren relevant. Da mutiertes K-ras nicht mehr an GAP (GTPase aktivierendes Protein) binden und somit nicht inaktiviert werden kann, kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung, die eine Erhöhung der Proliferation sowie eine Hemmung der Apoptose zur Folge hat (Bos 1989; Hoops & Traber 1997). Neben APC ist das Onkogen K-ras in der Initiationsphase der Tumorentstehung von Bedeutung. So findet man K-ras-Mutationen bereits in ACF (Smith et al. 1994a; Pretlow et al. 1993; Yamashita et al. 1995), wobei es insbesondere in hyperplastischen ACF vorkommt (Jen et al. 1994; Takayama et al. 2001; Yamada et al. 2003). Daraus wurde die Schlussfolgerung abgeleitet, dass K-ras nur in Verbindung mit einer weiteren Mutation wie z.B. APC bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielt (Arends 2000; Ilyas et al. 1999). Im Kolontumor tritt eine K-ras-Mutation in 50% aller Fälle auf (Bos 1989).

DCC-Mutation bzw. Genverlust auf Chromosom 18q

Ein Verlust des auf Chromosom 18q lokalisierten Gens DCC (*deleted in colon cancer*) liegt bei 70% der kolorektalen Karzinome sowie bei 50% der Adenome im späten Stadium vor (Vogelstein et al. 1988; Fearon et al. 1990). Dem in Kolonepithelzellen vorhandenen Membranprotein wurde aufgrund seines Fehlens in

der Mehrzahl der kolorektalen Karzinome eine wichtige Rolle in deren Entstehung zugeschrieben (Fearon & Vogelstein 1990). Zweifel an dieser Funktion als Tumorsuppressor begründeten sich in der Entdeckung, dass das Membranprotein DCC als Rezeptor von Netrin-1, einem Nervenwachstumsfaktor fungiert (Keino-Masu et al. 1996). Außer in Axonen des Nervensystems ist DCC auch in Kolonepithelzellen zu finden, für die eine pro-apoptotische Wirkung von DCC beschrieben ist (Mehlen & Fearon 2004). Neben DCC sind weitere auf Chromosom 18q liegende Gene für die Tumorpromotion bedeutend (Arends 2000). Hierzu gehören Smad2 und Smad4, die als Bestandteil des TGF- β -Signalwegs in Kolonkarzinomen mutiert sind (Eppert et al. 1996; Takagi et al. 1996; Hahn et al. 1996; Thiagalingam et al. 1996).

P53-Mutation

Mutationen des auch als Wächter des Genoms bezeichneten Gens p53 finden zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Kolonkarzinogenese statt (Lane 1992). Mutationen in diesem auf Chromosom 17p lokalisierten Gen sind bei 75% der kolorektalen Karzinome nachzuweisen (Vogelstein et al. 1988; Baker et al. 1989; Delattre et al. 1989) und sind für die Progression von Adenomen zu Karzinomen von Bedeutung (Baker et al. 1989; Fearon et al. 1987). P53 nimmt eine zentrale Rolle in der Apoptose ein (Ilyas et al. 1999). Bei geschädigter DNA induziert p53 den Zellzyklus-Inhibitor p21 und ermöglicht durch den damit verbundenen Zellzyklus-Arrest die Reparatur der DNA vor dem Eintritt in die S-Phase (Lane 1992; el Deiry et al. 1994). Als nächste Stufe kann p53 bei größerem DNA-Schaden die Apoptose über eine Aktivierung pro-apoptotischer Gene wie Bax oder über eine Inaktivierung anti-apoptotischer Gene wie Bcl-2 oder Bcl-xL einleiten (Lane 1992; Kokontis et al. 2001; Weller et al. 1998).

Mutationen der DNA-Mismatch-Reparaturgene

Tumoren, die Mutationen der DNA-Mismatch-Reparaturgene aufweisen, haben eine gesteigerte Mutationsrate und werden als Mikrosatelliten-instabile Tumoren (MSI) oder RER⁺-Tumoren (*replication error positive*) bezeichnet. (Eshleman et al. 1995; Ilyas et al. 1999). Neben Patienten mit dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC), denen eine Keimbahnmutation in mindestens einem der DNA-Mismatch-Reparaturgene zugrunde liegt, ist bei 10-15% der sporadischen

Kolonkarzinome eine MSI nachzuweisen (Ionov et al. 1993; Thibodeau et al. 1993). Da HNPCC-Patienten eine im Vergleich zu FAP-Patienten beschleunigte Tumorprogression aufweisen, scheinen Mutationen von DNA-Mismatch-Reparaturgenen insbesondere für die Progression von Tumoren bedeutsam zu sein (Kinzler & Vogelstein 1996). ACF können eine MSI aufweisen, wobei diese sowohl bei hyperplastischen als auch bei dysplastischen ACF auftritt und von der Größe des ACF unabhängig zu sein scheint (Augenlicht et al. 1996; Pedroni et al. 2001). In RER⁺-Tumoren treten Mutationen in den für den IGF-IIR und den TGF- β -Rezeptor Typ II kodierenden Genen auf, da diese repetitive DNA-Sequenzen aufweisen (Markowitz et al. 1995; Souza et al. 1996). Die häufig in RER⁺-Tumoren auftretende Inaktivierung des TGF- β -Rezeptors Typ II, die durch Mutation in dessen Polyadenin-Sequenz hervorgerufen wird, führt zu einer Unterbindung des wachstumshemmenden und Apoptose-induzierenden TGF- β -Signalwegs und trägt somit zur Kolonkarzinogenese bei (Salahshor et al. 1999; Markowitz 2000; Parsons et al. 1995).

2.1.5 β -Catenin

2.1.5.1 Der Wnt-Signalweg

Dem Protein β -Catenin, das als der Haupteffektor des Wnt-Signalwegs gilt, kommt eine zentrale Rolle während der Kolonkarzinogenese zu. In normal differenzierenden Epithelzellen ist der größte Teil von β -Catenin an das Zellmembranprotein E-Cadherin gebunden und ist an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt. Nach initialer Phosphorylierung durch die Casein Kinase I (Amit et al. 2002; Liu et al. 2002), bindet frei vorhandenes β -Catenin an einen aus APC, Axin und GSK-3 β bestehenden Komplex (Bienz & Clevers 2000). An diesen Multiproteinkomplex gebunden wird β -Catenin durch die Serin/Threonin Kinase GSK-3 β phosphoryliert (Hagen & Vidal-Puig 2002). Phosphoryliertes β -Catenin wird schließlich durch den Ubiquitin/Proteasom-Pathway abgebaut (Aberle et al. 1997) (siehe Abbildung 2.4 links). In normal differenzierenden Epithelzellen wird der Wnt-Signalweg durch das Binden von Wnt-Faktoren an den Rezeptor *Frizzled* aktiviert. Dadurch wird die Phosphorylierung von β -Catenin geblockt. Somit entgeht β -Catenin seiner Degradation und transloziert in den Zellkern, wo es nach der Assoziation an T-Zell-Faktoren (TCF)/*lymphoid enhancer*

factor (LEF) die Transkription von Genen aktiviert, die zur Proliferation und Differenzierung benötigt werden (Kolligs et al. 2002) (siehe Abbildung 2.4 Mitte).

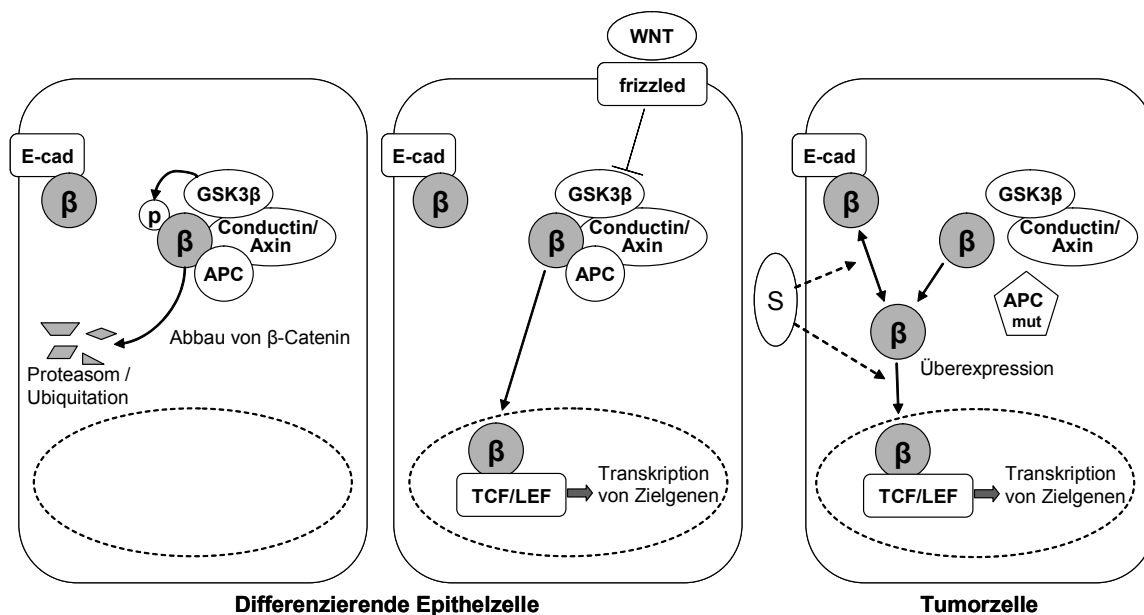


Abbildung 2.4: Wnt-Signalweg in normal differenzierenden Epithelzellen und Tumorzellen

Links: β -Catenin wird an einen Komplex aus GSK-3 β , APC und Axin gebunden und nach Phosphorylierung durch GSK-3 β degradiert. Freies β -Catenin wird an E-Cadherin gebunden, wodurch es an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist. *Mitte:* Durch das Binden von Wnt-Liganden an den *Frizzled*-Rezeptor, wird die Phosphorylierung durch GSK-3 β und somit die Degradation von β -Catenin verhindert. β -Catenin kann somit in den Zellkern translozieren, wo es nach Komplexbildung mit TCF/LEF die Transkription von Genen steuert. *Rechts:* Unregulierte Stabilisierung von β -Catenin in Tumorzellen. Durch Mutationen von APC, Axin/Conductin oder β -Catenin kommt es zur Dissoziation des Komplexes, was zur Akkumulation von β -Catenin führt. Signale aus dem *Tumorenvironment* scheinen bei der Dissoziation von E-Cadherin und der Akkumulation eine Rolle zu spielen. Es kommt zur unregulierten Transkription von Genen, die zur Tumorpheriferation, Dedifferenzierung und Progression beitragen. In Anlehnung an Brabletz et al. 2002.

In Tumorzellen kommt es zu einer kontinuierlichen Deregulierung des Wnt-Signalweges. Diese Deregulierung wird in den meisten Fällen des sporadischen CRC durch eine *loss-of-function* Mutation des APC-Gens (Fearon & Vogelstein 1990; Korinek et al. 1997; Morin et al. 1997) verursacht. In MSI-Tumoren führt eine *loss-of-function* Mutation des Conductin/Axin-2-Gens (Liu et al. 2000b) oder eine Mutation im β -Catenin-Gen (GSK-Phosphorylierungsstelle des Exons 3) (Shitoh et al. 2001) bei intaktem APC-Gen zu einer Akkumulation von β -Catenin. In den Zellkern transloziertes β -Catenin konkurriert mit inhibierenden Faktoren (Repressor) wie z.B. Groucho um die Bindung an DNA-bindende TCF-Proteine (Barker et al. 2000; Cavallo et al. 1998). Der β -Catenin/TCF-Komplex macht den Promotor des Zielgens

für andere Transkriptionsfaktoren zugänglich. Nukleäres β -Catenin fungiert somit als Transkriptionsaktivator von Genen, die zu einer unregulierten Proliferation sowie zur Dedifferenzierung und Progression der Tumoren führt. Daher wird β -Catenin auch als Onkoprotein bezeichnet (Brabletz et al. 1998) (siehe Abbildung 2.4 rechts). Zu diesen Genen zählen beispielsweise C-myc (He et al. 1998), Cyclin D1 (Shtutman et al. 1999), Cdx1 (Lickert et al. 2000), Plau, Vegf, C-jun, (Zhang et al. 2001; Mann et al. 1999). Interessanterweise wurde in einer neueren Studie IGFBP-2 als ein direktes Zielgen von β -Catenin postuliert (Naishiro et al. 2005). Die genaue Steuerung der nukleären Translokation von β -Catenin ist derzeit noch unklar. Es wird angenommen, dass Signale des Tumorenvironment diesen Prozess direkt oder indirekt regulieren (Brabletz et al. 1998; Brabletz et al. 2002). Hierzu zählen Faktoren des *Environment* wie IGF-I, -II und EGF, die eine Störung der E-Cadherin Bindung durch Thyrosin-Phosphorylierung von β -Catenin und damit letztlich den Verlust der interzellulären Adhäsion bewirken. Eine Überexpression dieser Faktoren in Karzinomen kann daher die Adhäsion und Migration von Tumorzellen beeinflussen (Freier et al. 1999; Shibamoto et al. 1994). Ein wichtiger Regulator der intrazellulären Verteilung von β -Catenin ist ILK (*integrin-like kinase*), eine Serin/Threonin-Kinase. Nach Binden von ECM-Proteinen an den Integrin-Rezeptor induziert ILK die nukleäre Translokation von β -Catenin und aktiviert den β -Catenin/TCF-Transkriptionsaktivator-Komplex (Novak et al. 1998). Zudem inhibiert ILK die Transkription von E-Cadherin über dessen Repressor Snail (Tan et al. 2001). Die Stärke des Wnt-Signals wird als eine Ursache für die Aktivierung der Transkription unterschiedlicher Gene in verschiedenen Tumorstadien angenommen, da β -Catenin im Tumor heterogen verteilt ist und die stärkste nukleäre Akkumulation an der invasiven Front zu finden ist. Das Wnt-Signal kann Snail aktivieren und so einen Verlust von E-Cadherin verursachen (Bachelder et al. 2005; Yook et al. 2005), was zu einem Freisetzen von β -Catenin und somit zu einem verstärkten Wnt-Signal führen kann (Behrens 2005).

2.1.5.2 Expression von β -Catenin in ACF und Tumoren

Während in hyperplastischen ACF keine veränderte β -Catenin-Lokalisation nachzuweisen ist, findet sich in dysplastischen ACF eine deutlich reduzierte Zellmembran-Bindung bzw. im Zytoplasma und im Zellkern eine massive Akkumulation von β -Catenin (Paulsen et al. 2001; Yamada et al. 2000; Hao et al.

2001). Die zytoplasmatische Akkumulation stellt die häufigste Veränderung in dysplastischen ACF dar (Hao et al. 2001). Die Abnahme der Membranbindung ist mit der Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und im Zellkern verbunden. Die Akkumulation von β -Catenin nimmt im ACF mit steigendem Dysplasiegrad (Yamada et al. 2001; Hao et al. 2001) und von dysplastischen ACF über Adenome bis hin zu Adenokarzinomen zu (Hao et al. 2001), weshalb dysplastischen ACF ein höheres Potential zur neoplastischen Progression zugeschrieben wird.

Im Tumor zeigt β -Catenin ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Differenzierte Tubuli weisen eine membranöse oder zytoplasmatische Lokalisation von β -Catenin auf, wohingegen β -Catenin in Arealen mit tubulärer Verzweigung im Zellkern nachgewiesen werden kann (Kirchner & Brabletz 2000). Adenokarzinome zeigen eine stärkere nukleäre β -Catenin Lokalisation (Hao et al. 1997a; Hao et al. 1997b). In dedifferenzierten, dissoziierten Tumorzellen der Invasionsfront von Adenokarzinomen ist die stärkste Konzentration von nukleärem β -Catenin aufzufinden (Brabletz et al. 1998; Kirchner & Brabletz 2000). In Adenomen korreliert die Konzentration von nukleärem β -Catenin mit der Tumorgröße, so dass β -Catenin nicht im Zellkern von kleinen aber von größeren Adenomen nachgewiesen werden konnte (Brabletz et al. 2000). Ebenso ist eine Korrelation der nukleären β -Catenin-Konzentration in Adenomen mit dem Grad der Dysplasie belegt (Hao et al. 1997b; Brabletz et al. 2000). Während Hao *et al.* keine Korrelation von β -Catenin und der Adenomgröße finden konnten, berichten Brabletz *et al.* über eine stärkere Korrelation von β -Catenin mit der Tumorgröße als mit dem Dysplasiegrad. Wie im ACF ist auch im Tumor eine zunehmende Konzentration von nukleärem β -Catenin mit einer Abnahme der Membranbindung von β -Catenin in Adenomen und Adenokarzinomen verbunden (Hao et al. 1997b). In Azoxymethan-induzierten Tumoren der Ratte treten Mutation von β -Catenin häufig auf und sind mit einer Akkumulation von β -Catenin verbunden (Takahashi et al. 1998; Dashwood et al. 1998).

2.2 Das Insulin-Like Growth Factor System

Das *Insulin-Like Growth Factor* (IGF-) System besteht aus den Peptidhormonen IGF-I und -II, den Rezeptoren IGF-IR und -IIR sowie sechs hochaffinen Bindungsproteinen IGFBP-1 bis -6 (Baxter et al. 1998)). In diesem Kapitel sollen die Komponenten des IGF-Systems zunächst einzelnen vorgestellt werden und anschließend auf deren

Bedeutung für die Entstehung von Krebs im allgemeinen sowie die Kolonkarzinogenese im speziellen eingegangen werden.

2.2.1 Die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II

2.2.1.1 Struktur der IGFs

Die Liganden des IGF-Systems IGF-I und IGF-II wurden bereits 1957 postuliert (SALMON, Jr. & DAUGHADAY 1957) und galten zunächst als Vermittler der Wachstumshormonwirkung, weshalb sie die Bezeichnung Somatomedine trugen (DAUGHADAY et al. 1972). IGF-I und -II sind Polypeptidhormone mit einer Länge von 70 Aminosäuren (IGF-I) bzw. 67 Aminosäuren (IGF-II). Die Homologie zwischen menschlichem IGF-I und -II beträgt 62% (Sara & Hall 1990).

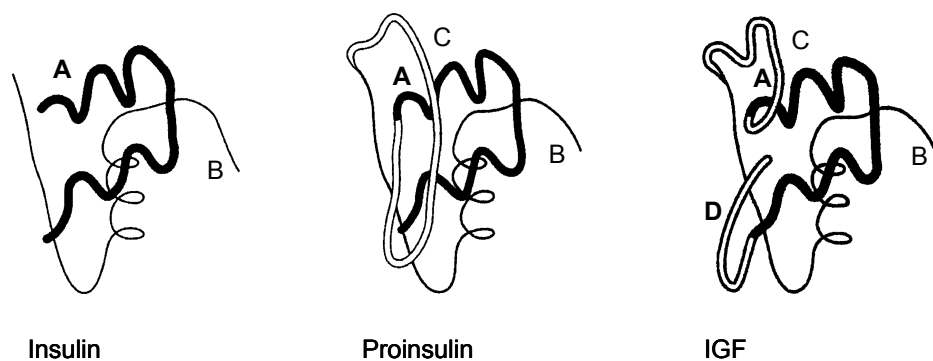


Abbildung 2.5: Proteinstrukturen von Insulin, Proinsulin und den IGF-Wachstumsfaktoren

Abbildung nach Blundell und Humbel (Blundell & Humbel 1980)

Die Aminosäuresequenz der IGFs ist zwischen den Spezies der Säugetiere hoch konserviert (Rotwein 1991). Durch die Konservierung von Cystin- und Glycinresten weist die Proteinstruktur der IGFs Ähnlichkeiten zu Proinsulin und Insulin auf (siehe Abbildung 2.5), aufgrund derer diese Wachstumsfaktoren ihre heute gültige Bezeichnung tragen. Beide Wachstumsfaktoren sowie Proinsulin und Insulin enthalten eine A- und eine B-Domäne. Eine C-Domäne ist bei IGF-I und -II sowie bei Proinsulin, aber nicht bei Insulin zu finden. Am C-terminalen Ende tragen die IGFs eine D-Domäne, die dem Insulin fehlt. Diese D-Domäne zeigt eine große Variabilität zwischen den verschiedenen Spezies. Die Proteine IGF-I und -II entstehen aus

Vorläufermolekülen, aus denen sie durch Proteolyse prozessiert werden. Für IGF-II existieren neben einer Hauptform weitere gewebespezifische Varianten (DAUGHADAY & Rotwein 1989).

2.2.1.2 Wirkung und Expression der IGFs

Nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrer Funktion weisen die IGFs Ähnlichkeiten zu Insulin auf. So vermögen diese Wachstumsfaktoren, ähnlich wie Insulin, die Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettzellen zu stimulieren (Rinderknecht & Humbel 1978). Im Unterschied zu Insulin werden die IGFs jedoch von verschiedenen Geweben gebildet, wobei in der Blutbahn zirkulierendes IGF-II vor allem in der Leber synthetisiert wird und auf endokrinem Wege wirkt (Moschos & Mantzoros 2002; Khandwala et al. 2000). Zusätzlich zu diesem endokrinen Wirkmechanismus werden die IGFs auch lokal im Gewebe produziert, wo sie ihre Wirkung über autokrine sowie parakrine Wirkmechanismen entfalten (Humbel 1990; Jones & Clemmons 1995; Butler & LeRoith 2001). Die IGF-Wachstumsfaktoren sind für das normale Wachstum und die allgemeine Entwicklung von großer Bedeutung (Zhou et al. 2003). Dies wurde anhand von *igf1*- bzw. *igf2*-Knock-out-Mäusen, bei denen starke Wachstumsdefizite auftraten, deutlich. So ist das Körpergewicht neugeborener *igf1*-Knock-out-Mäuse um 60% und das von *igf2*-Knock-out-Mäusen um 40% reduziert. Nach der Geburt entwickeln sich *igf1*-Knock-out-Mäuse nur langsam und weisen eine hohe Sterblichkeit auf (Powell-Braxton et al. 1993). Im Unterschied zu IGF-I scheint IGF-II vor allem ein embryonaler bzw. fötaler Wachstumsfaktor zu sein, da die postnatale Entwicklung von *igf2*-Knock-out-Mäusen normal weiterverläuft (DeChiara et al. 1990). Die Expression von IGF-I wird durch das Wachstumshormon GH (*growth hormone*) reguliert. Bei der Maus, jedoch nicht beim Menschen, unterliegen sowohl das *igf2*-Gen als auch das *igf2r*-Gen dem sog. genomischen *Imprinting* (Kalscheuer et al. 1993), wodurch nur das paternale (*igf2*) bzw. das maternale (*igf2r*) Allel exprimiert wird. Bedingt durch eine Promotor-Veränderung nach der Geburt geht beim Menschen das *Imprinting* verloren, so dass dort eine biallelische Expression des *igf2*-Gens erfolgt (Kalscheuer et al. 1993; Vu & Hoffman 1994; Davies 1994). Zudem steigt die IGF-II-Serumkonzentration beim Menschen in den ersten Lebensjahren an (Zapf et al. 1981). Im Unterschied dazu

findet bei Nagern post partum fast keine Gewebeexpression von IGF-II mehr statt, was auf ein Fehlen des P1-Promotors zurückzuführen ist (Humbel 1990).

2.2.1.3 Bedeutung der IGFs in der kolorektalen Karzinogenese

Für die Entstehung des CRC sind neben den Wachstumsfaktoren TGF- β (*transforming growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF), denen in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt wurde (Durai et al. 2005), von besonderer Relevanz.

Die Bedeutung der IGFs für die Entstehung von Tumoren liegt insbesondere in ihrer mitogenen Wirkung, die über den IGF-I Rezeptor vermittelt wird (Lahm et al. 1992; Lahm et al. 1994). Zudem sind die IGFs für die Invasion, Migration und Metastasierung relevant (Sachdev & Yee 2001; Clemmons et al. 1999; Jones et al. 1996). Durch Interaktion mit $\alpha\beta 3$ -Integrinen wird sowohl das Proliferations- als auch das Migrations-fördernde Potential von IGF-I verstärkt (Clemmons et al. 1999; Jones et al. 1996; Zheng & Clemmons 1998). IGF-I vermag die Expression des für das Tumorstadium wichtigen angiogenen Faktors VEGF in humanen Kolontumorzellen zu erhöhen (Akagi et al. 1998; Warren et al. 1996). Zudem scheint im Blut zirkulierendes IGF-I einen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren im Kolon zu haben. Erhöhte IGF-I-Serumspiegel sind oft mit einem erhöhten Kolonkrebsrisiko assoziiert (Ma et al. 1999; Giovannucci et al. 2000), wobei dies häufig zugleich mit niedrigen IGFBP-3-Serumspiegeln verbunden ist (Ma et al. 1999). Leber-spezifische IGF-I defiziente Mäuse, deren IGF-I-Serumspiegel stark reduziert sind, zeigen im orthotopen Mausmodell ein geringeres Wachstum von Adenomkarzinomen sowie ein selteneres Auftreten von Lebermetastasen (Wu et al. 2002).

IGF-II ist in Kolonkrebszelllinien (Lambert et al. 1992; Singh et al. 1996) sowie im Kolonkarzinom (Freier et al. 1999; Tricoli et al. 1986) häufig überexprimiert. Ein Verlust des genomischen *Imprintings* (LOI, *loss of imprinting*) des *igf2*-Gens wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet, weshalb auf eine Bedeutung des LOI an der Tumorentstehung geschlossen wurde (Vu et al. 1995; Ogawa et al. 1993). Auch bei Patienten des CRC ist das Phänomen des LOI beschrieben (Cui et al. 2003; Cruz-Correa et al. 2004). Obwohl erhöhte systemische IGF-II-Spiegel das Risiko für CRC nicht zu beeinflussen scheinen (Hassan & Macaulay 2002), haben Kolonkrebs-Patienten häufig aber erhöhte IGF-II-Serumspiegel (Renehan et al.

2000b). Eine Überexpression von IGF-II fördert zudem das Tumorwachstum in Mäusen (Hassan & Howell 2000; Harper et al. 2006). Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass IGF-II die nukleäre Translokation von β -Catenin in Blasen- und Mamma-Karzinomzellen (Morali et al. 2001) und im Kolonkarzinom (Harper et al. 2006) induzieren kann.

2.2.2 Die Rezeptoren des IGF-Systems

Die Peptidhormone IGF-I und -II vermitteln ihre biologische Wirkung über den IGF-I Rezeptor (IGF-IR) sowie den IGF-II-Rezeptor (IGF-IIR). Die IGF-Rezeptoren sind in der Zellmembran lokalisiert und kommen in fast allen Geweben vor. Beide Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Funktion (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2). Zusätzlich zu diesen spezifischen Rezeptoren können die IGFs aufgrund ihrer Strukturhomologie zu Insulin auch mit dem Insulin-Rezeptor interagieren, wobei hier die Affinität geringer ist (Roth & Kiess 1994).

2.2.2.1 Der IGF-I Rezeptor

Die meisten biologischen Effekte der IGF werden über den IGF-IR vermittelt (Lopaczynski et al. 1993). Der IGF-IR ist ein heterotetrameres Molekül, das aus zwei extrazellulären α -Untereinheiten (130 kDa) und zwei intrazellulären β -Untereinheiten (95 kDa) besteht. Die Liganden IGF-I und -II binden an die α -Untereinheiten. Dabei ist die Bindungsaffinität für IGF-I um das 10- bis 15-fach höher als für IGF-II (Germain-Lee et al. 1992). Aufgrund der Strukturverwandtschaft der IGFs zu Insulin kann der IGF-IR auch Insulin binden, allerdings mit einer gegenüber den IGFs etwa 500-fach geringeren Affinität (Jones & Clemmons 1995). Die β -Untereinheiten des IGF-IR vermitteln durch ihre Tyrosin-Kinase-Aktivität die intrazelluläre Effekte der IGFs (Ullrich et al. 1986; Kato et al. 1993). Dabei wird durch die Bindung des Liganden eine Autophosphorylierung der Tyrosinreste der β -Untereinheiten und die Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinen verursacht (Frattali & Pessin 1993). Die Signale werden auf intrazelluläre Signalketten übertragen. Zu diesen zählen beispielsweise der MAP-Kinase-Weg (Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase), der insbesondere für die proliferativen Signale bedeutsam ist oder der PI3-Kinase-Weg (Phosphatidylinositol-3-Kinase), der Zelltyp-spezifische Effekte auf Zellzahl und Zellgröße besitzt und darüber hinaus auch Kontrollfunktionen über Apoptose,

Alterung und Zellzyklus innehat. Die anti-apoptotische Wirkung wird zum einen durch die Hemmung pro-apoptotischer Proteine, zum anderen durch die Aktivierung anti-apoptotischer Proteine der Bcl-Familie vermittelt. Dies hat letztlich eine Hemmung von Caspasen zur Folge, die wichtige Kontrollfunktionen über die Apoptose ausüben (Butt et al. 1999). So kann beispielsweise eine Aktivierung der Caspase-3 über den IGF-IR indirekt gehemmt werden (Wang et al. 1998). Die Inaktivierung des pro-apoptotisch wirksamen BAD (*B-cell leukemia antagonist of death*) kann sowohl über den PI3-Kinase-Weg, als auch über den MAPK Signalweg erfolgen (Gilmore et al. 2002). Neben BAD können auch andere pro-apoptotische Proteine wie Caspase-9 oder FKHR (*Forkhead in rhabdomyosarcoma*) durch den PI3-Kinase-Weg inaktiviert werden (Bai et al. 1999; Brunet et al. 1999). Ebenso kann die verstärkte Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X durch den PI3-Kinase-Weg (Leverrier et al. 1999) oder NFκB (Heck et al. 1999) vermittelt werden. Interessanterweise kann die Genexpression des IGF1R durch das Tumorsuppressorgen p53, dessen Funktionsverlust vor allem in der Progression von Tumoren von Bedeutung ist, gehemmt werden (Ohlsson et al. 1998). Die transformierende Wirkung des IGF-IR konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Beispielsweise konnten normale Fibroblasten durch eine Überexpression des IGF-IR transformiert werden (Kaleko et al. 1990). Zudem wurde gezeigt, dass Fibroblasten von *igf1r*-knock-out-Mäusen durch ein virales Protein (SV 40) nicht transformiert werden können (Sell et al. 1993). Der IGF-IR ist daher durch die Übertragung von mitogenen, anti-apoptotischen und transformierenden Effekten nicht nur für das normale, sondern auch das maligne Wachstum von zentraler Bedeutung (Grothey et al. 1999; Baserga et al. 1997; Blakesley et al. 1996). Der IGF-IR wird - neben IGF-I und -II - häufig in kolorektalen Tumoren überexprimiert (Ouban et al. 2003) und kann somit auch auf autokriner Ebene agieren (LeRoith & Roberts, Jr. 2003; Leng et al. 2001a; Weber et al. 2002).

2.2.2.2 Der IGF-II Rezeptor

Der IGF-IIR, auch IGF-II/Mannose 6-Phosphat-Rezeptor (IGF-II/M6P) genannt, ist ein 230 kDa großes, multifunktionales Protein, das eine hochaffine Bindungsstelle für IGF-II und zwei Bindungsstellen für M6P besitzt. In der Maus unterliegt das *Igf2r*-Gen dem maternalen *Imprinting* (Barlow et al. 1991; Wang et al. 1994b). Aufgrund seiner M6P-Bindungsstellen bindet der IGF-IIR lysosomale Enzyme (Marzella & Glaumann

1983). Zudem kann der IGF-IIR Urokinase-Rezeptor (uPAR) (Kreiling et al. 2003), Proliferin (Lee & Nathans 1988), Retinsäure (Kang et al. 1997), TGF- β (Dennis & Rifkin 1991) und wohl auch Thyroglobulin (Scheel & Herzog 1989) binden, wobei die Bindungsstellen hierbei noch unklar sind. Zudem ist der IGF-IIR am Sorting lysosomaler Enzyme im Golgi-Apparat beteiligt (Chen et al. 1997). Durch die Bindung von IGF-II sowie von lysosomalen Enzymen werden diese aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere aufgenommen und in den Lysosomen abgebaut (Braulke 1999). Somit reguliert der IGF-IIR die extrazelluläre Konzentration von IGF-II (Oka et al. 1985). Aufgrund des erhöhten IGF-II-Spiegels haben IGF2r-Knockout-Mäuse ein um 30% gegenüber dem Wildtyp erhöhtes Körpergewicht (Wang et al. 1994b). In Tumoren kommt es häufig zu einem Funktionsverlust des IGF-IIR (LeRoith & Roberts, Jr. 2003), da das IGF-IIR Gen in seiner kodierenden Sequenz Mikrosatelliten beinhaltet, in der häufig Mutationen nachgewiesen werden (Yin et al. 1997). Durch den Funktionsverlust des IGF-IIR kommt es einerseits zu einem Anstieg von IGF-II (Freier et al. 1999), andererseits wird latentes TGF- β in seine aktive Form übergeführt (Dennis & Rifkin 1991), wodurch es zu einer Erhöhung der Zellproliferation kommt. Aufgrund dessen kommt dem IGF-IIR eine Funktion als Tumorsuppressor zu (Hankins et al. 1996).

2.2.3 Die IGF-Bindungsproteine

Die IGFs sind in der Zirkulation nicht frei, sondern an Bindungsproteine gebunden. Insgesamt sind sechs hochaffine Bindungsproteine (IGFBP-1 bis -6) charakterisiert (Firth & Baxter 2002).

2.2.3.1 Struktur und Bindungsmotive der IGFBPs

Die Gene der IGFBPs bestehen aus vier Exons, wobei IGFBP-3 ein weiteres nicht-translatiertes Exon aufweist. Exon 1 kodiert vor allem die N-terminale Domäne, Exon 2 die Linker-Region und die Exons 3 und 4 die C-terminale Domäne (Hwa et al. 1999). Die chromosomale Lokalisation und Größe der Gene, die mRNA-Transkriptlängen sowie das Molekulargewicht und die Aminosäuren-Anzahl der Proteine der menschlichen IGFBPs sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Charakteristika der menschlichen IGF-BPs

IGF-Bindungsprotein	Chromosomale Lokalisation	Gengröße (kb)	mRNA-Größe (kb)	Molekulargewicht (kDa) ^a	Aminosäureanzahl ^b
IGFBP-1	7p	5,2	1,6	25,3	234
IGFBP-2	2q	32,0	1,5	31,4	289
IGFBP-3	7p	8,9	2,4	28,7	264
IGFBP-4	17q	15,3	1,7	26,0	237
IGFBP-5	2q	33,0	1,7; 6,0	28,6	252
IGFBP-6	12	4,7	1,1	22,8	216

Modifiziert nach Ehrenborg et al. 1999; Hwa et al. 1999

^a Molekulargewicht des unglykosylierten Proteins; ^b Aminosäureanzahl des reifen Proteins

Die IGF-Bindungsproteine weisen eine ähnliche Primärstruktur sowie hochkonservierte N- und C-terminale Domänen auf, die durch eine variable Linker-Region (L-Domäne) getrennt werden (Firth & Baxter 2002). Die C- und N-terminalen Domänen sind relativ Cystin-reich. Dabei enthält die N-terminale Domäne von IGFBP-1 bis -5 zwölf bzw. die von IGFBP-6 zehn Cystinreste und die C-terminale Domäne von IGFBP-1 bis -6 sechs Cystin-Reste (Hwa et al. 1999; Bach et al. 2005). Disulfidbrücken bestehen jeweils innerhalb der C- und der N-terminalen Domäne, aber nicht zwischen diesen (Bach et al. 2005). Sowohl die N- als auch die C-terminale Domäne ist für die Bindung zu IGF-I bzw. -II relevant (Bach et al. 2005), während die L-Domäne nicht an der IGF-Bindung direkt beteiligt ist. Vielmehr finden in dieser Region posttranslationale Modifikationen und proteolytische Spaltung der IGFBPs statt, auf die in Abschnitt 2.2.3.2 detailliert eingegangen wird (Firth & Baxter 2002; Bunn & Fowlkes 2003).

2.2.3.2 Posttranslationale Modifikationen und Proteolyse der IGFBPs

Die biologische Aktivität der IGFBPs wird durch posttranslationale Glykosylierung, Phosphorylierung sowie proteolytische Spaltung moduliert. Diese Modifikationen finden zumeist innerhalb der Linker-Region der Bindungsproteine statt (Firth & Baxter 2002; Bunn & Fowlkes 2003).

Die Glykosylierung beeinflusst die Stabilität und Empfindlichkeit gegenüber proteolytischer Spaltung und die Halbwertszeit zirkulierender IGFBPs (Firth & Baxter 2002; Marinaro et al. 2000; Firth & Baxter 1999). Während IGFBP-1 und -2 unglykosyliert bleiben, werden IGFBP-3 und -4 N-glykosyliert und IGFBP-5 und -6 O-

glykosyliert. Eine posttranslationale Phosphorylierung findet bei IGFBP-1, -3 und -5 statt. Diese kann die Affinität der IGFbps zu den IGFs (Schedlich et al. 2003), ihre Empfindlichkeit gegenüber proteolytischer Spaltung ebenso wie die Halbwertszeit und Membranbindungseigenschaften beeinflussen (Coverley et al. 2000). Zudem führt eine Phosphorylierung von IGFBP-3 zu einer Hemmung der IGF-unabhängigen Apoptose (Hollowood et al. 2002). Die posttranslationalen Modifikationen sind gewebespezifisch und zellspezifisch, wodurch sich eine in Abhängigkeit vom Gewebe oder Zellkompartiment unterschiedliche IGFBP-Wirkung ergibt (Firth & Baxter 2002; Hwa et al. 1999).

Die proteolytische Spaltung kann durch unspezifische oder durch spezifische Proteasen für die IGFbps erfolgen. Zu den Proteasen zählen beispielsweise Plasmin (Lalou et al. 1997; Booth et al. 1996), Thrombin (Booth et al. 1996; Zheng et al. 1998), PSA (Fielder et al. 1994), PAPP-A (Conover et al. 1995; Overgaard et al. 2001; Lawrence et al. 1999), Cathepsine (Conover & De Leon 1994), Serinproteasen (Busby, Jr. et al. 2000) sowie Matrix Metalloproteinasen (Nakamura et al. 2005; Fowlkes et al. 1994). Die Sensitivität der IGFbps gegenüber einer Proteolyse wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Insbesondere ist diese von der Konformation der IGFbps abhängig. So wird die Proteolyse der IGFbps durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst (Coverley et al. 2000; Neumann et al. 1998; Gibson et al. 2001). Darüber hinaus kann die Bindung der IGFbps an die IGFs einen hemmenden Einfluss auf die Proteolyse von IGFbps haben, aber auch deren Proteolyse bewirken (Fowlkes et al. 1994; Qin et al. 2000; Fowlkes & Freemerk 1992; Gockerman & Clemmons 1995; Laursen et al. 2001). Zudem kann die IGF-Bindung auch durch intakte IGFbps sowie deren Fragmente gehemmt werden, wobei hier die HBD-Domäne von Bedeutung zu sein scheint (Bunn & Fowlkes 2003; Zhang et al. 2002). Desweiteren nehmen Interaktionen der IGFbps mit anderen Proteinen, wie beispielsweise Proteoglykanen der Zellmembran oder Proteinen der ECM, einen positiven oder negativen Einfluss auf die proteolytische Spaltung (Jones et al. 1993a).

Die Spaltung der IGFbps führt zur Entstehung von Fragmenten, die eine verminderte bzw. fehlende Affinität zu den IGFs haben und somit die Bioverfügbarkeit der IGFs steuern können (Clemmons et al. 1998; Clemmons et al. 1993; Conover 1995). Zudem entstehen durch die proteolytische Spaltung aber auch neue bioaktive Fragmente. Diese können wiederum zum Teil über IGF-unabhängige Mechanismen

eigene Wirkungen entfalten (Firth & Baxter 2002; Bunn & Fowlkes 2003; Hoeflich et al. 2004), was bereits für ein N-terminales Fragment von IGFBP-5 (Andress et al. 1993) und ein C-terminales Fragment von IGFBP-4 (Fernandez-Tornero et al. 2005) gezeigt werden konnte. Die proteolytische Degradation der IGFBPs ist auch unter pathologischen Bedingungen von Relevanz. So führen katabole Bedingungen im Allgemeinen zu einer erhöhten Proteolyse (Davenport et al. 1992). Auch bei Tumorerkrankungen scheinen die Proteasen eine große Bedeutung zu haben, da Tumore Proteasen produzieren können. Beipielsweise wurde eine erhöhte Proteolyse von IGFBP-3 im Serum Leukämie-kranker Kinder sowie von Brustkrebspatientinnen festgestellt (Muller et al. 1994a; Helle et al. 2001).

2.2.3.3 IGF-abhängige und -unabhängige Effekte der IGFBPs und deren Bedeutung in der Karzinogenese

Die IGFBPs haben eine hohe Affinität zu den Wachstumsfaktoren IGF-I und -II, die deren Affinität zu den IGF-Rezeptoren übersteigt (Mazerbourg et al. 2004). Sie fungieren nicht nur als Transport-Proteine der IGFs in der Blutbahn und in anderen Körperflüssigkeiten, sondern können vor allem auch die Halbwertszeit der IGFs erhöhen bzw. deren Degradation verhindern und damit die biologische Verfügbarkeit und Aktivität der IGFs modulieren (Hwa et al. 1999; Guler et al. 1989). An ein IGF-Bindungsprotein gebundenes IGF stellt keinen Liganden für den IGF-Rezeptor dar und kann daher kein Signal auslösen (Kelley et al. 1996). Somit können die IGFBPs die Wirkung der IGFs hemmen. Ein solcher Effekt existiert für alle IGFBPs (Firth & Baxter 2002; Baxter 2000; Clemmons 1997; Silha & Murphy 2002). Neben der Hemmung von IGF-Effekten ist für einige der IGF-Bindungsproteine auch eine Verstärkung der IGF-Wirkung beschrieben (Mohan et al. 1995; Clemmons et al. 1998; Clemmons et al. 1993). Diese ist vom Gewebe sowie vom physiologischen bzw. pathologischen Status abhängig und wird auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Abgesehen von den oben genannten IGF-abhängigen Effekten können die IGFBPs ihre Wirkung auch IGF-unabhängig entfalten. Solche Effekte werden zum einen IGFBP-Fragmenten (Firth & Baxter 2002) und zum anderen definierten Proteinbindungsdomänen (Jones et al. 1993b, Russo et al. 2005) einiger Bindungsproteine zugeschrieben. Zudem kann die IGF-unabhängige Wirkung der IGFs auch über postulierte IGFBP-Rezeptoren (Andress 1998; Leal et al. 1997)

sowie die Lokalisation der IGF-Bindungsproteine im Kern und die Interaktion mit Modulatoren der Transkription (Amaar et al. 2002; Liu et al. 2000a) erfolgen. Die dargestellten Wirkungsmechanismen sind auch in der Karzinogenese relevant (Durai et al. 2005; Firth & Baxter 2002). Auf die Bedeutung der einzelnen IGFBPs in der Karzinogenese wird im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben, wobei auf IGFBP-2 im nächsten Kapitel ausführlich eingegangen wird.

Für IGFBP-1 sind sowohl hemmende als auch fördernde Effekte der IGF-Wirkung beschrieben (Hunt et al. 2002). Zudem kann IGFBP-1 die Zellmigration IGF-unabhängig über $\alpha 5\beta 1$ -Integrine stimulieren (Jones et al. 1993b). Die genaue Rolle von IGFBP-1 in der Kolonkarzinogenese ist derzeit allerdings noch unklar (Durai et al. 2005). IGFBP-3 kann die Wirkung der IGFs ebenfalls hemmend oder fördernd modulieren (Jones & Clemmons 1995; Firth & Baxter 2002). Zusätzlich gibt es wachstumshemmende Effekte von IGFBP-3, die IGF-unabhängig sind (Firth & Baxter 2002) und über Zelloberflächenproteine und -rezeptoren (Leal et al. 1997; Booth et al. 1995; Fowlkes & Serra 1996; Smith et al. 1994b), nukleäre Translokation (Grimberg & Cohen 2000) oder spezifische IGFBP-3 Rezeptoren vermittelt werden. Hierzu zählt beispielweise die Induktion der Apoptose nach Schädigung der DNA (Williams et al. 2000; Howarth 2003). Zudem wird eine direkte Interaktion von IGFBP-3 mit dem IGF-IR diskutiert (Mohseni-Zadeh & Binoux 1997). Für IGFBP-4 werden vor allem hemmende Effekte, die IGF-abhängig sind, beschrieben (Zhou et al. 2003). IGFBP-4 kommt daher eine Rolle als potenter Inhibitor der mitogenen Effekte von endogenem und exogenem IGF zu (Singh et al. 1994a). Interessanterweise kann IGFBP-4 die Koloniebildung von Kolonkrebszellen durch IGF-unabhängige Mechanismen auch hemmen (Diehl et al. 2004). IGFBP-5 vermag die Wirkung der IGFs nicht nur zu hemmen, sondern durch Binden an die extrazelluläre Matrix auch zu steigern (Andress & Birnbaum 1992). Die Proliferation von Prostatakrebszellen kann nicht nur IGF-abhängig, sondern auch IGF-unabhängig stimuliert werden. Andererseits kann IGFBP-5 das Wachstum von Osteosarkomzellen auch inhibieren (Schneider et al. 2002). Wie IGFBP-3 kann auch IGFBP-5 in den Zellkern translozieren (Schedlich et al. 1998; Li et al. 1997). Die genaue Rolle von IGFBP-5 in der Tumorgenese scheint jedoch noch nicht vollständig geklärt zu sein (Durai et al. 2005). Für IGFBP-6 sind bislang nur IGF-abhängige Effekte bekannt (Durai et al. 2005; Firth & Baxter 2002). Aufgrund der hohen Affinität zu IGF-II (Oh et al. 2001)

hemmt IGFBP-6 die mitogenen Effekte von IGF-II in Tumorzellen (Leng et al. 2001b; Kim et al. 2002).

2.2.4 Das Bindungsprotein IGFBP-2

2.2.4.1 Bindungsdomänen von IGFBP-2

Anknüpfend an die in Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen strukturellen Aspekte und Bindungsdomänen der IGFBPs wird in diesem Kapitel auf spezifische, relevante Bindungsmotive von IGFBP-2 eingegangen. Für die Bindung zu IGF ist sowohl die C-terminale als auch die N-terminale Domäne von IGFBP-2 relevant, wobei die Bindungsaffinität der C-terminalen Domänen zu den IGFs höher ist (Carrick et al. 2001). Für diese Bindungseigenschaft ist in der N-terminalen Domäne die Position Tyr⁶⁰ (Hobba et al. 1996) und in der C-terminalen die Positionen 222-284 wichtig (Forbes et al. 1998). Wie eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, ist die Struktur der C-terminalen Domäne von IGFBP-2 gerade aufgeschlüsselt worden (Kuang et al. 2006).

Wie IGFBP-1 (Jones et al. 1993b) verfügt auch IGFBP-2 über ein RGD-Motiv (Asp-Gly-Asp), über das diese Bindungsproteine an $\alpha 5\beta 1$ -Integrine binden und darüber die Migration von Zellen beeinflussen können (Wang et al. 2006a; Schutt et al. 2004). Analog zu IGFBP-3 und -5 weist auch IGFBP-2 ein Heparin-Bindungsmotiv (HBD) auf, über das eine Interaktion mit Glykosaminoglykanen und mit der ECM erfolgen kann (Marinero et al. 2000; Booth et al. 1995; Fowlkes & Serra 1996; Smith et al. 1994b; Arai et al. 1996b; Arai et al. 1996a; Russo et al. 1997; Russo et al. 2005). Hierbei wurden die Positionen Lys²²⁷, His²²⁸, Asn²³², Leu²³³, Lys²³⁴ und His²⁷¹ als Heparin-Bindungsstellen von IGFBP-2 vorgeschlagen (Kuang et al. 2006). Interessanterweise wurde kürzlich festgestellt, dass die Ladung der HBD-Domäne vom pH-Wert abhängig ist, wobei in leicht saurem Milieu (pH 6,0) die HBD-Domäne an Proteoglykane der ECM binden könnte. Diese pH-Wert-Abhängigkeit könnte für die besondere Funktion von IGFBP-2 in Tumoren von großer Bedeutung sein, da Tumoren aufgrund der erhöhten Glykolyse ein leicht saures Milieu haben (Gatenby & Gillies 2004). Im Tumor überexprimiertes IGFBP-2 bzw. dessen C-terminale Fragmente (siehe auch 2.2.4.3) könnten daher bevorzugt an Glykosaminoglykane binden, wohingegen diese Bindung im pH-neutralen normalen Gewebe nicht zu erfolgen scheint (Kuang et al. 2006).

2.2.4.2 Regulation der IGFBP-2-Expression

Die Regulation der IGFBP-2-Expression ist komplex und wird in den unterschiedlichen Zelltypen von verschiedenen Faktoren insbesondere Wachstumsfaktoren und Hormonen beeinflusst. Der zell- bzw. gewebespezifische Einfluss dieser Faktoren auf die IGFBP-2-Expression wurde in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben. Angesichts der Fülle an Einflussfaktoren werden diese zur besseren Übersicht auf der folgenden Seite in Tabelle 2.2 separat dargestellt.

2.2.4.3 Proteolyse von IGFBP-2

Neben der Regulation der Transkription wird die Konzentration von IGFBP-2 auch durch proteolytische Degradation modifiziert. Die Erläuterungen dieses Kapitels knüpfen an die in Abschnitt 2.2.3.2 dargestellten Mechanismen zur Proteolyse der IGFBPs an. Die Proteolyse von IGFBP-2 wurde in der humanen Muttermilch (Ho & Baxter 1997a), im Serum (McCusker et al. 1991) und im Liquor cerebrospinalis (Roghani et al. 1989) nachgewiesen, was mit einer geringeren Affinität der IGFBP-2-Fragmente zu den IGFs verbunden war. In glatten Muskelzellen scheint die IGFBP-2-Proteolyse durch eine Ca^{2+} -abhängige Serinprotease verursacht zu werden, deren Aktivität IGF-II-abhängig ist (Gockerman & Clemmons 1995; Cohick et al. 1995). In Neuroblastomzellen wird die IGF-II-vermittelte autokrine Proliferation durch die Plasmin-induzierte proteolytische Spaltung von IGFBP-2 kontrolliert (Menouny et al. 1997). Während der Follikel-Reifung im equinen Ovar ist eine erhöhte proteolytische Degradation von IGFBP-2 durch PAPP-A zu finden (Gerard et al. 2004). Auch unter malignen Bedingungen scheint der Proteolyse von IGFBP-2 eine große Bedeutung zuzukommen. Eine Spaltung von IGFBP-2 durch Proteasen wurde beispielsweise in Osteosarkomzellen beschrieben (Koutsilieris et al. 1993). Ebenso wurde im Kolon eine hohe proteolytische Aktivität in Extrakten von malignen Geweben gefunden (Michell et al. 1997b). Die von Krebszellen produzierten Proteasen können zur Entstehung von IGFBP-2-Fragmenten mit einer geringeren Affinität zu den IGFs führen (Russo et al. 1999) und dadurch, nach der Freisetzung der IGFs, dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschaffen (Menouny et al. 1997; Michell et al. 1997b).

Tabelle 2.2: Einflussfaktoren der IGFBP-2 Expression

Faktor	Zelltyp / Gewebe	Spezies	IGFBP-2-Expression	Literaturquelle
FGF-2	NNR-Karzinomzellen	Mensch	-	(Boulle et al. 2000)
GH	Milz	Ratte	+	(Yakar et al. 1994)
	Pankreastumor	Mensch	+	(Katz et al. 1996)
	Serum	Mensch	-	(Kassem et al. 1998)
IGF-I	Brustkrebszelle	Mensch	+	(Adamo et al. 1992)
		Mensch	+	(Shemer et al. 1993)
		Mensch	+	(Sheikh et al. 1993)
	Gliomzellen C6	Maus	+	(Wang et al. 1997)
	Nierenfibroblasten	Mensch	+	(Boisclair et al. 1994)
		Maus	+	(Camacho-Hubner et al. 1991)
IGF-II	Leukämie T-Zellen	Mensch	+	(Wulbrand et al. 2000)
		Maus	+	(Wolf et al. 1994)
		Maus	+	(Rogler et al. 1994)
Insulin	Nierenfibroblasten	Mensch	+	(Boisclair et al. 1994)
Platelet-activating factor	Gebärmutterkrebszellen HEC-1A	Mensch	+	(Giannini et al. 1996)
Androgen	Prostata	Ratte	-	(Nickerson & Pollak 1999)
Dihydrotestosteron	Prostatakarzinomzellen LNCaP	Mensch	+	(Martin & Pattison 2000)
HCG	Brustdrüse	Ratte	+	(Huynh 1998)
	Leydigzellen	Ratte		(Wang et al. 1994a)
Östrogen	Brustkrebszellen	Mensch	+	(Clemmons et al. 1990)
		Mensch	-	(Dubois et al. 1995)
		Ratte	-	(Korc-Grodzicki et al. 1996)
FSH	Granulosa Zellen	Rind	-	(Armstrong et al. 1998)
TGF- β	IEC-6 Zellen	Ratte	+	(Guo et al. 1995)
Retinolsäure	Brustkrebszellen	Mensch	+	(Adamo et al. 1992)
		Mensch	+	(Shemer et al. 1993)
		Mensch	+	(Sheikh et al. 1993)
	Neuroblastomzellen	Mensch	+	(Bernardini et al. 1994)
Kurzkettige Fettsäuren	Caco-2 -Zellen	Mensch	+	(Nishimura et al. 1998)
N-myc	Neuroblastomzellen	Mensch	+	(Chambery et al. 1999)
Glucocorticoide	alveolären Lungenepithelzellen	Ratte	+	(Mouhieddine et al. 1996)
NF κ B	alveolären Lungenepithelzellen	Ratte	+	(Cazals et al. 1999)

Interessanterweise wurden im perinukleären Kompartiment verschiedener Organe von IGFBP-2-transgenen und nicht-transgenen Mäusen neben intaktem IGFBP-2 C-terminale Fragmente von IGFBP-2 gefunden (Hoeflich et al. 2004). Die Entstehung und Funktion dieser evolutionär hoch konservierten Fragmente am Zellkern ist allerdings bislang noch unklar.

2.2.4.4 Effekte von IGFBP-2

In den beiden folgenden Unterkapiteln wird die Wirkung von IGFBP-2 *in vitro* und *in vivo* separat dargestellt. Dabei wird auf die Wirkung von IGFBP-2 unter normalen und malignen Bedingungen eingegangen. Zusätzlich werden IGF-abhängige und IGF-unabhängige Wirkmechanismen aufgezeigt.

2.2.4.4.1 IGF-abhängige und IGF-unabhängige Effekte *in vitro*

Eine wachstumshemmende Wirkung von IGFBP-2 konnte in mehreren *in vitro* Studien klar gezeigt werden. So führt eine Überexpression von IGFBP-2 zu einer IGF-abhängigen Hemmung der Proliferation humaner embryonaler Nierenfibroblasten, die durch die Zugabe von exogenem IGF wieder vollständig aufgehoben werden kann (Hoflich et al. 1998). Eine Reihe weiterer *in vitro*-Arbeiten weisen ebenfalls auf einen IGF-abhängigen negativen Effekt von IGFBP-2 auf die Zellproliferation hin (Reeve et al. 1992; Michell et al. 1997a; Park et al. 1992; Singh et al. 1994b; Corkins et al. 1995). IGFBP-2 wird von verschiedenen Tumorzelllinien sezerniert, zu denen beispielsweise Ovarialkarzinomzellen SKOV3 (Lee et al. 2005), Glioblastomzellen Brust-, Pankreas-, Lungen-, Blasen-, Prostata-, Nebennierenrindenzellen (NC-H295R) und Kolonkarzinomzellen (Caco-2) zählen (Hoeflich et al. 2001b). In diesen Tumorzellen werden neben hemmenden auch stimulierende Effekte auf das Wachstum beschrieben. Zum Beispiel hemmt IGFBP-2 die mitogenen Eigenschaften der IGFs in Lungenkrebszellen (SCLC, small-cell lung carcinoma) (Reeve et al. 1993). Eine Reduzierung der Proliferation durch IGFBP-2 wurde auch in humanen Neuroblastomzellen (Babajko et al. 1997; Cianfarani et al. 1996) und in Gliomazellen der Zelllinie C6, die nach einer Transfektion IGFBP-2 exprimierten, (Bradshaw et al. 1999) beobachtet. Diese Effekte sind auf eine Hemmung der mitogenen Wirkung der IGFs zurückzuführen, da freies IGFBP-2 mit den IGF-Rezeptoren um die Bindung der IGFs konkurriert. Neben der

Hemmung der IGF-Wirkung kann IGFBP-2 als Transporter der IGFs deren Wirkung aber auch verstärken, indem es diese an den IGF-I Rezeptor befördert oder die IGFs vor der Proteolyse schützt (Ranke & Elmlinger 1997). In Tumoren ist IGFBP-2 häufig Zellmembran-assoziiert. Diese perizelluläre Lokalisation (Schutt et al. 2004; Russo et al. 1999; Pereira et al. 2004) scheint für die IGF-vermittelte prokarzinogene Wirkung relevant zu sein (Russo et al. 2005). Der Proliferations-fördernde Effekt von IGFBP-2 wurde in Osteosarkomzellen (Slootweg et al. 1995) sowie in Y-1 Tumorzellen der Nebennierenrinde beobachtet, welche zudem eine erhöhte Koloniebindung zeigten (Hoeflich et al. 2000). In einer aktuellen Studie wurde ein wachstumsstimulierender Effekt durch exogenes IGFBP-2 in epithelialen NIH-OVCAR3 Ovarialkrebszellen aufgezeigt (Chakrabarty & Kondratik 2006).

Neben IGF-abhängigen Effekten kann IGFBP-2 seine Wirkung auch IGF-unabhängig entfalten. Dabei wird die IGF-unabhängige Wirkung von IGFBP-2 vor allem durch Interaktion von IGFBP-2 mit Komponenten der ECM sowie mit Integrinen und Proteoglykanen der Zellmembran vermittelt, die Proliferation und insbesondere die Adhäsion und Migration von Zellen beeinflussen können (Schutt et al. 2004; Russo et al. 1997; Russo et al. 2005; Pereira et al. 2004). Diese IGF-unabhängigen Effekte von IGFBP-2 warfen neues Licht auf die zellulären Funktionen von IGFBP-2 (Frommer et al. 2006). IGFBP-2 kann über seine RGD-Sequenz spezifisch an $\alpha 5\beta 1$ -Integrinen binden und über Modulation des intrazellulären Signalings die Proliferation und Migration von Tumorzellen fördern (Schutt et al. 2004). Hierbei konnte auch eine Dephosphorylierung von FAK und MAPK festgestellt werden (Schutt et al. 2004). IGFBP-2 kann mit $\alpha \beta 3$ -Integrinen aber auch RGD-unabhängig interagieren und dadurch die IGF-vermittelte Migration in $\alpha \beta 3$ -überexprimierenden Brustkrebszellen der Linie MCF-7 (MCF-7 $\beta 3$) hemmen (Pereira et al. 2004). Über seine HBD-Domäne kann IGFBP-2 mit ECM-Komponenten interagieren und dadurch in Neuroblastomzellen die Zellmigration sowie die Invasion verstärken (Russo et al. 2005). Russo konnte hierbei auch zeigen, dass in diesem Modell die RDG-Sequenz nicht für die Bindung an die ECM verantwortlich zu sein scheint.

IGFBP-2 hat im nicht malignen Kontext zumeist einen negativen Effekt, wohingegen in Tumorzellen häufig Tumor-fördernde Wirkungen beschrieben werden. Der konditionale Effekt von IGFBP-2 wurde durch die Arbeit von Moore et al. in Prostatazellen aufgezeigt. Hier hatte IGFBP-2 einen hemmenden Effekt auf das Wachstum von nicht transformierten Prostatazellen, aber einen

wachstumsstimulierenden Effekt auf Prostata-Krebszellen (Moore et al. 2003). Ein möglicher Mechanismus für den konditionalen Effekt von IGFBP-2 wurde kürzlich diskutiert (Kuang 2006). IGFBP-2 ist nicht nur an der Zelloberfläche (Schutt et al. 2004; Russo et al. 2005; Pereira et al. 2004), sondern auch zytoplasmatisch und perinukleär lokalisiert (Hoeflich et al. 2004) und zeigt eine gemeinsame intrazelluläre Lokalisation und Interaktion mit dem Zellzyklusinhibitor p21 während der Wachstumshemmung (Terrien et al. 2005).

IGFBP-2 kann die Expression von Genen fördern, deren Produkte für die Invasion von Tumoren relevant sind. Hierzu zählt die Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2), deren Expression in Glioblastomzellen (Wang et al. 2003) sowie in Blasenkrebszellen (Miyake et al. 2005) durch eine Überexpression von IGFBP-2 hochreguliert wird. Die MMPs spielen eine bedeutende Rolle in der Degradation der ECM (Matrisian 1992). Darüber hinaus regulieren sie die intrazelluläre Zellsignaltransduktion über Aktivierung/Inaktivierung von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren von Zelladhäsionsmolekülen (Chirco et al. 2006). Neben MMP2 werden auch TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) und Faktoren der ECM sowie Integrine durch eine IGFBP-2-Überexpression in Glioblastomzellen hochreguliert (Wang et al. 2003). TIMPs sind Inhibitoren der MMPs, die bei verschiedenen Tumorerkrankungen neben den MMPs häufig auch hochreguliert werden (Yoshiji et al. 1996; Kossakowska et al. 1991). TIMP1 ist beim Kolonkarzinom und vor allem bei Brustkrebs mit einer schlechten Prognose assoziiert (McCarthy et al. 1999; Ree et al. 1997; Schrohl et al. 2004; Zeng et al. 1995). Darüber hinaus induziert IGFBP-2 das Invasions-hemmende Protein 45 (IIP45), das als Bindungsprotein für IGFBP-2 das Invasionspotential von Glioblastomzellen reduziert (Song et al. 2003). In IGF-unabhängigen Brustkrebszellen fördert IGFBP-2 die Transkription von Proliferations-hemmenden, Apoptose-induzierenden sowie Zelladhäsions-relevanten Genen (Frommer et al. 2006).

2.2.4.4.2 Wirkung von IGFBP-2 in vivo

In vivo konnte eine Hemmung des postnatalen Wachstums von Körper und Organen durch im IGFBP-2-transgenen Mausmodell gezeigt werden (Hoeflich et al. 1999). In IGFBP-2-transgenen Mäusen ist unter der Kontrolle des CMV-Promotors eine Überexpression von IGFBP-2 in fast allen Organen auf mRNA- und Protein-Ebene zu

finden. Im Serum sind die IGFBP-2-Werte um etwa das 3-fache erhöht. Ab der dritten Lebenswoche wurden reduzierte Massen des Körpers sowie von Karkasse, Niere, Pankreas und Milz messbar. Da IGF-I-transgene Mäusen eine entsprechende Gewichtssteigerung in denselben Organen aufweisen, scheint IGFBP-2 die Wirkung von IGF-I zu antagonisieren. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass GH-transgene Mäuse, deren IGF-I-Spiegel um das 2- bis 3-fache erhöht ist, nach der Verpaarung mit IGFBP-2-transgenen Mäusen ein noch deutlicher reduziertes Wachstum aufweisen (Hoeflich et al. 2001a). IGFBP-2 scheint somit, durch die Bindung von IGFs und die daraus resultierende Blockierung der über die IGF-Rezeptoren vermittelten Wirkung, ein negativer Regulator des Wachstums zu sein (Hoeflich et al. 2001b). IGFBP-2 kann die Wirkung von IGF-I und -II hemmen, indem es mit den IGF-Rezeptoren um die Bindung der IGF konkurriert. Dabei hat IGFBP-2 eine höhere Affinität zu IGF-II als zu IGF-I (Jones & Clemmons 1995; Carrick et al. 2001). Der hemmende Effekt von IGFBP-2 auf das Wachstum wurde zudem im *igfbp2*-Knock-out-Modell durch erhöhte Lebergewichte männlicher Mäuse deutlich (Wood et al. 1993; Wood et al. 2000). Da das Leberwachstum hauptsächlich durch GH gesteuert wird und IGF-I-transgene Mäuse ein unverändertes Lebergewicht haben (Mathews et al. 1988), kann ein hemmender Effekt von IGFBP-2 sogar auf die Wirkung von GH diskutiert werden. Dass die zelladhäsiven sowie auch die wachstumshemmenden Eigenschaften von IGFBP-2 unter normalen Bedingungen nicht von der RGD-Domäne abhängig sind, konnte in einem RGE-IGFBP-2-transgenen Mausmodell gezeigt werden, in dem die RGD-Sequenz durch eine RGE-Sequenz ersetzt ist (Hoeflich et al. 2002). Über die Funktion von IGFBP-2 in Tumormodellen der Maus ist bislang kaum etwas bekannt. IGFBP-2 scheint aber nach Interaktion mit $\alpha\beta 1$ -Integrinen das IGF-abhängige Tumorwachstum von Balb/c nu/nu Mäusen nach Inokulation von Brustkrebszellen zu reduzieren (Pereira et al. 2004).

Die Bedeutung von IGFBP-2 für Patienten des CRC wurde in vielen klinischen Studien untersucht und wird im Folgenden dargestellt. Das Risiko der Krebsentstehung scheint durch den IGFBP-2-Serumspiegel nicht erhöht zu werden. So wird etwa das Prostatakrebs-Risiko nicht durch die Höhe des IGFBP-2 Serumspiegels beeinflusst (Stattin et al. 2000). Für das Kolonkrebsrisiko wurde in einer Studie eine neutrale Rolle der IGFBP-2-Serumkonzentration gefunden (Palmqvist et al. 2003), wohingegen in einer anderen Studie hohe IGFBP-2-Spiegel

mit einem geringeren Kolonkrebsrisiko verbunden waren (Kaaks et al. 2000). Bei Patienten, bei denen sich die Krebserkrankung manifestiert hat, ist hingegen häufig ein Anstieg des IGFBP-2-Serumspiegels zu beobachten. So wurden erhöhte IGFBP-2-Serumspiegel bei Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom (HCC) (Ranke et al. 2003), Ovarialkrebs (Flyvbjerg et al. 1997; Lancaster et al. 2006), Prostatakarzinom (Cohen et al. 1993), Lungenkrebs (Lee et al. 1999) oder Nebennierenrindenzarzinom (Boulle et al. 1998) gefunden. Zudem steigt IGFBP-2 bei Gehirntumor-Patienten auch im Liquor cerebrospinalis (Muller et al. 1994b; Zumkeller & Westphal 2001) und bei Ovarialkrebspatienten in der Zystenflüssigkeit an (Karasik et al. 1994).

Bei CRC-Patienten ist der IGFBP-2-Serumspiegel verändert. Die Entstehung kolorektaler Adenome ist mit einem Anstieg von IGFBP-2 verbunden. Dabei korreliert die IGFBP-2-Konzentration wiederum mit der IGF-II-Konzentration (Renehan et al. 2000b). Nach der Resektion der Adenome fällt die IGFBP-2-Serumkonzentration ab, was mit einem Rückgang an IGF-II verbunden ist (Renehan et al. 2000b). Bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen werden ebenfalls erhöhte IGFBP-2-Werte im Serum gemessen (Kim et al. 2002), die zudem mit dem Grad der Malignität positiv korrelieren. Dabei ist der Anstieg von IGFBP-2 bei Tumoren des Duke Stage C oder späteren CRC-Stadien nicht mehr mit einer Erhöhung des IGF-II Serumspiegels verbunden (Renehan et al. 2000a). Zudem scheint IGFBP-2 die Tumormass zu widerspiegeln, da IGFBP-2 mit der Größe des Karzinoms korreliert und nach dessen kurativer Resektion abfällt (Renehan et al. 2000a).

Im Tumorgewebe selbst wird IGFBP-2 häufig verstärkt exprimiert. Dies konnte im malignen Gewebe des Magens (He et al. 2005), der Ovarien (Lancaster et al. 2006), des Gehirns (Elmlinger et al. 2001) und der Prostata (Richardson et al. 2003; Tennant et al. 1996) beobachtet werden. Zudem konnte eine starke Protein-Expression im fortgeschrittenen Ovarialkarzinom (*high-grade serous ovarian cancer*) gefunden werden (Wang et al. 2006b). In Kolontumoren wird IGFBP-2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verstärkt exprimiert (Kim et al. 2002; Mishra et al. 1998; Miraki-Moud et al. 2001). Wie bereits erwähnt korreliert der Anstieg an IGFBP-2 oft mit dem Grad der Malignität. Dieser Zusammenhang wurde bei Tumorerkrankungen der Nebennierenrinde (Boulle et al. 2001), der Prostata (Kaplan et al. 1999; Tennant et al. 1996) sowie auch beim Kolonkarzinom gezeigt. Bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (Dukes Stage C) ist IGFBP-2 stärker exprimiert als in früheren Tumorstadien (Mishra et al. 1998). Außerdem konnten Mishra *et al.*

zeigen, dass IGFBP-2 in den Tumorzellen und nicht in den Zellen des Stromas lokalisiert ist, was für eine autokrine Funktion von IGFBP-2 spricht (Mishra et al. 1998). Darüber hinaus korreliert die Serum-IGFBP-2-Konzentration mit spezifischen Tumormarkern des Hepatozellulären Karzinoms (α -Fetoprotein) (Ranke et al. 2003), des Prostatakarzinoms (prostataspezifisches Antigen) (Kanety et al. 1993; Ho & Baxter 1997b) sowie des epithelialen Ovarialkarzinoms (CA125 und Tumor-assoziiertes Trypsin-Inhibitor) (Flyvbjerg et al. 1997). Auch beim CRC wurde eine Korrelation von IGFBP-2 im Serum mit dem spezifischen Marker CEA beschrieben (Renehan et al. 2000a). Daher wurde IGFBP-2 als möglicher prognostischer Marker diskutiert, der in Kombination mit anderen Markern eine höhere Sensitivität zeigt (Hoeflich et al. 2001b; Renehan et al. 2000a).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

7700 Sequence Detection System ABI PRISM™	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Mettler AE 200	Mettler Toledo GmbH, Giessen
Automatische Pipette EDOS 5222	Eppendorf, Hamburg
Automatischer Sequenzierer ABI PRISM™377 PE	Applied Biosystems, Darmstadt
Gewebe-Homogenisator (Art-Micro D8)	ART Labortechnik, Mühlheim
Histo Embedder	Leica, Heidelberg
Illuminator Eagleeye II	Stratagene, Heidelberg
Magnetrührer IkaMag® RCT	Ika Labortechnik, Staufen
Microm Einbettautomat HMP 300	Zeiss, Jena
Mikroskop & halbautomatisches Bildanalysegerät	Zeiss, Jena
Mikrowellendruckkochtopf	Nordi Ware Minneapolis MN, USA
Optimas Software	PC-Systeme Stemmer, Puchheim
Rotationsmikrotom für Paraffinschnitte	Leica, Heidelberg
Schüttler KS 250 basic	Ika Labortechnik, Staufen
Thermocycler Uno II	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., NY, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG Zürich, Schweiz
Waage PM 3000	Mettler, Schweiz
Zentrifuge 3200	Eppendorf Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf Hamburg
Zentrifuge GS-15R	Beckman, München

3.1.2 Chemikalien

1,2-Dimethylhydrazin	Sigma, Deisenhofen
Agarose, ultra pure	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose 3:1	Amresco, Ohio, USA
Äther (Narkose)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Riedel-de Hâen, Deisenhofen
Citronensäure	Merck, Darmstadt
DEPC	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 1%	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaiser's Gelantine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
NaOH (2 N)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN, Irvine, CA USA
RNAlater™	Quiagen, Hilden
Rox 1 mM	Roche, Mannheim
Salzsäure (37%)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1 N	Merck, Darmstadt
SeaKem LE® Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Roth, Mannheim
Trizol™ Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

Tween-20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat)	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.3 Enzyme und Reagenzien

ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame
AmpErase® Uracil N-glycosylase (1 U/μl)	Applied Biosystems, Darmstadt
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame
DAB-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
DNA Polymerase I (E. coli) (10 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I, RNase-free (10 U/μl)	Roche, Mannheim
DTT 0,1 M	Invitrogen, Karlsruhe
Erststrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe
Fast Start TaqMan® Probe Master	Roche, Mannheim
Hotstar DNA Polymerase Kit	Qiagen, Heiden
Proteinase K (20 mg/ml)	Boehringer, Mannheim
Random Hexamer Primers (3 μg/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
RNAlater™	Quiagen, Hilden
RNase-Inhibitor (40 U/μl) RNaseOUT™	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Rox Referenz Dye 1mM	Roche, Mannheim
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Heiden
Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Uracil-DNA-Glykosylase (1 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Wizard Kit	Promega, Madison, WI, USA
Zweitstrang-Puffer (5x) für cDNA	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Lösungen und Reagenzien

Lösungen und Puffer:

DEPC-H₂O (0,1%)

1 ml DEPC

1000 ml Aqua bidest.

2 h bei 37°C unter Rühren gelöst und autoklaviert

10x DNase I Verdau Puffer

250 mM Tris-HCl (pH 8,3)

375 mM KCl

15 mM MgCl₂

steril filtriert, autoklaviert und aliquotiert

Rox 10µM

Rox 1 mM, 1:100 verdünnt mit steril filtriertem Tris 0,1 M pH 8,0

50x TAE-Puffer

242 g Tris Base

57,1 ml Essigsäure

7,2 g Na₂EDTA-Dihydrat

ad 1000 ml aqua dest.

TE-Puffer für RNA-Messung

10 mM Tris-HCl, (pH 8,0)

1 mM EDTA

TE-Puffer für Mikrodialyse (pH 7,2)

1 ml 1mM Tris-HCl

20 µl 0,5 mM EDTA

ad 100 ml aqua dest; 1:4 verdünnt mit VE-Wasser

Injektionspuffer

1 mM EDTA

0,9% NaCl

steril filtriert (0,22 µm) und autoklaviert

Paraformaldehydlösung

20 mg Paraformaldehyd

1000 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5)

Im Wasserbad bei 55°C gelöst

0,05 M Tris-Puffer (pH7,6)

6,05 g Tris

40 ml 1M HCl

in 900 ml aqua dest. gelöst, den gewünschten pH-Wert mit HCl eingestellt und auf

1000 ml mit aqua bidest. aufgefüllt

10x Tris-HCl-Puffer pH 7,8

12,1 g Tris

20 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ **0,01 M PBS pH7,5**1,36 g KH_2PO_4

9 g NaCl

In 1000 ml aqua bidest gelöst: Lösung A

1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

9 g NaCl

In 1000 ml Aqua bidest gelöst: Lösung B

ca. 800 ml Lösung A mit ca. 200 ml Lösung B gemischt und pH auf 7,5 eingestellt

0,1 M PBS pH 7,517,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml aqua bidest gelöst: Lösung A13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml aqua bidest gelöst: Lösung B

ca. 800 ml Lösung A mit etwa 200 ml Lösung B gemischt und pH auf 7,5 eingestellt

10 mM Citratpuffer pH 6,0

19,2 g Citronensäure in 1000 ml aqua dest: Stammlösung A
29,4 g Natriumcitrat-Dihydrat in 1000 ml aqua dest: Stammlösung B
27 ml Stammlösung A und 123 ml Stammlösung B gemischt und nach Zugabe von
1,5 ml Tween 20 mit aqua dest. auf 1500 ml aufgefüllt und gut gemischt

TBS-Puffer (pH 7,6)

Stammlösung:

250 g NaCl: Stammlösung A
in 3000 ml aqua dest. Gelöst
181,71 g Tris: Stammlösung B
in 2400 ml aqua dest. gelöst; pH mit HCl auf 7,6 eingestellt und auf 3000 ml
aufgefüllt

Gebrauchslösung:

300 ml Stammlösung A
300 ml Stammlösung B
mit aqua dest. auf 3000 ml aufgefüllt

Blockierungs- und Antikörperverdünnungs-Puffer

190 ml TBS-Gebrauchslösung
10 ml Serum (Ziege)

Antikörper-Verdünnungen

Anti-Ki-67-TEC3: 1:100 mit TBS-Gebrauchslösung verdünnt, frisch angesetzt;
Anti-Cleaved Caspase-3 Asp175: 1:100/1:200 TBS-Gebrauchslösung, frisch
angesetzt
Anti- β -Catenin: 1:4000/1:10000 mit TBS-Gebrauchslösung verdünnt, frisch angesetzt
Anti-Ratte, Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus IgG: 5 μ l ad 1000 ml TBS-
Gebrauchslösung, aliquotiert und bei -20°C gelagert

Methylenblau

2 g Methylenblau
1000 ml 0,01M PBS (pH 7,5)
filtriert (Filter 520b $\frac{1}{2}$); vor jeder Färbung frisch angesetzt

Eosin-Lösung, gelblich 0,5%

1 g	Eosin
200 ml	Aqua dest
2 ml	Formalin 37%

Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich

2 g	Hämatoxylin
3 g	Kalium-Aluminium-Sulfat
0,4 g	Natriumjodat
10 ml	Eisessig
100 ml	Ethanol 95%
100 ml	Aqua dest
100 ml	Glycerin

mindestens 1 h gerührt und anschließend filtriert (Filter 520b $\frac{1}{2}$)

Hämatoxylin nach Meyers

1 g	Hämatoxylin
1 g	Zitronensäure
0,2 g	Natriumjodat
50 g	Kalium-Aluminium-Sulfat
50 g	Chloralhydrat

in 1000 ml aqua dest. gelöst und filtriert (Filter 520 b $\frac{1}{2}$)

Essigsäure

250 μ l	Eisessig
250 ml	aqua bidest.

H₂O₂-Methanol-Lösung

180 ml	Methanol
3 ml	Wasserstoffperoxid 30%

Salzsäure-Ethanol-Lösung

320 μ l	HCl 25%
250 ml	Ethanol 70%

Wasser:

Für PCR-Reaktionen wurde autoklaviertes und aliquotiertes Reinstwasser nach Ultrafiltration (Milli-RO Plus 60, Millipore, Schwalbach) eingesetzt. Für die Quantitative Real-time RT-PCR wurde PCR-Grade Water (Roche, Mannheim) verwendet.

3.1.5 MolekulargewichtstandardsMolekulargewichtstandards für DNA:

Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder Plus: SM0321/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Gene Ruler™ (100 bp DNA Ladder: SM0241/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth
pUC Mix Marker 8 (SM0301/2/3)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

Molekulargewichtstandards für RNA:

Ready-Load™ 1 Kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
-----------------------------	-----------------------

3.1.6 Sonstige Materialien

96-fach PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dialyse-Membranen Millipore (Porendurchmesser 0,025µm)	Millipore, Schwalbach
Einbettkassetten	Sakura Finetek BV Zoeterwoude, Niederlande
Faltenfilter, 520b½	Schleicher & Schüll, Dassel
Faltenfilter, fein	Schleicher & Schüll, Dassel
Filter Millex GP Porendurchmesser 0,22 µm	Millipore Express, Irland
Gel-Blotting Papier GB002/GB004	Schleicher & Schuell, Dassel

Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Klebefolie Adhesive PCR Foil Seals	ABgene, Hamburg
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, Dänemark
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger, Superfrost®Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Omnifix 2 ml Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm	American National Can Neehan, WI, USA
PCR Gefäß 0,2 ml	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR Gefäßdeckel	G. Kisher GbR, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäße, à 8 Streifen	G. Kisher GbR, Steinfurt
Reaktionsgefäße <i>safe lock</i> (2, 1,5, 0,5, 0,2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 20 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen	Schubert, Wackersdorf

Verwendete Software:

Abi Prism® 7700 Sequenz Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Optimas	PC-Systeme Stemmer, Puchheim
Primer Express	Applied Biosystems, Darmstadt
SPSS Statistikprogramm	RRZN Hannover (Regionales Rechenzentrum für Niedersachsen/Uni Hannover)

3.1.7 Primer und Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Genotypisierung:

mlgfbp-2 sense	5'-gcgcggtacctgtgaaa-3'
mlgfbp-2 antisense	5'-tccctcagagtggctgcatc-3'

Oligonukleotide für die quantitative Real-Time PCR:

Tabelle 3.1: Übersicht über Oligonucleotide der qPCR

Oligonukleotid	Forward Primer	Reverse Primer	Universal ProbeLibrary Probe (Sonde)
Actb (β -Actin)	5'-tgacaggatgcagaaggaga-3'	5'-cgctcaggaggagcaatg-3'	#106
Ccnd1 (Cyclin D1)	5'-gaaaatcgtggccacctg-3'	5'-gcggaagacctcctt-3'	#68
Cdx1	5'-tccgagctggctgtaac-3'	5'-cggttctggaaccagatctt-3'	#100
Ctnnb1 (β -Catenin)	5'-gcagcagcagttgtgga-3'	5'-tgtggagagctccagtacacc-3'	#25
Enc1	5'-ccagccgactactgag-3'	5'-gtagatgttgatggagccactg-3'	#81
Hrpt 1	5'-tcctctcagaccgcttt-3'	5'-cctggtcatcatcgtaatc-3'	#95
Id2	5'-gacagaaccaggcgtcca-3'	5'-agctcagaagggaattcagatg-3'	#89
Igf2	5'-gcatgctgccaagagctc-3'	5'-gcttctccgaggggca-3'	---
Igfbp2	5'-gcggtacctgtgaaaagag-3'	5'-cctcagagtggctgcatca-3'	#62
Igfbp3	5'-gcagcctaagcacctacctc-3'	5'-tcctctcggactcactgat-3'	#1
Jun	5'-tgccaccgagactgtaaaga-3'	5'-cctgtcgaactggtatgag-3'	#7
Mdr	5'-gtaccaaagaggccctgga-3'	5'-actcaggatccgcaaaa-3'	#78
Mmp2	5'-ataacctggatgccgtcg-3'	5'-caggaataagcaccctgaaga-3'	#77
Mmp9	5'-acgacatagacggcatcca-3'	5'-gctgtggtcagttgtgtg-3'	#19
Myc	5'-ttgtctattggggacagtgt-3'	5'-catcgtcgtggctgtctg-3'	#34
Nfkb1	5'-ggccactgtctgcctct-3'	5'-gctgcactatcccggagt-3'	#69
P21	5'-tccacagcगतatccagaca-3'	5'-ggacatcaccaggattggac-3'	#21
P53	5'-acgcttctccgaagactgg-3'	5'-agggagctcaggctgata-3'	#25
Pgk1	5'-cagtctagagctcctggaagg-3'	5'-tgtgaaaacagcaggttagc-3'	---
Plau	5'-ggagcagctcatctgcac-3'	5'-cccgtgctgtacgtatct-3'	#64
Rb1	5'-gcctctccagggaaccata-3'	5'-ttcttggagatcttagaggagaaa-3'	#84
Rplp2	5'-gacgatgatcggctcaacaag-3'	5'-accctgagcgatgacatcct-3'	---
Sdha	5'-caaattctcttgacctgtagt-3'	5'-cctaattgaaggaactttatctcca-3'	#53
Socs1	5'-cagccgacaatgcgatct-3'	5'-cgaagacgaggacgagga-3'	#45
Survivin	5'-cccgatgacaaccgata-3'	5'-catctgcttctgacagtgagg-3'	#71
Timp1	5'-gctcagcaaagagtttctcaaa-3'	5'-agataaacagggaacactgtgc-3'	#76
Vegfa	5'-gcagcttgagtaaacgaacg-3'	5'-ggtcccgaaccctgag-3'	#4

3.1.8 Antikörper

Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-Ratte, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Cleaved Caspase-3 (Asp175), Kaninchen	Cell Signaling Technologies
Ki-67, Ratte, monoclonal	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
β-Catenin, Maus	Transduction Laboratories, via BD Bioscience

3.2 Versuchstiere

In dieser Studie kam ein transgenes Mausmodell (CMVintIGFBP-2) zum Einsatz, welches am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München etabliert wurde (Hoeflich et al. 1999). Die verwendeten Tiere gingen aus der Verpaarung von heterozygoten CMV-IGFBP-2-transgenen Männchen mit Wildtyp-Weibchen hervor. Die IGFBP-2-transgenen Mäuse exprimierten das murine IGFBP-2-Gen im Kolon und in fast allen anderen Organen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Zudem war das Tiermodell durch etwa dreifach erhöhte IGFBP-2 Konzentrationen im Serum sowie durch ein postnatal reduziertes Wachstum charakterisiert. Die verwendeten Tiere entstammten der 6. Rückkreuzungsgeneration auf den Inzuchtstamm C57BL/6 und verfügten über einen C56BL/6-Anteil von über 98% im Genom. Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser sowie Standardfutter (V1435, Ssniff, Soest). Da für diese Studie nur weibliche Mäuse gebraucht wurden, wurden die männlichen Mäuse, sofern sie nicht für die Zucht benötigt wurden, getötet. Die verwendeten Mäuse wurden nach der dritten Lebenswoche abgesetzt und durch Ohrlochnummern gekennzeichnet. Während des Versuches wurde der Gesundheitsstatus der Tiere überwacht. Das Versuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen AZ 209.1/211-2531-50/03).

3.3 Methoden

3.3.1 Genotypisierung der Tiere

3.3.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzen

Die Bestimmung des Genotyps aller Versuchstiere wurde jeweils nach dem Absetzen in der vierten Lebenswoche vorgenommen. Dazu wurde den Mäusen unter Narkose ein etwa 2-3 mm langes Stück Schwanzspitze entfernt, das auf Trockeneis schockgefroren und bis zur DNA-Isolierung bei -80°C gelagert wurde.

Aus den Schwanzspitzen wurde die DNA nach dem Wizard®-Protokoll unter Verwendung der Reagenzien des Wizard® Genomic DNA Purification Kits isoliert. Zunächst wurden die Proben proteolytisch verdaut. Dazu wurden diese mit einer Verdauungslösung aus 17,5 µl Proteinase K, 500 µl Nuclei Lysis Lösung und 120 µl EDTA pH 8,0 angesetzt und mindestens für 4 h unter mehrmaligem Schütteln oder über Nacht auf dem Thermomixer bei 56°C verdaut. Das Gewebelysate wurde mit 3 µl RNase A bei 37°C für 30 min zum Abbau vorhandener RNA inkubiert. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden 200 µl Protein-Präzipitationslösung hinzugegeben um die Proteinfraction von der DNA-Fraction durch Zentrifugation (4 min bei 15800 x g) zu trennen. Die in der wässrigen Phase enthaltene genomische DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die genomische DNA wurde mit Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (2 min, 15800 x g) pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit Ethanol 70% wurde dieses vollständig getrocknet und je nach Pelletgröße in 50-100 µl DNA-Rehydratationslösung durch eine einstündige Inkubation bei 65°C gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die genomische DNA bei 2–8°C gelagert.

3.3.1.2 PCR-Reaktion

Um das IGFBP-2-Genkonstrukt nachweisen zu können, wurden für IGFBP-2 und den CMV-Promotor spezifische Primer eingesetzt. 1 µl Template wurde in sterile PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt und 19 µl Mastermix (siehe Tabelle 3.2) hinzupipettiert.

Tabelle 3.2: Mastermix für die IGFBP-2-PCR

Reagenz	Menge [μ l]
10 x Puffer	2,00
MgCl ₂	1,25
Q-Solution	4,00
dNTPs 1 mM	2,00
mIGFBP-2 # 4; 2 μ M	2,00
CMV # 3; 2 μ M	2,00
HotStarTaq® DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,10
Wasser	4,65
DNA	1,00
Gesamtvolumen	19,00

Die PCR-Reaktion lief im Thermocycler Biometra Uno II unter den in Tabelle 3.3 dargestellten Bedingungen ab.

Tabelle 3.3: Bedingungen für die IGFBP-2-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Zeit in min
1	94	4
2	94	1
3	54	1
4	72	2
Wiederholung: 35 x Schritte 2 bis 4		
5	72	10

3.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde mit 4 μ l Ladepuffer (6x) versetzt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges 2%-iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Nach dem Auftrennen der DNA wurde die für IGFBP-2 spezifische Bande durch das enthaltene Ethidiumbromid im Gel-Dokumentationssystem unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Software des Stratagene Eagle Eye dokumentiert.

3.3.2 Chemische Induktion von ACF und Tumoren

Die Genese von ACF und Tumoren im Kolon IGFBP-2-transgener und nicht-transgener Mäuse wurde durch intra-peritoneale Applikationen des Kolonkarzinogens 1,2-Dimethylhydrazin induziert (Schmelz et al. 1996; Diehl 2002). Ab einem Alter von vier Wochen wurden die Mäuse sechs Wochen lang einmal wöchentlich mit DMH in einer Dosierung von 40 mg/kg behandelt. Die Injektionen fanden jeweils am gleichen Wochentag zwischen 9.00 und 11.00 Uhr statt. Für beide DMH-behandelten Versuchsgruppen gab es jeweils eine Kontrollgruppe, denen die Vehikellösung NaCl-EDTA im gleichen Volumen verabreicht wurde. Zur Untersuchung der Kolonmukosa auf frühe pathologische Veränderungen erfolgten die Sektionen 10 Wochen nach der ersten DMH-Behandlung. Der spätere Sektionszeitpunkt zur Analyse der entstandenen Tumoren fand 34 Wochen nach Behandlungsbeginn statt.

3.3.3 Gewinnung der Serumproben

Durch Punktion des retrobulbären Plexus wurde den Äther-narkotisierten Mäusen Blut entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes durch zweistündige Inkubation bei 4°C, wurden die Proben 2 x 10 min bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.4 Radioimmunoassay zur Bestimmung der IGFBP-2- und IGF-II-Serumkonzentrationen

Der kompetitive Radioimmunoassay (RIA) basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei konkurriert das zu bestimmende Antigen mit dem radioaktiv markierten Antigen um die Bindungsstelle des ersten Antikörpers. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex fällt durch die Zugabe des zweiten Antikörpers aus. Die Menge des Antikörper-markierten Antigens ist zur Menge des zu bestimmenden unmarkierten Antigens umgekehrt proportional. Die Konzentration des zu bestimmenden Antigens kann anhand einer mit einem entsprechenden Standard erstellten Eichkurve quantifiziert werden. Die RIAs wurden vom Hormonlabor der Kinderklinik der Universität Tübingen durchgeführt, in dem die Nachweisverfahren etabliert und standardisiert sind.

3.3.5 Präparation von Kolon und Tumoren

Nach der Blutabnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Die Haut wurde in der Medianen inzidiert, vom Os pubis bis zum kranialen Rand des Thorax longitudinal aufgeschnitten und seitlich vom Körper unter Spannung fixiert. Anschließend wurde das Peritoneum in gleicher Weise präpariert. Der so freiliegende Intestinaltrakt sowie die mesenterialen Lymphknoten und die Leber wurden auf makroskopisch sichtbare pathologische Veränderungen untersucht. Das Kolon descendens wurde nach rektal freipräpariert und distal des Rektums abgesetzt. Das abgetrennte rektale Ende des Intestinums wurde behutsam hochgezogen und somit vom Mesokolon gelöst. Das Kolon ascendens wurde am Übergang zum Zäkum abgesetzt und in gekühlten Tris-Puffer (4°C) gelegt. Unter Zuhilfenahme einer Schlundsonde wurde dieser Dickdarmabschnitt mehrmals mit gekühltem Tris-Puffer gespült, um das Kolongewebe von der Ingesta zu reinigen. Um das Kolongewebe auf einem Objektträger aufklappen zu können, wurde der Darmschlauch vorsichtig auf einen Rührspatel aufgezogen und an der mesenterialen Seite vollständig aufgeschnitten. Das Kolongewebe wurde in drei Abschnitte (I-III) zerteilt. Anatomisch gesehen entsprach Abschnitt I dem Kolon ascendens, Abschnitt II dem Kolon transversum mit dem proximalen Anteil des Kolon descendens und Abschnitt III dem distalen Anteil des Kolon descendens mit dem Rektum. Für die histologischen und immunhistochemischen Analysen wurde jeder Abschnitt auf einem beschichteten Objektträger so platziert, dass das Gewebe flach ausgebreitet und die mukosale Seite objektträgerfern zu liegen kam. Anschließend wurde das Darmgewebe mit Tris-Puffer getränktem Gel-Blotting-Papier überdeckt und in Paraformaldehyd (4%) verbracht. Makroskopisch sichtbare Tumoren wurden nummeriert und ihre Lokalisation im Darm protokolliert. Für die histologischen Untersuchungen wurde das Kolon proximal und distal des Tumors zerschnitten und separat fixiert. Zur Bestimmung des Tumolvolumens wurden Länge, Breite und Höhe aller Tumoren mit einem Messschieber nach der Fixierung vermessen. Aufgrund der Tumormorphologie wurde das Volumen der Tumoren (V) nach der Ellipsoid-Formel $V = \frac{4}{3} \pi L/2 B/2 H/2$ berechnet. Für die Untersuchungen auf RNA-Ebene wurde das Kolongewebe in RNAlater™ aufbewahrt. Sichtbare Tumoren wurden auf Trockeneis schockgefroren. Alle Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.3.6 Histologie

3.3.6.1 Methylenblau-Färbung

Methylenblau wurde als sogenannter Vitalfarbstoff bereits 1885 von Paul Ehrlich zur Färbung von Geweben verwendet. 1987 wurde dieser Farbstoff erstmals zur Darstellung aberranter Krypten in murinem Kolonepithel eingesetzt (Bird 1987). Die Methylenblau-Färbung wurde zur Identifikation und Quantifizierung der ACF in der Kolonmukosa zum früheren sowie zum späteren Analysezeitpunkt eingesetzt. Dabei wurde berücksichtigt, in welchem Kolonabschnitt die ACF lokalisiert waren. Das zuvor in Paraformaldehyd 3 h lang fixierte Kolongewebe der Abschnitte I-III wurde in 0,01 M PBS überführt und 3 x 5 min gewaschen. Dabei wurde das Blotting-Papier nach dem ersten Waschschrift entfernt. Die Färbung erfolgte durch eine 10-15 minütige Inkubation in frischer Methylenblaulösung (2 g/l). Anschließend wurden die Gewebe mit Kaiser's Glycerin-Gelatine eingedeckelt und für wenige Minuten (<5 min) bei 4°C gelagert. Direkt im Anschluss wurden die ACF bei 25-facher Vergrößerung mikroskopisch quantifiziert. Die Dokumentation wurde mithilfe der Optimas Software erstellt.

3.3.6.2 Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte

Zur Anfertigung von Gewebeschnitten von ACF und Tumoren für histologische und immunhistochemische Färbungen wurden Kolon- und Tumorgewebe in Paraffin eingebettet. Die Einbettung erfolgte mit einer vollautomatischen Maschine nach dem in Tabelle 3.4 dargestellten Verlaufsprotokoll. Anschließend wurden die Paraffin-durchtränkten Gewebe mit flüssigem Paraffin in Blöcke gegossen. Das Kolongewebe der Abschnitte II und III wurde eingebettet. Die Schnitte wurden in einer Dicke von etwa 3 µm angefertigt, auf SuperFrost®Plus-Objektträger gezogen und über Nacht im Trockenschrank bei 37°C getrocknet. Von dem flach eingebetteten Kolongewebe wurden histologische Schnitte über die gesamte Länge der Krypten angefertigt, um die Kolonkrypten im Querschnitt darzustellen. Von den Tumoren wurden Serienschnitte angefertigt.

Tabelle 3.4: Protokoll zur Paraffineinbettung von Geweben

Reagenz	Verdünnung	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Ethanol	70%	30	40
Ethanol	80%	30	40
Ethanol	95%	45	40
Ethanol	95%	45	40
Ethanol	100%	45	40
Ethanol	100%	45	40
Ethanol	100%	45	40
Xylol	100%	45	40
Xylol	100%	45	40
Paraffin	---	30	58
Paraffin	---	30	58
Paraffin	---	30	58
Paraffin	---	30	58

3.3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) wurde zur Klassifizierung der ACF und der Tumoren durchgeführt. Zur ACF-Klassifizierung wurde jeder dritte bis vierte Schnitt der Kolonabschnitte II und III gefärbt. Die Schnitte wurde in Xylol entparaffiniert (2 x 5 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 1 x 95%, 1 x 70%, 1 x 50%) für jeweils 2 min rehydriert. Die Zellkerne wurden mit Ehrlich's Hämalaun 5 min lang gefärbt. Anschließend wurden diese unter fließendem Wasser 5 min gebläut und knapp 1 min mit Salzsäure-Ethanol (0,1%) differenziert. Nach erneutem Waschen unter fließendem Wasser (5 min) wurden die Schnitte 1-2 min mit Eosin (0,5%) gegengefärbt und in Essigsäure (0,1%) für 1-2 min inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 95%, 2 x 100%) für jeweils 2 min dehydriert, 2 x 2 min in Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckelt.

3.3.6.4 Kriterien der ACF-Klassifizierung

Die ACF-Klassifizierung wurde an den Kolonquerschnitten vorgenommen, von denen jeder dritte bis vierte Objektträger über die gesamte Länge der Krypten H&E-gefärbt wurde. Hierfür wurden die Präparate der Tiere ausgewählt, deren ACF-Anzahl in der Methylenblau-Färbung am größten war. Die Anzahl der Tiere belief sich auf vier Wildtyp- und fünf transgene Tiere. Alle ACF, die im histologischen Schnitt identifiziert

wurden, wurden mit Hilfe der Optimas Software dokumentiert. Dadurch war es möglich alle ACF im direkten Vergleich entlang der Klassifizierungskriterien zu beurteilen. Anhand der validierten Parameter wurden die ACF in hyperplastische und dysplastische eingeteilt, wobei letztere in mild, moderat und stark dysplastische ACF weiter untergliedert wurden. Zu den Kriterien zählten die Kernzahl pro Krypt, die Morphologie der Zellkerne, die Differenzierung der Zellen und die Struktur der Krypten. Hyperplastische ACF waren gering hyperzellulär, während dysplastische ACF eine mit steigendem Dysplasiegrad zunehmende Hyperzellularität aufwiesen, die bei stärkerer Dysplasie zu einer Kernschichtung führte. Im Vergleich zu hyperplastischen ACF, deren Zellkerne gering hyperchromatisch waren, war dieses Merkmal bei dysplastischen ACF stärker ausgeprägt. Zudem bildeten dysplastische ACF pleomorphe und längliche Zellformen. Die Polarität der Kerne war beim hyperplastischen Typ noch erhalten und ging beim dysplastischen ACF-Typ immer mehr verloren. Die Anzahl an Becherzellen, die bei hyperplastischen ACF nur geringfügig reduziert war, war bei dysplastischen ACF deutlich reduziert. Bei stärker dysplastischen ACF waren keine Becherzellen mehr vorhanden. Dysplastische ACF zeigten eine in Abhängigkeit des Dysplasiegrades zunehmend veränderte Kryptenstruktur, die von einer runden über eine oval bzw. schlitzförmige bis hin zu einer geschlängelten Form reichte. Im Unterschied dazu war die Struktur der Krypten hyperplastischer ACF nur leicht verändert und präsentierte eine runde bis ovale Form. Diese Klassifizierungskriterien sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Kriterien zur Klassifizierung der ACF

Klassifizierungskriterium	Hyperplastische ACF	Dysplastische ACF
Kernzahl pro Krypt	gering hyperzellulär	zunehmend hyperzellulär; Kernschichtung
Kernmorphologie	gering hyperchromatisch; basal gelegene Zellkerne	zunehmend hyperchromatisch, länglich und pleomorph; Verlust der Zellpolarität
Zelldifferenzierung	kaum Verlust an Becherzellen	deutlicher bis kompletter Verlust an Becherzellen
Kryptenstruktur	normal bis leicht verändert (rund bis oval)	zunehmend verändert (rund bis länglich oder geschlängelt)

Tabellendarstellung in Anlehnung an Papanikolaou et al. 2000; Nambiar et al. 2004; Yamada et al. 2001

3.3.7 Immunhistochemie

3.3.7.1 Prinzip der Avidin-Biotin-Methode

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die Avidin-Biotin-Methode, die kurz ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) genannt wird, ausgewählt. Diese zeichnet sich durch eine höhere Sensitivität als die PAP- (Peroxidase und Antiperoxidase) oder die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase und Anti-Alkalische Phosphatase) aus (Hsu et al. 1981; DakoCytomation 2003). Die ABC-Methode basiert auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin. Ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex besteht aus einem Avidin-Molekül, das vier Bindungsstellen für Biotin ausweist. In einem solchen Komplex sind aufgrund der molekularen Ausrichtung nur drei Bindungsstellen besetzt. Der ABC-Komplex lagert sich an den Biotin-markierten bzw. biotinylierten Zweitantikörper an, der eine Brücke zum Antigen-gebundenen Erstantikörper darstellt (siehe Abbildung 3.1).

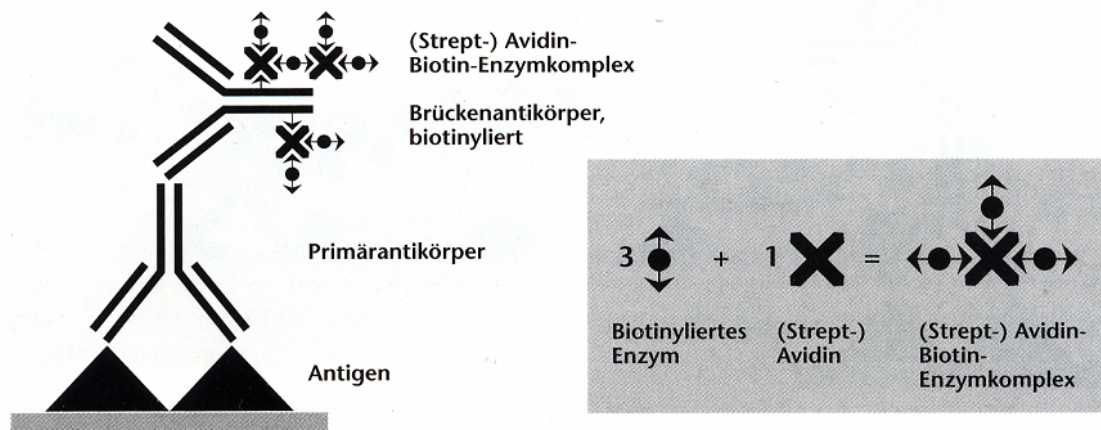


Abbildung 3.1: Schema der ABC-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex

Entnommen aus Praxis der Immunhistochemie (Höfler & Müller 2000)

3.3.7.2 Färbung der Antigene Ki-67, Caspase-3 und β -Catenin

Die immunhistochemischen Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67, des Apoptosemarkers Cleaved Caspase-3 sowie von β -Catenin fanden nach demselben Verlaufsprotokoll statt, das im Folgenden beschrieben ist. Die histologischen Schnitte wurden mit Xylol 2 x 5 min entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 100% 2 x 5 min, 1 x 96% 5 min, 70% 1 x 5 min, 50% 1 x 2 min, 30% 1 x 1 min, aqua dest. 3 min) rehydriert. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit

Wasserstoffperoxid nach der zweiten Alkoholstufe 20 min geblockt (3 ml Wasserstoffperoxid 30%, 180 ml Methanol). Um das Antigen für den Antikörper zugänglich zu machen, wurden die vollständig rehydrierten Schnitte dem sogenannten Antigen-Retrieval unterzogen. Hierzu wurden diese in einem Mikrowellendruckkochtopf in Citratpuffer (pH 6,0) 12 min lang gekocht. Im Anschluss an das Antigen-Retrieval folgte ein Blockierungsschritt mit 5%-igem Ziegen Serum zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen. Alle folgenden Reaktionsschritte wurden in einer Feuchtkammer durchgeführt. Die Waschschrte fanden immer in einer mit Tris-Puffer (1%) gefüllten Küvette für 3 x 5 min statt. Endogenes Biotin wurde mit dem Avidin-Biotin-Blockierungs-Kit blockiert. Zwischen den beiden 15 minütigen Blockierungsschritten wurden die Schnitte kurz (< 1 min) mit Tris-Puffer gewaschen. Direkt im Anschluss begann die Inkubation mit dem Primärantikörper, die bei Raumtemperatur stattfand und über Nacht dauerte. Alle Antikörper, sowohl Erst- als auch Zweitantikörper, wurden mit 5%-igem Ziegen Serum verdünnt (siehe Tabelle 3.6 für Antikörperverdünnungen). Am darauf folgenden Tag wurde die überschüssige Antikörperlösung mit Tris-Puffer abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Antigen-Detektion nach der ABC-Methode durch Binden des ABC-Komplexes an das Antikörper-markierte Antigen. Die Inkubationszeit betrug dabei 30 min. Der ABC-Komplex wurde bereits 30 min vor Gebrauch angesetzt. Danach wurden die Schnitte wieder mit Tris-Puffer gewaschen. Für die Färbung des markierten Antigens wurde der DAB-Farbstoff verwendet. Das Substrat wurde durch die Peroxidase innerhalb von 10–15 min umgesetzt und bildete durch seine Oxidation ein unlösliches braunfarbiges Produkt (Chromogen). Durch 5 minütiges Waschen mit aqua dest. wurde die überschüssige Färbelösung entfernt. Nicht DAB-gefärbte Zellkerne wurden mit Meyer's Hämalaun durch eine etwa 1-minütige Inkubation gegengefärbt und anschließend unter fließendem Wasser 5 min lang gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 30% 1 min, 50% 2 min, 70% 2 min, 95% 5 min, 100% 5 min) dehydriert, in Xylol (2 x 5 min) inkubiert und abschließend mit Entellan eingedeckelt. Als Negativkontrolle lief in jedem Ansatz mindestens ein Schnitt mit, der ohne Primärantikörper, d.h. nur mit der Verdünnungslösung inkubiert wurde. Alle zu färbenden Schnitte für einen der drei Erstantikörper wurden gemeinsam angesetzt.

Tabelle 3.6: Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper			Sekundärantikörper		
Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung	Bezeichnung	Ursprung	Verdünnung
Ki-67-Antikörper TEC-3	Ratte	1:100 (Kolon), 1:200 (Tumor)	Anti-Ratte IgG, biotinyliert	Ziege	1:200
Cleaved Caspase-3 Asp175	Kaninchen	1:200	Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:200
Anti- β -Catenin	Maus	1:4000 (Kolon), 1:10000 (Tumor)	Anti-Maus IgG, biotinyliert	Ziege	1:300 (Kolon), 1:200 (Tumor)

3.3.7.3 Bestimmung des Ki-67- und Caspase-3-Markierungsindex

Der Markierungsindex für den Proliferationsmarker Ki-67 wurde anhand der mit dem Antikörper Ki-67-Antikörper TEC-3 gefärbten Paraffinschnitte ermittelt (Scholzen & Gerdes 2000). Das Ki-67-Protein wurde 1983 von Gerdes *et al.* erstmals beschrieben (Gerdes et al. 1983). Demnach wird Ki-67 in allen Zellzyklusphasen (G_1 , S, G_2 und M) mit Ausnahme der Ruhephase (G_0) exprimiert und ist somit in proliferierenden Zellen nachweisbar. Im Laufe des Zellzyklus verändert sich die Lokalisation von Ki-67 innerhalb des Zellkerns, was mit einer zunehmenden Menge des Ki-67-Proteins von der G_1 -Phase bis hin zur M-Phase einhergeht. Direkt nach der Mitose sinkt die Menge an Ki-67 ab (Gerdes et al. 1984). Der Ki-67-Proliferationsmarker dient in der Tumordiagnostik zur Ermittlung der Wachstumsfraktion, wobei er auch im Rahmen der Prognose von Bedeutung ist (Brown & Gatter 2002). Die Bestimmung des Apoptose-Markierungsindex erfolgte anhand der mit dem Antikörper Cleaved Caspase-3 Asp175 gefärbten Schnitte (Alnemri et al. 1994; Nicholson et al. 1995). Die durch proteolytische Spaltung aktivierte Cleaved Caspase-3 (Nicholson et al. 1995) wird neben den Caspasen 6 und 7 zu den sog. Effektorcaspasen gezählt. Die Effektorcaspasen werden durch die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 aktiviert und verursachen den Abbau von Proteinen (Raghupathi et al. 2000). Zu diesen Proteinen zählt die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), die nach ihrer Spaltung die Fragmentierung chromosomaler DNA hervorruft (Alnemri et al. 1994). Desweiteren bewirkt die aktivierte Caspase-3 die Proteolyse von Strukturproteinen wie α -Fodrin und Laminin. Zur Bestimmung der Proliferations- bzw. Apoptose-Markierungsindices wurden pro Präparat etwa 1000 Tumorzellen bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Dazu wurden in Abhängigkeit von der Tumorgröße 4-6 Sichtfelder

ausgewertet, die alle in relativ proliferationsreichen Arealen lagen. Als positiv wurden braungefärbte, d.h. mit dem Antikörper markierte Epithelzellen und als negativ wurden blaugefärbte, d.h. unmarkierte Epithelzellen bewertet. Die Auszählung fand unter Zuhilfenahme der Optimas Software statt. Zur Berechnung der Proliferations- bzw. Apoptose-Markierungsindices wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Auszählungen wurden von zwei Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der beiden Ergebnisse herangezogen, wobei die Abweichungen beider Ergebnisse unter 3% liegen sollten.

3.3.8 Vorbereitung der Proben für die Quantitative PCR

3.3.8.1 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA aus Kolon- und Tumorgewebe erfolgte nach einer optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode, die erstmalig von Chomczynski und Sacchi 1987 beschrieben wurde (Chomczynski & Sacchi 1987). Hierbei wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des Reagenz Trizol[®] gewonnen.

Zur Isolierung der RNA aus dem Kolongewebe wurde 1 ml Trizol[®] in sterile 4,5 ml-Plastikröhrchen vorgelegt. Das in RNAlater gelagerte Kolongewebe wurde in das Trizol überführt und eingewogen (50-80 mg/ml Trizol[®]). Für die Isolierung der RNA aus Tumorgewebe wurden 0,5 ml Trizol[®] in 2,0 ml Eppendorfgefäße vorgelegt und die Tumoren direkt vom Trockeneis in das Reagenz transferiert und eingewogen (5-50 mg/0,5 ml Trizol[®]). Alle Proben wurden mit einem Gewebehomogenisator 1 min auf Stufe D (23500 rpm) homogenisiert. Die Kolonproben wurden in 2,0 ml Eppendorfgefäße überführt. Durch die anschließende Inkubation der Proben bei Raumtemperatur erfolgte eine Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe. Nach Zugabe von Chloroform (Kolonproben: 200 µl; Tumorproben: 100 µl) wurden die Proben 15 s per Hand gemischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Die Phasentrennung wurde anschließende Zentrifugation (10500 rpm, 15 min, 4°C) verursacht. Die RNA war nun in der farblosen wässrigen Phase gelöst, die sich durch eine Interphase (Proteine) von der rötlichen organischen Phase (DNA und Proteine) absetzte. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit Isopropanol (Kolonproben: 500 µl; Tumorproben: 250 µl) versetzt. In der darauf folgenden Inkubation (10 min, RT) bildete die RNA ein Präzipitat, das nach Zentrifugation (20

min, 10500 rpm, 15°C) in Form eines Pellets sichtbar wurde. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 15-35 µl DEPC-Wasser gelöst. Vor den weiteren Schritten wurden die Proben 5 min bei 65°C denaturiert.

3.3.8.2 Bestimmung der RNA-Quantität und -Qualität

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA mit TE-Puffer 1:100 verdünnt und photometrisch quantifiziert. Die Reinheit der RNA wurde anhand des Extinktions-Koeffizienten von 260nm/280nm bewertet, der mit einem Wert von 1,7 bis 1,9 im Normbereich lag. Die RNA-Qualität wurde in einem 1%-igen TAE-Agarosegel geprüft. Die ribosomale RNA, die den größten Anteil der RNA ausmacht, trennte sich in Form von zwei spezifischen Banden, einer 28S- und einer 18S-Bande, auf. Bei nicht degradierter RNA sind die Banden deutlich zu erkennen. Zur Überprüfung der RNA-Quantität wurden gleiche Mengen RNA (1µg) aufgetragen.

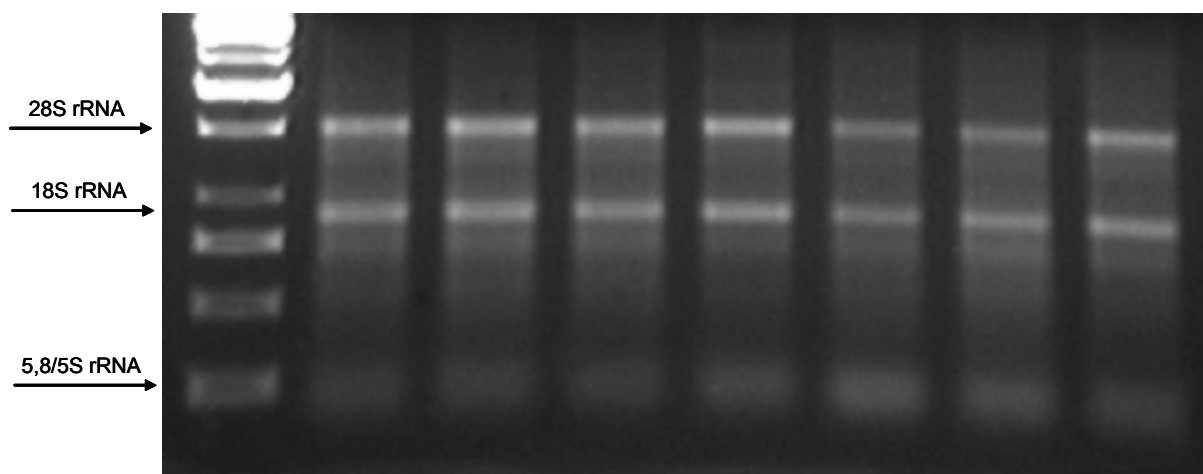


Abbildung 3.2: Bild zur Prüfung der RNA-Qualität und -Quantität

Mithilfe des PUC-Mix 8 Markers (Spur 1) können die rRNA spezifischen 28S- und 18S-Banden sowie werner weiteren relativ unscharfen 5,8/5S rRNA-Bande erkannt werden (Spuren 2-8). Alle Proben besitzen die gleiche Konzentration (400 ng/µl).

3.3.8.3 Synthese der cDNA

Vor der Umschreibung der RNA in cDNA wurde zunächst ein DNA-Verdau durchgeführt, um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen. Hierzu wurden 4000 ng RNA mit DNase I und 10 x DNase-I Verdau

Puffer versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation von 10 min bei 75°C gestoppt.

Mastermix für den DNA-Verdau:

4000 ng	RNA-Lösung
ad 10 µl	DEPC-Wasser
1 µl	DNase I (10 U/µl)
2 µl	DNase I Verdau Puffer (10x)

Nach dem DNA-Verdau wurden Quantität und Qualität der RNA erneut photometrisch bzw. gelelektrophoretisch kontrolliert. Die Reverse Transkription wurde mit dem Enzym Superscript II durchgeführt und erfolgte nach Angaben des Herstellers in drei Reaktionsschritten. Zunächst wurden 400 ng RNA mit sterilem Reinstwasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Im ersten Schritt wurden die Proben nach Zugabe des Mastermixes I für 5 min bei 65°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die RNA mit dem Mastermix II versetzt. Jede Probe wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt auf 42°C erwärmt. Nach 2 min wurde der Mastermix III hinzugegeben, wobei die Proben auf dem 42°C warmen Thermoblock verblieben. Bei dieser Temperatur fand die Umschreibung in den darauf folgenden 120 min statt. Danach wurde die Enzymaktivität gestoppt (15 min bei 70°C) und die Proben sofort auf Eis gestellt.

Mastermix I (für eine Reaktion, einfacher Ansatz):

1 µl	Random Primer 250 ng/µl
1 µl	dNTPs 10mM

Mastermix II (für eine Reaktion, einfacher Ansatz):

4 µl	5x Puffer
2 µl	DTT 0,1 M
1 µl	RNAse-Inhibitor

Mastermix III (für eine Reaktion, einfacher Ansatz):

0,25 µl	Superscript II
0,75 µl	5X Puffer

Alle Proben, die in der quantitativen Real-time RT-PCR (qPCR) miteinander verglichen wurden, wurden gemeinsam umgeschrieben. Um genügend cDNA zu erhalten, wurde jede Umschreibung im doppelten Ansatz und in drei Durchgängen durchgeführt. Anschließend wurde die gesamte cDNA einer jeden Probe gemischt, mit sterilem Reinstwasser verdünnt (cDNA aus Kolon 1:4; cDNA aus Tumor 1:3) und in einer Menge von je 8,5 µl aliquotiert. Für die Etablierung der qPCR wurde ein Mix verschiedener cDNA-Proben und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) hergestellt und entsprechend aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -80°C gelagert.

3.3.9 Quantitative Real-time PCR

3.3.9.1 Prinzip der Quantitativen Real-time PCR

Das Prinzip der Quantitative Real-time PCR (qPCR) basiert auf der nach jedem PCR-Zyklus stattfindenden Messung eines fluoreszierenden Stoffes bzw. Reporters. Über die Stärke des Fluoreszenz-Signals kann direkt auf die Menge des amplifizierten DNA-Templates geschlossen werden, da sich dieses mit zunehmender Menge an PCR-Produkt verstärkt (Freeman et al. 1999). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte durch das Detektionssystem des Sequence Detector 7700 (Abi Prism®, Applied Biosystems). Dieses System besteht aus einem PCR-Cycler und einem optischen Detektionsmodul sowie einem Computer-Programm zur Auswertung der gemessenen Signale. In diesem System werden die Fluorophore durch einen Laser zur Lichtemission angeregt. Dazu wird das Licht des Lasers über fiberoptische Fasern zu jedem der 96 optischen Cups geleitet. Die Messung der Fluoreszenz-Emission findet im Bereich von 500 nm bis 660 nm statt. Das gemessene Signal wird in einem Spektrographen gebündelt und zu einer CCD-Kamera geleitet. Über die Software von Applied Biosystems werden die gemessenen Fluoreszenz-Signale ausgewertet. Dabei wird aus dem Quotienten der Fluoreszenz-Emission des Reporters und des passiven Reporterfarbstoffes das normalisierte Fluoreszenz-Signal ermittelt. Durch Auftragen des logarithmierten Rn-Wertes (Abszisse) gegen

den entsprechenden PCR-Zyklus (Ordinate) entsteht eine Amplifikationskurve, die den Verlauf der PCR-Reaktion widerspiegelt (siehe Abbildung 3.4). In den ersten PCR-Zyklen ist aufgrund der geringen Templatemenge die Fluoreszenz des Hintergrundes höher als die des Reporters. Der Schwellenwert (*Threshold*) gibt die Fluoreszenz-Stärke an, ab der ein Signal als positiv gewertet wird, und kennzeichnet somit den Beginn der exponentiellen Phase der Amplifikation, in der die PCR-Bedingungen optimal sind. Der *Threshold Cycle* (Ct) gibt dabei die Anzahl der PCR-Zyklen an, die notwendig sind, um eine bestimmte Signalstärke zu erreichen.

3.3.9.2 Quantitative Real-Time PCR-Verfahren

3.3.9.2.1 Sybr Green PCR

Dieses gebräuchlichste Verfahren der qPCR basiert auf einem interkalierenden Farbstoff, der bei der Amplifizierung an den DNA-Doppelstrang bindet (Morrison et al. 1998). Während früher Ethidiumbromid als Farbstoff verwendet wurde, setzt man heute vor allem Sybr Green I ein. Aufgrund der Sequenz-unspezifischen Bindung der Fluoreszenz-Moleküle an doppelsträngige DNA geht allerdings neben dem gewünschten PCR-Produkt auch gegebenenfalls von Primer-Dimeren und PCR-Nebenprodukten ein positives Fluoreszenz-Signal aus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sybr Green PCR nur in einzelnen Fällen zur Bestimmung der Genexpression im Kolon und im Tumor eingesetzt.

3.3.9.2.2 TaqMan™ PCR

Das Prinzip des TaqMan™ Assays beruht auf der 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der *Thermus aquaticus* (Taq) DNA Polymerase, die erstmals 1991 von Holland *et al.* beschrieben wurde. Dabei kommt neben den Primern ein zusätzliches Oligonukleotid zum Einsatz, das am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter und am 3'-Ende einen Quencher trägt. Bei intakter Probe wird die Fluoreszenz des Reporters durch die Nähe zum Quencher vollständig unterdrückt (siehe Abbildung 3.3 Bild 1). Dieser Effekt beruht zumeist auf dem *Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer* (FRET). Der Quencher kann fluoreszierend oder auch ein sog. *Dark Quencher* sein, der nicht fluoresziert. Während der Amplifizierung hybridisiert die Probe mit der Zielsequenz des DNA-Stranges und wird durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq

Polymerase degradiert, wenn diese bei der Elongation auf das 5'-Ende der Sonde trifft (siehe Abbildung 3.3 Bilder 2 und 3). Durch die damit verbundene Trennung des Reporters vom Quencher wird das Fluoreszenz-Signal des Reporters freigegeben (siehe Abbildung 3.3 Bild 4).

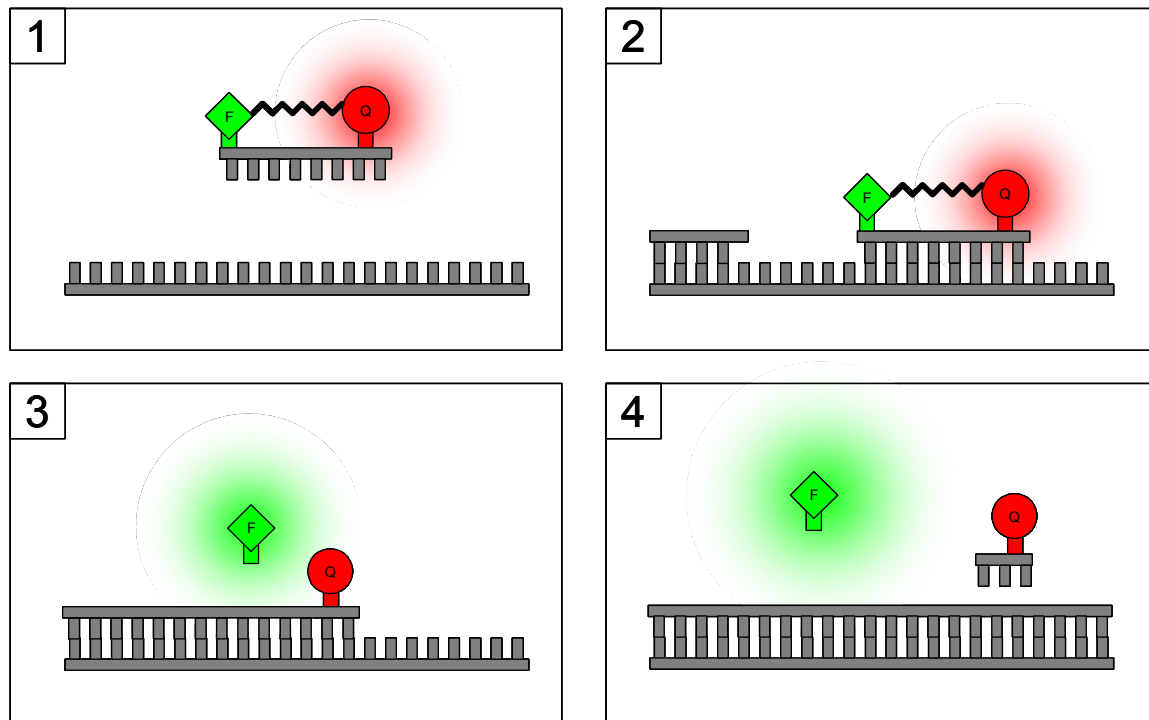


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der TaqMan PCR (5'→3'-Exonuklease-Assay)

Bei intakter Probe wird das Fluoreszenz-Signal vom Quencher vollständig unterdrückt (Bild 1). Die Sonde hybridisiert mit der Zielsequenz (Bild 2). Durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase wird der Reporter vom Quencher getrennt (Bild 3) und das Fluoreszenz-Signal wird freigegeben (Bild 4).

Die *Universal ProbeLibrary Proben* sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszein-Reporter FAM und nahe des 3'-Ende mit einem *Dark Quencher* versehen. Im Unterschied zu klassischen Sonden wie TaqMan™-Sonden oder Molecular beacons, deren Länge 9-40 bzw. 12-30 Nucleotiden beträgt, sind die Sonden der *Universal ProbeLibrary* mit einer Länge von 8-9 Nucleotiden kürzer. Dadurch kann eine Sonde für den Nachweis mehrerer Transkripte verwendet werden (ca. 7000 Transkripte pro Sonde). Die Bindungsaffinität sowie die biologische Stabilität der Sonde werden dabei durch *Locked Nucleid Acids* (LNA) gewährleistet. Diese LNAs sind Ribonukleoside, die zwischen dem 2'-Sauerstoff-Atom und dem 4'-C-Atom eine Methylenbrücke enthalten und dadurch eine bizyklische Struktur ausbilden (Kumar et al. 1998). Weil sich das Verfahren der *Universal ProbeLibrary Proben* nicht nur durch eine hohe Spezifität

auszeichnet, sondern auch sehr kosteneffizient ist, stellt dieses die Methode der Wahl für die Genexpressionsanalysen in der vorliegenden Arbeit dar.

3.3.9.3 Design der Quantitativen PCR-Assays

Die Assays für die TaqMan PCR wurden mit der Online-basierten *ProbeFinder Software* im Assay Design Center der *Universal ProbeLibrary* erstellt. Dabei wurden die Sequenzen in den Datenbanken Ensembl, RefSeq und EMBL anhand der Sequenz ID gesucht. Das Primerdesign der Probe Finder Software beruht auf dem Primer3 Primer Design Algorithmus des Whitehead Institute for Biomedical Research, der speziell für die Anwendung von Sonden der *Universal ProbeLibrary* optimiert wurde. Dadurch werden Primer ausgewählt, deren Länge von 18-27 bp - im optimalen Fall 20 bp - beträgt und deren Schmelzpunkt bei 58-61°C (Optimum 60°C) liegt. Angaben zu den Suchalgorithmen fallen unter das Betriebsgeheimnis von Roche. In den meisten Fällen wurden mehrere Assays für den Nachweis eines Gens von der *ProbeFinder Software* vorgeschlagen, deren Spezifität durch die jeweilige Kombination aus Primern und Probe gewährleistet wurde. Die Auswahl des Assays wurde unter Berücksichtigung der Empfehlungen von Roche und nach Prüfen der im Folgenden beschriebenen Aspekte getroffen. Die Probe sollte möglichst nahe am 5'-Ende hybridisieren, um eine hohe Prozessionsrate der Taq Polymerase zu gewährleisten und am 5'-Ende keine Guanin Base haben. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine komplementären Sequenzen zwischen den Oligonukleotiden bestanden und dass keine repetitiven Sequenzen in der Zielsequenz vorkamen. Die Länge der Amplifikate lag zwischen 60-110 bp. Um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurden Intron-überspannende Assays bevorzugt. Die Primer für die Sybr Green I PCR wurden mit der Primer Express Software (Applied Biosystems) nach den folgenden Auswahlkriterien entworfen:

- (1) GC-Anteil: 30-80%
- (2) Schmelzpunkt : 58-60°C
- (3) Primerlänge: 18-22 Basen
- (4) Terminal nicht mehr als 2 Guanin und/oder Cytosin Basen
- (5) Vermeidung von Sekundärstrukturen innerhalb eines Primers
- (6) Vermeidung von Basenwiederholungen (vor allem Guanin)
- (7) Amplikonlänge: 70-100 bp

3.3.9.4 Etablierung und Optimierung der Assays

In einem ersten PCR-Lauf wurde die optimale Konzentration der Primer bestimmt. Hierzu wurde eine Primermatrix erstellt, bei der je zwei Konzentrationen des Forward und des Reverse Primers auf vier verschiedene Weisen kombiniert wurden. Für die Probe-basierten Assays betragen die Konzentrationen 200 nM und 600 nM, für die Sybr Green PCR hingegen 300 nM und 900 nM. Die beste Primerkonzentration zeichnete sich dadurch aus, dass sie bei geringster Konzentration den niedrigsten Ct-Wert aufwies. Die Bestätigung jedes Wertes erfolgte durch Doppelbestimmung. Bei zu schwachem Fluoreszenz-Signal wurde die Endkonzentration der eingesetzten Probe gegebenenfalls von 100 nM auf 200 nM erhöht. Alle PCR-Produkte wurden in einem 4%-igen TAE-Gel aufgetrennt, anhand dessen die Größe des PCR-Produktes kontrolliert sowie unspezifische Nebenprodukte und Primer-Dimere ausgeschlossen werden konnten.

Die aus der Sybr Green I PCR stammenden PCR-Produkte wurden sequenziert. Dazu wurden 2,5 µl PCR-Produkt aus der optischen 96-Well Platte entnommen und durch eine Mikrodialyse aufbereitet. Die Sequenzierung wurde vom Sequenzierungsservice der Arbeitsgruppe Blum im Genzentrum durchgeführt. Die dadurch erhaltenen Gensequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (National Center of Biotechnology Information) mit den entsprechenden Sequenzen der öffentlichen Online-Datenbanken (NCBI) abgeglichen. PCR-Produkte, deren Amplifizierung mittels *Universal Probe* erfolgte, wurden gemäß den Angaben des Herstellers nicht sequenziert.

3.3.9.5 Bestimmung der PCR-Effizienz

Da die Quantifizierung der Proben von der Kinetik der PCR-Reaktion abhängig ist, ist die Bestimmung der PCR-Effizienz zur Auswertung der gemessenen Ct-Werte erforderlich. Zur Berechnung der Effizienz wurde in jedem PCR-Lauf eine aus vier Verdünnungsstufen bestehende Verdünnungsreihe gemessen. Anhand der Ct-Werte der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt (siehe Abbildung 3.5), die Effizienz der PCR wurde anhand der Steigung der Geraden nach folgender Formel berechnet: Effizienz $E = 10^{-1/\text{Steigung der Geraden}}$. Im Idealfall beträgt die Steigung der Geraden -3,322. Das entspricht einer Effizienz von $2 = 100\% (10^{-1/-3,322} = 2)$. Für jeden PCR-Ansatz wurde die Standardkurve eigens berechnet. Der Threshold lag

dabei immer im exponentiellen Bereich der Amplifikationskurve (siehe Abbildung 3.4).

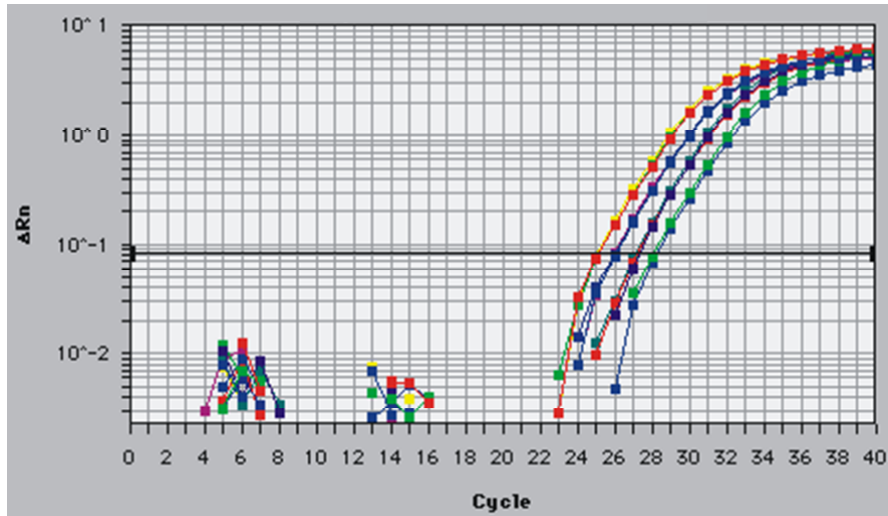


Abbildung 3.4: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe

Das Fluoreszenz-Signal der Amplikate der vier cDNA-Konzentrationen ist gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Die Gerade in Abbildung 3.4 gibt den *Threshold* an. Aus den Ct-Werten der vier Verdünnungsstufen und dem Logarithmus der Template-Menge ergibt sich die Gerade mit einer Steigung ($y = -3,3153x + 25,48$; siehe Abbildung 3.5). Daraus berechnet sich die Effizienz der PCR von 2,0 (Effizienz $E = 10^{-1/\text{Steigung der Geraden}}$). R^2 gibt die Korrelation der Werte an.

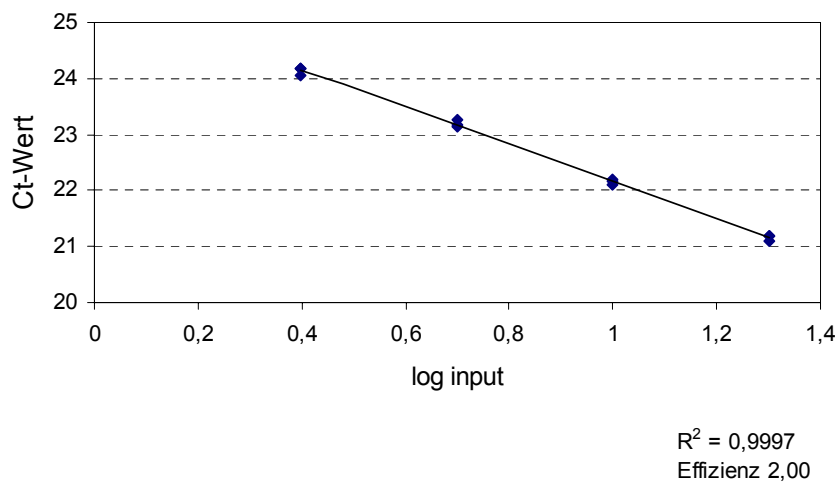


Abbildung 3.5: Standardkurve

3.3.9.6 Bedingungen der Quantitativen PCR

Alle PCR-Ansätze wurden in optischen 96-Well-Platten pipettiert und im Sequenz Detector 7700 gemessen. In einem PCR-Lauf wurden alle Kolon- bzw. alle Tumor-Proben gemessen. Der Reaktionsansatz umfasste ein Gesamtvolumen von 85 μl pro Probe um Triplikate à 25 μl zu erhalten. In Tabelle 3.7 sowie Tabelle 3.8 ist der Mastermix für die Sybr Green I PCR bzw. die TaqMan™ PCR dargestellt.

Tabelle 3.7: Mastermix für die TaqMan PCR

Reagenz	Menge [μl]	Finale Konzentration
Fast Start TaqMan™ Probe Master 2x	12,5	1x
Rox	0,25	300 nM
UNG	0,25	1 U/ μl
Probe (Universal Probe Library)	0,25/0,5	100 nM/200 nM
Forward Primer	2,0	200 nM/600 nM
Reverse Primer	2,0	200 nM/600 nM
Wasser	5,25/5,0	
cDNA	2,5	12,5-15 ng
Gesamtvolumen	25	

Tabelle 3.8: Mastermix für die SybrGreen I PCR

Reagenz	Menge [μl]	Finale Konzentration
Sybr Green PCR Master Mix 2x	12,5	1x
UNG	0,25	1 U/ μl
Forward Primer	2,0	300 nM/900 nM
Reverse Primer	2,0	300 nM/900 nM
Wasser	5,75	
cDNA	2,5	12,5-15 ng
Gesamtvolumen	25	

Der passive Referenzfarbstoff Rox, der im Sybr Green PCR Master Mix bereits in ausreichender Konzentration enthalten war, diente zum Ausgleich der Fluoreszenz-Schwankungen bei der Normalisierung der Fluoreszenz-Signale im PCR-Gerät. Zum Schutz vor *Carryover*-Kontaminationen startete der PCR-Lauf mit einem Dekontaminierungsschritt von 2 min bei 50°C um eventuell im Reaktionsansatz

vorhandene Uracil-haltige Amplifikate aus vorhergehenden PCR-Reaktionen durch die Uracil-N-Glycosylase (UNG) abzubauen. Im anschließenden Aktivierungsschritt von 95°C über 10 min wurde die Taq Polymerase aktiviert und gleichzeitig die UNG inaktiviert. Letzteres war notwendig, um die folgende DNA-Amplifizierung nicht zu stören. Das Zyklusprofil der PCR-Reaktion ist in der nachfolgenden Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Zyklusprofil der PCR-Reaktion

Schritt	Dauer	Temperatur	Bemerkung
UNG Verdau	2 min	50°C	---
Aktivierung der Taq Polymerase	10 min	95°C	---
Denaturierung	15 s	95°C	40 Zyklen
Annealing und Extension	1 min	60°C	

3.3.9.7 Normalisierung

Die Normalisierung der Daten erfolgte durch eine relative Quantifizierung. Hierzu erfolgte eine Vorauswahl von Housekeeping-Genen (HKG), für die in der Fachliteratur eine gute Stabilität vor allem im Kolon- und im Tumorgewebe beschrieben ist (de Kok et al. 2005; Szabo et al. 2004; Vandesompele et al. 2002). Zur Bestimmung welche dieser HKG sich zur Normalisierung am besten eignen, wurde die Expressionsstabilität dieser Gene im Untersuchungsgewebe ermittelt. Hierfür wurde das Programm GeNorm/Visual Basic Application (VBA) (Vandesompele et al. 2002) angewendet. GeNorm folgt der Empfehlung, dass aufgrund der beträchtlichen Schwankungen der Expressionsniveaus von HKG nicht nur auf ein einzelnes HKG normalisiert werden sollte. Vielmehr soll durch den Einsatz mehrerer HKG eine zuverlässigere Normalisierung erreicht werden. Basierend auf dem Prinzip, dass das Expressionsverhältnis von zwei idealen HKG in allen Proben gleich ist, berechnet GeNorm die Genstabilität M als den Durchschnitt der paarweisen Variation eines bestimmten Gens mit den anderen Genen. Durch den schrittweisen Ausschluss des jeweils instabilsten Gens (höchster M -Wert) werden die stabilsten HKG identifiziert (Vandesompele et al. 2002).

Die optimale Anzahl der zur Kalkulation des Normalisierungsfaktors notwendigen HKG wurde durch eine paarweise Varianzanalyse der Normalisierungsfaktoren NF_n

und NF_{n+1} berechnet. Dabei wurde, ausgehend von den zwei stabilsten HKG, das jeweils nächst stabilere HKG zur Kalkulation des neuen Normalisierungsfaktors schrittweise miteinbezogen, bis die Hinzunahme eines weiteren HKG keine deutliche Verbesserung des neu berechneten Normalisierungsfaktor hat. Vandesompele *et al.* geben eine Mindestanzahl von zwei HKG zur Normalisierung nach GeNorm an, wobei drei HKG empfohlen werden. Dabei gilt eine Varianz von 0,15 als ein Richtwert, unter dem die Einbeziehung eines weiteren Gens nicht erforderlich ist. Eine geringe Variation der Normalisierungsfaktoren bedeutet eine hohe Übereinstimmung der Werte (Vandesompele et al. 2002).

Die Normalisierung der Zielgene (*Gene of interest* - GOI) wurde wie folgt berechnet:

Zur Berechnung des Normalisierungsfaktors sowie des Expressionsniveaus wurden die Ct-Werte in die *relative Quantität* Q transformiert:

$$Q = E^{(\text{minCt} - \text{ProbenCt})}$$

(Q= Quantität der Probe; E = Effizienz der PCR; MinCt = kleinster CT-Wert = Probe mit der höchsten Expression)

Die *Standardabweichung* (Standard deviation SD) der *relativen Quantität* Q wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$SD Q = E^{\text{deltaCt}} \ln E \cdot SD \text{ ProbenCt}$$

(LnE = natürlicher Logarithmus der Amplifikationseffizienz; SD ProbenCt = Standardabweichung der Ct-Werte der Triplikate)

Der *Normalisierungsfaktor* NF wurde aus dem geometrischen Mittel der relativen Quantität der HKG berechnet:

$$NF_n = \sqrt[n]{HKG_1 \cdot HKG_2 \cdot \dots \cdot HKG_n}$$

Die *Standardabweichung des Normalisierungsfaktors* wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$SD NF_n = NF_n \cdot \sqrt{\left(\frac{SD}{n \cdot HKG_1}\right)^2 + \left(\frac{SD}{n \cdot HKG_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{SD}{n \cdot HKG_n}\right)^2}$$

Das *normalisierte Expressionsniveau* eines Kandidatengens wurde durch Division der Quantität des GOI durch den Normalisierungsfaktor errechnet.

$$\text{GOI}_{\text{norm}} = \frac{\text{GOI}}{\text{NF}}$$

Die Standardabweichung des normalisierten GOI wurde wie folgt berechnet:

$$\text{SD GOI}_{\text{norm}} = \text{GOI}_{\text{norm}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\text{SD NF}_n}{\text{NF}_n}\right)^2 + \left(\frac{\text{SD GOI}}{\text{GOI}}\right)^2}$$

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die normalisierten Expressionswerte umskaliert. Hierzu wurde der jeweilige normalisierte Expressionswert durch den niedrigsten normalisierten Expressionswert dividiert.

3.3.10 Datenauswertung und Statistische Analysen

Generell stellen alle angegebenen Werte den Mittelwert einer Tiergruppe mit dem Fehler der Standardabweichung dar.

Zur statistischen Auswertung der histologisch und immunhistochemisch erhobenen Daten (mit Ausnahme von β -Catenin) sowie zur Auswertung der Serumkonzentrationen wurde der nicht-parametrische U-test (Mann Whitney Test; Graph Pad Prism) eingesetzt. Für die Ermittlung der Signifikanz der β -Catenin-Expression und -Lokalisation in ACF und Tumoren wurde Fisher's exakter Test (SPSS) verwendet.

Zur Bestimmung der Genexpression in der quantitativen Real-time RT-PCR wurden alle Proben als Triplikate gemessen. Die Berechnungen bzw. Auswertungen zur Normalisierung der gemessenen Werte ist ausführlich in Abschnitt 3.3.9.7 dargestellt. Die statistische Datenauswertung erfolgte mit dem parametrischen T-test (Student's T-test; Graph Pad Prism) bzw. dem nicht-parametrischen U-test (Mann Whitney Test; Graph Pad Prism).

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung

Die Integration des Transgens CMV-IGFBP-2 wurde bei allen in dieser Studie verwendeten Tieren mittels PCR untersucht. In 71 Fällen wurde ein positives Signal für das Transgen nachgewiesen, während bei 74 Proben kein Signal auftrat.

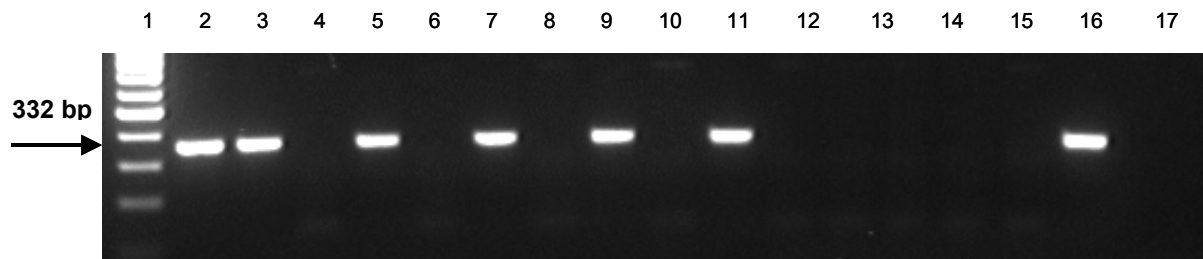


Abbildung 4.1: PCR-Analyse zum Nachweis des IGFBP-2-transgenen Genotyps

In Spur 1 ist der Molekulargewichtsstandard (100 bp DNA Gene Ruler), in den Spuren 2 bis 15 sind die PCR-Produkte genomischer DNA aus Schwanzproben aufgetragen. Die Positivkontrolle ist in Spur 16, die Negativkontrolle in Spur 17 dargestellt.

4.2 Versuchstiergruppen

Anhand der Ergebnisse der Genotypisierung wurden die Mäuse der transgenen bzw. nicht-transgenen Versuchstiergruppe zugeteilt. Hierzu zählten die beiden DMH-behandelten Gruppen der IGFBP-2-transgenen und der nicht-transgenen Mäuse sowie die beiden Vehikel-behandelten Kontrollgruppen IGFBP-2-transgener und nicht-transgener Mäuse.

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der ACF wurden zehn nicht-transgene und 13 IGFBP-2-transgene DMH-behandelte Mäuse sowie je drei Tiere in den Kontrollgruppen eingesetzt. Aufgrund der geringen Tumorprävalenz wurden 19 DMH-behandelte Wildtyp- und 20 DMH-behandelte transgene Tiere verwendet, die insgesamt acht bzw. 13 Tumoren entwickelten. Die Anzahl der Kontrolltiere betrug jeweils vier pro Genotyp. Die Tierzahlen bei den Analysen der Genexpression im Kolon beliefen sich auf je fünf Tiere pro Gruppe. Für die Genexpressionsanalysen im Tumor wurden 19 nicht-transgene und 20 IGFBP-2-transgene Mäuse der DMH-behandelten Gruppen, die insgesamt zehn bzw. acht Tumoren bildeten, sowie je fünf Kontrolltiere verwendet.

4.3 Quantifizierung der Serumspiegel

4.3.1 IGFBP-2-Serumspiegel

Transgene Tiere wiesen zu beiden Untersuchungszeitpunkten signifikant höhere IGFBP-2-Serumspiegel auf. Zum früheren Zeitpunkt waren die Serumwerte um den Faktor 2,4 (DMH-behandelte Gruppe; $***p < 0,001$) bzw. um den Faktor 2,3 (Vehikel-behandelte Gruppe; $**p < 0,01$) erhöht. Zum späteren Zeitpunkt überstiegen die Serumwerte transgener Tiere die Werte nicht-transgener um das 2,9-fache (DMH-behandelte Gruppe; $***p < 0,001$) bzw. das 3,2-fache (Vehikel-behandelte Gruppe; $***p < 0,001$).

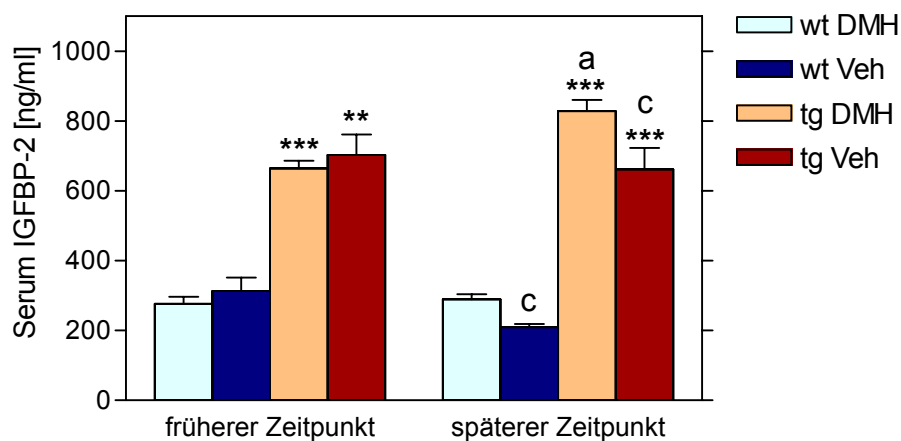


Abbildung 4.2: IGFBP-2-Serumspiegel nicht-transgener und transgener Tiere unter Berücksichtigung der Behandlungsgruppe und des Untersuchungszeitpunktes

Signifikante Unterschiede sind zwischen den beiden Genotypen innerhalb einer Phase ($**p < 0,01$; $***p < 0,001$) sowie zwischen den Behandlungsgruppen innerhalb der späteren Phase ($c_p < 0,01$) und im Vergleich der beiden Phasen innerhalb der transgenen DMH-Gruppe ($a_p < 0,01$) zu erkennen.

Die Serumspiegel DMH- und Vehikel-behandelter Tiere unterschieden sich in der frühen Phase der Kolonkarzinogenese nicht voneinander. Im Unterschied dazu waren in der späteren Phase die IGFBP-2-Serum-Konzentrationen in den beiden DMH-Gruppen signifikant höher als in den Vehikel-Gruppen ($c_p < 0,01$). Dieser Unterschied war nicht von der Manifestation sichtbarer Tumoren abhängig. Im Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte zeigte sich, dass die IGFBP-2-Serumwerte von transgenen DMH-behandelten Tieren zum späteren Untersuchungszeitpunkt signifikant höher waren ($a_p < 0,01$), während sich diese in den anderen Gruppen nicht signifikant unterschieden (siehe Abbildung 4.2).

4.3.2 IGF-II-Serumspiegel

In der früheren Phase der Kolonkarzinogenese unterschieden sich die IGF-II-Serumkonzentrationen zwischen den beiden Genotypen sowie auch zwischen den beiden Behandlungsgruppen (DMH, Vehikel) nicht signifikant voneinander. In der späteren Phase war der IGF-II-Serumspiegel in den beiden Behandlungsgruppen sowohl der transgenen als auch der nicht-transgenen Tiere gleich. Hingegen zeigten transgene DMH-behandelte Tiere zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere IGF-II-Serumwerte als die nicht-transgene Vergleichsgruppe (** $p < 0,01$). Die IGF-II-Werte waren in den DMH-behandelten Gruppen nicht-transgener sowie auch transgener Tiere zum späteren Zeitpunkt signifikant geringer als zum früheren Zeitpunkt (^a $p < 0,01$ bzw. ^c $p < 0,05$). Indessen änderten sich die Werte in den beiden Kontrollgruppen (Vehikel-behandelt) nicht deutlich.

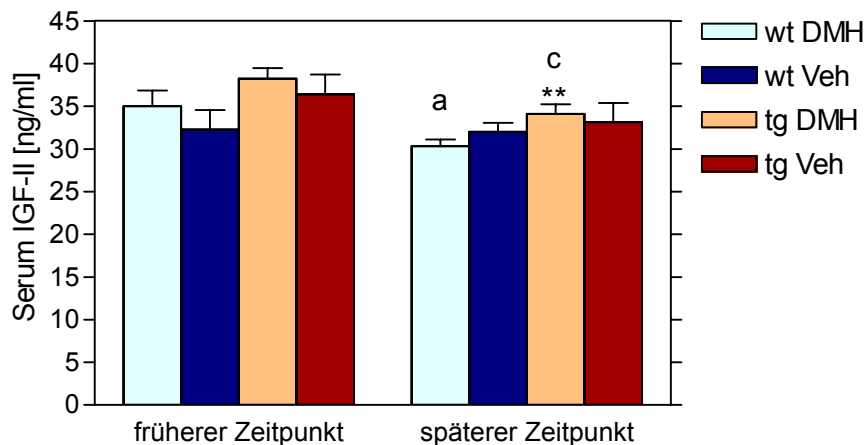


Abbildung 4.3: IGF-II-Serumspiegel nicht-transgener und transgener Tiere unter Berücksichtigung der Behandlungsgruppe und des Untersuchungszeitpunktes

In der frühen Phase unterscheiden sich die Werte in den verschiedenen Gruppen nicht voneinander, während in der späteren Phase signifikante Unterschiede zwischen nicht-transgenen und transgenen Tieren der DMH-behandelten Gruppen (** $p < 0,01$) vorliegen. Zum späteren Zeitpunkt waren die Serumspiegel DMH-behandelter transgener wie auch nicht-transgener Tiere signifikant niedriger als zum früheren Zeitpunkt (^a $p < 0,01$ bzw. ^c $p < 0,05$).

4.4 Analysen der ACF

4.4.1 Quantifizierung der ACF

Die Quantifizierung der im Kolon entstandenen ACF wurde im Methylenblaugefärbten Kolongewebe an beiden Untersuchungszeitpunkten durchgeführt. In dieser Färbung (siehe 3.3.6.1) konnten die ACF aufgrund ihrer morphologischen Veränderungen - wie vergrößertes Kryptenlumen oder verdicktes Epithel (siehe

2.1.3.1) - von den umliegenden Krypten differenziert werden. Neben der Beurteilung der Gesamtzahl an ACF wurde die *crypt multiplicity*, d.h die Anzahl aberranten Krypten pro Focus bestimmt. Hierzu wurde zwischen einzelnen aberranten Krypten und Foci, die sich aus 2, 3, 4 oder mindestens 5 AC zusammensetzten, unterschieden.

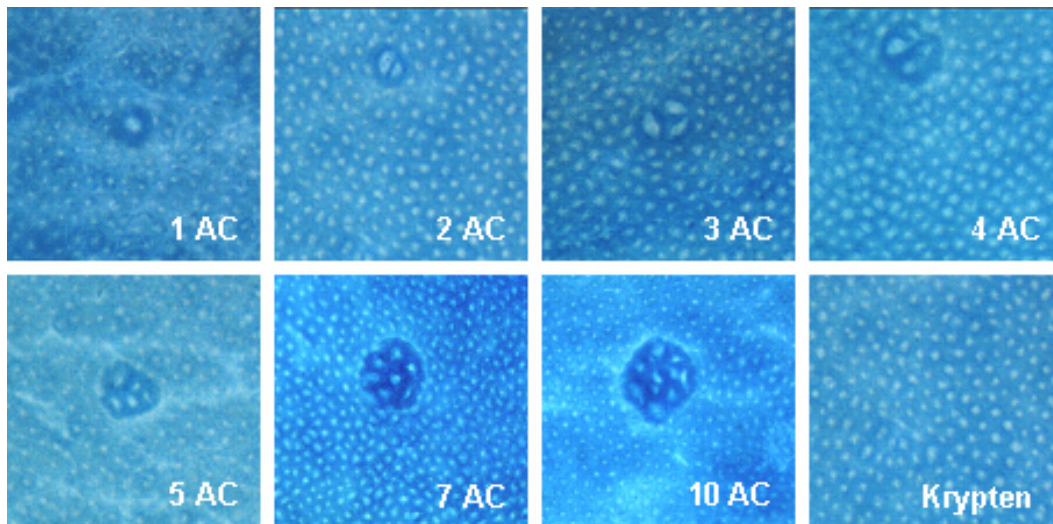


Abbildung 4.4: ACF im Kryptenepithel des Methylenblau-gefärbten Kolongewebes

In den Bildern 1 AC bis 10 AC sind ACF mit einer unterschiedlich großen Anzahl an aberranten Krypten im Kolon DMH-behandelter Tiere. Das Bild unten rechts zeigt unveränderte Kolonmukosa von Kontrolltieren. (25-fache Vergrößerung)

Sowohl 10 als auch 34 Wochen nach Beginn der karzinogenen Behandlung wurden AC bzw. ACF im Kolon von IGFBP-2-transgenen sowie von Wildtyp-Mäusen nachgewiesen (siehe Abbildung 4.4). Im Kolon Vehikel-behandelter Kontrolltiere wurden weder AC noch ACF zu einem der beiden Untersuchungszeitpunkte gefunden. Die Kolonmukosa dieser Tiere zeigte eine gleichmäßige Anordnung der Krypten (siehe Abbildung 4.4).

Zum früheren Analysezeitpunkt wurden im Kolon IGFBP-2 transgener Mäuse 34% mehr ACF gezählt als bei Wildtyp-Mäusen, was sich statistisch in einer Signifikanz von $**p < 0,01$ widerspiegelte (siehe Abbildung 4.5). Diese Signifikanz war durch einzelne AC und Foci von 2 AC bedingt ($*p < 0,05$) (siehe Abbildung 4.6).

Zum späteren Untersuchungszeitpunkt wiesen beide Genotypen etwa gleiche Zahlen an Foci von 1 AC bis ≥ 5 AC auf (siehe Abbildung 4.6), was sich auch in der Gesamtzahl der ACF niederschlug (siehe Abbildung 4.5).

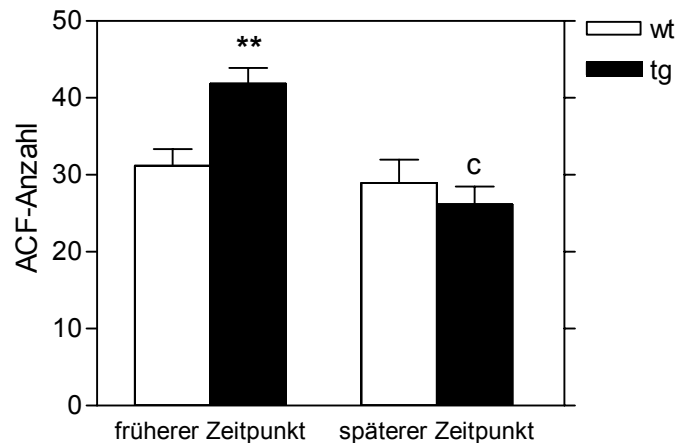


Abbildung 4.5: ACF-Gesamtzahl nicht-transgener und IGFBP-2-transgener Mäuse zum früheren und späteren Untersuchungszeitpunkt

Zum früheren Zeitpunkt entwickelten transgene Tiere signifikant mehr ACF als nicht-transgene Wurfgeschwister (** $p < 0,01$). Zum späteren Zeitpunkt war die ACF-Anzahl transgener Tiere signifikant gegenüber dem früheren Zeitpunkt vermindert ($^c p < 0,001$). Früherer Zeitpunkt: $n=10$ (wt), $n=13$ (tg); späterer Zeitpunkt: $n=19$ (wt), $n=20$ (tg);

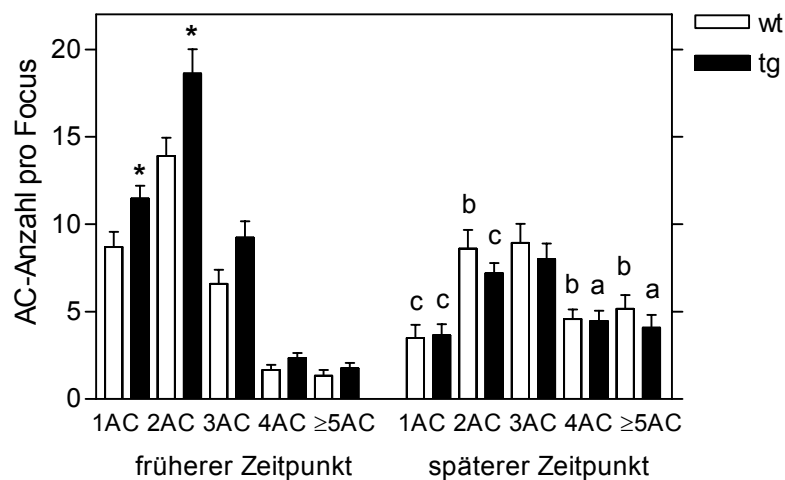


Abbildung 4.6: Anzahl der Foci mit 1 bis ≥5 AC beider Genotypen zum früheren und späteren Zeitpunkt

Zum früheren Zeitpunkt wiesen transgene Tiere signifikant mehr Foci von 1 und 2 AC auf (* $p < 0,05$). Zum späteren Zeitpunkt ging die Anzahl an 1 und 2 AC signifikant zurück ($^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$), während die von 4 AC und ≥5 AC signifikant zunahm ($^a p < 0,05$; $^b p < 0,01$). Früherer Zeitpunkt: $n=10$ (wt), $n=13$ (tg); späterer Zeitpunkt: $n=19$ (wt), $n=20$ (tg);

Im Vergleich zur frühen Phase nahm die Gesamtzahl an ACF bei beiden Genotypen ab. Während dieser Rückgang bei den Wildtypen nur 7% betrug, war er in der IGFBP-2-transgenen Gruppe mit 38% hochsignifikant ($^c p < 0,001$) (siehe Abbildung 4.5). Im Einzelnen gingen in beiden Gruppen die Anzahlen von Foci mit 1-2 AC signifikant zurück ($^b p < 0,01$; $^c p < 0,001$), während Foci mit 3 AC etwa genauso häufig

zu finden waren. Bei Foci mit 4 und 5 oder mehr AC war ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, der in der transgenen Gruppe deutlich geringer ausfiel als in der nicht-transgenen Vergleichsgruppe (^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$) (siehe Abbildung 4.6).

4.4.2 Klassifizierung der ACF

Um zum einen zwischen hyperplastischen und dysplastischen ACF zu unterscheiden und zum anderen den Grad der Dysplasie zu beurteilen, wurden die ACF im H&E-Schnitt klassifiziert. Hierzu wurden Kernzahl mit pro Krypt, Kernmorphologie, Zelldifferenzierung und Kryptenmorphologie vier histologische Parameter bewertet (siehe 3.3.6.4).

Anhand der Klassifizierung konnte festgestellt werden, dass bei IGFBP-2-transgenen Tieren signifikant weniger dysplastische ACF entstanden sind als beim Wildtyp ($*p < 0,05$). Dabei kamen sowohl ACF mit milder als auch solche mit moderater bzw. starker Dysplasie in der transgenen Gruppe seltener vor. Zudem war der Grad der Dysplasie in dieser Gruppe deutlich milder, was in einer signifikant geringeren Anzahl moderat bis stark dysplastischer ACF zum Ausdruck kam ($*p < 0,05$). Die Zahlenwerte der einzelnen ACF-Klassen sowie der Gesamtzahl aller in der Klassifizierung gefundenen ACF sind in Tabelle 4.1 angegeben sowie in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 graphisch dargestellt.

Tabelle 4.1: Anzahlen hyperplastischer und dysplastischer ACF sowie Gesamtzahl

ACF	Wildtyp n = 4	Transgen N = 5
Hyperplastisch	17 ± 4,70	20 ± 2,78
Mild dysplastisch	16,5 ± 4,21	7,8 ± 1,28
Moderat dysplastisch	6 ± 0,71	1,6 ± 0,6
Stark dysplastisch	1,75 ± 0,75	0,4 ± 0,4
Gesamtzahl	41,5 ± 8,68	29,8 ± 3,65

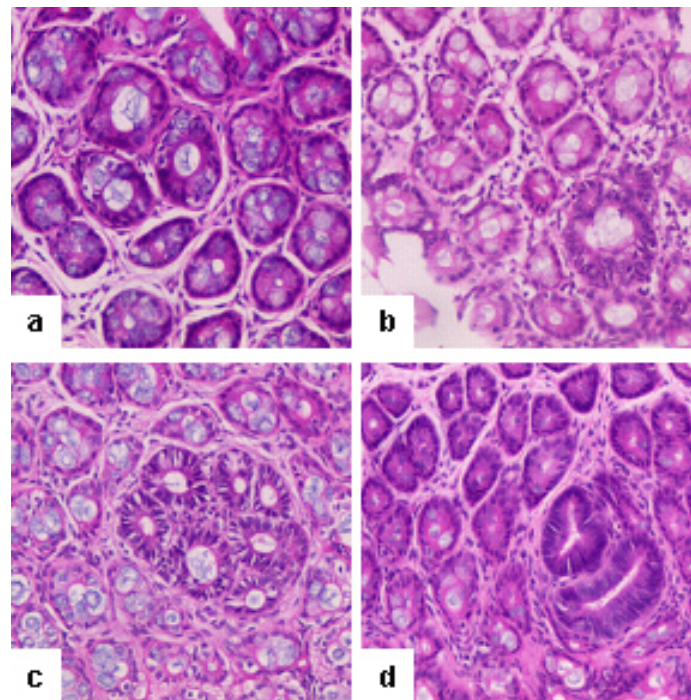


Abbildung 4.7: ACF in der H&E-Färbung

Representative ACF transgener (Bild a: hyperplastischer ACF; Bild b: mild dysplastischer ACF) und nicht-transgener Mäuse (Bild c: moderat dysplastischer und Bild d stark dysplastischer ACF).

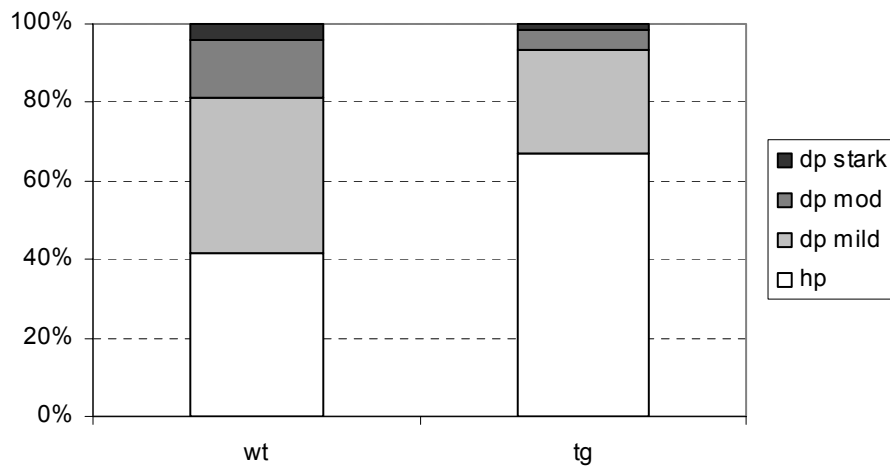


Abbildung 4.8: Anteile hyperplastischer und unterschiedlich stark dysplastischer ACF von transgenen und Wildtyp-Mäusen

Im Vergleich zum Wildtyp ist der Anteil dysplastischer ACF in der transgenen Gruppe deutlich geringer. Außerdem weisen diese ACF in der transgenen Gruppe eine geringergradige Dysplasie auf (wt n=4, tg n=5).

Durch die Bewertung der *crypt multiplicity* konnte zudem festgestellt werden, dass der Wildtyp sowohl signifikant mehr dysplastische ACF, bestehend aus 1-2 AC (*p<0,05), als auch deutlich mehr dysplastische ACF, bestehend aus mindestens 3 AC, (p=0,06), entwickelten. Diese grenzwertige Signifikanz größerer ACF wurde für

höhergradig dysplastische ACF (moderat und stark dysplastisch) deutlicher, da in der transgenen Gruppe zum einen weniger moderat dysplastische ACF zum anderen gar keine stark dysplastischen ACF entstanden (* $p < 0,05$). Hyperplastische ACF mit 1-2 AC kamen bei beiden Genotypen in etwa gleichen Anzahlen vor, während deutlich mehr größere ACF mit mindestens 3 AC beim transgenen Genotyp zu finden waren. Somit stellten größere ACF (≥ 3 AC) in der transgenen Gruppe in erster Linie den hyperplastischen ACF-Typ dar, wohingegen größere ACF in der nicht-transgenen Gruppe überwiegend vom dysplastischen ACF-Typ mit einer insgesamt höhergradigen Dysplasie geprägt wurden (siehe Abbildung 4.9)

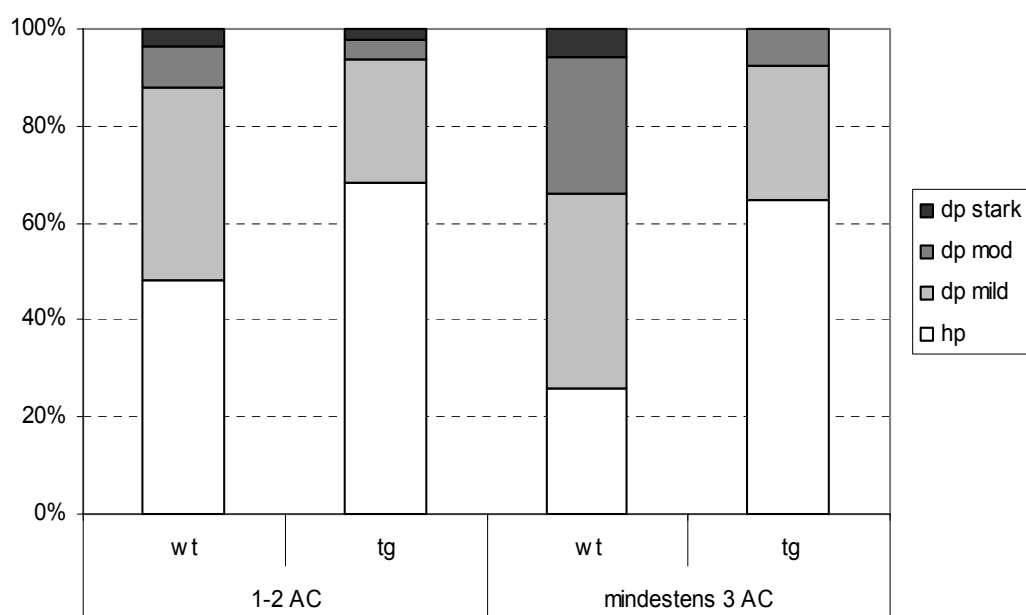


Abbildung 4.9: Anteile hyperplastischer und unterschiedlich stark dysplastischer ACF an kleinen (1-2 AC) und großen (≥ 3 AC) Foci bei nicht-transgenen Tieren

Wildtyp-Tiere entwickelten sowohl deutlich mehr kleine als auch mehr große dysplastische ACF. Dabei war der Dysplasiegrad großer ACF in dieser Tiergruppe deutlich stärker. Bei den transgenen Tieren waren die großen ACF überwiegend hyperplastisch.

4.4.3 Korrelation der ACF-Anzahl mit dem IGFBP-2-Serumspiegel

Zwischen den IGFBP-2-Serumwerten und der mit der Methylen-Färbung ermittelten Gesamtzahl an ACF bestand eine signifikant positive Korrelation ($r^2=0,2592$; * $p < 0,05$) (siehe Abbildung 4.10).

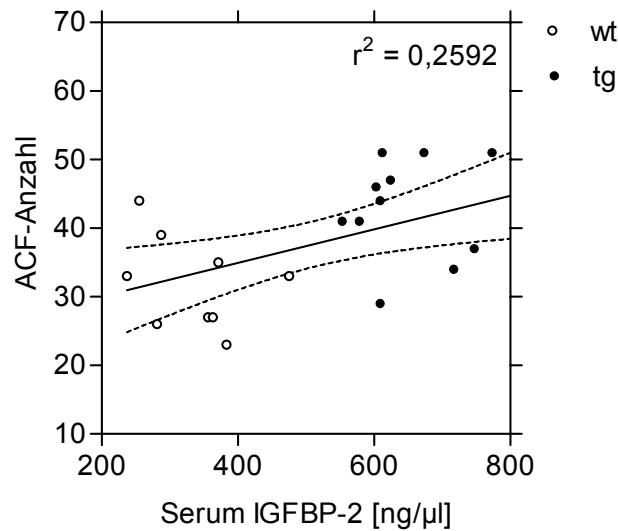


Abbildung 4.10: Korrelation von Serum-IGFBP-2 und ACF-Anzahl (Methylenblau-Färbung)

Positive Korrelation zwischen dem IGFBP-2-Serumspiegel und der Anzahl der in der Methylenblau-Färbung identifizierten ACF in IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen (* $p < 0,05$).

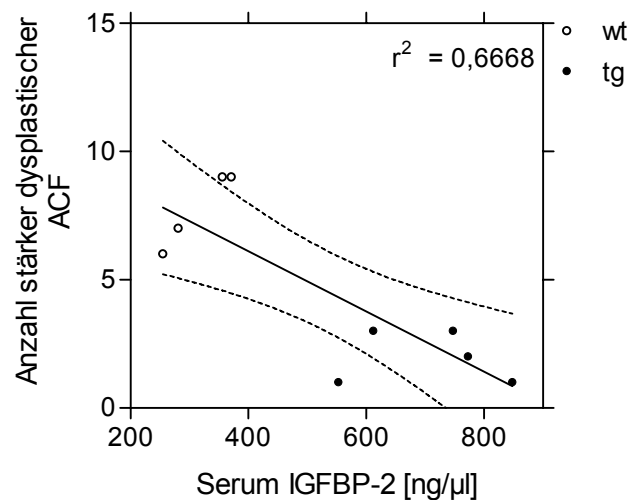


Abbildung 4.11: Korrelation von IGFBP-2-Serumspiegel und stärker dysplastischen ACF (H&E-Färbung)

Stark negative Korrelation zwischen dem IGFBP-2-Serumspiegel und der Anzahl der in der H&E-Färbung identifizierten stärker dysplastischen ACF (moderate bis starke Dysplasie) bei IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen (** $p < 0,01$).

Die IGFBP-2-Serumwerte korrelierten hingegen negativ mit der Anzahl dysplastischer ACF, die in der H&E-Färbung bestimmt wurde ($r^2 = 0,4968$; * $p < 0,05$). Für stärker dysplastische ACF wurde diese Korrelation noch deutlicher ($r^2 = 0,6668$; ** $p < 0,01$) (siehe Abbildung 4.11).

Zwischen den IGFBP-2-Serumwerten und der Anzahl an hyperplastischen ACF konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

4.4.4 Lokalisation der ACF im Kolon

Ein Grund dafür, dass ACF als präneoplastische Läsionen gelten, war die Beobachtung, dass ACF im Kolon ähnlich lokalisiert sind wie Tumoren (Shpitz 1998 Hum Pathol, Furukawa 2002 Clin Cancer) (siehe 2.1.3.1).

Zur Beurteilung der Lokalisation der ACF wurden die in der Methylenblau-Färbung identifizierten ACF den Kolonabschnitten I-III zugeteilt. Im Rahmen der Klassifizierung wurde außerdem die Verteilung von hyperplastischen und dysplastischen ACF auf die Kolonabschnitte II und III bewertet.

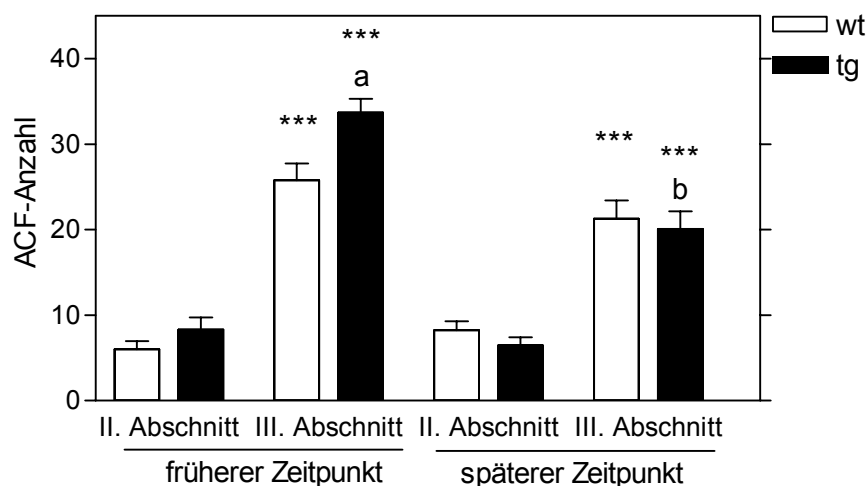


Abbildung 4.12: Lokalisation der ACF in den Abschnitten des Kolons

ACF entstanden nur im II. und III. Abschnitt des Kolons. Dabei kamen im III. Abschnitt signifikant mehr ACF vor als im Zweiten ($***p < 0,001$). Zum früheren Zeitpunkt waren im III. Abschnitt bei transgenen Tieren mehr ACF als bei Nicht-transgenen ($^ap < 0,05$). Dieser Unterschied war zum späteren Zeitpunkt aufgrund des Rückgangs der ACF-Anzahl nicht mehr gegeben ($^bp < 0,001$). Früherer Zeitpunkt: $n=10$ (wt), $n=13$ (tg); späterer Zeitpunkt: $n=19$ (wt), $n=20$ (tg);

In der Methylenblau-Färbung konnte sowohl zum früheren als auch zum späteren Analysezeitpunkt festgestellt werden, dass die ACF im zweiten und insbesondere im dritten Kolonabschnitt ACF entstanden, wohingegen sich im I. Kolonabschnitt keine ACF bildeten (siehe Abbildung 4.12). Die Anzahl der im III. Abschnitt identifizierten ACF war zu beiden Zeitpunkten signifikant größer als die des II. Abschnitts ($***p < 0,001$). Zwischen den beiden Genotypen unterschied sich Anzahl der im II.

Abschnitt vorkommenden ACF nicht voneinander. Jedoch wiesen transgene Tiere im III. Abschnitt zum früheren Zeitpunkt deutlich mehr ACF auf als Nicht-transgene (^a $p < 0,05$): Dieser Unterschied bestand in der späteren Phase aufgrund des starken Rückgangs der ACF-Anzahl transgener Tiere nicht mehr (^b $p < 0,001$) (siehe Kapitel 4.4.1).

4.4.5 Proliferation der ACF

Neben morphologischen und histopathologischen Veränderungen (siehe 4.4.1 und 4.4.2) weisen ACF auch zell-dynamische Unterschiede auf. So ist die Proliferationsrate, insbesondere bei dysplastischen ACF, gegenüber den normalen Kolonkrypten desselben Kryptenkompartiments erhöht (siehe 2.1.3.1).

In Abbildung 4.13 sind immunhistochemische Färbungen des Proliferationsmarkers Ki-67 verschiedener ACF-Typen zusammengestellt. Hyperplastische ACF (Bild a) weisen einen im Vergleich zu den umliegenden Kolonepithelzellen geringfügigen Anstieg der Proliferation auf. Im Unterschied dazu ist bei dysplastischen ACF der Anteil an Ki-67-positiven Zellen deutlich höher (Bilder b und c). Bei gleichem Dysplasiegrad zeigen kleinere ACF (Bild b) einen geringeren Anteil an proliferierenden Zellen als größere ACF (Bild c).

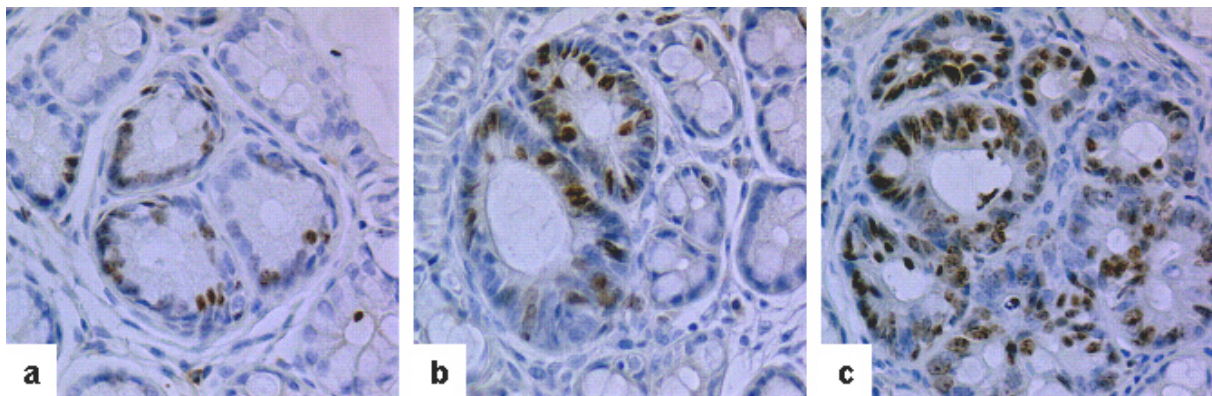


Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der Proliferation hyperplastischer und dysplastischer ACF

Im Vergleich zum umliegenden Kolonepithel zeigen hyperplastische ACF eine geringe Erhöhung der Proliferation (Bild a), während dysplastische ACF einen deutlich erhöhten Anteil an proliferierenden Zellen aufweisen (Bilder b und c). Dabei ist die Proliferationsrate bei kleineren ACF (Bild b) niedriger als bei größeren (Bild c).

4.4.6 β -Catenin-Expression im ACF

β -Catenin ist bei den Epithelzellen der Kolonkrypten ebenso wie hyperplastischen ACF an der Zellmembran lokalisiert, wo es an Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist. Bei dysplastischen ACF geht β -Catenin aus der Zellmembran zurück, akkumuliert im Zytoplasma und transloziert schließlich in den Zellkern (siehe 2.1.5.2).

Die Beurteilung der β -Catenin-Expression im ACF wurde anhand von Parallelschnitten der H&E-gefärbten Kolonquerschnitte durchgeführt, die 10 Wochen nach Beginn der DMH-Behandlung gewonnen wurden. Diese wurden mit dem Antikörper Anti- β -Catenin immunhistochemisch gefärbt (siehe 3.3.7.2). Die Schnitte stellten hyperplastische und dysplastische ACF mit unterschiedlichem Dysplasiegrad der beiden Tiergruppen dar. Die Veränderung der β -Catenin-Expression wurde anhand der drei folgenden Kriterien beurteilt: (1) Reduktion der Membranfärbung, (2) Vorhandensein der Zytoplasmafärbung und (3) Vorhandensein der Kernfärbung. Dabei wurde nicht nur das Vorliegen einer veränderten β -Catenin-Expression sondern auch die Stärke der Veränderung berücksichtigt, wobei zwischen einer gering-, mittel- und hochgradig veränderten Expression unterschieden wurde.

Hyperplastische ACF zeigten eine den umliegenden Epithelzellen entsprechende Membranfärbung. Eine Akkumulation im Zytoplasma oder im Zellkern war bei diesem ACF-Typ nicht zu beobachten.

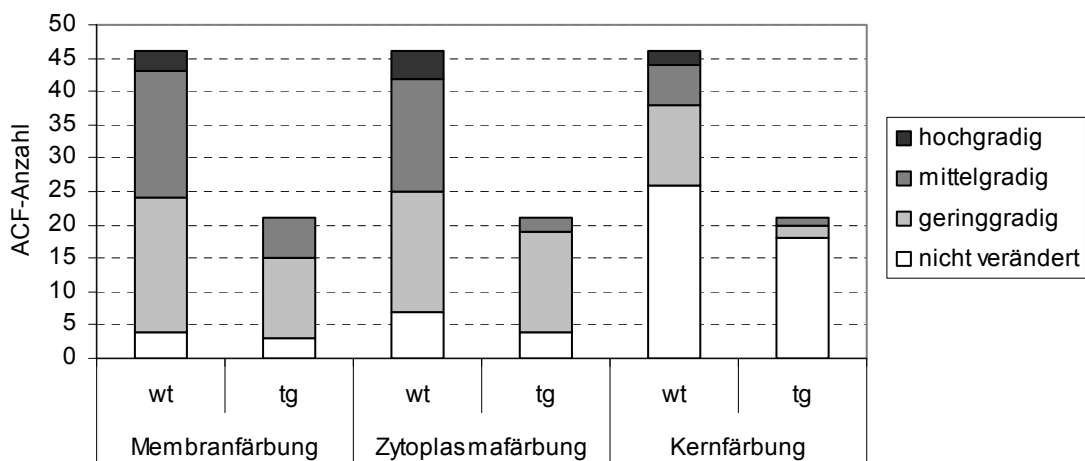


Abbildung 4.14: Vergleich der membranösen, zytoplasmatischen und nukleären β -Catenin-Färbung in dysplastischen ACF nicht-transgener und transgener Tiere

In der Graphik sind die unterschiedlichen Stärkegrade der Merkmalsausprägung in absoluten Zahlen angegeben. Sowohl in der Membran, als auch im Zytoplasma und im Zellkern ist die Veränderung der β -Catenin-Färbung beim transgenen Genotyp milder ausgeprägt (wt: n=46; tg: n=21).

Im Unterschied dazu wiesen dysplastische ACF häufig eine veränderte β -Catenin-Färbung in der Zellmembran, im Zytoplasma und im Zellkern auf, wobei diese Veränderungen in der transgenen Gruppe geringer ausgeprägt waren als beim Wildtyp. Die Membranfärbung ging in der Wildtyp-Gruppe bei 91% (42 von 46) der ACF und in der transgenen Gruppe bei 86% (18 von 21) der ACF zurück. Dieser Rückgang war bei den ACF des Wildtyps bei 41% mittelgradig und bei 7% hochgradig ausgebildet. Beim transgenen Genotyp erreichte dieses Merkmal nur eine mittelgradige Ausprägung, die bei 29% der ACF auftrat (siehe Abbildung 4.14). Bezüglich der Stärke des Rückgangs der Membranfärbung war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen zu verzeichnen.

Eine zytoplasmatische Akkumulation von β -Catenin trat bei 85% (39 von 46) der ACF nicht-transgener sowie bei 81% (17 von 21) der ACF transgener Tiere auf. Während beim Wildtyp 39% der ACF eine geringe, 37% eine mittlere und 9% eine starke Färbung im Zytoplasma zeigten, dominierte beim transgenen Genotyp die geringgradige Form (71%). Eine mittelgradige Ausprägung wurde bei 10%, eine hochgradige Ausprägung bei keinem der ACF transgener Tiere nachgewiesen (siehe Abbildung 4.15). Somit war die zytoplasmatische β -Catenin-Akkumulation in den ACF des Wildtyps signifikant stärker ausgebildet (Chi-Quadrat Test: $**p < 0,01$).

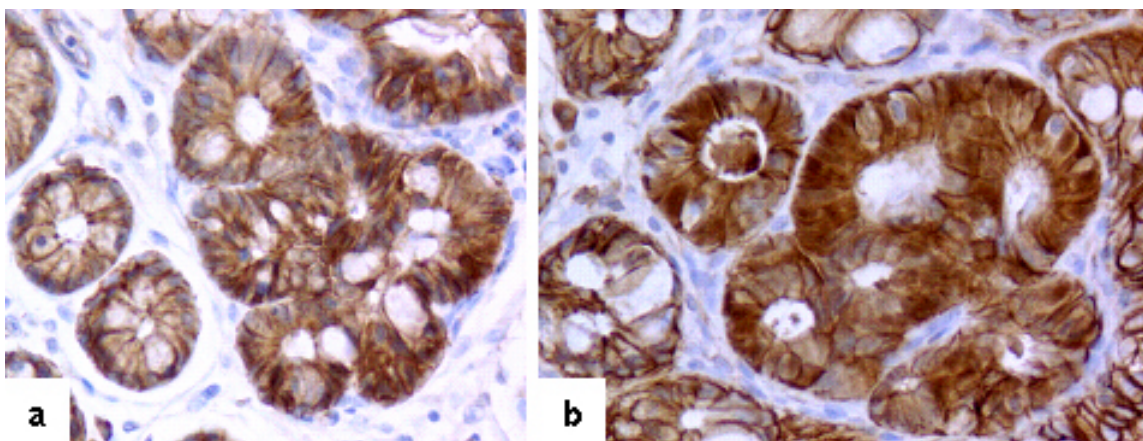


Abbildung 4.15: Zytoplasmatische β -Catenin-Färbung bei dysplastischen ACF transgener und nicht-transgener Tiere

Bild a zeigt einen ACF der transgenen Gruppe mit geringer β -Catenin-Färbung im Zytoplasma. In Bild b ist ein ACF des Wildtyps mit deutlicher β -Catenin-Zytoplasmafärbung dargestellt (wt: n=46; tg: n=21).

Eine Translokation von β -Catenin in den Zellkern wurde bei 46% der ACF des Wildtyps, aber nur bei 15% der ACF des transgenen Genotyps beobachtet und kam

somit bei transgenen Tieren signifikant seltener vor (Chi-Quadrat Test: $*p < 0,05$; siehe Abbildung 4.16). In der Wildtyp-Gruppe wurde diese nukleäre Akkumulation bei 26% der ACF als geringgradig, bei 13% als mittelgradig und bei 4% als hochgradig bewertet. Im Vergleich dazu war dieses Merkmal, mit einer geringgradigen Expression bei 10% der ACF, einer mittelgradigen Expression bei 5% und einer fehlenden hochgradigen Expression, in der transgenen Gruppe zwar deutlich aber nicht signifikant milder ausgeprägt.

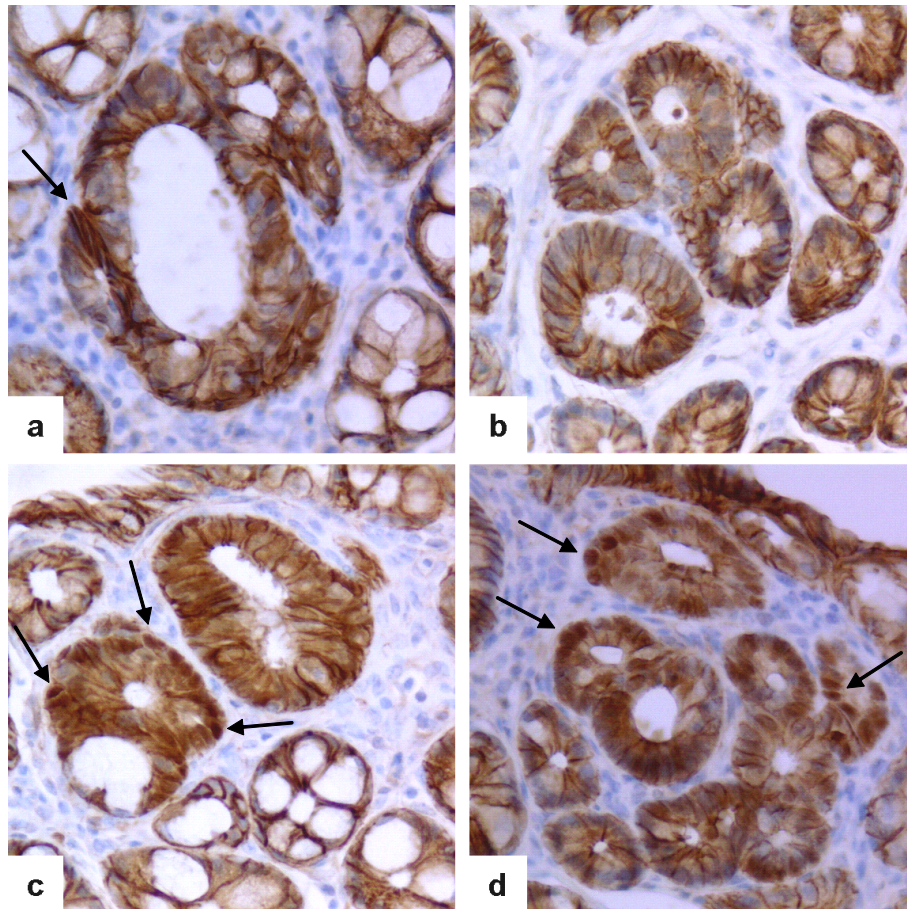


Abbildung 4.16: β -Catenin-Kernfärbung bei dysplastischen ACF transgener und nicht-transgener Tiere

Die ACF des transgenen Genotyps zeigen keine (Bild a) bzw. eine geringe (Bild b) nukleäre β -Catenin-Färbung, während die ACF des Wildtyps eine deutlichere Kernfärbung aufweisen (Bilder c und d; wt: n=46; tg: n=21).

4.5 Analyse der Tumoren

4.5.1 Tumorprävalenz und Klassifizierung

34 Wochen nach Beginn der DMH-Behandlung entwickelten sowohl IGFBP-2-transgene als auch Wildtyp-Mäuse makroskopisch sichtbare Tumoren (siehe Abbildung 4.17).

Die Tumorprävalenz war mit 34% (13 von 38 Tieren) in der Wildtyp-Gruppe und 35% (14 von 40 Tieren) in der transgenen Gruppe bei beiden Genotypen vergleichbar. Dabei entwickelten sich bei drei Wildtyp- und fünf transgenen Tieren zwei Tumoren sowie bei jeweils einem Tier drei Tumoren, während bei den meisten Tieren ein Tumor entstand.

Alle Tumoren der histologischen Untersuchungsgruppen wurden histopathologisch klassifiziert. Während in der Gruppe nicht-transgener Mäuse acht Tumoren als Kolondenome klassifiziert wurden, entstanden in der transgenen Gruppe zwölf Kolonadenome und ein Kolonkarzinom.

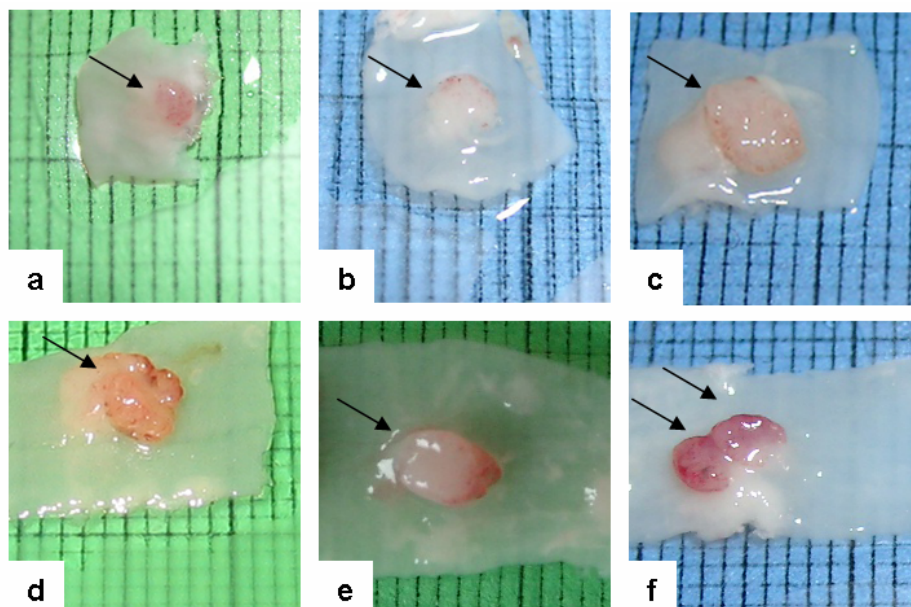


Abbildung 4.17: Kolontumoren IGFBP-2-transgener und Wildtyp-Mäuse

Die Bilder a-c zeigen Tumoren IGFBP-2-transgener Tiere. Tumoren nicht-transgener Tiere sind in den Bildern d-e dargestellt.

4.5.2 Lokalisation der Tumoren

Durch die Bestimmung der Lokalisation der Tumoren im Kolon konnten diese den Kolonabschnitten I-III bzw. dem Kolon ascendens, transversum bzw. descendens sowie dem Rektum zugeordnet werden.

In Übereinstimmung mit der Lokalisation der ACF waren auch die Tumoren nur in den Kolonabschnitten II und III zu finden. Der überwiegende Teil der Tumoren entstand dabei in beiden Tiergruppen im III. Abschnitt. Im einzelnen waren beim Wildtyp 7 der 18 Tumoren im II. Kolonabschnitt und 11 der 18 Tumoren im III.

Abschnitt lokalisiert. Bei transgenen Tieren entwickelten sich 7 von 21 Tumoren im Zweiten und 14 von 21 Tumoren im III. Kolonabschnitt. Unter anatomischen Gesichtspunkten, waren die Tumoren im Kolon transversum und descendens sowie im Rektum lokalisiert, während das Kolon ascendens keine Tumoren aufwies. Beim Wildtyp entwickelten sich 15 der 18 Tumoren im Kolon descendens, während ein Tumor dem Kolon transversum und 2 Tumoren dem Rektum zuzuordnen waren. Von den Tumoren transgener Tiere war ebenfalls der überwiegende Anteil (17 von 21) im Kolon descendens lokalisiert. Im Kolon transversum wurde 1 Tumor und im Rektum 3 Tumoren gezählt.

4.5.3 Tumolvolumen und Korrelation mit dem IGFBP-2-Serumspiegel

Zur Bestimmung der Tumorlast wurde das Volumen der Tumoren nach der Formel $V = \frac{4}{3} \pi L/2 B/2 H/2$ berechnet (siehe 3.3.5). Bei den Tieren, bei denen sich mehr als ein Tumor entwickelt hatte, wurde die Summe der Tumolvolumina als Kennzahl der Tumorlast eines Tieres berechnet.

Das Volumen der Tumoren transgener Tiere war um den Faktor 2,3 kleiner als das des Wildtyps (siehe Abbildung 4.18). Aufgrund der höheren Messgenauigkeit wurde das Tumolvolumen anhand der Vermessung der PFA-fixierten Kolonadenome berechnet. Wegen der stark abweichenden Morphologie wurde das Karzinom nicht in die Berechnungen des Tumolvolumens miteinbezogen.

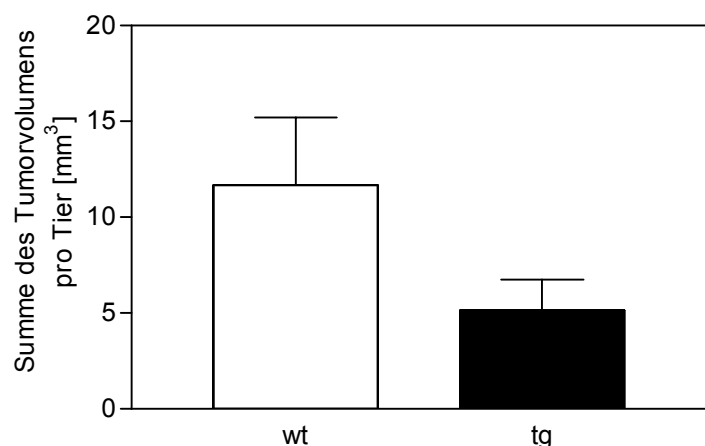


Abbildung 4.18: Volumen PFA-fixierter Tumoren (Adenome) transgener und nicht-transgener Tiere

Das Tumolvolumen war in der transgenen Gruppe (12 Tumoren) um das 2,3-fache kleiner als in der Wildtyp-Gruppe (8 Tumoren).

Zur Verdeutlichung der geringeren Tumorlast transgener Tiere konnte in einer Korrelationsanalyse gezeigt werden, dass das Tumolvolumen mit steigendem IGFBP-2-Serumspiegel transgener Tiere abnimmt (siehe Abbildung 4.19).

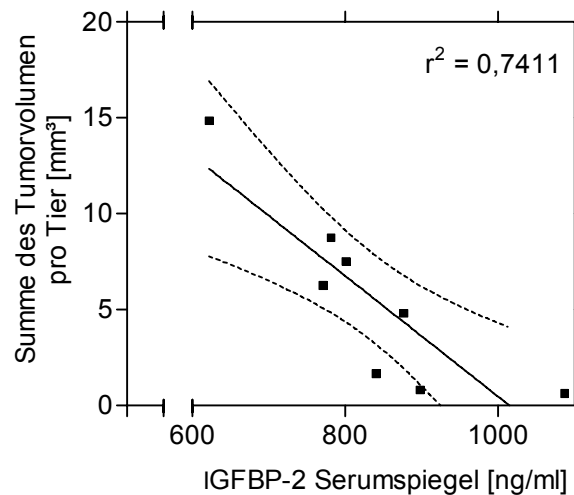


Abbildung 4.19: Negative Korrelation von Tumolvolumen und IGFBP-2-Serumspiegel

4.5.4 Proliferations- und Apoptoserate der Tumoren

Der Proliferations- sowie der Apoptoseindex der Tumoren wurde durch immunhistochemische Färbung des Ki-67-Antigens bzw. des Cleaved Caspase-3-Antigens bestimmt. Der Proliferationsindex gibt zum einen Auskunft über die Größe der Wachstumsfraktion eines Gewebes und ist zum anderen bei Tumorerkrankungen von prognostischer Relevanz. Der Apoptoseindex ist als weiterer Zellzyklusparameter für die Regulation des Gewebeerhaltes im Tumor von Bedeutung.

Der Anteil der Ki-67 positiven Zellen im Tumor belief sich auf durchschnittlich 33,2% in der transgenen Gruppe gegenüber 48,0% beim Wildtyp. Somit war der Proliferationsindex der Tumoren transgener Tiere signifikant niedriger (* $p < 0,05$; siehe Abbildung 4.20 und Abbildung 4.20).

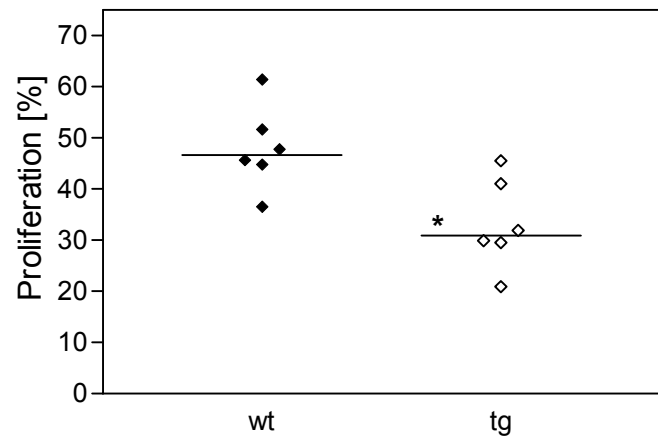


Abbildung 4.20: Proliferationsindex der Tumoren von transgenen und nicht-transgenen Tieren

Die Proliferation wurde anhand des Ki-67-Markierungsindex bestimmt. Die Tumoren transgener Tiere wiesen signifikant weniger Tumorzellen in der Proliferationsphase auf als die Tumoren des Wildtyps (* $p < 0,05$). In der Abbildung ist der Median dargestellt.

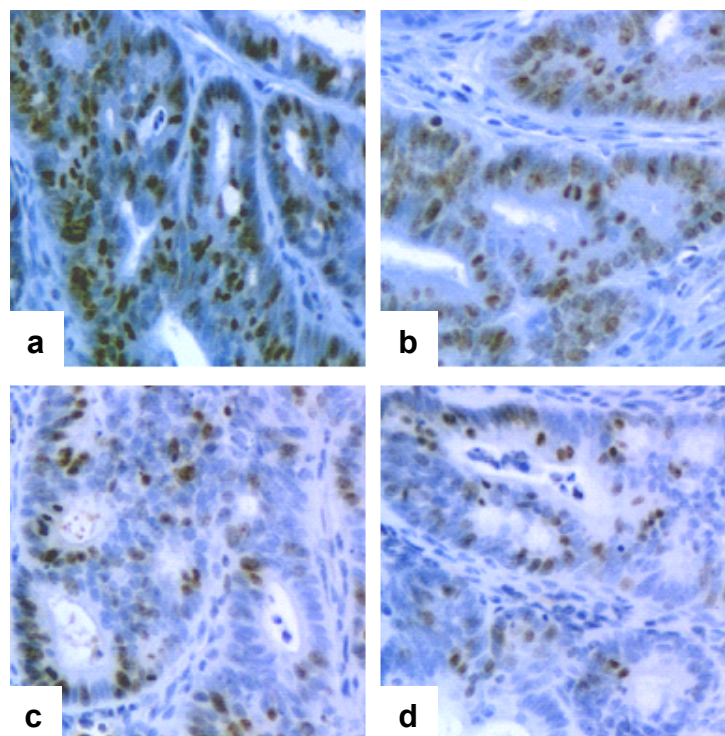


Abbildung 4.21: Proliferation in Tumoren von IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Tieren

Die braun gefärbten Zellkerne sind Ki-67-positiv. Die Bilder zeigen Ausschnitte aus Tumoren von nicht-transgenen (Bilder a und b) sowie von transgenen Tieren (Bilder c und d). Tumoren des transgenen Genotyps weisen einen geringeren Proliferationsindex auf.

Der mit dem Apoptosemarker Cleaved Caspase-3 ermittelte Index betrug bei Tumoren IGFBP-2-transgener Tiere im Durchschnitt 2,6 % und bei Wildtyp-Tieren 2,3 %. Somit unterschied sich der Anteil apoptotischer Zellen in den Adenomen der

beiden Tiergruppen nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23).

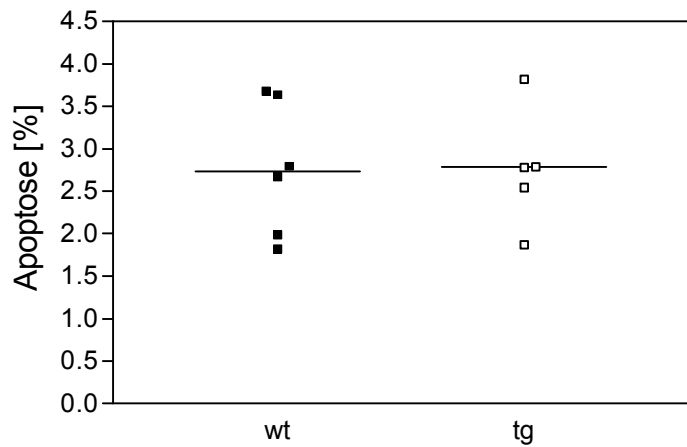


Abbildung 4.22: Apoptoseindex der Tumoren von transgenen und nicht-transgenen Tieren

Die Apoptose wurde immunhistochemisch über das Protein Cleaved Caspase-3 bestimmt. Die Apoptoserate unterscheidet sich bei transgenen und nicht-transgenen Tieren nicht voneinander. In der Abbildung ist der Median dargestellt.

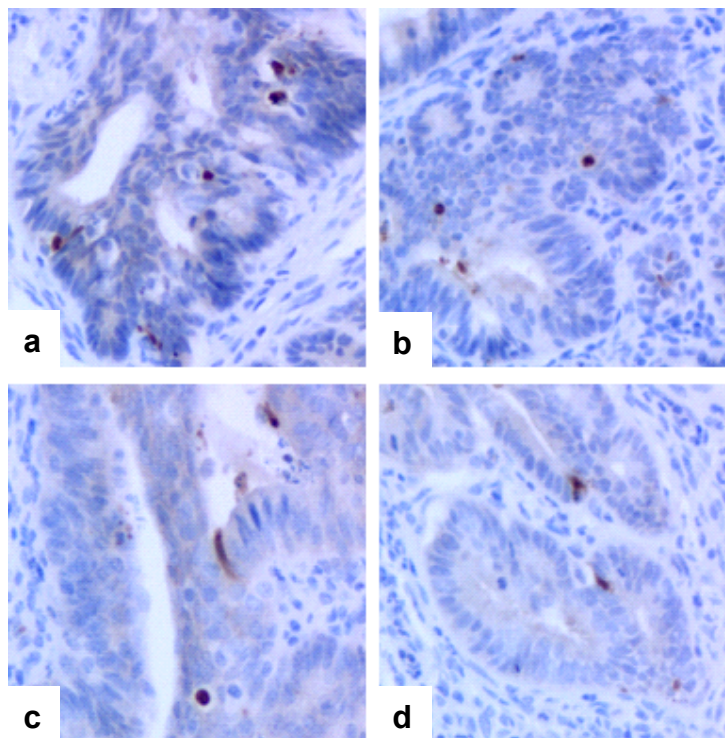


Abbildung 4.23: Apoptose in Tumoren von IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Tieren

Die Bilder zeigen Ausschnitte aus Tumoren, in denen sich apoptotische Zellen durch die Bestimmung des Caspase-3-Antigens braun färben. Zwischen den Tumoren nicht-transgener (Bilder a und b) und den Tumoren transgener Tiere (Bilder c und d) ist kein Unterschied zu erkennen.

4.5.5 Expression und Lokalisation von β -Catenin im Adenom

Wie bei den ACF im frühen Stadium der Kolonkarzinogenese wurde die Expression von β -Catenin auch in den zum späteren Analysezeitpunkt entstandenen Tumoren beurteilt (siehe 4.5.5). Zur Beurteilung der β -Catenin-Expression wurden Serienschritte von acht Adenomen des Wildtyps sowie von zehn Adenomen des transgenen Genotyps mit dem Antikörper Anti- β -Catenin immunhistochemisch gefärbt (siehe 3.3.7.2). Die Veränderung der β -Catenin-Färbung wurde anhand von drei Merkmalen beurteilt: (1) Reduktion der β -Catenin-Färbung aus der Zellmembran, (2) Färbung von β -Catenin im Zytoplasma und (3) Färbung von β -Catenin im Zellkern. Neben dem Vorliegen eines Merkmals wurde zudem die Stärke der Ausprägung eines Merkmals graduell bewertet, indem diese als fehlend, gering-, mittel- bzw. hochgradig eingestuft wurde.

Alle Tumoren des Wildtyps sowie 9 der 10 Tumoren des transgenen Genotyps zeigten einen Rückgang der Membranfärbung von β -Catenin, der in beiden Tiergruppen gleich stark ausgeprägt war (siehe Abbildung 4.24 und

Abbildung 4.25). Dabei zeigte der Großteil der Tumoren, d.h. 75% (6 von 8) beim Wildtyp und 60% (6 von 10) beim transgenen Genotyp, einen mittelgradigen Rückgang der Membranfärbung. Bei einem Tumor des Wildtyps und bei zwei Tumoren des transgenen Genotyps wurde dieses Merkmal als geringgradig sowie bei je einem Tumor pro Gruppe als hochgradig eingestuft.

Eine Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma wurde bei allen Tumoren beobachtet (siehe Abbildung 4.24 und

Abbildung 4.25). In der Wildtyp-Gruppe war die zytoplasmatische Expression bei 25% (2 von 8) der Tumoren geringgradig und bei 75% (6 von 8) Tumoren mittelgradig ausgeprägt. In der transgenen Gruppe wurde die Akkumulation im Zytoplasma bei der Hälfte der Tumoren als geringgradig und bei der anderen Hälfte als mittelgradig eingestuft. Bei diesem Merkmal konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Stärke seiner Ausprägung in den beiden Tiergruppen festgestellt werden.

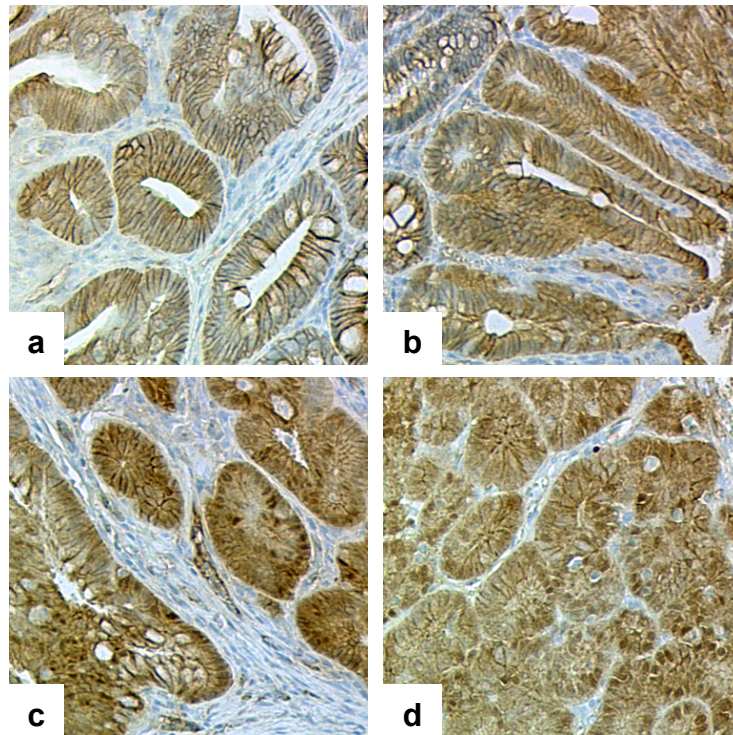


Abbildung 4.24: β -Catenin-Färbung Tumoren von transgenen und Wildtyp-Tieren

Die Bilder a und b zeigen Ausschnitte aus Tumoren IGFBP-2-transgener Tiere. In diesen ist ein Bereich ohne Akkumulation von β -Catenin (Bild a) sowie ein Bereich mit geringer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma dargestellt. In den Bildern c und d sind Tumorausschnitte des Wildtyps dargestellt, die eine deutliche zytoplasmatische und nukleäre β -Catenin-Färbung aufweisen.

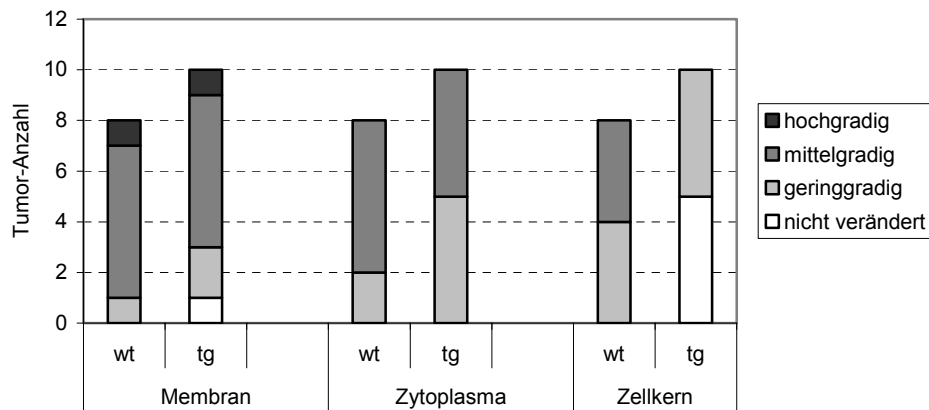


Abbildung 4.25: Veränderung der β -Catenin-Färbung in Tumoren nicht-transgener und transgener Tiere

β -Catenin zeigt bei allen Wildtyp-Tumoren und bei 90% der transgenen Tumoren einen Rückgang der Membranexpression, der in seiner Intensität in beiden Tiergruppen etwa gleichstark ausgeprägt ist. Alle Tumoren weisen eine zytoplasmatische Färbung auf, die bei 75% der Tumoren des Wildtyps sowie bei 50% der Tumoren des transgenen Genotyps als mittelgradig eingestuft wurde. Eine nukleäre Färbung trat bei allen Tumoren in der Wildtyp-Gruppe auf, wobei die Hälfte der Tumoren eine geringe und die andere eine mittelgradige Färbungsintensität im Zellkern aufwies. Hingegen zeigen nur 50% der Tumoren transgener Tiere eine veränderte Kernfärbung (* $p < 0,05$), die als geringgradig eingestuft wurde.

Analog zur Membran- und Zytoplasmafärbung war auch die Kernfärbung von β -Catenin in allen Tumoren von Wildtyp-Tieren verändert (siehe Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Hierbei zeigte die Hälfte der Tumoren eine geringe, die andere Hälfte eine mittelgradige Akkumulation. Im Unterschied dazu zeigten nur fünf Tumoren transgener Tiere eine Färbung von β -Catenin im Zellkern. Bei den anderen fünf Tumoren des transgenen Genotyps war eine geringgradige nukleäre Translokation zu beobachten. Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern von Tumoren kam in der transgenen Gruppe signifikant seltener vor als beim Wildtyp (Exakter Test nach Fischer: $*p < 0,05$).

4.5.6 Korrelation von β -Catenin-Färbung und Tumolvolumen

Durch eine Korrelationsanalyse, in der die Stärke der nukleären β -Catenin-Färbung mit dem Volumen der Tumoren in Bezug gesetzt wurde, konnte festgestellt werden, dass zwischen den beiden Größen ein positiver Zusammenhang besteht. So zeigen die Tumoren mit dem größten Tumolvolumen die stärkste Akkumulation von β -Catenin im Zellkern ($r^2 = 0,23$; $*p < 0,05$).

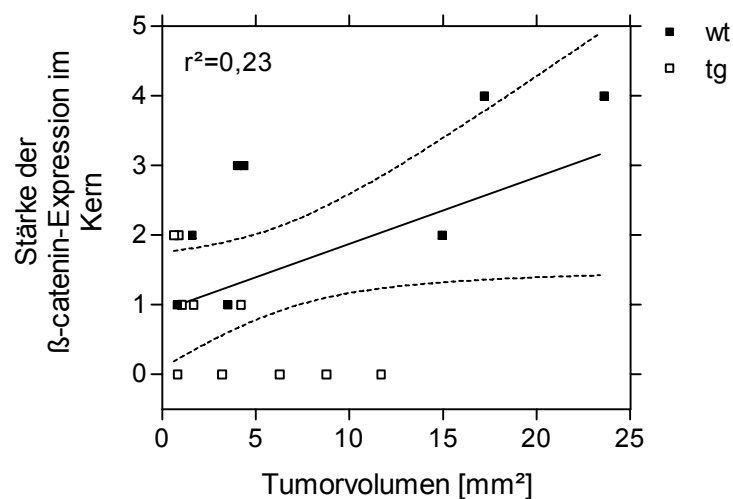


Abbildung 4.26: Korrelation des Tumolvolumens mit der Stärke der nukleären β -Catenin-Färbung

Die Stärke der β -Catenin-Färbung im Zellkern korreliert positiv mit dem Volumen der Tumoren ($*p < 0,05$). Die gepunkteten Linien geben das 95%-ige Konfidenz-Intervall an.

Zwischen der Stärke der β -Catenin-Akkumulation im Zytoplasma und dem Rückgang der Membranexpression konnte kein Bezug zum Volumen der Tumoren hergestellt werden.

4.6 Analyse der Genexpression

Durch Quantitative Real-Time PCR wurde die Auswirkung einer Überexpression von IGFBP-2 auf die Transkription von bestimmten Genen untersucht. Zu den Kandidatengenen zählten Zielgene von β -Catenin, die aufgrund der deutlich geringeren nukleären Translokation von β -Catenin bei Tumoren IGFBP-2-transgener Mäuse von Interesse waren. Darüber hinaus wurden weitere Kandidatengene untersucht, für die eine differenzielle Expression unter dem Einfluss einer IGFBP-2-Überexpression beschrieben wurde. Neben diesen Kandidatengenen wurde das Expressionsniveau von IGFBP-2 und IGF-II zur Charakterisierung des Kolon- und Tumorgewebes bestimmt.

Die Genexpressionsanalysen wurden zum früheren sowie zum späteren Untersuchungszeitpunkt in der Kolonkarzinogenese durchgeführt. Für die Untersuchung zum früheren Zeitpunkt, der 10 Wochen nach Beginn der Behandlungen mit dem Kolonkarzinogen DMH bzw. dem Vehikel stattfand, wurde der III. Kolonabschnitt verwendet, da in diesem aufgrund der histologischen Ergebnisse mit einer größeren Anzahl an ACF zu rechnen war als im II. Darmabschnitt (siehe 4.4.4). Die Probenzahl belief sich auf fünf Proben pro Tiergruppe. Neben der Untersuchung eines möglichen Einflusses von IGFBP-2 auf die Expression von Genen im gesunden Kolongewebe sowie im DMH-behandelten Kolon, wurde außerdem geprüft, ob die DMH-Behandlung eine mögliche Auswirkung auf die Transkription der Gene hat. Zum späteren Untersuchungszeitpunkt zehn Tumoren, die von 19 Wildtyp-Mäusen, und acht Tumoren, die von 20 transgenen Mäusen stammten, analysiert.

Im Folgenden wird in Kapitel 4.6.1 zunächst auf die Ergebnisse der Auswahl geeigneter Housekeeping-Gene zur Normalisierung der Daten eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse der Genexpression für die Analysen im Kolon- und im Tumorgewebe in Abschnitt 4.6.2 separat dargestellt.

4.6.1 Normalisierung

Zur Bestimmung des Expressionsniveaus von Genen wird ein internes Kontrollgen (Housekeeping-Gen - HKG) verwendet. Das HKG sollte dabei in allen Proben, die von verschiedenen Individuen stammen, auf gleichem Niveau exprimiert werden und von experimentellen Bedingungen unbeeinflusst sein (Bustin 2000). Da jedoch die

Expression von HKG Schwankungen häufig unterliegt, wird in der aktuellen Literatur die sorgfältige Prüfung auf deren Eignung als HKG empfohlen (de Kok et al. 2005; Huggett et al. 2005). Darüber hinaus wird durch die Verwendung von mehreren internen Kontrollen der Fehler eines einzelnen HKG reduziert (Vandesompele et al. 2002).

Um eine möglichst präzise Normalisierung zu gewährleisten, wurde das Expressionsniveau der Zielgene anhand des Normalisierungsfaktors berechnet, der sich aus den HKG ableitet, deren Expression in den Proben am wenigsten Schwankungen zeigte. Diese Expressionsstabilität wurde für die HKG β -Actin (Actb), RPLP2, HRPT1, PGK und SDHA mit Hilfe des Programms GeNorm/Visual Basic Application (VBA) (Vandesompele et al. 2002) ermittelt und validiert (siehe 3.3.9.7 und Tabelle 4.2). In den Proben der Kurzzeitstudie wurde eine abnehmende Stabilität der Gene β -Actin, RPLP2, SDHA, HRPT1 und PGK gemessen, während diese in der Langzeitstudie von RPLP2 über β -Actin, PGK, SDHA und HRPT1 geringer wurde (siehe Abbildung 4.27).

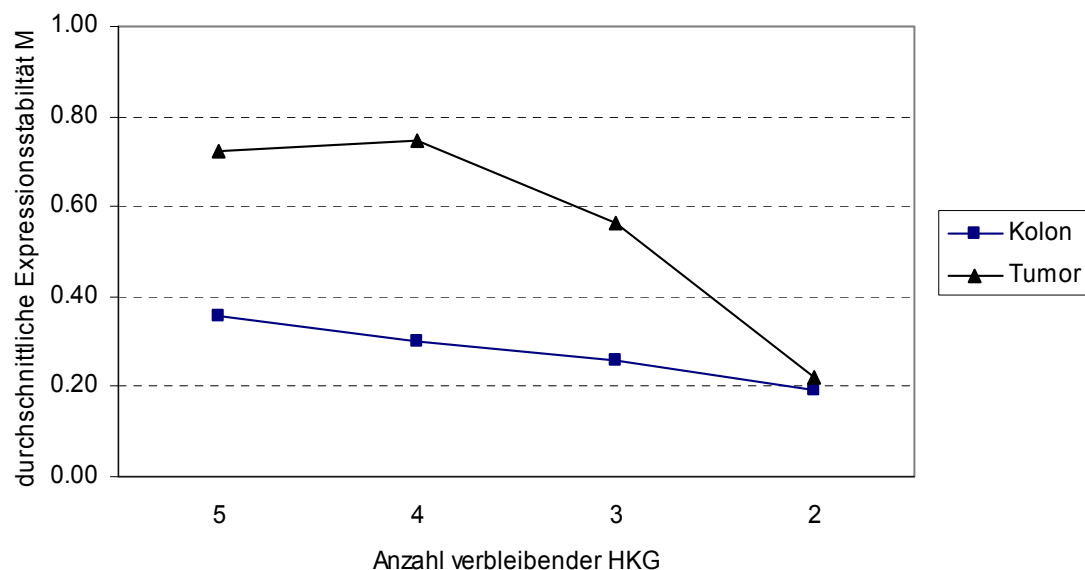


Abbildung 4.27: Expressionsstabilität der Housekeeping-Gene β -Actin, RPLP2, HRPT1, PGK und SDHA im Kolon- und Tumorgewebe

Durchschnittliche Expressionsstabilität M der verbleibenden HKG bei schrittweisem Ausschluss des Kontrollgens mit der höchsten Schwankung im Kolon- und im Tumorgewebe. Die Dreiecke kennzeichnen die durchschnittlichen Werte der Kolonproben, die Vierecke die der Tumorproben. (Kolon n=20; Tumor n=18).

Tabelle 4.2: Bezeichnung, Genbank Accession number und Proteinfunktion der Housekeeping-Gene

Bezeichnung des Gens	Genbank Accession number	Proteinfunktion
Mus musculus actin, beta, cytoplasmatic (Actb), mRNA	NM_007393.1	Strukturprotein des Zytoskeletts
Mus musculus hypoxanthine guanine phosphoriboryl transferase 1 (Hrpt 1), mRNA	NM_013556.1	Purinsynthese
Mus musculus phosphoglycerate kinase 1 (Pgk1), mRNA	NM_008828	Enzym der Glykolyse
Mus musculus succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) (Sdha), mRNA	NM_023281.1	Elektronentransport in der Atmungskette
Mus musculus ribosomal protein, large P2 (Rplp2), mRNA	NM_002602	Strukturkomponente der ribosomalen 60 S Untereinheit

Die Varianzen der Normalisierungsfaktoren (NF), die durch paarweise Varianzanalysen unter schrittweisem Einschluss des nächststabilsten HKG berechnet wurden, lagen in beiden Untersuchungsgruppen deutlich unter dem Richtwert von 0,15 (siehe Abbildung 4.28). Somit war das Einbeziehen eines weiteren Kontrollgens nicht notwendig. Daher wurde die empfohlene Anzahl von drei HKG für die Normalisierung der Daten ausreichend.

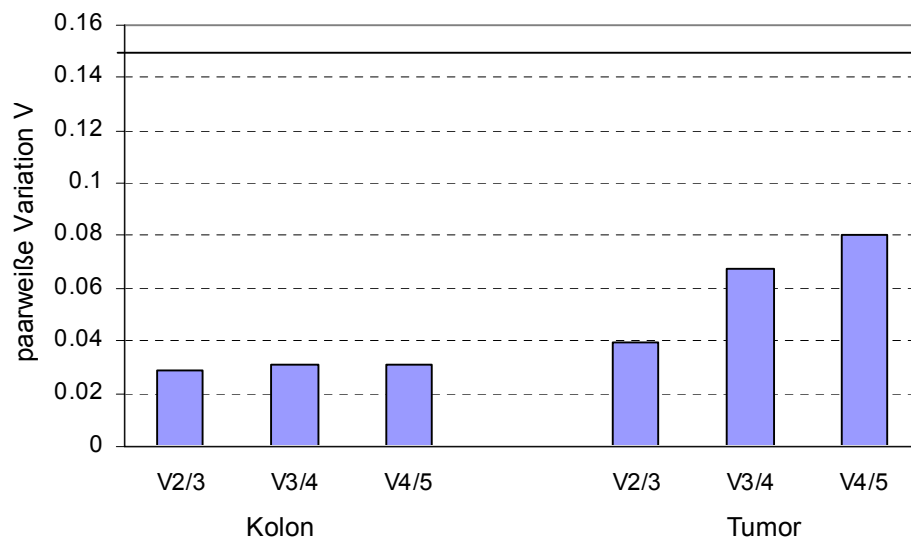


Abbildung 4.28: Paarweise Variation der Normalisierungsfaktoren für Kolon und Tumor

Die Abbildung zeigt die paarweise Variation $V_{n/n+1}$ zwischen den Normalisierungsfaktoren $NF_{n/n+1}$ zur Bestimmung der optimalen Anzahl an Kontrollgenen. Die Werte der Kolonproben (links) und der Tumorproben (rechts) liegen deutlich unter dem empfohlenen Richtwert 0,15 (durchgezogene Linie). Unterhalb dieses Wertes ist ein weiteres HKG nicht erforderlich.

Zusätzlich zu den Varianzanalysen wurden zur Validierung der HKG auch Korrelationsanalysen durchgeführt. Während sich die Korrelation der Normalisierungsfaktoren NF2/3 gegenüber NF3/4 im Kurzzeitversuch nicht veränderte (NF2/3 Spearman $r=0,9364$; NF3/4 $r = 0,9234$), wurde diese im Langzeitversuch durch das dritte HKG deutlich verbessert (NF2/3 Spearman $r=0,6574$; NF3/4 $r = 0,9030$).

Aufgrund der geringen Varianzen sowie der guten Korrelationen wurden zur Normalisierung der Kolonproben des früheren Analysezeitpunktes die HKG β -Actin, RPLP2 und SDHA sowie zur Auswertung der Tumordaten des späteren Zeitpunktes die internen Kontrollen RPLP2, β -Actin und PGK eingesetzt.

4.6.2 Genexpression

Mittels quantitativer Real-Time PCR wurde die Expression ausgewählter Gene auf mRNA-Ebene sowohl zum früheren als auch zum späteren Analysezeitpunkt bestimmt. Neben einzelnen Faktoren des IGF-Systems zählten hierzu verschiedene Kandidatengene, die in der Literatur als Zielgene von β -Catenin beschrieben sind oder die in Zusammenhang mit IGFBP-2 gebracht wurden. Dabei sind diese Gene für die Regulation des Zellzyklus und die Progression bzw. Invasion von Tumoren von Bedeutung (siehe Tabelle 4.3).

In der frühen Phase der Kolonkarzinogenese wurde die Genexpression im Kolon der vier Gruppen (1) Wildtyp/DMH (2) IGFBP-2-transgen/DMH (3) Wildtyp/Vehikel und (4) IGFBP-2-transgen/Vehikel untersucht. Die Anzahl der Kolonproben pro Gruppe betrug $n=5$. Durch den Vergleich des nicht-transgenen mit dem transgenen Genotyp in beiden Behandlungsgruppen (DMH bzw. Vehikel) wurde der Einfluss der Überexpression von IGFBP-2 auf die Transkription bestimmter Gene analysiert. Darüber hinaus wurde eine mögliche Auswirkung der karzinogenen Behandlung auf die Expression der Gene durch die Gegenüberstellung von DMH- und Vehikel-Gruppe bei beiden Genotypen geprüft.

In der späteren Phase der Kolonkarzinogenese wurde das Expressionsniveau der Kandidatengene in den Tumoren nicht-transgener und transgener Tiere bestimmt und dadurch den Einfluss einer IGFBP-2-Überexpression auf die Transkription der Kandidatengene untersucht. Hierzu standen in der Wildtyp-Gruppe zehn und in der transgenen Gruppe acht Tumoren zur Verfügung.

Tabelle 4.3: Bezeichnung, Genbank Accession number und Proteinfunktion der Kandidatengene

Bezeichnung des Genproduktes	Genbank Accession number	Proteinfunktion
Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2), mRNA	NM_008342	IGF-Bindungsprotein
Mus musculus insulin-like growth factor binding protein 3 (Igfbp3), mRNA	NM_008343.2	IGF-Bindungsprotein
Mus musculus insulin-like growth factor 2 (Igf2), mRNA	NM_010514.1	Wachstumsfaktor
Mus musculus inhibitor of apoptosis homolog mRNA (Survivin), complete cds.	AF_077349.1	Zellzyklus (Apoptose)
Mouse multidrug resistance protein (MDR) mRNA, complete cds.	M_30697.1	Zellzyklus (Apoptose)
Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a), mRNA	NM_007699.2	Zellzyklus (Zellzyklusarrest)
Mus musculus cyclin D1 (Ccnd1), mRNA	NM_007631.1	Zellzyklus (Proliferation)
Mus musculus myelocytomatosis oncogen (Myc), mRNA	NM_010849	Zellzyklus (Proliferation)
Mus musculus retinoblastoma 1 (Rb1), mRNA	NM_009029.1	Zellzyklus (Proliferation)
Mus musculus suppressor of cytokine signaling 1 (Socs1), mRNA	NM_009896.1	Zellzyklus (Proliferation)
Mus musculus ectodermal-neural cortex 1 (Enc1), mRNA	NM_007930.3	Zelldifferenzierung
Mus musculus caudal type homeo box 1 (Cdx1), mRNA	NM_009880.2	Zelldifferenzierung
Mus musculus inhibitor of DNA binding (Id2), mRNA	NM_010496.2	Zelldifferenzierung
Mus musculus transformation related protein 53 (Trp53), mRNA	NM_011640.1	Tumorsuppressor
Mus musculus vascular endothelial growth factor A (Vegfa), mRNA	NM_009505.2	Angiogenese
Mus musculus Jun oncogen (Jun), mRNA	NM_010591.1	AP-1 Transkriptions-Komplex
Mus musculus plasminogen activator, urokinase (PLAU), mRNA	NM_008873.2	Membranprotein
Mus musculus catenin beta 1 (Ctnnb1), mRNA	NM_007614.2	Wnt-Signalweg
Mus musculus matrix metalloproteinase 2 (Mmp2), mRNA	NM_008610.2	Metalloproteinase
Mus musculus tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), mRNA	NM_011593.1	Metalloproteinaseinhibitor
Mus musculus matrix metalloproteinase 9 (Mmp9), mRNA	NM_013599.2	Metalloproteinase
Mus musculus nuclear factor of kappa light chain gene enhancer B-cells 1 p105 (Nfkb1), mRNA	NM_008689.1	Nukleärer Transkriptionsfaktor

Im Folgenden werden auf die Ergebnisse des früheren (4.6.2.1) und des späteren Untersuchungszeitpunktes (4.6.2.2) dargestellt, wobei zunächst auf die Faktoren IGF-Systems und anschließend auf die Kandidatengene eingegangen wird.

4.6.2.1 Expression zum früheren Analysezeitpunkt

Zur Untersuchung einzelner Faktoren des IGF-Systems wurde deren Expression auf Ebene der mRNA im Kolongewebe bestimmt.

Im Vergleich zum Wildtyp wurde IGFBP-2 in beiden transgenen Tiergruppen durchschnittlich um den Faktor 37 überexprimiert (**p<0,01). Zwischen den DMH-behandelten und den Kontrollgruppen war bei beiden Genotypen kein Unterschied zu beobachten.

IGFBP-3 wurde in den verschiedenen Gruppen nicht differenziell exprimiert. Die Transkription von IGF-II war in beiden transgenen Gruppen tendenziell geringer als in den nicht-transgenen Vergleichsgruppen, während sie bei beiden Genotypen in der DMH-Gruppe signifikant gegenüber der Vehikel-Gruppe reduziert war (*p<0,05).

Tabelle 4.4: Expressionsniveau von IGFBP-2, -3 und IGF-II zum früheren Analysezeitpunkt

Gen	Wildtyp DMH	Transgen DMH	Wildtyp Vehikel	Transgen Vehikel	Δ Transgen	Δ DMH
IGFBP-2	1,82 ± 0,34	68,39 ± 57,04	1,85 ± 0,29	70,21 ± 42,90	DMH: 37-fach (**p<0,01) Vehikel: 37-fach (**p<0,01)	wt: n.s. tg: n.s.
IGFBP-3	1,49 ± 0,18	1,47 ± 0,09	1,26 ± 0,10	1,40 ± 0,16	n.s.	n.s.
IGF-II	1,31 ± 0,10	1,16 ± 0,08	1,94 ± 0,12	1,53 ± 0,10	Vehikel: *p<0,05.	wt: **p<0,01 tg: *p<0,05

Alle Werte sind als Mittelwert des relativen Expressionsniveaus ± SEM angegeben; n.s. = nicht signifikant; n=5

Die im Kurzzeitversuch untersuchten zwölf Kandidatengene zeigten zu diesem Untersuchungszeitpunkt keinen signifikanten Expressionsunterschied. Das Expressionsniveau der Kandidatengene ist in Tabelle 4.5 für die einzelnen Tiergruppen dargestellt.

Tabelle 4.5: Expressionsniveau ausgewählter Kandidatengene im Kolongewebe des früheren Analysezeitpunktes

Gen	Wildtyp DMH	Transgen DMH	Wildtyp Vehikel	Transgen Vehikel	Δ Transgen	Δ DMH
Survivin	2,00 ± 0,68	3,16 ± 0,45	3,45 ± 0,51	2,53 ± 0,51	n.s.	n.s.
Mdr1	1,50 ± 0,11	1,58 ± 0,10	1,77 ± 0,15	1,44 ± 0,14	n.s.	n.s.
P21	1,58 ± 0,13	1,411 ± 0,13	1,83 ± 0,23	1,74 ± 0,10	n.s.	n.s.
Cyclin D1	1,41 ± 0,16	1,40 ± 0,08	1,21 ± 0,09	1,33 ± 0,14	n.s.	n.s.
C-myc	1,24 ± 0,11	1,53 ± 0,10	1,39 ± 0,05	1,32 ± 0,13	n.s.	n.s.
Enc1	1,53 ± 0,21	1,30 ± 0,09	1,48 ± 0,12	1,51 ± 0,12	n.s.	n.s.
Cdx1	1,30 ± 0,05	1,32 ± 0,07	1,27 ± 0,07	1,23 ± 0,08	n.s.	n.s.
Id2	1,78 ± 0,10	1,64 ± 0,13	1,60 ± 0,16	1,69 ± 0,10	n.s.	n.s.
β-Catenin	1,26 ± 0,13	1,14 ± 0,09	1,31 ± 0,04	1,19 ± 0,05	n.s.	n.s.
MMP2	1,69 ± 0,14	1,42 ± 0,10	1,49 ± 0,06	1,49 ± 0,06	n.s.	n.s.
TIMP1	6,49 ± 2,82	7,63 ± 1,17	7,57 ± 1,52	5,83 ± 0,89	n.s.	n.s.
NFκB1	1,25 ± 0,05	1,16 ± 0,06	1,32 ± 0,03	1,28 ± 0,047	n.s.	n.s.

Alle Werte sind als Mittelwert des relativen Expressionsniveaus ± SEM angegeben. n.s. = nicht signifikant; n=5

4.6.2.2 Expression zum späteren Analysezeitpunkt

Wie bereits in den Kolonproben des früheren Untersuchungszeitpunktes wurde das Expressionsniveau von IGFBP-2, -3 und IGF-II auch in den Tumoren, die in der späteren Phase der Kolonkarzinogenese entstanden waren, bestimmt.

Dabei waren IGFBP-2-mRNAs in den Tumoren transgener Tiere um das 7,6-fache überexprimiert (**p<0,001). Hingegen war die Transkription von IGFBP-3 mit einem geringen Anstieg von 21,5% in der transgenen Gruppe nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp erhöht. IGF-II wurde bei beiden Genotypen etwa gleich stark exprimiert.

Tabelle 4.6: Expressionsniveau von IGFBP-2, -3 und IGF-II zum späteren Analysezeitpunkt

Gen	Wildtyp	Transgen	Δ Expression
IGFBP-2	3,73 \pm 1,03	28,59 \pm 8,62	***p<0,001 (Faktor 7,6)
IGFBP-3	1,59 \pm 0,18	1,93 \pm 0,10	n.s. (tg: + 21%)
IGF-II	6,97 \pm 1,73	7,33 \pm 1,87	n.s. (tg: + 5%)

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben; n.s. = nicht signifikant; wt: n=10, tg: n=8

Von den 19 Kandidatengenen, die in den Tumorproben analysiert wurden, wurde für vier Gene eine signifikant höhere Expression in der transgenen Gruppe festgestellt (siehe Tabelle 4.7). Diese Gene waren das Differenzierungs-assoziierte Gen *Enc1*, die Metastasierungs-assoziierten Gene *MMP2* und *TIMP1* sowie *NFkB1*, dessen Genprodukt sowohl in der Metastasierung als auch in der Apoptose und der im Entzündungsgeschehen eine Funktion zugesprochen wird.

Tabelle 4.7: In Tumoren transgener Tiere signifikant hochregulierte Gene

Gen	Wildtyp	Transgen	Δ Expression
<i>Enc1</i>	1,99 \pm 0,16	2,61 \pm 0,18	*p<0,05 (tg: + 31%)
<i>MMP2</i>	1,26 \pm 0,10	1,68 \pm 0,10	*p<0,05 (tg: + 33%)
<i>TIMP1</i>	1,58 \pm 0,13	2,16 \pm 0,25	*p<0,05 (tg: + 37%)
<i>NFkB1</i>	1,33 \pm 0,12	1,96 \pm 0,19	**p<0,01 (tg: + 47%)

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. n.s. = nicht signifikant; wt: n=10, tg: n=8

Neben diesen signifikanten Expressionsunterschieden konnte für die übrigen Gene nur eine tendenzielle Erhöhung bzw. Verminderung ihrer Expression beobachtet werden (siehe Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: In den Tumoren transgener Tiere nicht signifikant veränderte Gene

Gen	Wildtyp	Transgen	Δ Expression
Survivin	1,54 ± 0,15	1,62 ± 0,26	n.s. (tg: + 8,0 %)
Mdr1	6,14 ± 1,94	6,70 ± 1,35	n.s. (tg: + 9,8 %)
P21	2,93 ± 0,35	3,76 ± 0,33	n.s. (tg: + 29,7%)
Cyclin D1	3,04 ± 0,36	2,62 ± 0,30	n.s. (tg: - 12,7%)
c-myc	2,07 ± 0,17	1,80 ± 0,20	n.s. (tg: - 10 %)
Rb-1	7,17 ± 1,26	8,99 ± 1,23	n.s. (tg + 25,4%)
Socs1	1,83 ± 0,20	2,22 ± 0,32	n.s. (tg: + 21,3%)
P53	1,56 ± 0,12	1,81 ± 0,12	n.s. (tg: + 15,4%)
Cdx1	2,02 ± 0,25	1,77 ± 0,27	n.s. (tg: - 15,8%)
Id2	2,46 ± 0,46	3,15 ± 0,56	n.s. (tg: + 28,1 %)
VEGF	2,18 ± 0,27	2,63 ± 0,21	n.s. (tg: + 20,6 %)
C-jun	3,63 ± 0,59	4,43 ± 0,55	n.s. (tg: + 22,0%)
uPAR	2,13 ± 0,32	2,47 ± 0,36	n.s. (tg: + 16,0%)
β-Catenin	3,15 ± 0,47	3,08 ± 0,31	n.s. (tg: - 9,8%)
MMP9	3,55 ± 0,784	5,44 ± 0,80	n.s. (tg:+ 53,2%)

Alle Werte sind als Mittelwert ± SEM angegeben; n.s. = nicht signifikant; wt: n=10, tg: n=8

5 Diskussion

5.1 DMH-induzierte Kolonkarzinogenese versus APC-Min/+ Modell

Die APC-Min/+ Maus (Min, multiple intestinale Neoplasien) ist ein heterozygoter Träger einer Mutation im Tumor Suppressorgen APC. Diese Mutation führt nach einer weiteren Mutation oder durch epigenetische Modifikationen des 2. Allels (Fearhead et al. 2001) zu einem Funktionsverlust des APC-Proteins, der auch bei FAP-Patienten (Familiäre Adenomatöse Polyposis) zugrunde liegt (Kinzler & Vogelstein 1996). Mutationen des APC-Gens treten auch in der Genese des sporadischen Kolonkarzinoms auf, jedoch ist das Mutationsmuster hier breiter (Cheng & Lai 2003; Cottrell et al. 1992). So kann die initiale Mutation auch eine K-ras-Mutation sein, die häufig bei hyperplastischen ACF des sporadischen CRC nachgewiesen werden kann (Losi et al. 1996; Otori et al. 1998).

ACF und Tumore der APC-Min/+ Maus (ACFMin) unterscheiden sich bezüglich verschiedener Merkmale von ACF und Tumoren, die nach chemischer Induktion der Kolonkarzinogenese entstanden sind. ACF von ACFMin Mäusen haben eine höhere Dichte und eine höhere crypt multiplicity als die sporadisch entstandenen ACF. Histopathologisch zeichnen sich ACF von ACFMin Mäusen durch einen hohen Grad an Dysplasie aus (Paulsen et al. 2000), wohingegen die sporadischen ACF häufig hyperplastisch sind und einen milderen Dysplasiegrad aufweisen (Cheng & Lai 2003). ACFMin Mäuse entwickeln eine Vielzahl von Adenomen pro Tier, die nicht nur in den Dickdarmabschnitten Kolon und Rektum sondern auch im Dünndarm lokalisiert sind. Zudem entstehen weitere extraintestinale Tumoren und Erkrankungen (Hamilton et al. 1995; Fearhead et al. 2001). Im Unterschied dazu entwickelt sich im chemisch induzierten Tumormodell nur ein kleiner Teil der sporadischen ACF zu Tumoren (Nucci et al. 1997), die hauptsächlich im Kolon descendens lokalisiert sind (Tudek et al. 1989; Furukawa et al. 2002). Zudem entspricht auch die Histopathologie der Tumoren des chemisch induzierten Modells eher dem Erscheinungsbild des sporadischen CRC des Menschen (Cheng & Lai 2003).

Aufgrund der beschriebenen Gemeinsamkeiten zwischen dem Modell der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese und des sporadischen CRC des Menschen, wurde dieses Modell für die vorliegende Arbeit gewählt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass IGFBP-2 die Entstehung des hyperplastischen ACF-Typs fördert, der mit einer langsameren Weiterentwicklung verbunden ist. Außerdem hemmt IGFBP-2 die Entstehung von dysplastischen ACF. Durch eine Verpaarung von IGFBP-2-transgenen Mäusen mit APC-Min/+ Mäusen wäre daher eine geringere ACF-Gesamtzahl (entspricht der Anzahl an dysplastischen ACF) und eine geringere Tumorprävalenz der IGFBP-2-transgenen Mäuse zu erwarten.

5.2 Detektion von ACF in der Methylenblau-Färbung und im histologischen Schnitt

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl aberranter Krypten Foci (ACF) sowie die Anzahl der aberranten Krypten in einem einzelnen Focus (crypt multiplicity) in der Methylenblau-Färbung bestimmt und die Differenzierung zwischen hyperplastischen und dysplastischen ACF (ACF-Klassifizierung) im H&E-Schnitt vorgenommen. Dabei wurde die ACF-Anzahl und die crypt multiplicity berücksichtigt.

Es konnte beobachtet werden, dass die mit den beiden Methoden ermittelten ACF-Zahlen unterschiedlich waren. So wurden in H&E-gefärbten histologischen Schnitten von transgenen Tieren Gruppe weniger ACF gezählt als in der Wildtyp-Gruppe.

In der neueren Literatur werden von verschiedenen Arbeitsgruppen ebenfalls methodische Probleme bei der Identifizierung dysplastischer ACF in der Methylenblau-Färbung beschrieben. Zwar kann mit der normalen Methylenblau-Färbung nicht zwischen hyperplastischen und dysplastischen ACF differenziert werden, jedoch scheinen sich dysplastische ACF in der Methylenblau-Färbung anders als ursprünglich von Bird und Pretlow beschrieben (erhabene, vergrößerte Foci mit erhöhtem pericryptalen Lumen) darzustellen (Bird 1987). Yamada *et al.* berichten, dass sich dysplastische ACF bei mit einem Karzinogen behandelten Ratten nur undeutlich von den umliegenden Krypten abgrenzen und vielmehr eingedrückte Läsionen der Mukosa mit kleineren Krypten darstellen (Yamada *et al.* 2000). Paulsen *et al.* beschreiben dysplastische ACF bei der Min/+ Maus als flache ACF mit kleineren Krypten, die sich durch eine andere Beleuchtungstechnik in der Methylenblau-Färbung leuchtend blau darstellen lassen (Paulsen *et al.* 2005). Die geschilderte Problematik wird auch durch die Arbeitsgruppe von Nakagama bestätigt, die eine neue Methode zur Detektion dysplastischer ACF im ungeschnittenen

Kolongewebe entwickelt hat. Hierbei wird im Anschluss an eine konventionelle Methylenblau-Färbung eine Entfärbung mit Methanol 70% durchgeführt. Durch diese differenzielle Färbung werden (chemisch induzierte) dysplastische ACF im nativen Gewebe sichtbar (Ochiai et al. 2005). Als Grund hierfür nehmen die Autoren eine „Resistenz“ dysplastischer ACF gegen den Entfärbungsprozess, der auf der Bindung des Farbstoffes an die DNA beruht und sich durch die Morphologie dysplastischer ACF (höhere Zellzahl, größere Zellkerne, größere Zellkerndichte) erklären lässt.

Andererseits wurden in der transgenen Gruppe nicht alle in der Methylenblau-Färbung identifizierten ACF im H&E-Schnitt wiedergefunden. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass vor allem kleinere hyperplastische ACF aufgrund ihrer den normalen Krypten ähnlichen Morphologie im histologischen Schnitt schwerer zu detektieren sind. Studien, die eine Quantifizierung der ACF-Anzahl anführen, berufen sich entweder auf Ergebnisse aus der Histologie oder aus der Methylenblau-Färbung.

5.3 IGFBP-2 und Kolonkarzinogenese

5.3.1 Lokalisation von ACF und Tumoren

Die Lage der ACF und Tumoren im Kolon wurde bestimmt und definierten Kolonabschnitten zugeordnet (siehe 4.4.4 und 4.5.2). ACF und Tumoren entstanden nur in den Kolonabschnitt II und III, wobei der überwiegende Anteil dieser (prä-)neoplastischen Läsionen im Abschnitt III lokalisiert war. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lokalisationen von ACF und Tumoren übereinstimmen und unterstützen somit die gegenwärtige Hypothese, wonach ACF als präneoplastische Läsionen gelten (Cheng & Lai 2003; Pretlow et al. 1991).

Durch die Bestimmung der anatomischen Lage der Tumoren im Kolon wurde zudem festgestellt, dass sich diese insbesondere im Kolon descendens und vereinzelt im Rektum entwickelten. Somit stimmt auch die Lage der Tumoren im Kolon mit der des Menschen überein (Shpitz et al. 1998).

5.3.2 Effekte von IGFBP-2 auf die Entstehung und Entwicklung von ACF

ACF, insbesondere dysplastische ACF, gelten als präneoplastische Läsionen des CRC (Cheng & Lai 2003). Im frühen Stadium der Kolonkarzinogenese wurden im Methylenblau-gefärbten Kolon der IGFBP-2-transgenen Mäuse deutlich mehr ACF als bei deren nicht-transgenen Wurfgeschwistern gezählt. Diese signifikant höhere Anzahl war auf kleine ACF, die nur aus einem oder zwei AC bestanden zurückzuführen (siehe 4.4.1). Durch die Klassifizierung eines Teils dieser ACF konnte festgestellt werden, dass der transgene Genotyp signifikant weniger dysplastische ACF bildete, die zudem einen signifikant geringeren Dysplasiegrad aufwiesen. Darüber hinaus wurde die Bewertung der crypt multiplicity wurde zudem festgestellt, dass dieser Unterschied bei größeren ACF mit mindestens drei AC besonders stark ausgeprägt war (siehe 4.4.2). Im späteren Stadium der Kolonkarzinogenese wurde eine hochsignifikant niedrigere ACF-Anzahl in der transgenen Tiergruppe beobachtet, während diese beim Wildtyp nur geringfügig zurückging. Dieser Rückgang betraf insbesondere einzelne AC und Foci von zwei AC beider Tiergruppen. Beim Wildtyp nahm die Anzahl an Foci von vier AC und von ≥ 5 AC hochsignifikant zu, während beim transgenen Genotyp zwar ebenfalls ein signifikanter, aber geringerer Anstieg dieser Foci zu verzeichnen war (siehe 4.4.1).

Daraus kann gefolgert werden, IGFBP-2, nach einem durch DMH bedingten Stimulus, zunächst die Entstehung kleiner Foci mit 1-2 AC fördert. Diese scheinen sich jedoch nicht weiterentwickeln, da zum späteren Zeitpunkt ein starker Rückgang der ACF-Anzahl transgener Tiere bei gleicher Tumorprävalenz zu beobachten war. Der Rückgang der ACF zum späteren Zeitpunkt kann als eine Rückentwicklung dieser Läsionen verstanden werden. Dabei wird diese Vermutung durch andere Studien unterstützt, die einen Rückgang von einzelnen AC (Thurnherr & Reinhart 1975) bzw. Foci mit 1-3 AC (Diehl 2002) als deren Rückbildung bzw. Ausheilung interpretierten. Eine weitere Studie, die diese Interpretation ebenfalls bestärkt, untersuchte die Entstehung und Entwicklung von ACF in für das Kolonkarzinogen Azoxymethan (Abbauprodukt von DMH) unterschiedlich sensiblen Mausstämmen. Hierbei wurde festgestellt, dass bei dem Mausstamm, der nur kleine hyperplastische und mild dysplastische ACF mit 1-2 AC bildete, keine Tumoren entstanden (Papanikolaou et al. 2000). Durch die gleiche Tumorprävalenz zum späteren Untersuchungszeitpunkt kommt zum Ausdruck, dass die durch IGFBP-2 geförderte Entstehung von kleinen ACF, die zum überwiegenden Teil hyperplastisch sind, keine

Auswirkung auf die Entstehung von Tumoren zu haben scheint. Die vergleichsweise geringere Anzahl größerer ACF in der späteren Phase, lässt sich durch den größeren Anteil an hyperplastischen ACF erklären, denen ein langsames Wachstum zugeschrieben wird (Cheng & Lai 2003; Paulsen et al. 2001).

5.3.3 Effekte von IGFBP-2 auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren

Zum späteren Untersuchungszeitpunkt waren bei beiden Genotypen makroskopisch sichtbare Tumoren zu erkennen. Dabei unterschied sich die Tumoranzahl in den beiden Tiergruppen nicht voneinander (siehe 4.5.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass IGFBP-2 keinen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren im chemisch induzierten Mausmodell hat. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikant negativer Einfluss von IGFBP-2 auf die spontane Entstehung von Tumoren hoch seneszenten IGFBP-2-transgener Mäuse festgestellt (Hoeflich, unveröffentlichte Daten).

In dieser Arbeit konnte zwar kein Effekt von IGFBP-2 auf die Entstehung von Tumoren beobachtet werden, allerdings wurde eine Wirkung von IGFBP-2 auf das Wachstum der entstandenen Adenome beobachtet. So war das Volumen der Adenome in der IGFBP-2-transgenen Gruppe um den Faktor 2,3 kleiner als das der Wildtyp-Tumoren (siehe 4.5.3). Durch die Ermittlung der Proliferations- und Apoptoseindices wurde herausgefunden, dass das geringe Tumolvolumen durch eine verminderte Proliferationsrate, nicht aber durch eine erhöhte Apoptoserate, bedingt ist (siehe 4.5.4). In verschiedenen *in vitro* Studien wurde ein proliferationshemmender (Bradshaw et al. 1999; Cianfarani et al. 1996; Reeve et al. 1993) aber auch ein proliferationsfördernder (Chakrabarty & Kondratyck 2006; Hoeflich et al. 2000; Sloatweg et al. 1995) Effekt von IGFBP-2 gezeigt (siehe 2.2.4.4.1). *In vivo* ist IGFBP-2 unter normalen Bedingungen ein negativer Regulator des Wachstums (Hoeflich et al. 1999) (siehe 2.2.4.4.2). Die Wirkung von IGFBP-2 auf das Wachstum von Tumoren *in vivo* ist bislang nur unzureichend untersucht worden. In BALB/c nu/nu Mäusen konnte ein geringeres Tumorstadium nach Inokulation von MCF-7 β 3 Brustkrebszellen festgestellt werden, das auf die Interaktion dieser $\alpha\beta$ 3-Integrin-überexprimierenden Zellen mit IGFBP-2 zurückzuführen war (Pereira et al. 2004). Durch die Ergebnisse dieser Studie wurde eine klare Hemmung des Tumorstadiums *in vivo* gezeigt. Dieser Effekt kann

sowohl über einen IGF-abhängigen Mechanismus, in dem IGFBP-2 die Wirkung der IGFs hemmt, als auch durch einen IGF-unabhängigen Mechanismus, der möglicherweise über $\alpha\beta 3$ -Integrine vermittelt wird, erklärt werden.

Die Hemmung des Tumorwachstums im hier untersuchten Modell kann aber auch durch einen indirekten Effekt von IGFBP-2 verursacht werden. Dieser beruht darauf, dass IGFBP-2 die Entstehung hyperplastischer ACF begünstigt. Somit wäre das geringere Tumorumfang durch das langsamere Wachstum hyperplastischer ACF erklärbar (Shpitz et al. 1997; Paulsen et al. 2001; Yamada et al. 2001), was durch die geringere Proliferationsrate dieses ACF-Typs, die auch in dieser Studie gezeigt werden konnte (siehe 4.4.5), deutlich wird. Diese hyperplastischen ACF können sich nicht nur direkt (Cheng & Lai 2003; Yamada et al. 2001), sondern auch nach Transformation zu dysplastischen ACF (Cheng & Lai 2003; Nascimbeni et al. 1999) bzw. zu Tumoren weiterentwickeln.

5.3.4 Effekte von IGFBP-2 auf die Expression und Lokalisation von β -Catenin

Durch immunhistochemischen Nachweis des β -Catenin-Antigens wurde die Expression dieses Onkoproteins in den ACF des frühen Stadiums und den Tumoren des späteren Stadiums der Kolonkarzinogenese bestimmt. Dazu wurde die physiologische Lokalisation an der Zellmembran von epithelialen Zellen sowie die aberrante Akkumulation im Zytoplasma und im Zellkern unter Berücksichtigung der Färbintensität bewertet (für Details siehe 4.4.6 und 4.5.5).

Hyperplastische ACF zeigten eine physiologische Membranfärbung und keine Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma oder im Zellkern. Diese Beobachtung wird durch andere Arbeiten bestätigt, die ebenfalls eine unveränderte Membranexpression sowie keine nukleäre Lokalisation von β -Catenin in hyperplastischen ACF nachwiesen (Hao et al. 2001; Furihata et al. 2002; Yamada et al. 2000). Dysplastische ACF wiesen jedoch häufig eine veränderte Expression von β -Catenin auf, die in den ACF des transgenen Genotyps deutlich milder ausgeprägt war. Die Membranfärbung war in ACF des transgenen Genotyps tendenziell stärker vorhanden und die Stärke der Akkumulation im Zytoplasma hochsignifikant geringer ausgebildet. Die nukleäre Translokation kam in diesen präneoplastischen Läsionen signifikant seltener vor und war zudem in ihrer Intensität milder ausgeprägt. Die veränderte Expression von β -Catenin in dysplastischen ACF wird durch

verschiedene Arbeiten in der Literatur bestätigt (Hao et al. 2001; Yamada et al. 2000). In den Tumoren transgener Tiere waren der Rückgang von membrangebundenem β -Catenin sowie die Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma milder ausgeprägt. Die Akkumulation des Onkoproteins im Zellkern war signifikant seltener zu finden und zeigte zudem eine geringere Färbintensität (für Details siehe 4.4.6 und 4.5.5).

Diese Daten bestätigen insgesamt die Beobachtungen von Hao *et al.* zur Reziprozität zwischen der membranständigen Lokalisation und der Akkumulation von β -Catenin im Zellplasma und Zellkern (Hao et al. 1997b; Hao et al. 2001). Des Weiteren lassen diese Ergebnisse aber auch die Schlussfolgerung zu, dass IGFBP-2 einen hemmenden Einfluss auf die zytoplasmatische und insbesondere die nukleäre Akkumulation von β -Catenin im Tumor, sowie bereits in frühen präneoplastischen Veränderungen der Kolonmukosa (ACF) hat.

Für IGF-II wurde ein Mechanismus beschrieben, wonach dieser Wachstumsfaktor die Bindung von β -Catenin an E-Cadherin beeinflusst bzw. die Translokation von β -Catenin in den Zellkern begünstigt (Freier et al. 1999). Nach Binden von IGF-II könnte IGFBP-2 die Wirkung von IGF-II hemmen und dadurch die E-Cadherin-Bindung von β -Catenin somit theoretisch stabilisieren. Da IGFBP-2 in der frühen Phase der Kolonkarzinogenese im Serum transgener DMH-behandelter Tiere signifikant höher ist als in der nicht-transgenen Vergleichsgruppe, wohingegen die IGF-II-Serumspiegel in diesen Tiergruppen keinen Unterschied zeigen, wäre ein solcher Mechanismus denkbar. Zudem könnte dieser Mechanismus auch in der späteren Phase die geringere β -Catenin-Akkumulation erklären, in der die IGF-II-Serumspiegel sogar noch geringer und die IGFBP-2-Serumspiegel höher sind als in der frühen Phase. Somit wäre die Theorie von Brabletz *et al.* gestützt, wonach Signale aus dem Tumorenvironment die nukleäre Translokation von β -Catenin steuern (Brabletz et al. 2002).

Neben diesem direkten Einfluss könnte die stabilisierte Membranlokalisation von β -Catenin in IGFBP-2-transgenen Mäusen auch durch einen indirekten Effekt von IGFBP-2 erklärt werden. Da die zytoplasmatische und nukleäre Akkumulation von β -Catenin mit steigendem Dysplasiegrad der ACF zunimmt (Yamada et al. 2001; Hao et al. 2001), könnte der geringere Dysplasiegrad in den ACF transgener Tiere die geringere β -Catenin-Akkumulation in diesen ACF erklären. Interessanterweise ist die

Korrelation zwischen den IGFBP-2-Serumkonzentration negativ und der Anzahl dysplastischer ACF negativ (* $p < 0,05$) und für stärker dysplastische ACF sogar noch deutlicher (** $p < 0,01$). Auch in den Tumoren lässt sich die geringere β -Catenin-Expression durch einen indirekten Effekt von β -Catenin erklären, der auf das geringere Volumen der Tumoren transgener Tiere zurückzuführen ist. Diese mögliche Erklärung knüpft an die Beobachtung von Brabletz *et al.*, die berichteten, dass die nukleäre β -Catenin-Expression in Adenomen mit der Größe dieser Tumoren stark korreliert (Brabletz *et al.* 2000). In dieser Studie konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Stärke der nukleären β -Catenin-Expression und dem Tumolvolumen hergestellt werden, was in einer positiven Korrelation zum Ausdruck kommt (siehe 4.5.6). Die negative Korrelation zwischen dem Volumen der Adenome und dem IGFBP-2-Serumspiegel lässt eine ursächliche Rolle von IGFBP-2 vermuten.

Die Frage nach dem Mechanismus für die Steuerung der β -Catenin-Lokalisation durch IGFBP-2 lässt sich möglicherweise durch die Verpaarung von IGFBP-2 transgenen Mäusen mit ACF^{Min} Mäusen beantworten. In diesem Modell wäre die Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma unabhängig von Typ und Größe des ACF bzw. Tumors. Eine Stabilisierung von membrangebundenem β -Catenin müsste sich dann theoretisch in einer Verminderung der Tumorprogression widerspiegeln.

5.4 Genexpressionsanalyse

Der Effekt von IGFBP-2 auf die Expression ausgewählter Gene wurde sowohl zum früheren als auch zum späteren Zeitpunkt der Kolonkarzinogenese untersucht. Dazu wurde das Kolon DMH- und Vehikel-behandelter IGFBP-2-transgener und nicht-transgener Tiere des früheren Zeitpunktes sowie die Tumoren der beiden Genotypen des späteren Zeitpunktes in der quantitativen Real-Time PCR analysiert. Neben der Expression von IGFBP-2, -3 und IGF-II wurde die Expression von β -Catenin-Zielgenen sowie weiterer Gene im Kolon und in den Tumoren bestimmt, die insbesondere für die Migration bzw. Adhäsion von Zellen relevant sind (siehe 4.6.2).

5.4.1 Wirkung von IGFBP-2 auf die Expression von β -Catenin-Zielgenen

Durch immunhistochemische Analysen wurde festgestellt, dass die nukleäre Expression von β -Catenin sowohl in ACF des früheren Zeitpunktes in der Kolonkarzinogenese als auch in den Adenomen des späteren Zeitpunktes bei den

IGFBP-2-transgenen Tieren signifikant seltener auftrat als beim Wildtyp (siehe 4.4.6 und 4.5.5). Daher wurde ein hemmender Effekt von IGFBP-2 auf die Expression von denjenigen Genen vermutet, deren Transkription durch den β -Catenin/TCF-Komplex reguliert wird, und die Expression solcher β -Catenin-Zielgene sowohl im Kolon als auch in den Tumoren transgener und nicht-transgener Mäuse untersucht. Zu den analysierten β -Catenin-Zielgenen zählten zum einen die Proliferations-assoziierten Gene Cyclin D1 (Shtutman et al. 1999), C-myc (He et al. 1998), Survivin, Mdr1 (Yamada et al. 2001) und p21 (Kamei et al. 2003), die Differenzierungs-relevanten Gene Cdx1 (Lickert et al. 2000), Id2 (Rockman et al. 2001) und Enc1 (Fujita et al. 2001) sowie die Tumorprogressions-assoziierten Gene C-jun und uPAR (Mann et al. 1999) und VEGF (Easwaran et al. 2003). Wider Erwarten wurde weder im Kolon noch in Tumoren eine signifikant geringere Expression dieser Gene in transgenen Mäusen gefunden (siehe 4.6.2.1). Somit konnte die ursprüngliche Vermutung, dass IGFBP-2 die Transkription von β -Catenin-Zielgenen hemmt, in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Wnt-Signalweg in den Wildtyp-Tumoren trotz der stärkeren Kernexpression von β -Catenin nicht aktiviert war und somit keine Transkription von β -Catenin-Zielgenen stattfinden konnte. Dies lässt sich damit begründen, dass die Transkription von Zielgenen nicht durch nukleäres β -Catenin allein, sondern durch den β -Catenin/LEF-Komplexes aktiviert wird (Kolligs et al. 2002). Eine andere mögliche Erklärung liegt in der Wahl der hier angewendeten Methode: Für die quantitative Real-Time PCR wurde die aus dem gesamten Tumor bzw. Kolon gewonnene RNA bzw. cDNA verwendet. β -Catenin zeigt im Tumor ein heterogenes Verteilungsmuster und die nukleäre Akkumulation von β -Catenin ist in einzelnen Tumorealen sowie in dysplastischen ACF des Kolons zu finden (siehe 2.1.5.2). Daher wäre es denkbar, dass sich ein Effekt von IGFBP-2, der sich im Tumor bzw. im Kolon lokal auswirkt, durch bei der Analyse des gesamten Gewebes nicht deutlich wird, da er sozusagen zu stark verdünnt wird.

Zur Klärung dieser Fragestellung stellt die Mikrodissektion einen vielversprechenden Ansatz dar, da diese die Analyse bestimmter Areale des Tumors bzw. des Kolons (ACF) ermöglicht. Diese Methode hat zudem den Vorteil, dass zunächst eine histologische Klassifizierung sowie eine immunhistochemische Analyse des Tumors erfolgen kann, bevor einzelne Areale derselben Probe für quantitative Expressionsuntersuchungen mit einem Laser herausgeschnitten werden.

Die Transkription des als β -Catenin-Zielgen postulierten Gens Enc1 (Fujita et al. 2001) wurde in den Tumoren der IGFBP-2-transgenen Tiere sogar signifikant hochreguliert. Somit scheint dieses Ergebnis zunächst den Ergebnissen von Fujita et al. zu widersprechen, da die Expression von Enc1 hier β -Catenin-unabhängig reguliert zu sein scheint. Die Transkription von Enc1 wird beispielsweise durch den von Tumorzellen produzierten Differenzierungsfaktor Retinolsäure gefördert (Kim et al. 2000), der auch die IGFBP-2-Expression positiv beeinflusst (siehe 2.2.4.2). Fujita et al. berichteten, dass die Aktivität des Enc1-Promotors in Kolonkarzinomzellen durch β -Catenin und Tcf4 hochreguliert wird. Enc1 wird außerdem während der Differenzierung von Kolonepithelzellen sowie in der fetalen Entwicklung verschiedener Organe exprimiert, wo es die Differenzierung von Zellen fördert (Fujita et al. 2001; Kim et al. 1998). Eine Überexpression von Enc1 im Tumor (Fujita et al. 2001; Kim et al. 2000) scheint hingegen die Differenzierung zu hemmen (Fujita et al. 2001). Demnach kann Enc1 die Differenzierung in Abhängigkeit von der Dosis sowohl positiv als auch negativ modulieren. Da die in den Tumoren der transgenen Tiere um 31,2% höhere Enc1-Expression keine Überexpression von Enc1 im Vergleich zum Wildtyp darstellt, spricht dieses Ergebnis vielmehr für eine bessere Differenzierung der transgenen Tumoren. Diese Vermutung wird auch durch die Expression der Differenzierungs-assoziierten Gene Cdx1 und Id2 unterstützt, die tendenziell eher auf eine bessere Differenzierung der transgenen Tumoren hinweisen.

5.4.2 Wirkung von IGFBP-2 auf die Expression von Adhäsions/Migrations-assoziierten Genen

Sowohl im Kolon als auch in den Tumoren der transgenen und der nicht-transgenen Tiere wurde die Expression der Invasions-assoziierten Gene MMP2, Timp1, MMP9 (MMP9 – nur im Tumor untersucht) und NF κ B1 durch quantitative Real-Time PCR bestimmt (siehe 4.6.2). Die Analysen ergaben, dass MMP2, TIMP1 und NF κ B1 in den Tumoren des transgenen Genotyps signifikant hochreguliert wurden, wohingegen die Transkription von Mmp9 in den Tumoren der transgenen Tiere zwar um 53,2% anstieg, aber der Anstieg sich nicht in einer statistischen Signifikanz niederschlug. Im Kolon wurde keines der Gene differenziell exprimiert.

Die in dieser Studie beobachtete Hochregulation von MMP2 stimmt mit anderen Arbeiten überein, die den gleichen Effekt *in vitro* in IGFBP-2-überexprimierenden

Glioblastomzellen sowie Blasenkrebszellen beobachtet haben (Miyake et al. 2005; Wang et al. 2003). Die Bedeutung von MMP2 für die Tumordinvasion liegt insbesondere in der Degradation der ECM (Matrisian 1992; Mignatti & Rifkin 1993). Dass dieser Effekt von IGFBP-2 für die Invasion von Tumoren tatsächlich relevant ist, wurde dadurch gezeigt, dass in IGFBP-2-überexprimierende Glioblastomzellen MMP2 nicht nur auf mRNA-Ebene sondern auch auf Proteinebene hochreguliert wird und eine verstärkte Expression von IGFBP-2 im Glioblastom mit der MMP2-Expression positiv korreliert (Wang et al. 2003). Dies wird auch dadurch deutlich, dass es nach Injektion von IGFBP-2-überexprimierenden Blasenkrebszellen in die Harnblase von Nacktmäusen zu einer erhöhten Lymphknotenmetastasierung kommt (Miyake et al. 2005). Somit wäre es möglich, dass IGFBP-2 das Metastasierungspotential des Kolonkarzinoms über MMP-2 erhöht. Für die Hochregulation von MMP2 durch IGFBP-2 ist sowohl ein IGF-abhängiger als auch ein IGF-unabhängiger Mechanismus denkbar. Der IGF-abhängige Mechanismus wäre dadurch erklärbar, dass IGFBP-2 die IGF-I-regulierte Expression von MMP-2 (Yoon & Hurta 2001; Long et al. 1998) verstärkt. Der IGF-unabhängige Mechanismus wäre über die Bindung von IGFBP-2 an Integrine der Zellmembran, deren Transkription durch IGFBP-2 in Glioblastomzellen gemeinsam mit der von MMP2 gefördert wird (Wang et al. 2003), erklärbar.

Neben MMP2 wurde auch die Transkription von TIMP1 in den Tumoren der IGFBP-2-transgenen Mäuse gefördert. Eine parallele Hochregulation von MMP2 und TIMP1 wurde auch von Wang *et al.* beobachtet (Wang et al. 2003). Ein Anstieg der Transkription von TIMP1 wurde auch von Frommer *et al.* in IGFBP-2-überexprimierenden Brustkrebszellen beschrieben, wobei hier keine Daten zur Expression von MMP2 enthalten waren. Die verstärkte Expression von TIMP1 kann als Antwort der Zelle auf die Expression von Invasions-fördernden Genen, die einer Zellmigration entgegenwirken soll, verstanden werden. Auf der anderen Seite kann die Expression von TIMP1 auch MMP-unabhängig stimuliert werden. Hierbei scheint dem MAPK- sowie dem PI3K-Signalweg eine große Bedeutung zuzukommen (Kadri et al. 2000; Chirco et al. 2006). So wurde in der aktuellen Literatur ein Wirkmechanismus für TIMP1 postuliert, in dem TIMP1 über CD63/Integrin-Komplexe der Zellmembran den FAK/PI3K-Signalweg aktiviert und dadurch den programmierten Zelltod verhindert (Liu et al. 2005; Chirco et al. 2006; Liu et al. 2003).

Die signifikante Hochregulation des Transkriptionsfaktors NFκB1 durch IGFBP-2, die in dieser Studie gezeigt wurde, wird durch die Arbeit von Frommer *et. al* bestätigt (Frommer et al. 2006). Neben der Bedeutung für die Apoptose, liegt die besondere Relevanz von NFκB1 für die Tumorgenese insbesondere in der Regulation von Zelladhäsion und -migration, da das NFκB1-Protein die Expression von Invasions-assoziierten Genen wie beispielsweise MMPs aktivieren kann (Li & Stark 2002; Gao et al. 2006; Amiri & Richmond 2005). Zudem fungiert NFκB1 als ein zentraler Regulator in der Antwort auf Zellstress, da verschiedene Stressbedingungen wie z.B. oxidativer Stress zu dessen Aktivierung führen (Li & Stark 2002). Dies ist insofern von Interesse, als die Expression von IGFBP-2 durch oxidativen Stress in epithelialen Lungenzellen erhöht wird (Besnard et al. 2001). Interessanterweise besitzt der IGFBP-2-Promotor vier potentielle Bindungsstellen für NFκB1. Somit könnte, unter der Annahme, dass NFκB1 den IGFBP-2-Promotor aktiviert, die Hochregulation von NFκB1 zu einem autokrinen Loop führen (Cazals et al. 1999).

Für den in dieser Arbeit beobachteten Effekt auf die Expression von Genen im Tumor kann sowohl ein endokriner als auch ein auto-/parakriner Effekt von IGFBP-2 in Frage kommen, da IGFBP-2 sowohl im Serum DMH-behandelter transgener Tiere, als auch im Tumor selbst hochsignifikant überexprimiert wird. Ob IGFBP-2 diese Adhäsions-/Migrations-assoziierten Gene über IGF-abhängige oder IGF-unabhängige Mechanismen reguliert, kann durch diese Studie nicht geklärt werden. Allerdings konnte in verschiedenen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte Invasion von Hs578T Brustkrebszellen (Schutt et al. 2004; Frommer et al. 2006) und SKN-SHEP Neuroblastomzellen (Russo et al. 2005) durch IGF-unabhängige Mechanismen erfolgen kann. Bei dieser IGF-unabhängigen Wirkung könnte die HBD- bzw. die RGD-Domäne von IGFBP-2 von großer Bedeutung sein, da IGFBP-2 über diese Domänen mit ECM-Komponenten (Russo et al. 2005) bzw. Integrinen interagieren kann. In einer kürzlich erschienen Arbeit wurde zudem eine Aktivität der HBD-Domäne im leicht sauren Milieu festgestellt (Kuang et al. 2006), was zur Klärung eines konditionalen Wirkmechanismus von IGFBP-2 im Tumor äußerst relevant sein könnte. Neben intaktem IGFBP-2 kommen auch C-terminale-Fragmente von IGFBP-2 für die IGF-unabhängige Wirkung in Betracht. Als weiterer IGF-unabhängiger Mechanismus wäre die Translokation von IGFBP-2 in den Zellkern vorstellbar. IGFBP-2 könnte somit die Transkription von Invasions-assoziierten Genen induzieren. Ein solcher Mechanismus wurde bereits im Kontext

von oxidativem Zellstress vermutet (Hoefflich et al. 2001b; Besnard et al. 2001) und wird dadurch unterstützt, dass IGFBP-2 und sogar definierte IGFBP-2-Fragmente auch innerhalb der Zelle zu finden sind (Hoefflich et al. 2004; Terrien et al. 2005). Eine Antwort auf die Frage, ob IGFBP-2 über IGF-abhängige oder IGF-unabhängige Mechanismen im Tumor wirkt, sollte in weiterführenden Studien, unter Verwendung zielgerichteter mutierter IGFBP-2-Varianten, untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die IGFBP-2-Serumkonzentrationen sind beim menschlichen Kolonkarzinom mit dem Tumorstadium signifikant positiv korreliert und sogar als prognostischer Marker für eine Wiedererkrankung nach Tumorresektion informativ. Dennoch ist die spezifische Rolle von IGFBP-2 für die Entstehung und Progression des Kolonkarzinoms völlig unklar. *In vitro* wurden für IGFBP-2 sowohl positive als auch negative Effekte auf das Wachstum normaler und maligner Zellen nachgewiesen. Für die zweifelsfreie Zuordnung spezifischer Effekte *in vivo* wurde in der vorliegenden Arbeit das IGFBP-2-transgene Mausmodell verwendet. In diesem Modell wurde die Kolonkarzinogenese chemisch induziert. Um herauszufinden, in welchem Stadium der mehrstufigen Kolonkarzinogenese IGFBP-2 von Bedeutung ist, wurden die Analysen 10 und 34 Wochen nach Beginn der Behandlung mit dem Karzinogen durchgeführt.

Zum früheren Analysezeitpunkt wurde festgestellt, dass IGFBP-2 zunächst die Entstehung von kleinen hyperplastischen aberranten Krypten Foci (ACF) förderte, sich diese ACF aber in der späteren Phase zurückentwickelten und keinen Einfluss auf die Tumorprävalenz hatten. Im Vergleich zum Wildtyp entwickelten die IGFBP-2-transgenen Mäuse jedoch weniger dysplastische ACF. Dysplastische ACF in IGFBP-2-transgenen Mäusen bildeten kleinere Foci und wiesen einen deutlich geringeren Dysplasiegrad auf. Größere ACF des transgenen Genotyps stellten den hyperplastischen ACF-Typ dar. Interessanterweise war die Expression von β -Catenin in den ACF transgener Tiere gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IGFBP-2 einen hemmenden Effekt bereits im frühen Stadium der Kolonkarzinogenese ausübt.

Zum späteren Untersuchungszeitpunkt unterschied sich die Tumorprävalenz zwischen den beiden Genotypen nicht voneinander. Jedoch war das Volumen der Adenome der IGFBP-2-transgenen Gruppe um das 2,3-fache kleiner als beim Wildtyp, was durch einen geringeren Anteil an proliferierenden Tumorzellen bedingt war und sich bereits bei den ACF der frühen Phase abzeichnete. Zudem wurde, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der früheren Phase, eine deutlich geringere nukleäre Akkumulation von β -Catenin in den Adenomen IGFBP-2-transgener Tiere beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass IGFBP-2 sowohl in der frühen als auch in der späteren Phase der Kolonkarzinogenese einen hemmenden Effekt auf das

Wachstum von dysplastischen ACF und Tumoren hat, indem es die Tumorlast reduziert und die Akkumulation von nukleärem β -Catenin inhibiert.

Um Effekte von IGFBP-2 auch auf Ebene der Genexpression zu berücksichtigen, wurde eine Expressionsanalyse von Kandidatengenen, die aus der Literatur im Zusammenhang mit einer Überexpression von IGFBP-2 bekannt waren, durchgeführt. Interessanterweise ergab die Real-Time PCR Analyse eine erhöhte MMP2-, TIMP1- und NF κ B-mRNA Expression in Tumoren, nicht aber im normalen Kolongewebe von IGFBP-2-transgenen Mäusen. Aus der konditionalen Überexpression von Invasions- und Migrations-assoziierten Genen im Tumor von IGFBP-2-transgenen Mäusen könnte auf einen möglichen Effekt von IGFBP-2 auf die Metastasierung geschlossen werden. Die Relevanz dieser veränderten Genexpression sollte in einem Metastase-Modell weiterführend untersucht werden.

7 Summary

The role of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in chemical-induced colon carcinogenesis in transgenic mice

IGFBP-2 serum levels are positively correlated with Duke's stages of colon cancer and are even informative for the recurrence of tumor growth after resection. However, the specific role of IGFBP-2 for tumor growth is unclear, since both positive and negative effects have been proven *in vitro*. For the unambiguous identification of specific effects of IGFBP-2 during colon carcinogenesis *in vivo* we made use of an established IGFBP-2 transgenic mouse model and performed a study of chemical-induced colon carcinogenesis in these mice. In order to identify specific functions at distinct stages of multistep colon carcinogenesis we analyzed consequences of IGFBP-2 overexpression 10 weeks and 34 weeks after beginning of the treatment.

At the earlier time point IGFBP-2 promoted development of small aberrant crypt foci (ACF) which, however, degenerated later on and thus had no effect on tumour prevalence at the later stage of analysis. Instead, IGFBP-2 transgenic mice developed significantly less dysplastic ACF than wildtype mice. These ACF displayed smaller foci and showed a lower degree of dysplasia, while bigger ACF of the transgenic genotype were classified as hyperplastic ACF. Moreover, β -catenin immunoreactivity in ACF of transgenic animals was significantly reduced if compared to wildtype mice. The results indicate that IGFBP-2 has a negative effect during earlier stages of colon carcinogenesis.

At the later time point, tumour prevalence was similar in both genotypes. The volumes of adenoma however were 2.3 times smaller in transgenic mice than in wildtype mice. This result was correlated with a smaller proportion of proliferating tumour cells and reduced proliferative activity became apparent already in ACF of the earlier stage. In line with the findings at the earlier stage, significantly reduced nucleic accumulation of β -catenin could be found in adenoma of IGFBP-2 transgenic animals. These findings therefore suggest that IGFBP-2 has both at earlier and later stages an inhibiting effect on growth and development of dysplastic ACF and growth of tumours by reduction of cell proliferation in tumours and inhibition of nucleic β -catenin accumulation.

In order to further explore effects potentially induced by IGFBP-2 we also studied expression of candidate genes, known as transcriptome analysis in IGFBP-2

transfected cell lines from the literature. Our studies in normal and malignant colon tissues revealed a specific increase of MMP2-, TIMP1- and NFκB mRNA expression in tumours, but not in normal tissues from IGFBP-2 transgenic mice. From the specific increases of genes associated with invasiveness in IGFBP-2 overexpressing tumours an effect of IGFBP-2 during metastasis might be concluded. The relevance of these altered gene expressions should be studied in more detail in a metastatic animal model.

8 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (avidin-biotin complex)
AC	Aberrante Krypte (aberrant crypt)
ACF	Aberranter Krypten Focus (aberrant crypt focus)
ACF ^{Min}	ACF der APC-Min/+ Maus
ACTb	Synonym für β-Actin
AK	Antikörper
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
APPAP	Alkalische Phosphatase und antialkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren (amino acids)
B	Breite
BAD	B-cell leukaemia antagonist of death
Bax	Pro-apoptotisches Gen
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
bp	Basenpaare (base pairs)
BrdU	5'Bromo-2'-desoxy-Uridin
Caco-2	Kolonkarzinomzellen Linie 2
Ccnd1	Synonym für Cyclin D1
CDK	Cyclinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinase)
cDNA	Zur mRNA komplementäre DNA (complementary desoxyribonucleic acid)
Cdx1	Caudal type homeo box 1
CEA	Carcinoembryonales Antigen (carcinoembryonic antigene)
c-jun	Jun oncogene
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
c-myc	Myelocytomatosis oncogene
CpG island	Zytosin paart Guanin-Insel (cytosine pairs guanine)
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
CRC	Kolonkarzinom (colorectal carcinoma)
Ct	Cycle threshold
Ctnnb1	Synonym für β-Catenin; cadherin associated protein, beta 1

DAB	Diaminobenzidine
DCC	Deleted in colon cancer (auf Chromosom 18q lokalisiertes Gen)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNA-MMR	DNA-Mismatch-Reparaturgen
dNTPs	2'Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
dp	Dysplastisch
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
E-cad	E-Cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
Enc1	Ectodermal-neural cortex 1
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FKHR	Forkhead Transkriptionsfaktor in rhabdomyosarcoma
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Relative centrifugal force (RCF) ($= 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GOI	Gene of interest
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
h	Stunde
H	Höhe
H&E	Hämatoxylin und Eosin (Färbung)
HBD	Heparin-Bindungsdomäne
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCG	Menschliches Choriongonadotropin (human chorion gonadotropin)
His	Histidin

HKG	Housekeeping-Gen
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
hp	Hyperplastisch
HRPT1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
i.p.	Intraperitoneal
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
IEC-6	Intestinale Epithelzelllinie 6
igf1	IGF-I-Gen (Maus)
igf2	IGF-II-Gen (Maus)
IGF2	IGF-II-Gen (Mensch)
Igf2r	IGF-IIR-Gen (Maus)
IGFBP 1 – 6	IGF-Bindungsproteine 1 – 6
IGF-I, -II	Insuline-like growth factor I bzw. II
IGF-IR, -IIR	IGF-Rezeptor Typ I bzw. Typ II
IL	Interleukin
ILK	Integrin-like kinase
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ki67	Proliferationsmarker
l	Liter
L	Länge
LEF	Lymphoid enhancer factor
Leu	Leucin
LNA	Locked nucleid acids
LOH	Verlust des zweiten Allels (loss of heterozygosity)
LOI	Verlust der Geninaktivierung durch Methylierung (loss of imprinting)
Lys	Lysin
M	Molar (mol/l)
M6P	Mannose-6-Phosphat
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase

Mdr1	Multidrug resistance protein 1
mg	Milligramm
Min	Multiple intestinale Neoplasien
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MSI	Mikrosatteliten-instabil
NFκB	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNR	Nebennierenrinde
P	Signifikanzniveau
P21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a) Zellzyklusinhibitor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAP	Peroxidase und Antiperoxidase
PAPP-A	Schwangerschaft-assoziiertes-Plasmaprotein-A (pregnancy-associated plasma protein-A)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
pg	Picogramm
PGK	Phosphoglycerate kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMSG	Serumgonadotropin (pregnant mare's serum gonadotropin)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10
qPCR	Quantitative Real-time PCR
Ras	Rat Sarcoma
RB	Retinoblastom Protein (Regulatorprotein im Zellzyklus)
RER+	Replication error positive

RGD	Arg-Gly-Asp (Integrinbindungsmotiv)
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPLP2	Ribosomal protein, large P2
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SCLC	Small-cell lung carcinoma
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Survivin	Inhibitor of apoptosis homolog
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
Taq	Thermophilus Aquaticus
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TCF	T-cell factor
tg	Transgen
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor(transforming growth factor)
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr60	Tyrosin (Position 60)
U	Einheit (unit)
UNG	Uracil-DNA-Glykosylierung
uPAR	Plasminogen activator, urokinase (Plau)
V	Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
wt	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Gleichgewicht und Ungleichgewicht von Proliferation und Apoptose in der Kolonkrypte.....	3
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der chemisch induzierten Kolonkarzinogenese	5
Abbildung 2.3: Modell der genetischen Alterationen in der Kolonkarzinogenese	11
Abbildung 2.4: Wnt-Signalweg in normal differenzierenden Epithelzellen und Tumorzellen	15
Abbildung 2.5: Proteinstrukturen von Insulin, Proinsulin und den IGF-Wachstumsfaktoren	18
Abbildung 3.1: Schema der ABC-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex	55
Abbildung 3.2: Bild zur Prüfung der RNA-Qualität und -Quantität	59
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der TaqMan PCR (5'→3'-Exonuklease-Assay).....	63
Abbildung 3.4: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe.....	66
Abbildung 3.5: Standardkurve	66
Abbildung 4.1: PCR-Analyse zum Nachweis des IGFBP-2-transgenen Genotyps	71
Abbildung 4.2: IGFBP-2-Serumspiegel nicht-transgener und transgener Tiere unter Berücksichtigung der Behandlungsgruppe und des Untersuchungszeitpunktes	72
Abbildung 4.3: IGF-II-Serumspiegel nicht-transgener und transgener Tiere unter Berücksichtigung der Behandlungsgruppe und des Untersuchungszeitpunktes	73
Abbildung 4.4: ACF im Kryptenepithel des Methylenblau-gefärbten Kolongewebes	74
Abbildung 4.5: ACF-Gesamtzahl nicht-transgener und IGFBP-2-transgener Mäuse zum früheren und späteren Untersuchungszeitpunkt.....	75
Abbildung 4.6: Anzahl der Foci mit 1 bis ≥ 5 AC beider Genotypen zum früheren und späteren Zeitpunkt.....	75
Abbildung 4.7: ACF in der H&E-Färbung.....	77
Abbildung 4.8: Anteile hyperplastischer und unterschiedlich stark dysplastischer ACF von transgenen und Wildtyp-Mäusen.....	77
Abbildung 4.9: Anteile hyperplastischer und unterschiedlich stark dysplastischer ACF an kleinen (1-2 AC) und großen (≥ 3 AC) Foci bei nicht-transgenen und transgenen Tieren.....	78
Abbildung 4.10: Korrelation von Serum-IGFBP-2 und ACF-Anzahl (Methylenblau-Färbung)	79
Abbildung 4.11: Korrelation von IGFBP-2-Serumspiegel und stärker dysplastischen ACF (H&E-Färbung).....	79

Abbildung 4.12: Lokalisation der ACF in den Abschnitten des Kolons	80
Abbildung 4.13: Exemplarische Darstellung der Proliferation hyperplastischer und dysplastischer ACF	81
Abbildung 4.14: Vergleich der membranösen, zytoplasmatischen und nukleären β -Catenin-Färbung in dysplastischen ACF nicht-transgener und transgener Tiere	82
Abbildung 4.15: Zytoplasmatische β -Catenin-Färbung bei dysplastischen ACF transgener und nicht-transgener Tiere.....	83
Abbildung 4.16: β -Catenin-Kernfärbung bei dysplastischen ACF transgener und nicht-transgener Tiere.....	84
Abbildung 4.17: Kolontumoren IGFBP-2-transgener und Wildtyp-Mäuse.....	85
Abbildung 4.18: Volumen PFA-fixierter Tumoren (Adenome) transgener und nicht-transgener Tiere.....	86
Abbildung 4.19: Negative Korrelation von Tumolvolumen und IGFBP-2-Serumspiegel.....	87
Abbildung 4.20: Proliferationsindex der Tumoren von transgenen und nicht-transgenen Tieren.....	88
Abbildung 4.21: Proliferation in Tumoren von IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Tieren	88
Abbildung 4.22: Apoptoseindex der Tumoren von transgenen und nicht-transgenen Tieren.....	89
Abbildung 4.23: Apoptose in Tumoren von IGFBP-2-transgenen und Wildtyp-Tieren	89
Abbildung 4.24: β -Catenin-Färbung Tumoren von transgenen und Wildtyp-Tieren	91
Abbildung 4.25: Veränderung der β -Catenin-Färbung in Tumoren nicht-transgener und transgener Tiere	91
Abbildung 4.26: Korrelation des Tumolvolumens mit der Stärke der nukleären β -Catenin-Färbung	92
Abbildung 4.27: Expressionsstabilität der Housekeeping-Gene β -Actin, RPLP2, HRPT1, PGK und SDHA im Kolon- und Tumorgewebe.....	94
Abbildung 4.28: Paarweise Variation der Normalisierungsfaktoren für Kolon und Tumor	95

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Charakteristika der menschlichen IGFBNs	24
Tabelle 2.2: Einflussfaktoren der IGFBN-2 Expression.....	30
Tabelle 3.1: Übersicht über Oligonucleotide der qPCR	46
Tabelle 3.2: Mastermix für die IGFBN-2-PCR.....	49
Tabelle 3.3: Bedingungen für die IGFBN-2-PCR	49
Tabelle 3.4: Protokoll zur Paraffineinbettung von Geweben.....	53
Tabelle 3.5: Kriterien zur Klassifizierung der ACF	54
Tabelle 3.6: Antikörper für die Immunhistochemie.....	57
Tabelle 3.7: Mastermix für die TaqMan PCR.....	67
Tabelle 3.8: Mastermix für die SybrGreen I PCR.....	67
Tabelle 3.9: Zyklusprofil der PCR-Reaktion.....	68
Tabelle 4.1: Anzahlen hyperplastischer und dysplastischer ACF sowie Gesamtzahl	76
Tabelle 4.2: Bezeichnung, Genbank <i>Accession number</i> und Proteinfunktion der Housekeeping-Gene.....	95
Tabelle 4.3: Bezeichnung, Genbank <i>Accession number</i> und Proteinfunktion der Kandidatengene.....	97
Tabelle 4.4: Expressionsniveau von IGFBN-2, -3 und IGF-II zum früheren Analysezeitpunkt.....	98
Tabelle 4.5: Expressionsniveau ausgewählter Kandidatengene im Kolongewebe des früheren Analysezeitpunktes	99
Tabelle 4.6: Expressionsniveau von IGFBN-2, -3 und IGF-II zum späteren Analysezeitpunkt.....	100
Tabelle 4.7: In Tumoren transgener Tiere signifikant hochregulierte Gene	100
Tabelle 4.8: In den Tumoren transgener Tiere nicht signifikant veränderte Gene	101

11 Literaturverzeichnis

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16: 3797-3804.

Adamo, M. L., Shao, Z. M., Lanau, F., Chen, J. C., Clemmons, D. R., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D. & Fontana, J. A. 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and retinoic acid modulation of IGF-binding proteins (IGFBPs): IGFBP-2, -3, and -4 gene expression and protein secretion in a breast cancer cell line. *Endocrinology* 131: 1858-1866.

Akagi, Y., Liu, W., Zebrowski, B., Xie, K. & Ellis, L. M. 1998. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res.* 58: 4008-4014.

Alnemri, E. S., Fernandes-Alnemri, T., Pomeroy, K., Robertson, N. M., Dudley, K., DuBois, G. C. & Litwack, G. 1994. FKBP46, a novel Sf9 insect cell nuclear immunophilin that forms a protein-kinase complex. *J.Biol.Chem.* 269: 30828-30834.

Amaar, Y. G., Thompson, G. R., Linkhart, T. A., Chen, S. T., Baylink, D. J. & Mohan, S. 2002. Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2). *J.Biol.Chem.* 277: 12053-12060.

Amiri, K. I. & Richmond, A. 2005. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24: 301-313.

Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben Shushan, E., Mann, M., Ben Neria, Y. & Alkalay, I. 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16: 1066-1076.

Andress, D. L. 1998. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates phosphorylation of the IGFBP-5 receptor. *Am.J.Physiol* 274: E744-E750.

Andress, D. L. & Birnbaum, R. S. 1992. Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J.Biol.Chem.* 267: 22467-22472.

Andress, D. L., Loop, S. M., Zapf, J. & Kiefer, M. C. 1993. Carboxy-truncated insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates mitogenesis in osteoblast-like cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 195: 25-30.

Arai, T., Busby, W., Jr. & Clemmons, D. R. 1996a. Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* 137: 4571-4575.

Arai, T., Clarke, J., Parker, A., Busby, W., Jr., Nam, T. & Clemmons, D. R. 1996b. Substitution of specific amino acids in insulin-like growth factor (IGF) binding protein 5 alters heparin binding and its change in affinity for IGF-I response to heparin. *J.Biol.Chem.* 271: 6099-6106.

Arends, J. W. 2000. Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J.Pathol.* 190: 412-416.

Armstrong, D. G., Baxter, G., Gutierrez, C. G., Hogg, C. O., Glazyrin, A. L., Campbell, B. K., Bramley, T. A. & Webb, R. 1998. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology* 139: 2146-2154.

- Augenlicht, L. H., Richards, C., Corner, G. & Pretlow, T. P. 1996. Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* 12: 1767-1772.
- Babajko, S., Leneuve, P., Loret, C. & Binoux, M. 1997. IGF-binding protein-6 is involved in growth inhibition in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: its production is both IGF- and cell density-dependent. *J.Endocrinol.* 152: 221-227.
- Bach, L. A., Headey, S. J. & Norton, R. S. 2005. IGF-binding proteins--the pieces are falling into place. *Trends Endocrinol.Metab* 16: 228-234.
- Bachelder, R. E., Yoon, S. O., Franci, C., de Herreros, A. G. & Mercurio, A. M. 2005. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J.Cell Biol.* 168: 29-33.
- Bai, H., Pollman, M. J., Inishi, Y. & Gibbons, G. H. 1999. Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ.Res.* 85: 229-237.
- Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221.
- Barker, N., Morin, P. J. & Clevers, H. 2000. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv.Cancer Res.* 77: 1-24.
- Barlow, D. P., Stoger, R., Herrmann, B. G., Saito, K. & Schweifer, N. 1991. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 349: 84-87.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. & Valentinis, B. 1997. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1332: F105-F126.
- Baxter, R. C. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 278: E967-E976.
- Baxter, R. C., Binoux, M. A., Clemmons, D. R., Conover, C. A., Drop, S. L., Holly, J. M., Mohan, S., Oh, Y. & Rosenfeld, R. G. 1998. Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 3213.
- Behrens, J. 2005. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem.Soc.Trans.* 33: 672-675.
- BERENBLUM, I. & Shubik, P. 1949. The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene. *Br.J.Cancer* 3: 384-386.
- Bernardini, S., Cianfarani, S., Spagnoli, A., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., Massoud, R., Boscherini, B., Finazzi-Agro, A., Rosenfeld, R. G. & Federici, G. 1994. Expression and down-regulation by retinoic acid of IGF binding protein-2 and -4 in medium from human neuroblastoma cells. *J.Neuroendocrinol.* 6: 409-413.
- Besnard, V., Corroyer, S., Trugnan, G., Chadelat, K., Nabeyrat, E., Cazals, V. & Clement, A. 2001. Distinct patterns of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 expression in oxidant exposed lung epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1538: 47-58.
- Bienz, M. & Clevers, H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103: 311-320.

- Bird, R. P. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 37: 147-151.
- Bird, R. P. 1995. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.* 93: 55-71.
- Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & Le Roith, D. 1996. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* 7: 153-159.
- Blundell, T. L. & Humbel, R. E. 1980. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287: 781-787.
- Bodmer, W. F., Bailey, C. J., Bodmer, J., Bussey, H. J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F. C., Murday, V. A., Rider, S. H., Scambler, P. & . 1987. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328: 614-616.
- Boisclair, Y. R., Yang, Y. W., Stewart, J. M. & Rechler, M. M. 1994. Insulin-like growth factor-I and insulin stimulate the synthesis of IGF-binding protein-2 in a human embryonic kidney cell line. *Growth Regul.* 4: 136-146.
- Booth, B. A., Boes, M., Andress, D. L., Dake, B. L., Kiefer, M. C., Maack, C., Linhardt, R. J., Bar, K., Caldwell, E. E., Weiler, J. & . 1995. IGFBP-3 and IGFBP-5 association with endothelial cells: role of C-terminal heparin binding domain. *Growth Regul.* 5: 1-17.
- Booth, B. A., Boes, M. & Bar, R. S. 1996. IGFBP-3 proteolysis by plasmin, thrombin, serum: heparin binding, IGF binding, and structure of fragments. *Am.J.Physiol* 271: E465-E470.
- Bos, J. L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- Boulle, N., Baudin, E., Gicquel, C., Logie, A., Bertherat, J., Penfornis, A., Bertagna, X., Luton, J. P., Schlumberger, M. & Le Bouc, Y. 2001. Evaluation of plasma insulin-like growth factor binding protein-2 as a marker for adrenocortical tumors. *Eur.J.Endocrinol.* 144: 29-36.
- Boulle, N., Gicquel, C., Logie, A., Christol, R., Feige, J. J. & Le Bouc, Y. 2000. Fibroblast growth factor-2 inhibits the maturation of pro-insulin-like growth factor-II (Pro-IGF-II) and the expression of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in the human adrenocortical tumor cell line NCI-H295R. *Endocrinology* 141: 3127-3136.
- Boulle, N., Logie, A., Gicquel, C., Perin, L. & Le Bouc, Y. 1998. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 1713-1720.
- Brabletz, T., Herrmann, K., Jung, A., Faller, G. & Kirchner, T. 2000. Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. *Am.J.Pathol.* 156: 865-870.
- Brabletz, T., Jung, A., Hermann, K., Gunther, K., Hohenberger, W. & Kirchner, T. 1998. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. *Pathol.Res.Pract.* 194: 701-704.
- Brabletz, T., Jung, A. & Kirchner, T. 2002. Beta-catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 441: 1-11.
- Bradshaw, S. L., D'Ercole, A. J. & Han, V. K. 1999. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in C6 glioma cells results in conditional alteration of cellular growth. *Endocrinology* 140: 575-584.

- Braulke, T. 1999. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm.Metab Res.* 31: 242-246.
- Brown, D. C. & Gatter, K. C. 2002. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40: 2-11.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. & Greenberg, M. E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868.
- Bunn, R. C. & Fowlkes, J. L. 2003. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol.Metab* 14: 176-181.
- Busby, W. H., Jr., Nam, T. J., Morales, A., Smith, C., Jennings, M. & Clemmons, D. R. 2000. The complement component C1s is the protease that accounts for cleavage of insulin-like growth factor-binding protein-5 in fibroblast medium. *J.Biol.Chem.* 275: 37638-37644.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* 25: 169-193.
- Butler, A. A. & LeRoith, D. 2001. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142: 1685-1688.
- Butt, A. J., Firth, S. M. & Baxter, R. C. 1999. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol.Cell Biol.* 77: 256-262.
- Camacho-Hubner, C., Clemmons, D. R. & D'Ercole, A. J. 1991. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in transgenic mice with altered expression of growth hormone and IGF-I. *Endocrinology* 129: 1201-1206.
- Carrick, F. E., Forbes, B. E. & Wallace, J. C. 2001. BIAcore analysis of bovine insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-2 identifies major IGF binding site determinants in both the amino- and carboxyl-terminal domains. *J.Biol.Chem.* 276: 27120-27128.
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. & Bejsovec, A. 1998. Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395: 604-608.
- Cazals, V., Nabeyrat, E., Corroyer, S., de Keyzer, Y. & Clement, A. 1999. Role for NF-kappa B in mediating the effects of hyperoxia on IGF-binding protein 2 promoter activity in lung alveolar epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 1448: 349-362.
- Chakrabarty, S. & Kondratick, L. 2006. Insulin-like growth factor binding protein-2 stimulates proliferation and activates multiple cascades of the mitogen-activated protein kinase pathways in NIH-OVCAR3 human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5: 189-197.
- Chambery, D., Mohseni-Zadeh, S., de Galle, B. & Babajko, S. 1999. N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 59: 2898-2902.
- Chen, H. J., Yuan, J. & Lobel, P. 1997. Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting. *J.Biol.Chem.* 272: 7003-7012.

- Cheng, L. & Lai, M. D. 2003. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J.Gastroenterol.* 9: 2642-2649.
- Chirco, R., Liu, X. W., Jung, K. K. & Kim, H. R. 2006. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 99-113.
- Cho, K. R. & Vogelstein, B. 1992. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 70: 1727-1731.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162: 156-159.
- Cianfarani, S., Germani, D., Rossi, P., Spagnoli, A. & Mercanti, D. 1996. Do insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) modulate the IGF-I growth promoting and differentiating effects in human neuroblastoma cells? *Eur.J.Endocrinol.* 135: 716-723.
- Clemmons, D. R. 1997. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 45-62.
- Clemmons, D. R., Busby, W., Clarke, J. B., Parker, A., Duan, C. & Nam, T. J. 1998. Modifications of insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Endocr.J.* 45 Suppl: S1-S8.
- Clemmons, D. R., Camacho-Hubner, C., Coronado, E. & Osborne, C. K. 1990. Insulin-like growth factor binding protein secretion by breast carcinoma cell lines: correlation with estrogen receptor status. *Endocrinology* 127: 2679-2686.
- Clemmons, D. R., Horvitz, G., Engleman, W., Nichols, T., Moralez, A. & Nickols, G. A. 1999. Synthetic alphaVbeta3 antagonists inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated smooth muscle cell migration and replication. *Endocrinology* 140: 4616-4621.
- Clemmons, D. R., Jones, J. I., Busby, W. H. & Wright, G. 1993. Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 692: 10-21.
- Cohen, P., Peehl, D. M., Stamey, T. A., Wilson, K. F., Clemmons, D. R. & Rosenfeld, R. G. 1993. Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 in the serum of prostate cancer patients. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 76: 1031-1035.
- Cohick, W. S., Gockerman, A. & Clemmons, D. R. 1995. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 synthesis and degradation by platelet-derived growth factor and the IGFs is enhanced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells. *J.Cell Physiol* 164: 187-196.
- Conover, C. A. 1995. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis in bone cell models. *Prog.Growth Factor Res.* 6: 301-309.
- Conover, C. A. & De Leon, D. D. 1994. Acid-activated insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis in normal and transformed cells. Role of cathepsin D. *J.Biol.Chem.* 269: 7076-7080.
- Conover, C. A., Durham, S. K., Zapf, J., Masiarz, F. R. & Kiefer, M. C. 1995. Cleavage analysis of insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF-binding protein-4 proteolysis and expression of protease-resistant IGF-binding protein-4 mutants. *J.Biol.Chem.* 270: 4395-4400.

- Corkins, M. R., Vanderhoof, J. A., Slentz, D. H., MacDonald, R. G. & Park, J. H. 1995. Growth stimulation by transfection of intestinal epithelial cells with an antisense insulin-like growth factor binding protein-2 construct. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 211: 707-713.
- Cottrell, S., Bicknell, D., Kaklamanis, L. & Bodmer, W. F. 1992. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340: 626-630.
- Coverley, J. A., Martin, J. L. & Baxter, R. C. 2000. The effect of phosphorylation by casein kinase 2 on the activity of insulin-like growth factor-binding protein-3. *Endocrinology* 141: 564-570.
- Cruz-Correa, M., Cui, H., Giardiello, F. M., Powe, N. R., Hylind, L., Robinson, A., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X. & Feinberg, A. P. 2004. Loss of imprinting of insulin growth factor II gene: a potential heritable biomarker for colon neoplasia predisposition. *Gastroenterology* 126: 964-970.
- Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N. R. & Feinberg, A. P. 2003. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 299: 1753-1755.
- Cummings, O. W. 2000. Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. *Semin.Gastrointest.Dis.* 11: 229-237.
- DakoCytomation . Handbuch Immunchemische Färbemethoden. 3. Auflage, 36. 2003.
Boenisch, T.
Ref Type: Generic
- Dashwood, R. H., Suzui, M., Nakagama, H., Sugimura, T. & Nagao, M. 1998. High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.* 58: 1127-1129.
- DAUGHADAY, W. H., Hall, K., Raben, M. S., SALMON, W. D., Jr., van den Brande, J. L. & van Wyk, J. J. 1972. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107.
- DAUGHADAY, W. H. & Rotwein, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr.Rev.* 10: 68-91.
- Davenport, M. L., Isley, W. L., Pucilowska, J. B., Pemberton, L. B., Lyman, B., Underwood, L. E. & Clemmons, D. R. 1992. Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 75: 590-595.
- Davies, S. M. 1994. Developmental regulation of genomic imprinting of the IGF2 gene in human liver. *Cancer Res.* 54: 2560-2562.
- de Kok, J. B., Roelofs, R. W., Giesendorf, B. A., Pennings, J. L., Waas, E. T., Feuth, T., Swinkels, D. W. & Span, P. N. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest* 85: 154-159.
- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A. & Robertson, E. J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345: 78-80.

- Delattre, O., Olschwang, S., Law, D. J., Melot, T., Remvikos, Y., Salmon, R. J., Sastre, X., Validire, P., Feinberg, A. P. & Thomas, G. 1989. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 2: 353-356.
- Dennis, P. A. & Rifkin, D. B. 1991. Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 580-584.
- Deschner, E. E. 1978. Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon. *Z.Krebsforsch.Klin.Onkol.Cancer Res.Clin.Oncol.* 91: 205-216.
- Deschner, E. E., Long, F. C., Hakissian, M. & Herrmann, S. L. 1983. Differential susceptibility of AKR, C57BL/6J, and CF1 mice to 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic tumor formation predicted by proliferative characteristics of colonic epithelial cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 70: 279-282.
- Di Gregorio, C., Losi, L., Fante, R., Modica, S., Ghidoni, M., Pedroni, M., Tamassia, M. G., Gafa, L., Ponz, d. L. & Roncucci, L. 1997. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology* 30: 328-334.
- Diehl, D. Development of 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic aberrant crypt foci in PEPCK-IGF-II transgenic mice. Schönfeld, R., Wolf, E., Lahm, H., and Oesterle, D. *Arch.Pharmacol.* 365 S1 (2002) 504 R130. 2002.
Ref Type: Generic
- Diehl, D., Hoeflich, A., Wolf, E. & Lahm, H. 2004. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res.* 64: 1600-1603.
- Dubois, V., Couissi, D., Schonke, E., Rémacle, C. & Trouet, A. 1995. Intracellular levels and secretion of insulin-like-growth-factor-binding proteins in MCF-7/6, MCF-7/AZ and MDA-MB-231 breast cancer cells. Differential modulation by estrogens in serum-free medium. *Eur.J.Biochem.* 232: 47-53.
- Durai, R., Yang, W., Gupta, S., Seifalian, A. M. & Winslet, M. C. 2005. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int.J.Colorectal Dis.* 20: 203-220.
- Easwaran, V., Lee, S. H., Inge, L., Guo, L., Goldbeck, C., Garrett, E., Wiesmann, M., Garcia, P. D., Fuller, J. H., Chan, V., Randazzo, F., Gundel, R., Warren, R. S., Escobedo, J., Aukerman, S. L., Taylor, R. N. & Fantl, W. J. 2003. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 63: 3145-3153.
- Ehrenborg, E., Zazzi, H., Lagercrantz, S., Granqvist, M., Hillerbrand, U., Allander, S. V., Larsson, C. & Luthman, H. 1999. Characterization and chromosomal localization of the human insulin-like growth factor-binding protein 6 gene. *Mamm.Genome* 10: 376-380.
- el Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y. & . 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54: 1169-1174.
- Elmlinger, M. W., Deininger, M. H., Schuett, B. S., Meyermann, R., Duffner, F., Grote, E. H. & Ranke, M. B. 2001. In vivo expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* 142: 1652-1658.

- Eppert, K., Scherer, S. W., Ozcelik, H., Pirone, R., Hoodless, P., Kim, H., Tsui, L. C., Bapat, B., Gallinger, S., Andrulis, I. L., Thomsen, G. H., Wrana, J. L. & Attisano, L. 1996. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86: 543-552.
- Eshleman, J. R., Lang, E. Z., Bowerfind, G. K., Parsons, R., Vogelstein, B., Willson, J. K., Veigl, M. L., Sedwick, W. D. & Markowitz, S. D. 1995. Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene* 10: 33-37.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P. & Bodmer, W. F. 2001. The ABC of APC. *Hum.Mol.Genet.* 10: 721-733.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W. & . 1990. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247: 49-56.
- Fearon, E. R., Hamilton, S. R. & Vogelstein, B. 1987. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238: 193-197.
- Fearon, E. R. & Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Fernandez-Tornero, C., Lozano, R. M., Rivas, G., Jimenez, M. A., Standker, L., Diaz-Gonzalez, D., Forssmann, W. G., Cuevas, P., Romero, A. & Gimenez-Gallego, G. 2005. Synthesis of the blood circulating C-terminal fragment of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 in its native conformation. Crystallization, heparin and IGF binding, and osteogenic activity. *J.Biol.Chem.* 280: 18899-18907.
- Fielder, P. J., Rosenfeld, R. G., Graves, H. C., Grandbois, K., Maack, C. A., Sawamura, S., Ogawa, Y., Sommer, A. & Cohen, P. 1994. Biochemical analysis of prostate specific antigen-proteolyzed insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Regul.* 4: 164-172.
- Firth, S. M. & Baxter, R. C. 1999. Characterisation of recombinant glycosylation variants of insulin-like growth factor binding protein-3. *J.Endocrinol.* 160: 379-387.
- Firth, S. M. & Baxter, R. C. 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr.Rev.* 23: 824-854.
- Flyvbjerg, A., Mogensen, O., Mogensen, B. & Nielsen, O. S. 1997. Elevated serum insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) and decreased IGFBP-3 in epithelial ovarian cancer: correlation with cancer antigen 125 and tumor-associated trypsin inhibitor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 2308-2313.
- Forbes, B. E., Turner, D., Hodge, S. J., McNeil, K. A., Forsberg, G. & Wallace, J. C. 1998. Localization of an insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine IGF binding protein-2 using disulfide mapping and deletion mutation analysis of the C-terminal domain. *J.Biol.Chem.* 273: 4647-4652.
- Fowlkes, J. & Freemark, M. 1992. Evidence for a novel insulin-like growth factor (IGF)-dependent protease regulating IGF-binding protein-4 in dermal fibroblasts. *Endocrinology* 131: 2071-2076.
- Fowlkes, J. L., Enghild, J. J., Suzuki, K. & Nagase, H. 1994. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J.Biol.Chem.* 269: 25742-25746.

- Fowlkes, J. L. & Serra, D. M. 1996. Characterization of glycosaminoglycan-binding domains present in insulin-like growth factor-binding protein-3. *J.Biol.Chem.* 271: 14676-14679.
- Frattali, A. L. & Pessin, J. E. 1993. Molecular defects of insulin/IGF-1 receptor transmembrane signaling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 687: 77-89.
- Freeman, W. M., Walker, S. J. & Vrana, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26: 112-115.
- Freier, S., Weiss, O., Eran, M., Flyvbjerg, A., Dahan, R., Nephesh, I., Safra, T., Shiloni, E. & Raz, I. 1999. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. *Gut* 44: 704-708.
- Frommer, K. W., Reichenmiller, K., Schutt, B. S., Hoeflich, A., Ranke, M. B., Dodt, G. & Elmlinger, M. W. 2006. IGF-independent effects of IGFBP-2 on the human breast cancer cell line Hs578T. *J.Mol.Endocrinol.* 37: 13-23.
- Fujimitsu, Y., Nakanishi, H., Inada, K., Yamachika, T., Ichinose, M., Fukami, H. & Tatematsu, M. 1996. Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts. *Jpn.J.Cancer Res.* 87: 1199-1203.
- Fujita, M., Furukawa, Y., Tsunoda, T., Tanaka, T., Ogawa, M. & Nakamura, Y. 2001. Up-regulation of the ectodermal-neural cortex 1 (ENC1) gene, a downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex, in colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 61: 7722-7726.
- Furihata, T., Kawamata, H., Kubota, K. & Fujimori, T. 2002. Evaluation of the malignant potential of aberrant crypt foci by immunohistochemical staining for beta-catenin in inflammation-induced rat colon carcinogenesis. *Int.J.Mol.Med.* 9: 353-358.
- Furukawa, F., Nishikawa, A., Kitahori, Y., Tanakamaru, Z. & Hirose, M. 2002. Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. *J.Exp.Clin.Cancer Res.* 21: 197-201.
- Gao, K., Dai, D. L., Martinka, M. & Li, G. 2006. Prognostic Significance of Nuclear Factor- κ B p105/p50 in Human Melanoma and Its Role in Cell Migration. *Cancer Res.* 66: 8382-8388.
- Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat.Rev.Cancer* 4: 891-899.
- Gerard, N., Delpuech, T., Oxvig, C., Overgaard, M. T. & Monget, P. 2004. Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and association with dominant but not subordinated follicles. *J.Endocrinol.* 182: 457-466.
- Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. & Stein, H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J.Immunol.* 133: 1710-1715.
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int.J.Cancer* 31: 13-20.
- Germain-Lee, E. L., Janicot, M., Lammers, R., Ullrich, A. & Casella, S. J. 1992. Expression of a type I insulin-like growth factor receptor with low affinity for insulin-like growth factor II. *Biochem.J.* 281 (Pt 2): 413-417.

- Giannini, S., Maggi, M., Cresci, B., Finetti, G., Bonaccorsi, L., Luconi, M., Rotella, C. M., Forti, G., Serio, M. & Baldi, E. 1996. Platelet-activating factor enhances production of insulin-like growth factor binding proteins in a human adenocarcinoma cell line (HEC-1A). *Gynecol.Oncol.* 61: 333-340.
- Gibson, J. M., Aplin, J. D., White, A. & Westwood, M. 2001. Regulation of IGF bioavailability in pregnancy. *Mol.Hum.Reprod.* 7: 79-87.
- Gilmore, A. P., Valentijn, A. J., Wang, P., Ranger, A. M., Bundred, N., O'Hare, M. J., Wakeling, A., Korsmeyer, S. J. & Streuli, C. H. 2002. Activation of BAD by therapeutic inhibition of epidermal growth factor receptor and transactivation by insulin-like growth factor receptor. *J.Biol.Chem.* 277: 27643-27650.
- Giovannucci, E., Pollak, M. N., Platz, E. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Majeed, N., Colditz, G. A., Speizer, F. E. & Hankinson, S. E. 2000. A prospective study of plasma insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 and risk of colorectal neoplasia in women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9: 345-349.
- Gockerman, A. & Clemmons, D. R. 1995. Porcine aortic smooth muscle cells secrete a serine protease for insulin-like growth factor binding protein-2. *Circ.Res.* 76: 514-521.
- Goss, K. H. & Groden, J. 2000. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J.Clin.Oncol.* 18: 1967-1979.
- Grimberg, A. & Cohen, P. 2000. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J.Cell Physiol* 183: 1-9.
- Grothey, A., Voigt, W., Schober, C., Muller, T., Dempke, W. & Schmoll, H. J. 1999. The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 125: 166-173.
- Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C. & Froesch, E. R. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol.(Copenh)* 121: 753-758.
- Guo, Y. S., Townsend, C. M., Jr., Jin, G. F., Beauchamp, R. D. & Thompson, J. C. 1995. Differential regulation by TGF-beta 1 and insulin of insulin-like growth factor binding protein-2 in IEC-6 cells. *Am.J.Physiol* 268: E1199-E1204.
- Hagen, T. & Vidal-Puig, A. 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 294: 324-328.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. & Kern, S. E. 1996. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B. & . 1995. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N.Engl.J.Med.* 332: 839-847.
- Hankins, G. R., De Souza, A. T., Bentley, R. C., Patel, M. R., Marks, J. R., Iglehart, J. D. & Jirtle, R. L. 1996. M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 12: 2003-2009.
- Hao, X., Palazzo, J. P., Ilyas, M., Tomlinson, I. & Talbot, I. C. 1997a. Reduced expression of molecules of the cadherin/catenin complex in the transition from colorectal adenoma to carcinoma. *Anticancer Res.* 17: 2241-2247.

- Hao, X., Tomlinson, I., Ilyas, M., Palazzo, J. P. & Talbot, I. C. 1997b. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch.* 431: 167-172.
- Hao, X. P., Pretlow, T. G., Rao, J. S. & Pretlow, T. P. 2001. Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 61: 8085-8088.
- Harper, J., Burns, J. L., Foulstone, E. J., Pignatelli, M., Zaina, S. & Hassan, A. B. 2006. Soluble IGF2 receptor rescues Apc(Min/+) intestinal adenoma progression induced by Igf2 loss of imprinting. *Cancer Res.* 66: 1940-1948.
- Hassan, A. B. & Howell, J. A. 2000. Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res.* 60: 1070-1076.
- Hassan, A. B. & Macaulay, V. M. 2002. The insulin-like growth factor system as a therapeutic target in colorectal cancer. *Ann.Oncol.* 13: 349-356.
- He, T., Wu, X. T., Yang, Z. M., Da, M. X., Zhang, M. M. & Qian, K. 2005. [IGFBP-2 mRNA expression in gastric cancer tissues and its roles in proliferation, differentiation and peritoneal metastasis of gastric cancer]. *Sichuan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.* 36: 187-189.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512.
- Heck, S., Lezoualc'h, F., Engert, S. & Behl, C. 1999. Insulin-like growth factor-1-mediated neuroprotection against oxidative stress is associated with activation of nuclear factor kappaB. *J.Biol.Chem.* 274: 9828-9835.
- Helle, S. I., Geisler, S., Aas, T., Paulsen, T., Holly, J. M. & Lonning, P. E. 2001. Plasma insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis is increased in primary breast cancer. *Br.J.Cancer* 85: 74-77.
- Ho, P. J. & Baxter, R. C. 1997a. Characterization of truncated insulin-like growth factor-binding protein-2 in human milk. *Endocrinology* 138: 3811-3818.
- Ho, P. J. & Baxter, R. C. 1997b. Insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with prostate carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 46: 333-342.
- Hobba, G. D., Forbes, B. E., Parkinson, E. J., Francis, G. L. & Wallace, J. C. 1996. The insulin-like growth factor (IGF) binding site of bovine insulin-like growth factor binding protein-2 (bIGFBP-2) probed by iodination. *J.Biol.Chem.* 271: 30529-30536.
- Hoeflich, A., Fettscher, O., Lahm, H., Blum, W. F., Kolb, H. J., Engelhardt, D., Wolf, E. & Weber, M. M. 2000. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res.* 60: 834-838.
- Hoeflich, A., Nedbal, S., Blum, W. F., Erhard, M., Lahm, H., Brem, G., Kolb, H. J., Wanke, R. & Wolf, E. 2001a. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2. *Endocrinology* 142: 1889-1898.
- Hoeflich, A., Reisinger, R., Lahm, H., Kiess, W., Blum, W. F., Kolb, H. J., Weber, M. M. & Wolf, E. 2001b. Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: protector or promoter? *Cancer Res.* 61: 8601-8610.
- Hoeflich, A., Reisinger, R., Schuett, B. S., Elmlinger, M. W., Russo, V. C., Vargas, G. A., Jehle, P. M., Lahm, H., Renner-Muller, I. & Wolf, E. 2004. Peri/nuclear localization of intact

insulin-like growth factor binding protein-2 and a distinct carboxyl-terminal IGFBP-2 fragment in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 324: 705-710.

Hoeflich, A., Reisinger, R., Vargas, G. A., Elmlinger, M. W., Schuett, B., Jehle, P. M., Renner-Muller, I., Lahm, H., Russo, V. C. & Wolf, E. 2002. Mutation of the RGD sequence does not affect plasma membrane association and growth inhibitory effects of elevated IGFBP-2 in vivo. *FEBS Lett.* 523: 63-67.

Hoeflich, A., Wu, M., Mohan, S., Foll, J., Wanke, R., Froehlich, T., Arnold, G. J., Lahm, H., Kolb, H. J. & Wolf, E. 1999. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain. *Endocrinology* 140: 5488-5496.

Höfler, H. & Müller, K. M. Praxis der Immunhistochemie. Noll, S. and Schaub-Kuhnen, S. 17. 2000.

Ref Type: Generic

Hoflich, A., Lahm, H., Blum, W., Kolb, H. & Wolf, E. 1998. Insulin-like growth factor-binding protein-2 inhibits proliferation of human embryonic kidney fibroblasts and of IGF-responsive colon carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* 434: 329-334.

Hollowood, A. D., Stewart, C. E., Perks, C. M., Pell, J. M., Lai, T., Alderson, D. & Holly, J. M. 2002. Evidence implicating a mid-region sequence of IGFBP-3 in its specific IGF-independent actions. *J.Cell Biochem.* 86: 583-589.

Hoops, T. C. & Traber, P. G. 1997. Molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 11: 609-633.

Howarth, G. S. 2003. Insulin-like growth factor-I and the gastrointestinal system: therapeutic indications and safety implications. *J.Nutr.* 133: 2109-2112.

Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem.Cytochem.* 29: 577-580.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6: 279-284.

Humbel, R. E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur.J.Biochem.* 190: 445-462.

Hunt, K. J., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Lukanova, A., Dechaud, H., Rinaldi, S., Zeleniuch-Jacquotte, A., Shore, R. E., Riboli, E. & Kaaks, R. 2002. Insulin-like growth factor II and colorectal cancer risk in women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 11: 901-905.

Huynh, H. 1998. In vivo regulation of the insulin-like growth factor system of mitogens by human chorionic gonadotropin. *Int.J.Oncol.* 13: 571-575.

Hwa, V., Oh, Y. & Rosenfeld, R. G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr.Rev.* 20: 761-787.

Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P. & Bodmer, W. F. 1999. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur.J.Cancer* 35: 1986-2002.

Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561.

- Jen, J., Powell, S. M., Papadopoulos, N., Smith, K. J., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1994. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res.* 54: 5523-5526.
- Jones, J. I. & Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr.Rev.* 16: 3-34.
- Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H., Jr., Camacho-Hubner, C. & Clemmons, D. R. 1993a. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J.Cell Biol.* 121: 679-687.
- Jones, J. I., Gockerman, A., Busby, W. H., Jr., Wright, G. & Clemmons, D. R. 1993b. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 10553-10557.
- Jones, J. I., Prevet, T., Gockerman, A. & Clemmons, D. R. 1996. Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 2482-2487.
- Kaaks, R., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Lukanova, A., Biessy, C., Dechaud, H., Rinaldi, S., Zeleniuch-Jacquotte, A., Shore, R. E. & Riboli, E. 2000. Serum C-peptide, insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-binding proteins, and colorectal cancer risk in women. *J.Natl.Cancer Inst.* 92: 1592-1600.
- Kadri, Z., Petitfrere, E., Boudot, C., Freyssonier, J. M., Fichelson, S., Mayeux, P., Emonard, H., Hornebeck, W., Haye, B. & Billat, C. 2000. Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ.* 11: 573-580.
- Kaleko, M., Rutter, W. J. & Miller, A. D. 1990. Overexpression of the human insulinlike growth factor I receptor promotes ligand-dependent neoplastic transformation. *Mol.Cell Biol.* 10: 464-473.
- Kalscheuer, V. M., Mariman, E. C., Schepens, M. T., Rehder, H. & Ropers, H. H. 1993. The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nat.Genet.* 5: 74-78.
- Kamei, J., Toyofuku, T. & Hori, M. 2003. Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 312: 380-387.
- Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M. & Kolodner, R. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57: 808-811.
- Kanety, H., Madjar, Y., Dagan, Y., Levi, J., Papa, M. Z., Pariente, C., Goldwasser, B. & Karasik, A. 1993. Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 77: 229-233.
- Kang, J. X., Li, Y. & Leaf, A. 1997. Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 13671-13676.
- Kaplan, P. J., Mohan, S., Cohen, P., Foster, B. A. & Greenberg, N. M. 1999. The insulin-like growth factor axis and prostate cancer: lessons from the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) model. *Cancer Res.* 59: 2203-2209.

- Karasik, A., Menczer, J., Pariente, C. & Kanety, H. 1994. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-2 are increased in cyst fluids of epithelial ovarian cancer. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 78: 271-276.
- Kassem, M., Brixen, K., Mosekilde, L., Blum, W. F. & Flyvbjerg, A. 1998. Effects of growth hormone treatment on serum levels of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins 1-4 in postmenopausal women. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 49: 747-756.
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T., Jr. & LeRoith, D. 1993. Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3). *J.Biol.Chem.* 268: 2655-2661.
- Katz, L. E., Liu, F., Baker, B., Agus, M. S., Nunn, S. E., Hintz, R. L. & Cohen, P. 1996. The effect of growth hormone treatment on the insulin-like growth factor axis in a child with nonislet cell tumor hypoglycemia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81: 1141-1146.
- Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E. D., Chan, S. S., Culotti, J. G. & Tessier-Lavigne, M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87: 175-185.
- Kelley, K. M., Oh, Y., Gargosky, S. E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D. M. & Rosenfeld, R. G. 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 28: 619-637.
- Khandwala, H. M., McCutcheon, I. E., Flyvbjerg, A. & Friend, K. E. 2000. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr.Rev.* 21: 215-244.
- Kim, E. J., Schaffer, B. S., Kang, Y. H., MacDonald, R. G. & Park, J. H. 2002. Decreased production of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-6 by transfection of colon cancer cells with an antisense IGFBP-6 cDNA construct leads to stimulation of cell proliferation. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 17: 563-570.
- Kim, T. A., Lim, J., Ota, S., Raja, S., Rogers, R., Rivnay, B., Avraham, H. & Avraham, S. 1998. NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J.Cell Biol.* 141: 553-566.
- Kim, T. A., Ota, S., Jiang, S., Pasztor, L. M., White, R. A. & Avraham, S. 2000. Genomic organization, chromosomal localization and regulation of expression of the neuronal nuclear matrix protein NRP/B in human brain tumors. *Gene* 255: 105-116.
- Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.
- Kirchner, T. & Brabletz, T. 2000. Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation. *Am.J.Pathol.* 157: 1113-1121.
- Knudson, A. G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 68: 820-823.
- Knudson, A. G., Jr. 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 45: 1437-1443.
- Kokontis, J. M., Wagner, A. J., O'Leary, M., Liao, S. & Hay, N. 2001. A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* 20: 659-668.

- Kolligs, F. T., Bommer, G. & Goke, B. 2002. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 66: 131-144.
- Korc-Grodzicki, B., Ren, N. & Hilf, R. 1996. Effects of estradiol on the expression and production of IGFBP-2 by R3230AC mammary tumor cells. *Oncol.Res.* 8: 473-483.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Clevers, H. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784-1787.
- Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J. & Edwards, D. R. 1991. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 77: 2475-2481.
- Koutsilieris, M., Frenette, G., Lazure, C., Lehoux, J. G., Govindan, M. V. & Polychronakos, C. 1993. Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in PA-III cell-induced osteoblastic metastases. *Anticancer Res.* 13: 481-486.
- Kreiling, J. L., Byrd, J. C., Deisz, R. J., Mizukami, I. F., Todd, R. F., III & MacDonald, R. G. 2003. Binding of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) to the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor: contrasting interactions of full-length and soluble forms of uPAR. *J.Biol.Chem.* 278: 20628-20637.
- Kuang, Z., Yao, S., Keizer, D. W., Wang, C. C., Bach, L. A., Forbes, B. E., Wallace, J. C. & Norton, R. S. 2006. Structure, Dynamics and Heparin Binding of the C-terminal Domain of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-2 (IGFBP-2). *J.Mol.Biol.*
- Kumar, R., Singh, S. K., Koshkin, A. A., Rajwanshi, V. K., Meldgaard, M. & Wengel, J. 1998. The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8: 2219-2222.
- Kuraguchi, M., Cook, H., Williams, E. D. & Thomas, G. A. 2001. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *J.Pathol.* 193: 517-521.
- Lahm, H., Amstad, P., Wyniger, J., Yilmaz, A., Fischer, J. R., Schreyer, M. & Givel, J. C. 1994. Blockade of the insulin-like growth-factor-I receptor inhibits growth of human colorectal cancer cells: evidence of a functional IGF-II-mediated autocrine loop. *Int.J.Cancer* 58: 452-459.
- Lahm, H., Suardet, L., Laurent, P. L., Fischer, J. R., Ceyhan, A., Givel, J. C. & Odartchenko, N. 1992. Growth regulation and co-stimulation of human colorectal cancer cell lines by insulin-like growth factor I, II and transforming growth factor alpha. *Br.J.Cancer* 65: 341-346.
- Lalou, C., Sawamura, S., Segovia, B., Ogawa, Y. & Binoux, M. 1997. Proteolytic fragments of insulin-like growth factor binding protein-3: N-terminal sequences and relationships between structure and biological activity. *C.R.Acad.Sci.III* 320: 621-628.
- Lambert, S., Carlisi, A., Collette, J., Franchimont, P. & Gol-Winkler, R. 1992. Insulin-like growth factor II in two human colon-carcinoma cell lines: gene structure and expression, and protein secretion. *Int.J.Cancer* 52: 404-408.
- Lancaster, J. M., Sayer, R. A., Blanchette, C., Calingaert, B., Konidari, I., Gray, J., Schildkraut, J., Schomberg, D. W., Marks, J. R. & Berchuck, A. 2006. High expression of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA in epithelial ovarian cancers produces elevated preoperative serum levels. *Int.J.Gynecol.Cancer* 16: 1529-1535.
- Lane, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16.

- Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Soe, R., Boldt, H. B., Sottrup-Jensen, L., Giudice, L. C., Conover, C. A. & Oxvig, C. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A. *FEBS Lett.* 504: 36-40.
- Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., Hays, L. G., Yates, J. R., III & Conover, C. A. 1999. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 3149-3153.
- Leal, S. M., Liu, Q., Huang, S. S. & Huang, J. S. 1997. The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. *J.Biol.Chem.* 272: 20572-20576.
- Lee, D. Y., Kim, S. J. & Lee, Y. C. 1999. Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J.Korean Med.Sci.* 14: 401-404.
- Lee, E. J., Mircean, C., Shmulevich, I., Wang, H., Liu, J., Niemisto, A., Kavanagh, J. J., Lee, J. H. & Zhang, W. 2005. Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes ovarian cancer cell invasion. *Mol.Cancer* 4: 7.
- Lee, S. J. & Nathans, D. 1988. Proliferin secreted by cultured cells binds to mannose 6-phosphate receptors. *J.Biol.Chem.* 263: 3521-3527.
- Leng, S. L., Leeding, K. S., Gibson, P. R. & Bach, L. A. 2001a. Insulin-like growth factor-II renders LIM 2405 human colon cancer cells resistant to butyrate-induced apoptosis: a potential mechanism for colon cancer cell survival in vivo. *Carcinogenesis* 22: 1625-1631.
- Leng, S. L., Leeding, K. S., Whitehead, R. H. & Bach, L. A. 2001b. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II-induced but not basal proliferation and adhesion of LIM 1215 colon cancer cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 174: 121-127.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649.
- LeRoith, D. & Roberts, C. T., Jr. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 195: 127-137.
- Leverrier, Y., Thomas, J., Mathieu, A. L., Low, W., Blanquier, B. & Marvel, J. 1999. Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death.Differ.* 6: 290-296.
- Li, W., Fawcett, J., Widmer, H. R., Fielder, P. J., Rabkin, R. & Keller, G. A. 1997. Nuclear transport of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in opossum kidney cells. *Endocrinology* 138: 1763-1766.
- Li, X. & Stark, G. R. 2002. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp.Hematol.* 30: 285-296.
- Lickert, H., Doman, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B. I., Freund, J. N. & Kemler, R. 2000. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 127: 3805-3813.
- Liu, B., Lee, H. Y., Weinzimer, S. A., Powell, D. R., Clifford, J. L., Kurie, J. M. & Cohen, P. 2000a. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J.Biol.Chem.* 275: 33607-33613.

- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. & He, X. 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108: 837-847.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K., Halling, K. C., Cunningham, J. M., Boardman, L. A., Qian, C., Christensen, E., Schmidt, S. S., Roche, P. C., Smith, D. I. & Thibodeau, S. N. 2000b. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat.Genet.* 26: 146-147.
- Liu, X. W., Bernardo, M. M., Fridman, R. & Kim, H. R. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 278: 40364-40372.
- Liu, X. W., Taube, M. E., Jung, K. K., Dong, Z., Lee, Y. J., Roshy, S., Sloane, B. F., Fridman, R. & Kim, H. R. 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res.* 65: 898-906.
- Long, L., Navab, R. & Brodt, P. 1998. Regulation of the Mr 72,000 type IV collagenase by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res.* 58: 3243-3247.
- Lopaczynski, W., Harris, S. & Nissley, P. 1993. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) dependent phosphorylation of the IGF-I receptor in MG-63 cells. *Regul.Pept.* 48: 207-216.
- Losi, L., Roncucci, L., Di Gregorio, C., de Leon, M. P. & Benhattar, J. 1996. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J.Pathol.* 178: 259-263.
- Luceri, C., De Filippo, C., Caderni, G., Gambacciani, L., Salvadori, M., Giannini, A. & Dolara, P. 2000. Detection of somatic DNA alterations in azoxymethane-induced F344 rat colon tumors by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis* 21: 1753-1756.
- Ma, J., Pollak, M. N., Giovannucci, E., Chan, J. M., Tao, Y., Hennekens, C. H. & Stampfer, M. J. 1999. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J.Natl.Cancer Inst.* 91: 620-625.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J. & Hanski, C. 1999. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 1603-1608.
- Marinero, J. A., Neumann, G. M., Russo, V. C., Leeding, K. S. & Bach, L. A. 2000. O-glycosylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-6 maintains high IGF-II binding affinity by decreasing binding to glycosaminoglycans and susceptibility to proteolysis. *Eur.J.Biochem.* 267: 5378-5386.
- Markowitz, S. 2000. DNA repair defects inactivate tumor suppressor genes and induce hereditary and sporadic colon cancers. *J.Clin.Oncol.* 18: 75S-80S.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zborowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & . 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336-1338.
- Martin, J. L. & Pattison, S. L. 2000. Insulin-like growth factor binding protein-3 is regulated by dihydrotestosterone and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in LNCaP prostate carcinoma cells. *Endocrinology* 141: 2401-2409.

- Marzella, L. & Glaumann, H. 1983. Biogenesis, translocation, and function of lysosomal enzymes. *Int.Rev.Exp.Pathol.* 25: 239-278.
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. 1988. Expression of insulin-like growth factor I in transgenic mice with elevated levels of growth hormone is correlated with growth. *Endocrinology* 123: 433-437.
- Matrisian, L. M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463.
- Mazerbourg, S., Callebaut, I., Zapf, J., Mohan, S., Overgaard, M. & Monget, P. 2004. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth Horm.IGF.Res.* 14: 71-84.
- McCarthy, K., Maguire, T., McGreal, G., McDermott, E., O'Higgins, N. & Duffy, M. J. 1999. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int.J.Cancer* 84: 44-48.
- McCusker, R. H., Cohick, W. S., Busby, W. H. & Clemmons, D. R. 1991. Evaluation of the developmental and nutritional changes in porcine insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 serum levels by immunoassay. *Endocrinology* 129: 2631-2638.
- McLellan, E. A. & Bird, R. P. 1988. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 48: 6187-6192.
- Mehlen, P. & Fearon, E. R. 2004. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J.Clin.Oncol.* 22: 3420-3428.
- Menouny, M., Binoux, M. & Babajko, S. 1997. Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neuroblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Endocrinology* 138: 683-690.
- Michell, N. P., Dent, S., Langman, M. J. & Eggo, M. C. 1997a. Insulin-like growth factor binding proteins as mediators of IGF-I effects on colon cancer cell proliferation. *Growth Factors* 14: 269-277.
- Michell, N. P., Langman, M. J. & Eggo, M. C. 1997b. Insulin-like growth factors and their binding proteins in human colonocytes: preferential degradation of insulin-like growth factor binding protein 2 in colonic cancers. *Br.J.Cancer* 76: 60-66.
- Midgley, R. & Kerr, D. 1999. Colorectal cancer. *Lancet* 353: 391-399.
- Mignatti, P. & Rifkin, D. B. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73: 161-195.
- Miller, E. C. & Miller, J. A. 1981. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 47: 2327-2345.
- Minamoto, T., Yamashita, N., Ochiai, A., Mai, M., Sugimura, T., Ronai, Z. & Esumi, H. 1995. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* 75: 1520-1526.
- Miraki-Moud, F., Jenkins, P. J., Fairclough, P. D., Jordan, S., Bustin, S. A., Jones, A. M., Lowe, D. G., Monson, J. P., Grossman, A. B., Besser, G. M. & Camacho-Hubner, C. 2001. Increased levels of insulin-like growth factor binding protein-2 in sera and tumours from patients with colonic neoplasia with and without acromegaly. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 54: 499-508.

- Mishra, L., Bass, B., Ooi, B. S., Sidawy, A. & Korman, L. 1998. Role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor, IGF-I, and IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. *Growth Horm.IGF.Res.* 8: 473-479.
- Miyake, H., Hara, I., Yamanaka, K., Muramaki, M., Gleave, M. & Eto, H. 2005. Introduction of insulin-like growth factor binding protein-2 gene into human bladder cancer cells enhances their metastatic potential. *Oncol.Rep.* 13: 341-345.
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T. & Nakamura, Y. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum.Mol.Genet.* 1: 229-233.
- Modrich, P. 1991. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu.Rev.Genet.* 25: 229-253.
- Mohan, S., Nakao, Y., Honda, Y., Landale, E., Leser, U., Dony, C., Lang, K. & Baylink, D. J. 1995. Studies on the mechanisms by which insulin-like growth factor (IGF) binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-5 modulate IGF actions in bone cells. *J.Biol.Chem.* 270: 20424-20431.
- Mohseni-Zadeh, S. & Binoux, M. 1997. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 interacts with the type 1 IGF receptor, reducing the affinity of the receptor for its ligand: an alternative mechanism in the regulation of IGF action. *Endocrinology* 138: 5645-5648.
- Moore, M. G., Wetterau, L. A., Francis, M. J., Peehl, D. M. & Cohen, P. 2003. Novel stimulatory role for insulin-like growth factor binding protein-2 in prostate cancer cells. *Int.J.Cancer* 105: 14-19.
- Morali, O. G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J. P. & Larue, L. 2001. IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene* 20: 4942-4950.
- Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-1790.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. & Wittwer, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-8, 960, 962.
- Morson, B. C., Whiteway, J. E., Jones, E. A., Macrae, F. A. & Williams, C. B. 1984. Histopathology and prognosis of malignant colorectal polyps treated by endoscopic polypectomy. *Gut* 25: 437-444.
- Moschos, S. J. & Mantzoros, C. S. 2002. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology* 63: 317-332.
- Mouhieddine, O. B., Cazals, V., Kuto, E., Le Bouc, Y. & Clement, A. 1996. Glucocorticoid-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells is associated with increased production of insulin-like growth factor binding protein-2. *Endocrinology* 137: 287-295.
- Muller, H. L., Oh, Y., Gargosky, S. E., Wilson, K. F., Lehrnbecher, T. & Rosenfeld, R. G. 1994a. Insulin-like growth factor binding protein-3 concentrations and insulin-like growth factor binding protein-3 protease activity in sera of patients with malignant solid tumors or leukemia. *Pediatr.Res.* 35: 720-724.

- Muller, H. L., Oh, Y., Lehrnbecher, T., Blum, W. F. & Rosenfeld, R. G. 1994b. Insulin-like growth factor-binding protein-2 concentrations in cerebrospinal fluid and serum of children with malignant solid tumors or acute leukemia. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 79: 428-434.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. & Polakis, P. 1995. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 3046-3050.
- Naishiro, Y., Yamada, T., Idogawa, M., Honda, K., Takada, M., Kondo, T., Imai, K. & Hirohashi, S. 2005. Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. *Oncogene* 24: 3141-3153.
- Nakamura, M., Miyamoto, S., Maeda, H., Ishii, G., Hasebe, T., Chiba, T., Asaka, M. & Ochiai, A. 2005. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 333: 1011-1016.
- Nambiar, P. R., Nakanishi, M., Gupta, R., Cheung, E., Firouzi, A., Ma, X. J., Flynn, C., Dong, M., Guda, K., Levine, J., Raja, R., Achenie, L. & Rosenberg, D. W. 2004. Genetic signatures of high- and low-risk aberrant crypt foci in a mouse model of sporadic colon cancer. *Cancer Res.* 64: 6394-6401.
- Nascimbeni, R., Villanacci, V., Mariani, P. P., Di Betta, E., Ghirardi, M., Donato, F. & Salerni, B. 1999. Aberrant crypt foci in the human colon: frequency and histologic patterns in patients with colorectal cancer or diverticular disease. *Am.J.Surg.Pathol.* 23: 1256-1263.
- Neumann, G. M., Marinaro, J. A. & Bach, L. A. 1998. Identification of O-glycosylation sites and partial characterization of carbohydrate structure and disulfide linkages of human insulin-like growth factor binding protein 6. *Biochemistry* 37: 6572-6585.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. & . 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43.
- Nickerson, T. & Pollak, M. 1999. Bicalutamide (Casodex)-induced prostate regression involves increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding proteins. *Urology* 54: 1120-1125.
- Nishimura, A., Fujimoto, M., Oguchi, S., Fusunyan, R. D., MacDermott, R. P. & Sanderson, I. R. 1998. Short-chain fatty acids regulate IGF-binding protein secretion by intestinal epithelial cells. *Am.J.Physiol* 275: E55-E63.
- Novak, A., Hsu, S. C., Leung-Hagesteijn, C., Radeva, G., Papkoff, J., Montesano, R., Roskelley, C., Grosschedl, R. & Dedhar, S. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 4374-4379.
- Nucci, M. R., Robinson, C. R., Longo, P., Campbell, P. & Hamilton, S. R. 1997. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum.Pathol.* 28: 1396-1407.
- Ochiai, M., Watanabe, M., Nakanishi, M., Taguchi, A., Sugimura, T. & Nakagama, H. 2005. Differential staining of dysplastic aberrant crypt foci in the colon facilitates prediction of carcinogenic potentials of chemicals in rats. *Cancer Lett.* 220: 67-74.

- Ogawa, O., Eccles, M. R., Szeto, J., McNoe, L. A., Yun, K., Maw, M. A., Smith, P. J. & Reeve, A. E. 1993. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 362: 749-751.
- Oh, Y. S., Kim, E. J., Schaffer, B. S., Kang, Y. H., Binderup, L., MacDonald, R. G. & Park, J. H. 2001. Synthetic low-calcaemic vitamin D(3) analogues inhibit secretion of insulin-like growth factor II and stimulate production of insulin-like growth factor-binding protein-6 in conjunction with growth suppression of HT-29 colon cancer cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 183: 141-149.
- Ohlsson, C., Kley, N., Werner, H. & LeRoith, D. 1998. p53 regulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1. *Endocrinology* 139: 1101-1107.
- Oka, Y., Rozek, L. M. & Czech, M. P. 1985. Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process. *J. Biol. Chem.* 260: 9435-9442.
- Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K., Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Mukai, K., Fukushima, S., Miyaki, M. & Esumi, H. 1998. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* 83: 896-900.
- Otori, K., Sugiyama, K., Hasebe, T., Fukushima, S. & Esumi, H. 1995. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res.* 55: 4743-4746.
- Ouban, A., Muraca, P., Yeatman, T. & Coppola, D. 2003. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum. Pathol.* 34: 803-808.
- Overgaard, M. T., Boldt, H. B., Laursen, L. S., Sottrup-Jensen, L., Conover, C. A. & Oxvig, C. 2001. Pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPP-A2), a novel insulin-like growth factor-binding protein-5 proteinase. *J. Biol. Chem.* 276: 21849-21853.
- Palmqvist, R., Stattin, P., Rinaldi, S., Biessy, C., Stenling, R., Riboli, E., Hallmans, G. & Kaaks, R. 2003. Plasma insulin, IGF-binding proteins-1 and -2 and risk of colorectal cancer: a prospective study in northern Sweden. *Int. J. Cancer* 107: 89-93.
- Papanikolaou, A., Wang, Q. S., Papanikolaou, D., Whiteley, H. E. & Rosenberg, D. W. 2000. Sequential and morphological analyses of aberrant crypt foci formation in mice of differing susceptibility to azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 1567-1572.
- Park, J. H., McCusker, R. H., Vanderhoof, J. A., Mohammadpour, H., Harty, R. F. & MacDonald, R. G. 1992. Secretion of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 by intestinal epithelial (IEC-6) cells: implications for autocrine growth regulation. *Endocrinology* 131: 1359-1368.
- Parsons, R., Myeroff, L. L., Liu, B., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 5548-5550.
- Paulsen, J. E., Knutsen, H., Olstorn, H. B., Loberg, E. M. & Alexander, J. 2006. Identification of flat dysplastic aberrant crypt foci in the colon of azoxymethane-treated A/J mice. *Int. J. Cancer* 118: 540-546.

- Paulsen, J. E., Loberg, E. M., Olstorn, H. B., Knutsen, H., Steffensen, I. L. & Alexander, J. 2005. Flat dysplastic aberrant crypt foci are related to tumorigenesis in the colon of azoxymethane-treated rat. *Cancer Res.* 65: 121-129.
- Paulsen, J. E., Namork, E., Steffensen, I. L., Eide, T. J. & Alexander, J. 2000. Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of Min mice--a murine model of familial adenomatous polyposis. *Scand.J.Gastroenterol.* 35: 534-539.
- Paulsen, J. E., Steffensen, I. L., Loberg, E. M., Husoy, T., Namork, E. & Alexander, J. 2001. Qualitative and quantitative relationship between dysplastic aberrant crypt foci and tumorigenesis in the Min/+ mouse colon. *Cancer Res.* 61: 5010-5015.
- Pedroni, M., Sala, E., Scarselli, A., Borghi, F., Menigatti, M., Benatti, P., Percesepe, A., Rossi, G., Foroni, M., Losi, L., Di Gregorio, C., De Pol, A., Nascimbeni, R., Di Betta, E., Salerni, B., de Leon, M. P. & Roncucci, L. 2001. Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 61: 896-899.
- Peraino, C., Fry, R. J. & Staffeldt, E. 1971. Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.* 31: 1506-1512.
- Pereira, J. J., Meyer, T., Docherty, S. E., Reid, H. H., Marshall, J., Thompson, E. W., Rossjohn, J. & Price, J. T. 2004. Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res.* 64: 977-984.
- Pitot, H. C. 1989. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn.J.Cancer Res.* 80: 599-607.
- Ponder, B. A., Schmidt, G. H., Wilkinson, M. M., Wood, M. J., Monk, M. & Reid, A. 1985. Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature* 313: 689-691.
- Potter, V. R. 1980. Initiation and promotion in cancer formation: the importance of studies on intercellular communication. *Yale J.Biol.Med.* 53: 367-384.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359: 235-237.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N. & Stewart, T. A. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 7: 2609-2617.
- Pretlow, T. P., Barrow, B. J., Ashton, W. S., O'Riordan, M. A., Pretlow, T. G., Jurcisek, J. A. & Stellato, T. A. 1991. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 51: 1564-1567.
- Pretlow, T. P., Brasitus, T. A., Fulton, N. C., Cheyer, C. & Kaplan, E. L. 1993. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J.Natl.Cancer Inst.* 85: 2004-2007.
- Pretlow, T. P., O'Riordan, M. A., Pretlow, T. G. & Stellato, T. A. 1992. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J.Cell Biochem.Suppl* 16G: 55-62.

- Qin, X., Byun, D., Lau, K. H., Baylink, D. J. & Mohan, S. 2000. Evidence that the interaction between insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein (IGFBP)-4 is essential for the action of the IGF-II-dependent IGFBP-4 protease. *Arch.Biochem.Biophys.* 379: 209-216.
- Raghupathi, R., Graham, D. I. & McIntosh, T. K. 2000. Apoptosis after traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* 17: 927-938.
- Ranke, M. B. & Elmlinger, M. 1997. Functional role of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm.Res.* 48 Suppl 4: 9-15.
- Ranke, M. B., Maier, K. P., Schweizer, R., Stadler, B., Schleicher, S., Elmlinger, M. W. & Flehmig, B. 2003. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm.Res.* 60: 174-180.
- Reddy, B. S., Watanabe, K. & Weisburger, J. H. 1977. Effect of high-fat diet on colon carcinogenesis in F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate, or methylnitrosourea. *Cancer Res.* 37: 4156-4159.
- Ree, A. H., Florenes, V. A., Berg, J. P., Maelandsmo, G. M., Nesland, J. M. & Fodstad, O. 1997. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin.Cancer Res.* 3: 1623-1628.
- Reeve, J. G., Kirby, L. B., Brinkman, A., Hughes, S. A., Schwander, J. & Bleehen, N. M. 1992. Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines. *Int.J.Cancer* 51: 818-821.
- Reeve, J. G., Morgan, J., Schwander, J. & Bleehen, N. M. 1993. Role for membrane and secreted insulin-like growth factor-binding protein-2 in the regulation of insulin-like growth factor action in lung tumors. *Cancer Res.* 53: 4680-4685.
- Renehan, A. G., Jones, J., Potten, C. S., Shalet, S. M. & O'dwyer, S. T. 2000a. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 83: 1344-1350.
- Renehan, A. G., O'dwyer, S. T., Haboubi, N. J. & Potten, C. S. 2002. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis.* 4: 76-89.
- Renehan, A. G., Painter, J. E., O'Halloran, D., Atkin, W. S., Potten, C. S., O'dwyer, S. T. & Shalet, S. M. 2000b. Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85: 3402-3408.
- Rex, D. K. 2003. Postpolypectomy and post-cancer resection surveillance. *Rev.Gastroenterol.Disord.* 3: 202-209.
- Richardsen, E., Ukkonen, T., Bjornsen, T., Mortensen, E., Egevad, L. & Busch, C. 2003. Overexpression of IGFBP2 is a marker for malignant transformation in prostate epithelium. *Virchows Arch.* 442: 329-335.
- Rickert, R. R., Auerbach, O., Garfinkel, L., Hammond, E. C. & Frasca, J. M. 1979. Adenomatous lesions of the large bowel: an autopsy survey. *Cancer* 43: 1847-1857.
- Rinderknecht, E. & Humbel, R. E. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J.Biol.Chem.* 253: 2769-2776.

- Roberts, R. A., Nebert, D. W., Hickman, J. A., Richburg, J. H. & Goldsworthy, T. L. 1997. Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology. *Fundam.Appl.Toxicol.* 38: 107-115.
- Rockman, S. P., Currie, S. A., Ciavarella, M., Vincan, E., Dow, C., Thomas, R. J. & Phillips, W. A. 2001. Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J.Biol.Chem.* 276: 45113-45119.
- Roghani, M., Hossenlopp, P., Lepage, P., Balland, A. & Binoux, M. 1989. Isolation from human cerebrospinal fluid of a new insulin-like growth factor-binding protein with a selective affinity for IGF-II. *FEBS Lett.* 255: 253-258.
- Rogler, C. E., Yang, D., Rossetti, L., Donohoe, J., Alt, E., Chang, C. J., Rosenfeld, R., Neely, K. & Hintz, R. 1994. Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 269: 13779-13784.
- Roncucci, L., Modica, S., Pedroni, M., Tamassia, M. G., Ghidoni, M., Losi, L., Fante, R., Di Gregorio, C., Manenti, A., Gafa, L. & Ponz, d. L. 1998. Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 77: 2343-2348.
- Roncucci, L., Pedroni, M., Fante, R., Di Gregorio, C. & Ponz, d. L. 1993. Cell kinetic evaluation of human colonic aberrant crypts. (Colorectal Cancer Study Group of the University of Modena and the Health Care District 16, Modena, Italy). *Cancer Res.* 53: 3726-3729.
- Roncucci, L., Stamp, D., Medline, A., Cullen, J. B. & Bruce, W. R. 1991. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum.Pathol.* 22: 287-294.
- Roth, R. A. & Kiess, W. 1994. Insulin-like growth factor receptors: recent developments and new methodologies. *Growth Regul.* 4 Suppl 1: 31-38.
- Rotwein, P. 1991. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5: 3-18.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S. & Polakis, P. 1997. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res.* 57: 4624-4630.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S. H., Masiarz, F. R., Munemitsu, S. & Polakis, P. 1993. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262: 1731-1734.
- Russo, V. C., Bach, L. A., Fosang, A. J., Baker, N. L. & Werther, G. A. 1997. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. *Endocrinology* 138: 4858-4867.
- Russo, V. C., Rekaris, G., Baker, N. L., Bach, L. A. & Werther, G. A. 1999. Basic fibroblast growth factor induces proteolysis of secreted and cell membrane-associated insulin-like growth factor binding protein-2 in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 140: 3082-3090.
- Russo, V. C., Schutt, B. S., Andaloro, E., Ymer, S. I., Hoeflich, A., Ranke, M. B., Bach, L. A. & Werther, G. A. 2005. Insulin-like growth factor binding protein-2 binding to extracellular matrix plays a critical role in neuroblastoma cell proliferation, migration, and invasion. *Endocrinology* 146: 4445-4455.

- Sachdev, D. & Yee, D. 2001. The IGF system and breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* 8: 197-209.
- Salahshor, S., Kressner, U., Pahlman, L., Glimelius, B., Lindmark, G. & Lindblom, A. 1999. Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosomes.Cancer* 26: 247-252.
- SALMON, W. D., Jr. & DAUGHADAY, W. H. 1957. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J.Lab Clin.Med.* 49: 825-836.
- Sara, V. R. & Hall, K. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev.* 70: 591-614.
- Schedlich, L. J., Nilsen, T., John, A. P., Jans, D. A. & Baxter, R. C. 2003. Phosphorylation of insulin-like growth factor binding protein-3 by deoxyribonucleic acid-dependent protein kinase reduces ligand binding and enhances nuclear accumulation. *Endocrinology* 144: 1984-1993.
- Schedlich, L. J., Young, T. F., Firth, S. M. & Baxter, R. C. 1998. Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 share a common nuclear transport pathway in T47D human breast carcinoma cells. *J.Biol.Chem.* 273: 18347-18352.
- Scheel, G. & Herzog, V. 1989. Mannose 6-phosphate receptor in porcine thyroid follicle cells. Localization and possible implications for the intracellular transport of thyroglobulin. *Eur.J.Cell Biol.* 49: 140-148.
- Schmelz, E. M., Dillehay, D. L., Webb, S. K., Reiter, A., Adams, J. & Merrill, A. H., Jr. 1996. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 56: 4936-4941.
- Schmelz, E. M., Sullards, M. C., Dillehay, D. L. & Merrill, A. H., Jr. 2000. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *J.Nutr.* 130: 522-527.
- Schneider, M. R., Wolf, E., Hoeflich, A. & Lahm, H. 2002. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J.Endocrinol.* 172: 423-440.
- Scholzen, T. & Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol* 182: 311-322.
- Schrohl, A. S., Holten-Andersen, M. N., Peters, H. A., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., Klijn, J. G., Brunner, N. & Foekens, J. A. 2004. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 10: 2289-2298.
- Schutt, B. S., Langkamp, M., Rauschnabel, U., Ranke, M. B. & Elmlinger, M. W. 2004. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J.Mol.Endocrinol.* 32: 859-868.
- Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liu, J. P., Efstratiadis, A. & Baserga, R. 1993. Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 11217-11221.
- Shanmugathan, M. & Jothy, S. 2000. Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol.Int.* 50: 273-279.

- Sheikh, M. S., Shao, Z. M., Hussain, A., Clemmons, D. R., Chen, J. C., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D. & Fontana, J. A. 1993. Regulation of insulin-like growth factor-binding-protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6: synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells. *J. Cell Physiol* 155: 556-567.
- Shemer, J., Yaron, A., Werner, H., Shao, Z. M., Sheikh, M. S., Fontana, J. A., LeRoith, D. & Roberts, C. T., Jr. 1993. Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 in the T47D human breast carcinoma cell line by IGF-I and retinoic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 77: 1246-1250.
- Shibamoto, S., Hayakawa, M., Takeuchi, K., Hori, T., Oku, N., Miyazawa, K., Kitamura, N., Takeichi, M. & Ito, F. 1994. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes. Commun.* 1: 295-305.
- Shitoh, K., Furukawa, T., Kojima, M., Konishi, F., Miyaki, M., Tsukamoto, T. & Nagai, H. 2001. Frequent activation of the beta-catenin-Tcf signaling pathway in nonfamilial colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Genes Chromosomes. Cancer* 30: 32-37.
- Shivapurkar, N., Huang, L., Ruggeri, B., Swalsky, P. A., Bakker, A., Finkelstein, S., Frost, A. & Silverberg, S. 1997. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.* 115: 39-46.
- Shpitz, B., Bomstein, Y., Mekori, Y., Cohen, R., Kaufman, Z., Grankin, M. & Bernheim, J. 1997. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am. J. Surg.* 174: 425-430.
- Shpitz, B., Bomstein, Y., Mekori, Y., Cohen, R., Kaufman, Z., Neufeld, D., Galkin, M. & Bernheim, J. 1998. Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum. Pathol.* 29: 469-475.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. & Ben Ze'ev, A. 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 5522-5527.
- Silha, J. V. & Murphy, L. J. 2002. Insights from insulin-like growth factor binding protein transgenic mice. *Endocrinology* 143: 3711-3714.
- Singh, P., Dai, B., Dhruva, B. & Widen, S. G. 1994a. Episomal expression of sense and antisense insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 complementary DNA alters the mitogenic response of a human colon cancer cell line (HT-29) by mechanisms that are independent of and dependent upon IGF-I. *Cancer Res.* 54: 6563-6570.
- Singh, P., Dai, B., Yallampalli, C. & Xu, Z. 1994b. Expression of IGF-II and IGF-binding proteins by colon cancer cells in relation to growth response to IGFs. *Am. J. Physiol* 267: G608-G617.
- Singh, P., Dai, B., Yallampalli, U., Lu, X. & Schroy, P. C. 1996. Proliferation and differentiation of a human colon cancer cell line (CaCo2) is associated with significant changes in the expression and secretion of insulin-like growth factor (IGF) IGF-II and IGF binding protein-4: role of IGF-II. *Endocrinology* 137: 1764-1774.
- Siu, I. M., Pretlow, T. G., Amini, S. B. & Pretlow, T. P. 1997. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am. J. Pathol.* 150: 1805-1813.

- Siu, I. M., Robinson, D. R., Schwartz, S., Kung, H. J., Pretlow, T. G., Petersen, R. B. & Pretlow, T. P. 1999. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 59: 63-66.
- Slaga, T. J. 1983. Host factors in the susceptibility of mice to tumour initiating and promoting agents. *IARC Sci.Publ.* 257-273.
- Slootweg, M. C., Ohlsson, C., Salles, J. P., de Vries, C. P. & Netelenbos, J. C. 1995. Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 136: 4210-4217.
- Smith, A. J., Stern, H. S., Penner, M., Hay, K., Mitri, A., Bapat, B. V. & Gallinger, S. 1994a. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res.* 54: 5527-5530.
- Smith, E. P., Lu, L., Chernausk, S. D. & Klein, D. J. 1994b. Insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) concentration in rat Sertoli cell-conditioned medium is regulated by a pathway involving association of IGFBP-3 with cell surface proteoglycans. *Endocrinology* 135: 359-364.
- Song, S. W., Fuller, G. N., Khan, A., Kong, S., Shen, W., Taylor, E., Ramdas, L., Lang, F. F. & Zhang, W. 2003. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 13970-13975.
- Souza, R. F., Appel, R., Yin, J., Wang, S., Smolinski, K. N., Abraham, J. M., Zou, T. T., Shi, Y. Q., Lei, J., Cottrell, J., Cymes, K., Biden, K., Simms, L., Leggett, B., Lynch, P. M., Frazier, M., Powell, S. M., Harpaz, N., Sugimura, H., Young, J. & Meltzer, S. J. 1996. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat.Genet.* 14: 255-257.
- Stattin, P., Bylund, A., Rinaldi, S., Biessy, C., Dechaud, H., Stenman, U. H., Egevad, L., Riboli, E., Hallmans, G. & Kaaks, R. 2000. Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study. *J.Natl.Cancer Inst.* 92: 1910-1917.
- Szabo, A., Perou, C. M., Karaca, M., Perreard, L., Quackenbush, J. F. & Bernard, P. S. 2004. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol.* 5: R59.
- Takagi, Y., Kohmura, H., Futamura, M., Kida, H., Tanemura, H., Shimokawa, K. & Saji, S. 1996. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* 111: 1369-1372.
- Takahashi, M., Fukuda, K., Sugimura, T. & Wakabayashi, K. 1998. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.* 58: 42-46.
- Takayama, T., Ohi, M., Hayashi, T., Miyanishi, K., Nobuoka, A., Nakajima, T., Satoh, T., Takimoto, R., Kato, J., Sakamaki, S. & Niitsu, Y. 2001. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121: 599-611.
- Tan, C., Costello, P., Sanghera, J., Dominguez, D., Baulida, J., de Herreros, A. G. & Dedhar, S. 2001. Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells. *Oncogene* 20: 133-140.

- Tennant, M. K., Thrasher, J. B., Twomey, P. A., Birnbaum, R. S. & Plymate, S. R. 1996. Insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 expression in benign human prostate epithelium, prostate intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma of the prostate. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81: 411-420.
- Terrien, X., Bonvin, E., Corroyer, S., Tabary, O., Clement, A. & Henrion, C. A. 2005. Intracellular colocalization and interaction of IGF-binding protein-2 with the cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 during growth inhibition. *Biochem.J.* 392: 457-465.
- Thiagalingam, S., Lengauer, C., Leach, F. S., Schutte, M., Hahn, S. A., Overhauser, J., Willson, J. K., Markowitz, S., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat.Genet.* 13: 343-346.
- Thibodeau, S. N., Bren, G. & Schaid, D. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819.
- Thurnherr, N., Deschner, E. E., Stonehill, E. H. & Lipkin, M. 1973. Induction of adenocarcinomas of the colon in mice by weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res.* 33: 940-945.
- Thurnherr, N. & Reinhart, K. 1975. [Induction of colonic carcinoma in mice using 1,2-dimethylhydrazine hydrochloride]. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 105: 585-586.
- Tricoli, J. V., Rall, L. B., Karakousis, C. P., Herrera, L., Petrelli, N. J., Bell, G. I. & Shows, T. B. 1986. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res.* 46: 6169-6173.
- Tudek, B., Bird, R. P. & Bruce, W. R. 1989. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res.* 49: 1236-1240.
- Uchida, K., Kado, S., Ando, M., Nagata, Y., Takagi, A. & Onoue, M. 2001. A mucinous histochemical study on malignancy of aberrant crypt foci (ACF) in rat colon. *J.Vet.Med.Sci.* 63: 145-149.
- Ullrich, A., Riedel, H., Yarden, Y., Coussens, L., Gray, A., Dull, T., Schlessinger, J., Waterfield, M. D. & Parker, P. J. 1986. Protein kinases in cellular signal transduction: tyrosine kinase growth factor receptors and protein kinase C. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 2: 713-724.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. & Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.* 319: 525-532.
- Vu, T. H. & Hoffman, A. R. 1994. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* 371: 714-717.
- Vu, T. H., Yballe, C., Boonyanit, S. & Hoffman, A. R. 1995. Insulin-like growth factor II in uterine smooth-muscle tumors: maintenance of genomic imprinting in leiomyomata and loss of imprinting in leiomyosarcomata. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 80: 1670-1676.

- Wang, D., Nagpal, M. L., Lin, T., Shimasaki, S. & Ling, N. 1994a. Insulin-like growth factor-binding protein-2: the effect of human chorionic gonadotropin on its gene regulation and protein secretion and its biological effects in rat Leydig cells. *Mol.Endocrinol.* 8: 69-76.
- Wang, G. K., Hu, L., Fuller, G. N. & Zhang, W. 2006a. An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J.Biol.Chem.* 281: 14085-14091.
- Wang, H., Rosen, D. G., Wang, H., Fuller, G. N., Zhang, W. & Liu, J. 2006b. Insulin-like growth factor-binding protein 2 and 5 are differentially regulated in ovarian cancer of different histologic types. *Mod.Pathol.* 19: 1149-1156.
- Wang, H., Wang, H., Shen, W., Huang, H., Hu, L., Ramdas, L., Zhou, Y. H., Liao, W. S., Fuller, G. N. & Zhang, W. 2003. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res.* 63: 4315-4321.
- Wang, L., Ma, W., Markovich, R., Lee, W. L. & Wang, P. H. 1998. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 139: 1354-1360.
- Wang, Z. H., Ma, J., Zeng, B. J., Catanese, V. M., Samuels, S., Gama Sosa, M. A. & Kolodny, E. H. 1997. Correlation of glioma cell regression with inhibition of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein-2 expression. *Neuroendocrinology* 66: 203-211.
- Wang, Z. Q., Fung, M. R., Barlow, D. P. & Wagner, E. F. 1994b. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted *Igf2/Mpr* gene. *Nature* 372: 464-467.
- Warren, B. S., Naylor, M. F., Winberg, L. D., Yoshimi, N., Volpe, J. P., Gimenez-Conti, I. & Slaga, T. J. 1993. Induction and inhibition of tumor progression. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 202: 9-15.
- Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Ferrara, N. & Donner, D. B. 1996. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J.Biol.Chem.* 271: 29483-29488.
- Weber, M. M., Fottner, C., Liu, S. B., Jung, M. C., Engelhardt, D. & Baretton, G. B. 2002. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human colon carcinomas. *Cancer* 95: 2086-2095.
- Weller, M., Rieger, J., Grimm, C., Van Meir, E. G., De Tribolet, N., Krajewski, S., Reed, J. C., von Deimling, A. & Dichgans, J. 1998. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int.J.Cancer* 79: 640-644.
- Willett, W. C. 2001. Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 10: 3-8.
- Williams, A. C., Collard, T. J., Perks, C. M., Newcomb, P., Moorghen, M., Holly, J. M. & Paraskeva, C. 2000. Increased p53-dependent apoptosis by the insulin-like growth factor binding protein IGFBP-3 in human colonic adenoma-derived cells. *Cancer Res.* 60: 22-27.
- Witschi, H., Williamson, D. & Lock, S. 1977. Enhancement of urethan tumorigenesis in mouse lung by butylated hydroxytoluene. *J.Natl.Cancer Inst.* 58: 301-305.
- Wolf, E., Kramer, R., Blum, W. F., Foll, J. & Brem, G. 1994. Consequences of postnatally elevated insulin-like growth factor-II in transgenic mice: endocrine changes and effects on body and organ growth. *Endocrinology* 135: 1877-1886.

- Wood, T. L., Rogler, L., Streck, R. D., Cerro, J., Green, B., Grewal, A. & Pintar, J. E. 1993. Targeted disruption of IGFBP-2 gene. *Growth Regul.* 3: 5-8.
- Wood, T. L., Rogler, L. E., Czick, M. E., Schuller, A. G. & Pintar, J. E. 2000. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein-2 gene. *Mol.Endocrinol.* 14: 1472-1482.
- Wu, Y., Yakar, S., Zhao, L., Hennighausen, L. & LeRoith, D. 2002. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 62: 1030-1035.
- Wulbrand, U., Remmert, G., Zofel, P., Wied, M., Arnold, R. & Fehmann, H. C. 2000. mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. *Eur.J.Clin.Invest* 30: 729-739.
- Yakar, S., Domene, H., Meidan, R., Cassorla, F., Gilad, I., Koch, I., Laron, Z., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D. & Eshet, R. 1994. Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein (IGFBP)-2 gene expression in spleens of juvenile rats. *Horm.Metab Res.* 26: 363-366.
- Yamada, Y., Oyama, T., Hirose, Y., Hara, A., Sugie, S., Yoshida, K., Yoshimi, N. & Mori, H. 2003. beta-Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 24: 91-97.
- Yamada, Y., Yoshimi, N., Hirose, Y., Kawabata, K., Matsunaga, K., Shimizu, M., Hara, A. & Mori, H. 2000. Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 60: 3323-3327.
- Yamada, Y., Yoshimi, N., Hirose, Y., Matsunaga, K., Katayama, M., Sakata, K., Shimizu, M., Kuno, T. & Mori, H. 2001. Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 61: 1874-1878.
- Yamashita, N., Minamoto, T., Ochiai, A., Onda, M. & Esumi, H. 1995. Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. Is there preference among K-ras mutants for malignant progression? *Cancer* 75: 1527-1533.
- Yin, J., Kong, D., Wang, S., Zou, T. T., Souza, R. F., Smolinski, K. N., Lynch, P. M., Hamilton, S. R., Sugimura, H., Powell, S. M., Young, J., Abraham, J. M. & Meltzer, S. J. 1997. Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Hum.Mutat.* 10: 474-478.
- Yook, J. I., Li, X. Y., Ota, I., Fearon, E. R. & Weiss, S. J. 2005. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J.Biol.Chem.* 280: 11740-11748.
- Yoon, A. & Hurta, R. A. 2001. Insulin like growth factor-1 selectively regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 in malignant H-ras transformed cells. *Mol.Cell Biochem.* 223: 1-6.
- Yoshiji, H., Gomez, D. E. & Thorgeirsson, U. P. 1996. Enhanced RNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human breast cancer. *Int.J.Cancer* 69: 131-134.
- Zapf, J., Walter, H. & Froesch, E. R. 1981. Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J.Clin.Invest* 68: 1321-1330.

- Zeng, Z. S., Cohen, A. M., Zhang, Z. F., Stetler-Stevenson, W. & Guillem, J. G. 1995. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin.Cancer Res.* 1: 899-906.
- Zhang, M., Smith, E. P., Kuroda, H., Banach, W., Chernausek, S. D. & Fagin, J. A. 2002. Targeted expression of a protease-resistant IGFBP-4 mutant in smooth muscle of transgenic mice results in IGFBP-4 stabilization and smooth muscle hypotrophy. *J.Biol.Chem.* 277: 21285-21290.
- Zhang, X., Gaspard, J. P. & Chung, D. C. 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 61: 6050-6054.
- Zheng, B., Clarke, J. B., Busby, W. H., Duan, C. & Clemmons, D. R. 1998. Insulin-like growth factor-binding protein-5 is cleaved by physiological concentrations of thrombin. *Endocrinology* 139: 1708-1714.
- Zheng, B. & Clemmons, D. R. 1998. Blocking ligand occupancy of the alphaVbeta3 integrin inhibits insulin-like growth factor I signaling in vascular smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 11217-11222.
- Zhou, R., Diehl, D., Hoeflich, A., Lahm, H. & Wolf, E. 2003. IGF-binding protein-4: biochemical characteristics and functional consequences. *J.Endocrinol.* 178: 177-193.
- Zumkeller, W. & Westphal, M. 2001. The IGF/IGFBP system in CNS malignancy. *Mol.Pathol.* 54: 227-229.

12 Danksagung

Bei Prof. Dr. Eckhard Wolf möchte ich mich für die Vermittlung der Dissertation und die stets freundliche und hilfreiche Unterstützung bedanken.

PD Dr. Andreas Höflich danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung meiner Arbeit, seine hilfreiche und stets freundliche Unterstützung sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Daniela Diehl, die durch Ihre Promotionsarbeit eine gute methodische Grundlage für diese Arbeit geschaffen hat, danke ich für die gute Einarbeitung in die verschiedenen histologischen Methoden und die RNA-Isolierung sowie ihre wissenschaftlichen Ratschläge.

Dr. Ingrid Renner-Müller, Petra Renner, Tanja Mittmann und allen fleißigen Mitarbeitern im Tierstall danke ich für die gute Versorgung meiner Mäuse. Bei Dr. Ingrid Renner-Müller möchte ich mich zudem für ihre Hilfe bei tierexperimentellen Arbeiten bedanken.

Bei Dr. Marc Boelhauve möchte ich mich für seine guten Tipps in Fragen der Quantitativen Real-Time PCR bedanken und dafür, dass er stets offenes Ohr für mich hatte.

Olga Fettscher, Petra Demleitner und Steffen Schiller danke ich für die gute Einarbeitung bzw. die freundliche Hilfe im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt Marianne Berauer und Carmen Spiller (Institut für Toxikologie der GSF) für ihren unermüdlichen Einsatz und die gute und angenehme Zusammenarbeit.

Dr. Doris Oesterle (Institut für Toxikologie der GSF) danke ich für die Überlassung eines Laborarbeitsplatzes, ihre Hilfsbereitschaft und die Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Laetitia Quintanilla-Fend (Institut für Pathologie der GSF) danke ich für die Klassifizierung der Tumoren und ihren wissenschaftlichen Rat in immunhistochemischen Fragen.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Georg J. Arnold (Genzentrum) danke ich für die Synthese der Primer.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Helmut Blum (Genzentrum) gilt mein Dank für die Sequenzierung der PCR-Produkte.

PD Dr. Martin Elmlinger und Karin Weber (Hormon-Labor der Kinderklinik der Universität Tübingen) danke ich für die Durchführung der IGFBP-2 und IGF-II RIAs.

Bei all den lieben Kollegen und Mitdoktoranden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen, bedanke ich mich ganz herzlich. Insbesondere möchte ich hier Dr. Anne Wünsch, Dr. Susanne Schmidt, Dr. Corinna Mörth, Maik Dahlhoff und Dr. Elisabeth Kemter nennen.

Der Hanns-Seidel-Stiftung e.V. danke ich für die finanzielle und ideelle Förderung im Rahmen eines Promotionsstipendiums über einen Zeitraum von zweieinhalb Jahren.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinem Ehemann Felix Hessel, der mit mir alle Phasen meiner Doktorarbeit durchlebt hat und mir dabei immer zur Seite stand. Ihm widme ich diese Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich immer unterstützt haben.

13 Lebenslauf

Name:	Esther Maria Hessel, geborene Braunreuther
Geburtsdatum:	07.08.1976
Geburtsort:	Würzburg
Familienstand:	Verheiratet
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
1983 – 1987	Grundschule Höchberg
1987 – 1996	Wirsberg-Gymnasium Würzburg Abitur (Allgemeine Hochschulreife)
1996 – 1997	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Studium der Fachrichtungen Chemie, Biologie und Italienisch Kleintierpraxis-Praktikum in Gerchsheim
1997 – 2000	Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Studium der Tiermedizin – 1. Staatsexamen (2000)
2000 – 2001	Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Frankreich) Studium der Tiermedizin (Auslandssemester) Praktikum in den Pferde-, Rinder- und Kleintierkliniken der Universität
2001 – 2003	Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss der Tiermedizinstudiums – 3. Staatsexamen (2003) Approbation als Tierärztin Praktika an den Tierkliniken der LMU in den Bereichen Innere Medizin und Chirurgie Laborpraktikum bei Laboklin Labor für klinische Diagnostik GmbH in den Bereichen Bakteriologie, Parasitologie, Pathologie, Molekulargenetik und Hämatologie/Serologie
2003 - 2006	Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München Anfertigung der vorliegenden Dissertationsarbeit am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der LMU München (gefördert durch ein Stipendium der Hanns-Seidel-Stiftung e.V.) Thema: Die Rolle von Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-2 in der chemisch induzierten Kolonkarzinogene der Maus